

ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВРТ НА ФОНЕ ВНУТРИМАТОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК У ЖЕНЩИН С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ

Вторушина В.В., Перминова С.Г., Кречетова Л.В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Частота повторных неудач имплантации (repeated implantation failure-RIF) в программах вспомогательных репродуктивных технологий продолжает оставаться высокой и достигает 50-75%. Одним из методов иммунокоррекции при повторных неудачах имплантации является внутриматочное введение аутологичных моноклеарных клеток перед переносом эмбриона в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Прямое влияние моноклеарных клеток на имплантацию впервые изучили в 2006 году и показали, что внутриматочное введение аутологичных моноклеарных клеток значительно повышало частоту имплантации, частоту клинической беременности и частоту родов у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Целью данного исследования явилась оценка влияния внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе и анализ цитокинового профиля супернатантов вводимых культур моноклеарных клеток периферической крови.

В исследование включены 129 женщин с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий, случайно разделенных на три группы с внутриматочным введением перед переносом эмбриона в стимулированном цикле и в криоцикле: 1-я группа – моноклеарных клеток, активированных хорионическим гонадотропином человека, 2-я группа – моноклеарных клеток без активации хорионическим гонадотропином человека, 3-я группа – физиологического раствора (плацебо).

Клинико-анамнестические данные женщин всех трех групп не различались. Возраст женщин всех трех групп достоверно не различался. Число повторных неудач имплантации в анамнезе было сопоставимо в 3 группах. Анализ эмбриологических показателей также продемонстрировал отсутствие существенных различий в количестве перенесенных эмбрионов, в том числе хорошего качества.

В супернатантах активированных хорионическим гонадотропином человека моноклеарных клеток пациенток с наступившей имплантацией в криоцикле выявлены более высокие уровни IL-2 ($p = 0,006$), IL-4 ($p = 0,012$), IL-5 ($p = 0,012$), IL-12p70 ($p = 0,011$), IFN γ ($p = 0,012$), GM-CSF ($p = 0,026$), TNF α ($p = 0,021$), чем в супернатантах неактивированных моноклеарных клеток. Ча-

Адрес для переписки:

Вторушина Валентина Валентиновна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.
Тел.: 8 (495) 438-11-83.
E-mail: vtorushina@inbox.ru

Address for correspondence:

Vtorushina Valentina V.
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.
Phone: 7 (495) 438-11-83.
E-mail: vtorushina@inbox.ru

Образец цитирования:

В.В. Вторушина, С.Г. Перминова, Л.В. Кречетова «Исходы программ ВРТ на фоне внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток у женщин с повторными неудачами имплантации» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 425-434. doi: 10.46235/1028-7221-1050-001
© Вторушина В.В. и соавт., 2021

For citation:

V.V. Vtorushina, S.G. Perminova, L.V. Krechetova "Outcomes of IVF programs with intrauterine administration of autologous mononuclear cells in women with repeated implantation failure", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 425-434. doi: 10.46235/1028-7221-1050-001
DOI: 10.46235/1028-7221-1050-001

стота имплантации и частота наступления клинической беременности были значимо выше в группах при проведении внутриматочного введения аутологичных моноклеарных клеток как в стимулированном цикле, так и в криоцикле по сравнению с группами плацебо.

Цитокиновый профиль супернатантов культур моноклеарных клеток при внутриматочном введении влияет на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

Полученные данные могут позволить персонализированный подход для использования различных видов иммунотерапии в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе.

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

OUTCOMES OF IVF PROGRAMS WITH INTRAUTERINE ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS MONONUCLEAR CELLS IN WOMEN WITH REPEATED IMPLANTATION FAILURE

Vtorushina V.V., Perminova S.G., Krechetova L.V.

