

Эффективность внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий

Т.С.Амян[✉], С.Г.Перминова, Л.В.Кречетова, В.В.Вторушина

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

Цель исследования – оценить эффективность внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Материал и методы. В исследование включены 129 пациенток с повторными неудачами имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения: 1-я группа – 42 женщины, которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение аутологичных МКПК, активированных хорионическим гонадотропином человека – ХГЧ (Прегнил 500 МЕ); 2-я группа – 42 пациентки, которым проводилось внутриматочное введение аутологичных МКПК без активации ХГЧ, 3-я группа (плацебо) – 45 участниц, которым проводилось внутриматочное введение физиологического раствора.

Результаты. В группе пациенток с внутриматочным введением МКПК, активированными ХГЧ, частота положительного анализа крови на ХГЧ, имплантации и наступления клинической беременности была значимо выше по сравнению с аналогичными показателями в группе пациенток с внутриматочным введением МКПК без активации ХГЧ и в группе плацебо как в стимулированном, так и в криоцикле ($p \leq 0,05$).

Заключение. Внутриматочное введение аутологичных МКПК перед переносом эмбриона в программе экстракорпорального оплодотворения/ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в яйцеклетку) повышает эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Ключевые слова: повторные неудачи имплантации, внутриматочное введение, аутологичные моноклеарные клетки периферической крови, хорионический гонадотропин человека.

[✉]amyantanya@rambler.ru

Для цитирования: Амян Т.С., Перминова С.Г., Кречетова Л.В., Вторушина В.В. Эффективность внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Гинекология. 2018; 20 (2): 28–33. DOI: 10.26442/2079-5696_2018.2.28-33

Efficacy of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer in patients with recurrent implantation failures in assisted reproductive technology programmes

T.S.Amyan[✉], S.G.Perminova, L.V.Krechetova, V.V.Vtorushina

V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Ministry of Health of the Russian Federation. 117997, Russian Federation, Moscow, ul. Akademika Oparina, d. 4

Study objective. To evaluate the efficacy of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) prior to embryo transfer in patients with recurrent implantation failures in IVF program.

Materials and methods. The study enrolled 129 patients with recurrent implantation failures in an IVF programme. Group 1 – 42 patients who had intrauterine administration of autologous PBMC activated with hCG (Pregnyl 500 IU). Group 2 – 42 patients who had intrauterine administration of autologous PBMC without hCG activation. Group 3 (placebo) – 45 patients who had intrauterine administration of saline.

Study results. In the hCG-activated PBMC group, the rates of positive blood hCG tests, implantation, and clinical pregnancy were significantly higher than the respective rates in the non-activated PBMC group and in the placebo group, both in a stimulated cycle and in an FET cycle ($p \leq 0,05$).

Conclusion. Intrauterine administration of autologous PBMC prior to embryo transfer in an IVF/ICSI programme increases the efficacy of IVF program in patients with a history of recurrent implantation failures.

Key words: recurrent implantation failures, intrauterine administration, autologous peripheral blood mononuclear cells, hCG.

[✉]amyantanya@rambler.ru

For citation: Amyan T.S., Perminova S.G., Krechetova L.V., Vtorushina V.V. Efficacy of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer in patients with recurrent implantation failures in assisted reproductive technology programmes. Gynecology. 2018; 20 (2): 28–33. DOI: 10.26442/2079-5696_2018.2.28-33

Несмотря на несомненные достижения в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), частота повторных неудач имплантации продолжает оставаться высокой и достигает 50–75% [1]. Повторные неудачи имплантации (repeated implantation failure – RIF) – серьезная проблема, решению которой посвящено большое количество как клинических, так и фундаментальных исследований в области репродукции человека. Молекулярные и иммунологические аспекты неудач имплантации находятся в фокусе научных исследований последних лет. Некоторые аспекты иммунных взаимоотно-

шений матери и эмбриона до сих пор остаются неизвестными, несмотря на то что последние достижения в области молекулярной биологии позволили выявить некоторые иммунологические параметры, определяющие взаимосвязь между иммунными нарушениями матери и плода во время имплантации. Имплантация – сложный многоступенчатый процесс, регулируемый как системными, так и локальными факторами.