V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Frequency of the repeated implantation failure (RIF) in assisted reproductive technology programs remains to be high, reaching 50–75%. Intrauterine administration of autologous mononuclear cells before embryo transfer is a technique for the RIF immunocorrection being used in assisted reproductive technology programs. Direct effect of mononuclear cells upon implantation was first studied in 2006 and showed that intrauterine administration of autologous mononuclear cells prior to embryo transfer proved to significantly increase implantation frequency, as well as incidence of clinical pregnancy, and frequency of delivery in the patients with a history of RIF. The aim of this study was to evaluate the effect of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer upon the results of assisted reproductive technology programs in women with a history of RIF, and to evaluate cytokine profile of the supernates from the injected cultures of peripheral blood mononuclear cells.

The study included 129 women with RIF included into the assisted reproductive technology programs. The patients were divided into three groups with intrauterine administration before embryo transfer in a stimulated cycle and in a cryocycle: group 1, treated with mononuclear cells activated by human chorionic gonadotropin; group 2, with mononuclear cells without activation by human chorionic gonadotropin; group 3 who received saline solution (placebo). Clinical and anamnestic data of the women from these groups did not differ. The age of women in all three groups was also similar. The number of RIFs in their anamnesis was comparable for the 3 groups. Analysis of the embryological parameters also showed that there were no significant differences in the number of transferred embryos, including those of good quality.

The levels of IL-2 ($p = 0.006$), IL-4 ($p = 0.012$), IL-5 ($p = 0.012$), IL-12p70 ($p = 0.011$), IFN γ ($p = 0.012$), GM-CSF ($p = 0.026$), and TNF α ($p = 0.021$) were found to be higher in the supernatants of human chorionic gonadotropin-activated mononuclear cells of women with advanced cryocycle implantation, than in supernatants of inactivated chorionic gonadotropin mononuclear cells. Frequencies of implantation and clinical pregnancy were significantly higher in the groups with intrauterine administration of autologous mononuclear cells, both in stimulated cycle and the cryocycle compared to the placebo groups.

The cytokine profile of the mononuclear cell culture supernates upon intrauterine administration affects the efficiency of assisted reproductive technology programs in the women with RIF. Hence, the data obtained may allow us to develop a personalized approach to usage of various immunotherapies in assisted reproductive technology programs for the patients with a history of repeated implantation failure.

Keywords: repeated implantation failure, intrauterine administration, autologous mononuclear cells, immunotherapy, human chorionic gonadotropin, cytokines

Введение

Повторные неудачи имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) – актуальная проблема, изучению которой посвящено значительное количество исследований. Несмотря на достаточно высокие современные достижения в сфере вспомогательных репродуктивных технологий, частота повторных неудач имплантации в программах ВРТ остается по-прежнему высокой и составляет 50-75% [14]. Большинство аспектов иммунного взаимодействия матери и эмбриона до сих пор остаются неуточненными, несмотря на то, что последние работы в области молекулярной биологии позволили определить некоторые иммунологические параметры, определяющие иммунные взаимоотношения между матерью и эмбрионом во время имплантации. В прежних работах считалось, что наступление и прогрессирование беременности связано с преобладанием Th2 профилем цитокинов (LIF, IL-1, IL-8, IL-11, IL-4 и IL-10), а преобладание Th1-цитокинов (IFN γ , IL-2 и TNF α , IL-1, IL-6) неблагоприятно для наступления беременности [7, 11]. Однако позднее появились данные о том, что мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови индуцируют выработку ряда цитокинов, таких как IL-1 α , IL-1 и TNF α , позитивно влияющих на рецептивность эндометрия [13]. Это стало предпосылкой использования внутриматочного введения аутологичных МНК перед переносом эмбриона в программах ВРТ при повторных неудачах имплантации в анамнезе. Роль МНК в обеспечении рецептивности эндометрия обсуждается с 1997 года, когда было показано, что клетки селезенки беременных мышей могут влиять на рецептивность эндометрия [10], а МНК, введенные внутриматочно перед переносом эмбриона, повышают вероятность имплантации [5]. Также было установлено, что МНК периферической крови, полученные у женщин на ранних сроках гестации, могут индуцировать продукцию прогестерона [6] и усиливать инвазию трофобласта эмбрионов мышей *in vitro* [4]. В 2006 году показали, что внутриматочное введение аутологичных МНК, которые культивировали с хорионическим гонадотропином человека (ХГч) в течение 48 часов, перед переносом эмбрионов, значительно повышало частоту имплантации, частоту наступления беременности и частоту родов у женщин с повторными неудачами имплантации в программах ВРТ [7, 11]. Однако в исследовании Santiba ez не было выявлено позитивного эффекта внутриматочного введения аутологичных МНК перед

переносом эмбриона на исходы программ ВРТ у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе [9]. Позднее было показано, что внутриматочное введение МНК повышает частоту имплантации при переносе размороженных эмбрионов в программах ВРТ, как на фоне подготовки эндометрия препаратами эстрогенов и прогестерона, так и в естественном цикле у женщин, имеющих несколько неудач имплантации в анамнезе [12].

Целью данного исследования явилась оценка исходов программ ВРТ на фоне внутриматочного введения аутологичных МНК периферической крови перед переносом эмбриона у женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе и анализ цитокинового профиля супернатантов вводимых культур МНК.

Материалы и методы

Проведено рандомизированное контролируемое исследование 129 женщин с повторными неудачами имплантации в анамнезе, обратившихся для проведения программ ВРТ и подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Женщины путем простой рандомизации были разделены на 3 группы, в зависимости от вида проводимой иммунотерапии: группа 1 – 42 женщины которым перед переносом эмбриона проводилось внутриматочное введение аутологичных МНК, активированных ХГч (АМНК), группа 2 – 42 женщины, которым проводилось внутриматочное введение аутологичных МНК без активации ХГч (МНК), группа 3 (плацебо) – 45 женщин, которым проводилось внутриматочное введение физиологического раствора.

В зависимости от различного вида программы ВРТ – стандартный фиксированный протокол с антагонистом гонадотропин-рилизинг гормона и препаратами рекомбинатного фолликулостимулирующего гормона (стимулированный цикл) или криоцикл – были выделены подгруппы в каждой из трех групп: подгруппа 1а – 17 женщин, которым внутриматочно вводили АМНК в стимулированном цикле, подгруппа 1б – 25 женщин, которым внутриматочно вводили АМНК в криоцикле; подгруппа 2а – 21 женщина, которым внутриматочно вводили МНК в стимулированном цикле, подгруппа 2б – 21 женщина, которым внутриматочно вводили МНК в криоцикле; подгруппа 3а – 22 женщины группы плацебо в стимулированном цикле и подгруппа 3б – 23 женщины группы плацебо в криоцикле. Всего в программах ВРТ участвовали 60 женщин в стимулированном цикле и 69 женщин – в криоцикле [1].

Перед проведением программы ВРТ пациенткам проводили полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с Приказом МЗ РФ от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Возраст женщин был не старше 37 лет, отсутствие имплантации наблюдалось как минимум в 3 программах ВРТ при условии переноса эмбрионов хорошего качества.

Из исследования исключались супружеские пары у которых наблюдались: хромосомные аномалии, выраженная патозооспермия у мужчины, верифицированный хронический эндометрит, толщина эндометрия менее 7 мм, врожденные пороки развития половых органов, миома матки с узлами более 3 см, наружный генитальный эндометриоз III-IV степени, гидросальпинкс, «бедный ответ» яичников на гонадотропную стимуляцию.

Всем пациенткам с учетом повторных неудач имплантации в программах ВРТ оплодотворение выполнялось методом интраплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI). Количество переносимых эмбрионов не превышало двух. В стимулированном цикле перенос эмбрионов в полость матки производили на 5-е сутки культивирования. В криоцикле перенос размороженных после витрификации эмбрионов на стадии бластоцисты в полость матки выполняли на 5-е сутки от начала приема препаратов микронизированного прогестерона. Перед переносом эмбриона в полость матки вводили фракцию аутологичных МНК периферической крови. Забор крови для получения МНК у всех исследуемых женщин осуществляли в стерильные вакутейнеры Monovette LH/9мл, SARSTEDT общим объемом 18 мл, содержащие в качестве антикоагулянта гепарин [1].