Как известно, успешное наступление и прогрессирование беременности ассоциировано с преимущественным профилем Th2-цитокинов (LIF, интерлейкины – ИЛ-1,

ИЛ-8, ИЛ-11, L-4 и ИЛ-10), а преобладание Th1-цитокинов (интерферон γ , ИЛ-2 и фактор некроза опухоли α , ИЛ-1, ИЛ-6) неблагоприятно для наступления беременности [2, 3]. Большое значение имеют Т-регуляторные клетки, фенотипически определяющиеся как CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, которые модулируют иммунологическое микроокружение эндометрия, необходимое для имплантации [4].

В последнее время появились данные о том, что локальные иммунные клетки вносят существенный вклад в имплантацию эмбриона. Так, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), к которым относятся Т-, В-лимфоциты и моноциты, индуцируют образование ряда цитокинов, таких как ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и фактор некроза опухоли α , позитивно влияющих на рецептивность эндометрия. Более того, они инициируют и контролируют инвазию трофобласта и регулируют иммунную толерантность к эмбриону во время имплантации [5].

В настоящее время отсутствует единая точка зрения на необходимость проведения иммунологических исследований и назначения различных видов иммунотерапии у женщин с повторными неудачами имплантации. Обсуждается целесообразность проведения иммунизации отцовскими лимфоцитами, внутривенного введения иммуноглобулина, терапии интралипидом, а также локального повреждения эндометрия [6, 7].

Одним из методов иммунокоррекции при повторных неудачах имплантации является внутриматочное введение аутологических мононуклеарных клеток перед переносом эмбриона в программу экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Роль периферических мононуклеарных клеток в обеспечении рецептивности эндометрия обсуждается с тех пор, как было показано, что клетки селезенки беременных мышей могут регулировать рецептивность эндометрия [7], а МКПК, введенные в полость матки перед переносом эмбриона, повышают вероятность имплантации [8]. Также показано, что МКПК, полученные от женщин с беременностью ранних сроков, могут индуцировать продукцию прогестерона [9] и усиливать инвазию трофобласта эмбрионов мышей *in vitro* [10]. Прямое влияние МКПК на имплантацию впервые изучили S.Yoshioka и соавт. в 2006 г. и показали, что внутриматочное введение аутологических МКПК перед переносом эмбрионов, которые культивировали с хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ) в течение 48 ч, значительно повышало частоту имплантации, клинической беременности и родов у пациенток с повторными неудачами имплантации в программе ЭКО [2]. Позднее было показано, что внутриматочное введение МКПК повышает частоту имплантации в криоциклах как на фоне подготовки эндометрия препаратами эстрогенов и прогестерона, так и в естественном цикле у женщин, имеющих до 3 неудач имплантации в анамнезе [11]. Подобный подход применяли также на животных, и было выявлено повышение частоты имплантации у мышей с предшествующими неудачами имплантации [12]. Более поздние исследования также продемонстрировали положительные эффекты внутриматочного введения ХГЧ и аутологических МКПК, активированных ХГЧ, перед переносом эмбрионов у пациенток с 2 и более неудачами имплантации [6]. Однако в исследованиях A.Santibañez (2014 г.) [13] и M.Volovsky (2018 г.) [14] не выявлено позитивного эффекта внутриматочного введения аутологических МКПК перед переносом эмбриона на исходы программ ВРТ у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе [13, 14].