Методика выделения и внутриматочного введения МНК осуществлялась в соответствии с протоколом «Проведение иммунотерапии с помощью внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток», утвержденным на Ученом совете ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол № 19 от 22.12.2015 г.) [1].

Процедуру выделения МНК проводили в стерильных условиях в ламинарном шкафу, оснащенном необходимым оборудованием. Периферическую кровь тщательно перемешивали, разводили в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:2 и выделяли МНК на градиенте фиколл-пак с плотностью 1,077. После центрифугирования в течение 30 минут

при 1500 об/мин отбирали кольцо, содержащее МНК, и переносили в другую пробирку для отмывания культуральной средой (RPMI-1640 с добавлением L-глутамин) путем центрифугирования в течение 10 минут при 1500 об/мин. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. В полученной взвеси определяли количество клеток путем визуального подсчета в камере Горяева. Окончательная концентрация МНК составляла не менее 2025 млн в 1 мл. Взвесь МНК в 1 мл культуральной среды инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в присутствии ХГч (10 мкл препарата «Прегнил» 500 МЕ/мл на 1×10^6 клеток) в течение 48 часов или без ХГч. Через 48 часов инкубирования МНК ресуспендировали и в объеме 200 мкл в стерильной пробирке передавали для внутриматочного введения [1].

Полученные сразу после отбора из культивируемых плашек и после центрифугирования образцы избыточного бесклеточного объема супернатанта замораживали и хранили до анализа при -80 °С.

Эффективность программы ВРТ оценивали путем исследования концентрации ХГч в сыворотке крови через 12-14 дней после переноса эмбриона. При значениях ХГч ≥ 20 МЕ/л констатировали положительный результат. При условии положительного ХГч осуществляли ультразвуковое исследование через 21 день после переноса эмбриона. Частоту имплантации оценивали как отношение числа перенесенных эмбрионов к числу плодных яиц по данным УЗИ. Клиническую беременность диагностировали при наличии живого эмбриона по данным УЗИ через 4-5 недель после переноса эмбриона [1].

Определение концентрации цитокинов в супернатантах клеточных культур проводилось мультиплексным методом с использованием стандартной 9-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine Th1/Th2 Assay (Bio-Rad, США) для определения GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF α на проточном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) и последующей обработкой полученных результатов с использованием приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки результатов исследования использовался Statistical Package for Social Sciences (SPSS v. 21.0). Для каждого количественного параметра были определены: среднее значение (M), ошибка среднего (m) в случае нормального распределения признака, медиана (Me) и интерквартильный размах (Q_{0,25}-Q_{0,75}) – в случае отклонения распределения признака от нормального, для качественных данных – часто-

ты (%). Оценку характера распределения параметра осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения частот встречаемости признаков в анализируемых группах использовали критерий χ^2 с поправкой на непрерывность. Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. При попарном сравнении трех групп использовали t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении признака) и Манна–Уитни (при отклонении распределения от нормального) с применением поправки Бонферони, и отклонения считались значимыми при $p \leq 0,017$.

Результаты и обсуждение

Клинико-анамнестические данные женщин всех трех групп не различались. Возраст женщин (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)) 1-й группы составил 34 (30-35) лет, 2-й группы – 32 (30-35) лет, 3-й группы – 34 (31-36). Число неэффективных программ ВРТ в анамнезе было сопоставимо в 3 группах. Анализ эмбриологических показателей также продемонстрировал отсутствие существенных различий в количестве перенесенных эмбрионов, в том числе хорошего качества.

Сравнительная оценка исходов программ ВРТ при внутриматочном введении аутологичных МНК, как активированных ХГч (АМНК), так и без активации (МНК) перед переносом эмбриона в стимулированном цикле и криоцикле у женщин с повторными неудачами имплантации представлена в таблице 1.