Целью исследования явилась оценка эффективности программ ЭКО/ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в яйцеклетку) при использовании внутриматочного введения аутологических МКПК как активированных ХГЧ, так и МКПК без активации ХГЧ перед переносом эмбриона в стимулированном и криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Материал и методы

В исследование были включены 129 пациенток: 1-ю группу составили 42 женщины, которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение аутологических МКПК, активированных ХГЧ (Прегнил 500 МЕ);

2-ю – 42 пациентки, которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение аутологических МКПК без активации ХГЧ; 3-ю (плацебо) составили 45 участниц, которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение физиологического раствора. Исходя из различных протоколов ВРТ (стимулированный и криоцикл) было выделено по 2 подгруппы в каждой из 3 групп: 1а (n=17) – пациентки группы МКПК+ХГЧ в стимулированном цикле; 1б (n=25) – пациентки группы МКПК+ХГЧ в криоцикле; 2а (n=21) – пациентки группы МКПК в стимулированном цикле и 2б (n=21) – пациентки группы МКПК в криоцикле; 3а (n=22) – пациентки группы плацебо в стимулированном цикле и 3б (n=22) – пациентки группы плацебо в криоцикле.

Критериями включения в исследуемые группы явились: возраст пациенток 37 лет и менее, неудачные попытки ЭКО как минимум в 3 стимулированных или криоциклах при условии переноса эмбрионов хорошего качества.

Критериями невключения в группы явились: хромосомные аномалии супругов, выраженная патозооспермия у партнера, хронический эндометрит, верифицированный при гистологическом исследовании, толщина эндометрия менее 7 мм, врожденные аномалии матки, миома матки 3 см и более, наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) III–IV стадии; гидросальпинкс с одной или обеих сторон, синдром поликистозных яичников, «бедный ответ» яичников на гонадотропную стимуляцию, наличие системных аутоиммунных заболеваний.

Методы

Пациенткам проводили полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с Приказом Минздрава России от 30.08.2012 №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Программу ЭКО проводили в протоколе с антагонистом гонадотропин-рилизинг-гормона (антГнРГ). Со 2–3-го дня менструального цикла начинали стимуляцию суперовуляции препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона или человеческого менопаузального гонадотропина. При достижении фолликулами диаметра 14 мм для предотвращения преждевременного пика лютеинизирующего гормона пациенткам вводили антГнРГ (цетрореликс 0,25 мг) до дня введения триггера овуляции включительно. При наличии не менее 3 фолликулов диаметром 18 мм назначали триггер овуляции (ХГЧ в дозе 10 000 МЕ) за 35–36 ч до проведения трансвагинальной пункции яичников, которую производили в асептических условиях под кратковременным внутривенным наркозом посредством вакуумной аспирации фолликулов под трансвагинальным ультразвуковым мониторингом. Учитывая безуспешные попытки ЭКО в анамнезе, оплодотворение выполнялось методом ИКСИ. Оценку качества полученных эмбрионов осуществляли по морфологическим критериям в соответствии с классификацией, принятой Istanbul consensus workshop on embryo assessment (ESHRE, 2011; «модифицированная» классификация D.Gardner) [15].

Перенос эмбрионов в полость матки производили на 5-е сутки культивирования под контролем ультразвукового исследования (УЗИ). Число переносимых эмбрионов не превышало 2. Для поддержки лютеиновой фазы использовали микронизированный прогестерон со следующего дня после трансвагинальной пункции яичников в дозе 600 мг/сут вагинально.

Проведение криоцикла осуществляли на фоне подготовки эндометрия с использованием препаратов эстрогенов и микронизированного прогестерона под контролем УЗИ. Перенос размороженных после витрификации эмбрионов на стадии бластоцисты в полость матки выполняли на 5-е сутки от начала приема прогестерона под ультразвуковым контролем.