Как следует из данных таблицы 1, в стимулированном цикле эффективность программ ВРТ при внутриматочном введении МНК, как активированных ХГч, так и без активации ХГч, была существенно выше по сравнению с группой плацебо, о чем свидетельствует более высокая частота биохимической беременности, клинической беременности, частота имплантации, частота прогрессирующей беременности и частота родов. Вместе с тем, в стимулированном цикле существенных различий в частоте анализируемых показателей у пациенток с иммунотерапией МНК в зависимости от активации ХГч не выявлено.

Анализ исходов криоциклов при использовании иммунотерапии также выявил позитивное влияние данной методики, о чем свидетельствуют существенно более высокие частота биохимической беременности, частота имплантации, частота наступления клинической беременности, частота прогрессирующей беременности и частота родов в сравнении с аналогичными показателями в группе плацебо. В криоциклах также отсутствовали различия в частоте анализируемых

показателей в зависимости от наличия или отсутствия активации МНК ХГч.

Цитокиновый профиль супернатантов культур МНК был проанализирован у женщин, получивших иммунотерапию как в стимулированном цикле, так и в криоцикле: при эффективных исходах в стимулированном цикле $n_{AMHK} = 9$ и $n_{MHK} = 6$, в криоцикле – $n_{AMHK} = 10$, $n_{MHK} = 8$, при неэффективных исходах в стимулированном цикле – $n_{AMHK} = 7$, $n_{MHK} = 5$ и в криоцикле $n_{AMHK} = 10$, $n_{MHK} = 5$ соответственно.

Не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов культур МНК в каждом из типов циклов независимо от исходов программ ВРТ. Также не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов культур вводимых клеток при обоих типах цикла, в зависимости от исхода настоящей программы ВРТ. Не выявлено различий в цитокиновом профиле супернатантов АМНК и МНК у женщин и в стимулированном цикле и в криоцикле при неэффективных исходах, а также при эффективных исходах у женщин в стимулированном цикле.

При эффективных исходах в криоциклах с использованием АМНК по сравнению с использованием МНК в цитокиновом профиле супернатантов были выявлены значимые различия (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют, что при успешной имплантации в криоцикле супернатанты АМНК характеризуются более высоким уровнем провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-5, IL-12p70, GM-CSF, IFN γ , TNF α), а также противовоспалительного IL-4.

В таблице 3 представлен цитокиновый профиль супернатантов клеток женщин с наступившей имплантацией в обоих типах циклов с использованием АМНК при внутриматочном введении.

Анализ данных в таблице 3 показывает, что в супернатантах АМПК у женщин с наступившей имплантацией в криоцикле выше уровень GM-CSF, IL-2 и TNF α , чем в супернатантах АМПК женщин в стимулированном цикле.

Таким образом, исследование цитокинового профиля супернатантов, вводимых вместе с суспензией аутологичных мононуклеарных клеток, стимулированных ХГч, показало, что в случае применения криоцикла супернатанты характеризуются более высоким уровнем провоспалительных цитокинов, которые, возможно, и способствуют успешной имплантации.

В литературе существует много противоречивых данных в отношении значимости различных иммунологических исследований и различных

ТАБЛИЦА 1. ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВРТ ПРИ ВНУТРИМАТОЧНОМ ВВЕДЕНИИ АУТОЛОГИЧНЫХ МНК В СТИМУЛИРОВАННОМ ЦИКЛЕ И КРИОЦИКЛЕ У ЖЕНЩИН С ПОВТОРНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ

TABLE 1. OUTCOMES OF IVF PROGRAMS FOR INTRAUTERINE ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS MNC IN THE STIMULATED CYCLE AND CRYOCYCLE IN WOMEN WITH REPEATED IMPLANTATION FAILURE