Для получения фракции МКПК забор крови у пациенток в стимулированном цикле осуществлялся натошак из локтевой вены в день трансвагинальной пункции, у пациенток в криоцикле – в день начала приема препаратов микронизированного прогестерона. Процедура выделения МКПК

Таблица 1. Клинико-анамнестические и лабораторные характеристики пациенток с бесплодием и повторными неудачами имплантации				
Параметры	1-я группа, МКПК+ХГЧ (n=42)	2-я группа, МКПК (n=42)	3-я группа, плацебо (n=45)	p
Возраст, лет (Me, L–H)	34 (30–35)	32 (30–35)	34 (31–36)	$p_1=0,478$ $p_2=0,215$ $p_3=0,408$
Длительность бесплодия, М±m	6 (3–14) 6,0±0,3	5 (3–10) 5,0±0,2	5 (3–12) 5,0±0,2	$p_1=0,072$ $p_2=0,905$ $p_3=0,065$
Характер бесплодия				
Первичное	28 (66,7%)	26 (61,9%)	26 (57,8%)	$p_1=0,478$ $p_2=0,215$ $p_3=0,408$
Вторичное	14 (33,3%)	16 (38,1%)	19 (42,2%)	$p_1=0,455$ $p_2=0,653$ $p_3=0,743$
Фактор бесплодия				
Трубно-перитонеальный	18 (42,9%)	19 (45,2%)	13 (28,9%)	$p_1=0,623$ $p_2=0,240$ $p_3=0,531$
Мужской	24 (57,2%)	22 (52,4%)	31 (68,9%)	$p_1=0,930$ $p_2=0,173$ $p_3=0,531$
НГЭ	4 (9,5%)	6 (14,3%)	0	$p_1=0,433$ $p_2=0,052$ $p_3=0,063$
Сочетанный фактор	10 (23,8%)	7 (16,7%)	7 (15,6%)	$p_1=0,516$ $p_2=0,854$ $p_3=0,394$
Бесплодие неясного генеза	8 (19%)	5 (11,9%)	7 (15,6%)	$p_1=0,455$ $p_2=0,653$ $p_3=0,743$
Количество неудачных попыток ЭКО				
2	14 (33,3%)	12 (28,6%)	7 (15,6%)	$p_1=0,930$ $p_2=0,173$ $p_3=0,531$
3–4	27 (64,3%)	28 (66,7%)	31 (68,9%)	$p_1=0,516$ $p_2=0,854$ $p_3=0,394$
5 и более	1 (2,4%)	2 (4,8%)	2 (4,4%)	$p_1=0,255$ $p_2=0,165$ $p_3=0,590$
Перенесено эмбрионов, М±m	1,85±0,038	1,83±0,035	1,83±0,035	$p_1=0,247$ $p_2=0,792$ $p_3=0,549$
Перенесено эмбрионов хорошего качества, М±m	1,04±0,08	0,8±0,07	0,8±0,07	$p_1=0,062$ $p_2=0,967$ $p_3=0,074$
Примечание. Показатели представлены в виде М±m, Me (L–H), где М – среднее значение, m – ошибка среднего, Me – медиана, L – 25 (нижний) квартиль, H – 75 (верхний) квартиль; здесь и далее в табл. 2, 3: p – частота встречаемости, p_1 – сравнение частот встречаемости признаков в 1 и 2-й группах, p_2 – сравнение частот встречаемости признаков во 2 и 3-й группах, p_3 – сравнение частот встречаемости признаков в 1 и 3-й группах.				

осуществлялась в стерильные пробирки общим объемом 18 мл, содержащие в качестве консерванта гепарин (вакутейнер Sarstedt Monovette LH/9мл) в соответствии с протоколом «Проведение иммунотерапии с помощью внутриматочного введения аутологических мононуклеарных клеток», утвержденным на ученом совете ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И.Кулакова».

Эффективность программы оценивали путем исследования концентрации β ХГЧ в сыворотке крови через 12–14 дней после переноса эмбриона. При β ХГЧ ≥ 20 МЕ/л констатировали положительный результат. При условии положительного β ХГЧ осуществляли УЗИ через 21 день после переноса эмбриона. Частоту имплантации оценивали как отношение числа перенесенных эмбрионов к числу плодных яиц по данному УЗИ. Клиническую беременность диагностировали при наличии живого эмбриона по данным УЗИ через 4–5 нед после переноса эмбриона.