Исходы программ ВРТ Outcomes of IVF programs	Группа АМНК Group AMNC	Группа МНК Group MNC	Группа плацебо Group placebo	Сравнение исходов в группах Comparison of outcomes in groups
стимулированный цикл / stimulated cycle				
Параметры Parameters	Подгруппа 1а Subgroup 1a n = 17	Подгруппа 2а Subgroup 2a n = 21	Подгруппа 3а Subgroup 3a n = 22	р-значение p-value
Биохимическая беременность Biochemical pregnancy	6 (35,3%)	7 (33,3%)	4 (18,2%)	p ₁₋₂ = 0,988 p ₂₋₃ = 0,006 p ₃₋₁ = 0,034
Клиническая беременность Clinical pregnancy	5 (29,4%)	5 (23,8%)	3 (13,7%)	p ₁₋₂ = 0,956 p ₂₋₃ = 0,035 p ₃₋₁ = 0,009
Имплантация Implantation	33,3%	28,6%	7,7%	p ₁₋₂ = 0,873 p ₂₋₃ = 0,010 p ₃₋₁ = 0,001
Самопроизвольный выкидыш Spontaneous miscarriage	2 (11,8%)	2 (9,5%)	1 (4,5%)	p ₁₋₂ = 0,873 p ₂₋₃ = 0,165 p ₃₋₁ = 0,324
Прогрессирующая беременность Progressive pregnancy	3 (17,6%)	3 (14,3%)	2 (9%)	p ₁₋₂ = 0,435 p ₂₋₃ = 0,011 p ₃₋₁ = 0,025
Роды живым плодом Live birth	3 (17,6%)	3 (14,3%)	2 (9%)	p ₁₋₂ = 0,367 p ₂₋₃ = 0,035 p ₃₋₁ = 0,024
криоцикл / cryocycle				
Параметры Parameters	Подгруппа 1б Subgroup 1b n = 25	Подгруппа 2б Subgroup 2b n = 21	Подгруппа 3б Subgroup 3b n = 23	р-значение p-value
Биохимическая беременность Biochemical pregnancy	10 (40%)	8 (38,1%)	6 (25%)	p ₁₋₂ = 0,097 p ₂₋₃ = 0,006 p ₃₋₁ = 0,001
Клиническая беременность Clinical pregnancy	8 (36%)	7 (33,3%)	5 (20,8%)	p ₁₋₂ = 0,095 p ₂₋₃ = 0,025 p ₃₋₁ = 0,005
Имплантация Implantation	35,4%	30,3%	9,8%	p ₁₋₂ = 0,084 p ₂₋₃ = 0,026 p ₃₋₁ = 0,034
Самопроизвольный выкидыш Spontaneous miscarriage	1 (4%)	1 (4,8%)	1 (4,3%)	p ₁₋₂ = 0,073 p ₂₋₃ = 0,416 p ₃₋₁ = 0,878
Прогрессирующая беременность Progressive pregnancy	7 (28%)	6 (28,6%)	4 (17,4%)	p ₁₋₂ = 0,134 p ₂₋₃ = 0,017 p ₃₋₁ = 0,032
Роды живым плодом Live birth	7 (28%)	6 (28,6%)	2 (8,7%)	p ₁₋₂ = 0,134 p ₂₋₃ = 0,024 p ₃₋₁ = 0,033

ТАБЛИЦА 2. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СУПЕРНАТАНТОВ АМНК И МНК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН ПРИ ЭФФЕКТИВНОМ ИСХОДЕ ДАННОЙ ПРОГРАММЫ ВРТ В КРИОЦИКЛЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CYTOKINE PROFILE OF THE AMNC AND MNC SUPERNATANTS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF WOMEN WITH AN EFFECTIVE OUTCOME OF THIS CRYOCYCLE IVF PROGRAM, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	Концентрация цитокина / Cytokine concentration	
	МНК / MNC (n = 8)	АМНК / AMNC (n = 10)
IL-2 (пг/мл) IL-2 (pg/ml)	15,4 (10,9-19,1)	60,1 (46,6-110,4) p = 0,0002 *
IL-4 (фг/мл) IL-4 (f/ml)	170 (140-235)	530 (333-958) p = 0,012*
IL-5 (пг/мл) IL-5 (pg/ml)	1,8 (1,5-2,2)	3,7 (2,7-13,2) p = 0,012*
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	24,4 (17,7-47,1)	102,2 (26,1-239,8)
IL-12p70 (пг/мл) IL-12p70 (pg/ml)	0,6 (0,5-0,6)	0,9 (0,7-1,3) p = 0,011*
IL-13 (пг/мл) IL-13 (pg/ml)	0,7 (0,4-0,9)	2,1 (0,7-2,9)
GM-CSF (пг/мл) GM-CSF (pg/ml)	0,9 (0,5-2,2)	20,4 (8-163) p = 0,006*
IFNγ (пг/мл) IFN γ (pg/ml)	0,6 (0,5-0,6)	1,1 (0,8-2,0) p = 0,012*
TNFα (пг/мл) TNF α (pg/ml)	800 (390-1216)	4622 (2055-5873) p = 0,002*