Для статистической обработки результатов исследования использовался Statistical Package for Social Sciences (SPSS v21.0). Все полученные в исследовании количественные анамнестические, клинические, инструментальные и лабо-

раторные данные были обработаны методом вариационной статистики. Для каждого количественного параметра были определены: среднее значение (M), ошибка среднего (m), медиана (Me), для качественных данных – частоты (%). При нормальном характере распределения данных результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (M $\pm$ m). Для сравнения частот встречаемости признаков в анализируемых группах использовался критерий χ^2 с поправкой на непрерывность. Разница в менее 0,05 считалась существенной.

Результаты

Мы провели анализ клинико-анамнестических и лабораторных характеристик пациенток с повторными неудачами ВРТ, включенных в исследование (табл. 1).

Медиана возраста женщин, включенных в исследование, в 1-й группе составила 34 года (интерквартильный интервал 30–35 лет), во 2-й – 32 года (интерквартильный интервал 30–35 лет), в 3-й – 34 года (интерквартильный интервал 31–36 лет). Анализ менструальной функции пациенток исследуемых групп показал, что возраст менархе

в 3 группах был в пределах от 10 до 18 лет ($13,0 \pm 0,1$), продолжительность менструального цикла в среднем составила в 1-й группе – $30,1 \pm 0,3$ дня, во 2-й – $29,0 \pm 0,3$, 3-й – $32,0 \pm 0,7$ ($p > 0,05$). Нарушений становления и характера менструального цикла среди обследованных женщин выявлено не было. Статистически значимых различий по всем перечисленным показателям в 3 исследуемых группах не выявлено ($p > 0,05$).

Длительность бесплодия колебалась от 3 до 14 лет и в среднем составила в 1-й группе $6,0 \pm 0,3$ года, во 2 и 3-й – $5,0 \pm 0,2$. Первичное бесплодие было выявлено у 28 (66,7%) пациенток 1-й группы, 26 (61,9%) женщин 2-й группы и 26 (57,8%) – 3-й. Вторичное – у 14 (33,3%), 16 (38,1%), 19 (42,2%) пациенток 3 групп соответственно ($p > 0,05$). Значимых различий в распределении факторов бесплодия среди пациенток исследуемых групп не выявлено. Бесплодие было обусловлено трубно-перитонеальным фактором у 18 (42,9%) женщин 1-й группы, 19 (45,2%) – 2-й и 13 (28,9%) – 3-й ($p > 0,05$). Мужской фактор был выявлен у 24 (57,2%), 22 (52,4%) и 31 (68,9%) пациентки 3 групп соответственно, характеризовался умеренными нарушениями сперматогенеза, которые наиболее часто проявлялись в виде астенозооспермии 1–2-й степени (49,8%) и астенотератозооспермии 1–2-й степени (26,9%). НГЭ I–II стадии диагностирован у 10 пациенток: в 9,5 и 14,3% случаев в 1 и 2-й группе соответственно. Сочетание факторов наблюдалось у 24 (18%) женщин. Идиопатическое бесплодие отмечено у 28 (17,6%) пациенток.

Число безуспешных попыток ЭКО в анамнезе было сопоставимо в 3 группах, в том числе в 1-й 2 неудачи имели 14 (33,3%) пациенток, 3 или 4 неудачи – 27 (64,3%) и 5 неудач – у 1 (2,4%) пациентки. Среди пациенток 2-й группы 2 неудачи имели 12 (28,6%), 3 или 4 – 28 (66,7%) и более 5 – 2 (4,8%) пациентки. Среди участниц 3-й группы 2 неудачи имели 7 (15,6%) пациенток, 3 или 4 – 31 (68,9%) и 5 неудач – 2 (4,4%) пациентки ($p > 0,05$).

Параметры овариального резерва у пациенток 3 групп на момент вступления в программу ЭКО находились в пределах нормативных значений, статистически значимых различий между исследуемыми группами не выявлено – уровни антимюллера гормона были сопоставимы в 3 группах (медиана 2,4, 2,1 и 2,0 МЕ/л; $p_1 = 0,154$, $p_2 = 0,143$, $p_3 = 0,539$).

Таким образом, анализ клинико-анамнестических и лабораторных данных показал, что исследуемые пациентки с повторными неудачами имплантации находились в репродуктивном возрасте, имели овуляторный характер менструального цикла, а также сопоставимые факторы бесплодия и показатели овариального резерва.

Анализ эмбриологических показателей продемонстрировал отсутствие существенных различий в количестве перенесенных эмбрионов ($1,85 \pm 0,038$, $1,83 \pm 0,035$, $1,83 \pm 0,035$; $p_1 = 0,247$, $p_2 = 0,792$, $p_3 = 0,549$) и количестве эмбрионов хорошего качества ($1,04 \pm 0,08$, $0,8 \pm 0,07$, $0,8 \pm 0,07$; $p_1 = 0,062$, $p_2 = 0,967$, $p_3 = 0,074$).

Мы провели сравнительную оценку исходов программ ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток как активированных ХГЧ, так и без активации перед переносом эмбриона в стимулированном и криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации. Результаты представлены в табл. 2, 3.

Как видно из данных табл. 2, в стимулированном цикле частота положительного анализа крови на βХГЧ, имплантации и наступления клинической беременности была существенно выше в группе пациенток, которым проводили внутриматочное введение МКПК как активированных ХГЧ, так и в группе женщин с МКПК без активации ХГЧ в сравнении с аналогичными показателями в группе плацебо (35,3 и 9,1%, $p_3 = 0,034$; 29,4 и 9,1%, $p_3 = 0,009$; 33,3 и 7,6%, $p_3 = 0,001$; 33,3 и 9,1%; $p_2 = 0,006$; 23,8 и 9,1%, $p_2 = 0,035$; 28,6 и 7,6%, $p_2 = 0,01$). При этом в группе пациенток с МКПК, активированных ХГЧ, частота анализируемых показателей была выше по сравнению с группой МКПК без активации ХГЧ, однако статистически значимых отличий не зафиксировано (35,3 и 33,3%, $p_1 = 0,988$; 29,4 и 23,8%, $p_1 = 0,956$; 33,3 и 28,6%, $p_1 = 0,873$).

Таблица 2. Сравнительная характеристика исходов программы ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток перед переносом эмбриона в стимулированном цикле у пациенток с повторными неудачами имплантации				
Параметры	Группа 1а, МКПК+ХГЧ (n=17)	Группа 2а, МКПК (n=21)	Группа 3а, плацебо (n=22)	p
Положительный анализ крови на βХГЧ	6 (35,3%)	7 (33,3%)	2 (9,1%)	$p_1=0,988$ $p_2=0,006^*$ $p_3=0,034^*$
Частота клинической беременности	5 (29,4%)	5 (23,8%)	1 (4,5%)	$p_1=0,956$ $p_2=0,035^*$ $p_3=0,009^*$
Частота имплантации	33,3%	28,6%	7,7%	$p_1=0,873$ $p_2=0,01^*$ $p_3=0,001^*$

*Здесь и в табл. 3: показатель, достоверно отличающийся в исследуемых группах.