Примечание. * – различия со значениями в подгруппе АМНК значимы p ≤ 0,05 (критерий Манна–Уитни).
 Note. *, differences with the values in the AMNC subgroup are significant p ≤ 0.05 (Mann–Whitney test).

ТАБЛИЦА 3. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СУПЕРНАТАНТОВ АМНК У ЖЕНЩИН С ЭФФЕКТИВНЫМ ИСХОДОМ ДАННОЙ ПРОГРАММЫ ВРТ В СТИМУЛИРОВАННОМ ЦИКЛЕ И КРИОЦИКЛЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. CYTOKINE PROFILE OF AMNC SUPERNATANTS IN WOMEN WITH AN EFFECTIVE OUTCOME OF THIS IVF PROGRAM IN THE STIMULATED CYCLE AND CRYOCYCLE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	Концентрация цитокина / Cytokine concentration	
	стимулированный цикл stimulated cycle (n = 9)	криоцикл cryocycle (n = 10)
IL-2 (пг/мл) IL-2 (pg/ml)	31,0 (15,3-45,5)	60,1 (46,6-110,4) p = 0,018*
IL-4 (фг/мл) IL-4 (f/ml)	380 (165-490)	530 (333-958)
IL-5 (пг/мл) IL-5 (pg/ml)	2,5 (1,6-3,5)	3,7 (2,7-6,8)
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	101 (30-229)	102 (26-240)
IL-12p70 (пг/мл) IL-12p70 (pg/ml)	0,68 (0,60-0,92)	0,92 (0,72-1,29)
IL-13 (пг/мл) IL-13 (pg/ml)	2,1 (0,5-3,0)	2,1 (0,9-2,9)
GM-CSF (пг/мл) GM-CSF (pg/ml)	0,8 (0,6-1,5)	20,4 (8,0-162,6) p = 0,009*
IFNγ (пг/мл) IFN γ (pg/ml)	0,8 (0,5-0,8)	1,1 (0,8-2,0)
TNFα (пг/мл) TNF α (pg/ml)	1530 (841-2095)	4622 (2055-5873) p = 0,018*

Примечание. * – различия между группами значимы при p ≤ 0,05 (критерий Манна–Уитни).
 Note. *, differences between groups are significant at p ≤ 0.05 (Mann–Whitney test).

видов иммунотерапии у женщин с повторными неудачами имплантации [2, 9]. Внутриматочное введение аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбрионов является одним из новых методов иммунотерапии.

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

Обсуждаются несколько механизмов действия МНК. МНК могут индуцировать дифференциацию эндометрия, что повышает вероятность имплантации эмбриона. МНК могут индуцировать асептические воспалительные реакции в полости матки *in vivo* [4]. ХГч потенцирует эти множественные эффекты, непосредственно участвуя в регуляции имплантации эмбриона, стимулируя секрецию цитокинов и хемокинов в МНК, таких как LIF и IL-1, MMP-2, MMP-9 и VEGF, способствующих инвазии трофобласта [8]. Следовательно, можно предположить, что МНК, 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.

Сравнительный анализ оценки эффективности данного метода иммунотерапии в зависимости от активации МНК и вида программы ВРТ показал, что активация МНК ХГч повышает эффективность криоциклов в 1,2 раза, но не влияет на исходы стимулированных циклов, что, вероятно, связано с эффектами ХГч, используемого в качестве триггера овуляции в стимулированных циклах, что согласуется с данными литературы о снижении частоты клинической беременности в стимулированных циклах по сравнению с криоциклами [3].

Заключение

Таким образом, можно заключить, что активация мононуклеарных клеток периферической крови хорионическим гонадотропином приводит к высокому уровню продукции про- и противовоспалительных цитокинов, что обуславливает более высокую эффективность данного вида иммунотерапии. В результате проведенного исследования показано, что внутриматочное введение аутологичных МНК перед переносом эмбриона повышает эффективность программ ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации в анамнезе. Полученные данные могут позволить персонализированный подход для использования различных видов иммунотерапии в программах ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации.

Благодарности

Авторы выражают огромную признательность и благодарность: аспиранту Амян Татьяне Сергеевне – за организацию и проведение процедуры внутриматочного введения МНК, участие в подборе пациентов и формирование базы данных.

Список литературы / References

1. Амян Т.С., Кречетова Л.В., Перминова С.Г., Вторушина В.В. Эффективность внутриматочного введения аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбриона у пациенток с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Гинекология, 2018. Т. 2, № 2. С. 28-33. [Amyan T.S., Krechetova L.V., Perminova S.G., Vtorushina V.V. Effectiveness of intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells before embryo transfer in patients with repeated implantation failures in assisted reproductive technology programs. *Ginekologiya = Gynecology*, 2018, Vol. 2, no. 2, pp. 28-33. (In Russ.)]
2. Huang P. Effects of intrauterine perfusion of human chorionic gonadotropin in women with different implantation failure numbers. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 2. doi: 10.1111/aji.12809.
3. 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.*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 1-11.

4. Lea R.G., Sandra O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. *Reproduction*, 2007, Vol. 134, pp. 389-404.
5. Makrigiannakis A., BenKhalifa M., Vrekoussis T., Mahjub S., Kalantaridou S.N. Gurgan: repeated implantation failure: a new potential treatment option. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 45, pp. 380-384.
6. Nakayama T., Fujiwara H., Maeda M. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion *in vitro*: hCG enhances the effects of PBMC. *Hum. Reprod.*, 2002, Vol. 17, pp. 207-212.
7. Okitsu O., Kiyokawa M., Oda T., Miyake K., Sato Y., Fujiwara H. 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, Vol. 92, pp. 82-87.
8. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M., Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, pp. 601-610.
9. Santibañez A., García J., Pashkova O., Colín O., Castellanos G., Sánchez A.P., De la Jara J.F. 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, Vol. 12, 9. doi: 10.1186/1477-7827-12-9.
10. Takabatake K., Fujiwara H., Goto Y., Nakayama T., Higuchi T., Fujita J., Maeda M., Mori T. Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum. Reprod.*, 1997, Vol. 12, pp. 2102-2107.
11. Yoshinaga K. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2008, Vol. 19, pp. 161-169.
12. Yoshioka S., Fujiwara H., Nakayama T., Kosaka K., Mori T., Fujii S. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 21, pp. 3290-3294.
13. Yu N., Yang J., Guo Y., Fang J., Yin T., Luo J., Li X., Li W., Zhao Q., Zou Y., Xu W. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) improves endometrial receptivity with embryonic implantation dysfunction. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 71, pp. 24-33.
14. Zeyneloglu H.B., Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Semin. Reprod. Med.*, 2014, Vol. 32, pp. 297-305.

Авторы:

Вторушина В.В. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Vtorushina V.V., PhD (Medicine), Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Перминова С.Г. — д.м.н., ведущий научный сотрудник
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Министерства
здравоохранения РФ, Москва, Россия

Perminova S.G., MD, PhD (Medicine), Leading Research
Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for
Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian
Federation

Кречетова Л.В. — д.м.н., заведующая лабораторией
клинической иммунологии ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии имени академика
В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

Krechetova L.V., MD, PhD (Medicine), Head, Laboratory of
Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research
Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow,
Russian Federation

Поступила 17.07.2021
Принята к печати 20.07.2021

Received 17.07.2021
Accepted 20.07.2021