Таблица 3. Сравнительная характеристика исходов программы ВРТ при проведении внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток перед переносом эмбриона в криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации				
Параметры	Группа 1б, МКПК+ХГЧ (n=25)	Группа 2б, МКПК (n=21)	Группа 3б, плацебо (n=23)	p
Положительный анализ крови на βХГЧ	10 (40%)	8 (38,1%)	6 (25%)	$p_1=0,597$ $p_2=0,006^*$ $p_3=0,001^*$
Частота клинической беременности	8 (36%)	7 (33,3%)	5 (20,8%)	$p_1=0,595$ $p_2=0,025^*$ $p_3=0,005^*$
Частота имплантации	35,4%	30,3%	9,8%	$p_1=0,134$ $p_2=0,026^*$ $p_3=0,034^*$

В криоцикле частота положительного анализа крови на βХГЧ, клинической беременности и имплантации в группе пациенток с МКПК, активированными ХГЧ, была выше по сравнению с аналогичными показателями в группе МКПК без активации и группе плацебо (40 и 25%, $p_1=0,046$; 36 и 20,8%, $p_1=0,014$; 35,4 и 17,3%, $p_1=0,001$; 38,1 и 25%, $p_2=0,001$; 33,3 и 20,8%, $p_3=0,005$; 30,3 и 17,3%, $p_3=0,034$). При этом в группе пациенток с МКПК, активированными ХГЧ, частота анализируемых показателей была выше по сравнению с группой женщин с МКПК без активации ХГЧ, однако достоверно значимых отличий не зафиксировано (40 и 38,1%, $p_1=0,597$; 36 и 33,3%, $p_1=0,595$; 35,4 и 30,3%, $p_1=0,134$); см. табл. 3.

Обсуждение полученных результатов

В литературе существует много противоречивых данных по значимости различных иммунологических исследований и различных видов иммунотерапии у женщин с RIF [13] [3]. Внутриматочное введение аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбрионов является одним из новых методов иммунотерапии при RIF.

В данном исследовании мы оценивали эффективность внутриматочного введения аутологичных МКПК как активированных ХГЧ, так и МКПК без активации перед переносом эмбриона в стимулированном и криоцикле у пациенток с повторными неудачами имплантации. Полученные данные продемонстрировали значимое повышение частоты наступления клинической беременности и частоты имплантации в группе пациенток с проведением внутриматочного введения МКПК, активированных ХГЧ, перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации как в стимулированном, так и криоцикле по сравнению с группой плацебо.

Обсуждается несколько механизмов действия МКПК. Во-первых, МКПК могут индуцировать дифференциацию эндометрия, что повышает вероятность имплантации эмбриона. Во-вторых, хотя МКПК и являются аутологичными клетками, они индуцируют асептические воспалительские реакции в полости матки *in vivo* [10]. В-третьих, МКПК способны секретировать протеазы, которые эффективно влияют на функцию и структуру поверхностных молекул, экспрессируемых на люминальных эпителиальных клетках эндометрия [16]. ХГЧ потенцирует эти множественные эффекты, непосредственно участвуя в регуляции имплантации эмбриона. ХГЧ – это основной эмбриональный сиг-

нал, стимулирующий секрецию цитокинов и хемокинов в МКПК, таких как LIF и ИЛ-1, матриксная металлопротеиназа 2, матриксная металлопротеиназа 9 и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), способствующих инвазии трофобласта [17]. Следовательно, можно предположить, что МКПК, активированные ХГЧ, повышают частоту имплантации и частоту наступления клинической беременности за счет создания адекватного баланса цитокинов Th2/Th1 и адекватного уровня и функции Т-регуляторных клеток, создавая благоприятное иммунное микроокружение для имплантации эмбриона.

В результате проведения сравнительной оценки эффективности данного метода иммунотерапии в зависимости от типа протокола ВРТ было выявлено, что частота наступления клинической беременности и имплантации была выше в криоцикле по сравнению с аналогичными показателями в стимулированном цикле, что согласуется с данными литературы о снижении частоты клинической беременности в стимулированных циклах по сравнению с криоциклами [18].

Действительно, в стимулированных циклах эндометрий подвергается влиянию высоких уровней гормонов вследствие гонадотропной стимуляции, что может приводить к нарушению созревания эндометрия, негативно влияя на его рецептивность [14, 19]. В криоциклах в отличие от стимулированных циклов эндометрий не подвергается повышенным гормональным нагрузкам вследствие стимуляции суперовуляции, поэтому в них создаются более оптимальные условия для имплантации, приближенные к естественному циклу [20].

Таким образом, проведение внутриматочного введения аутологичных МКПК, активированных ХГЧ, перед переносом эмбриона в стимулированных и криоциклах повышает частоту имплантации и наступления клинической беременности у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе. Полученные данные позволяют рекомендовать проведение этого метода иммунотерапии у пациенток с повторными неудачами в программах ВРТ.

Литература/References

1. Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Semin Reprod Med* 2014; 32: 297–305.
2. Yoshinaga K. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19, 161–9.

3. Huang P. Effects of intrauterine perfusion of human chorionic gonadotropin in women with different implantation failure numbers. *Am J Reprod Immunol* 2018; 79 (2).
4. Stephenson M, Fluker M. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil Steril* 2000; 74 (6): 1108–13.
5. Yu N, Yang J, Guo Y et al. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) improves endometrial receptivity with embryonic implantation dysfunction. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71: 24–33.
6. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil Steril* 2012; 97 (5): 1039–43.
7. Makrigiannakis A, Benkhalifa M, Vrekoussis T et al. Gurgan: repeated implantation failure: a new potential treatment option. *Eur J Clin Invest* 2011; 45: 380–4.
8. Takabatake K, Fujiwara H, Goto Y et al. Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum Reprod* 1997; 12: 2102–7.
9. Nakayama T, Fujiwara H, Maeda M et al. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: bCG enhances the effects of PBMC. *Hum Reprod* 2002; 17: 207–12.
10. Lea RG, Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction* 2007; 134: 389–404.
11. Yoshioka S, Fujiwara H, Nakayama T et al. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum Reprod* 2006; 21: 3290–4.
12. Okitsu O, Kiyokawa M, Oda T et al. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. *J Reprod Immunol* 2011; 92: 82–7.
13. Santibañez A, García J, Pasbkova O et al. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer on clinical pregnancy rates from in vitro fertilisation cycles: a prospective study. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12 (1): 9.
14. Fujiwara H. Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 335–43.
15. Roque M, Lattes K, Serra S et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013; 99 (1): 156–62.
16. Hammer A. Immunological regulation of trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 2011; 90: 21–8.
17. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 601–10.
18. Imakawa K, Bai R, Fujiwara H, Kusama K. Conceptus implantation and placentation: molecules related to epithelial-mesenchymal transition, lymphocyte homing, endogenous retroviruses, and exosomes. *Reprod Med Biol* 2015; 14: 1–11.
19. Volovsky M, Healey M. Should intrauterine human chorionic gonadotropin infusions ever be used prior to embryo transfer? *Assist Reprod Genet* 2018; 35: 273–8. DOI: 10.1007/s10815-017-1049-5
20. Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update* 2003; 9 (6): 515–22.
21. Haouzi D, Assou S, Mahmoud K et al. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod* 2009; 24 (6): 1436–45.
22. Istanbul consensus workshop on embryo assessment (ESHRE, 2011).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Амян Татьяна Сергеевна – аспирант отд-ния сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦ АПГ им. акад. В.И.Кулакова».

E-mail: amyantanya@rambler.ru

Перминова Светлана Григорьевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния сохранения и восстановления репродуктивной функции ФГБУ «НМИЦ АПГ

им. акад. В.И.Кулакова». E-mail: perisvet@list.ru

Кречетова Любовь Валентиновна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., зав. лаб. клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АПГ им. акад. В.И.Кулакова». E-mail: k_l_v_@mail.ru

Вторушина Валентина Валентиновна – канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ АПГ им. акад. В.И.Кулакова».

E-mail: vtorushina@inbox.ru