

Применение мононуклеарных клеток периферической крови в программах вспомогательных репродуктивных технологий

В.А. Питько, А.И. Ткачев, О.А. Логинова

ГУ «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии
Министерства здравоохранения Украины», г. Киев

Изучены клинические результаты применения в программах экстракорпорального оплодотворения методики внутриматочного введения мононуклеарных клеток периферической крови. Как свидетельствуют результаты наблюдения за пациентками, применение мононуклеарных клеток периферической крови повышает процент приживления эмбрионов к эндометрию и увеличивает процент клинических беременностей.

Ключевые слова: мононуклеарные клетки периферической крови, экстракорпоральное оплодотворение, имплантация.

В настоящее время использование вспомогательных репродуктивных технологий (метода экстракорпорального оплодотворения, дополненного интрацитоплазматической инъекцией спермия) за первые 3 попытки позволяет получить беременность почти в 70% случаев. Для повышения вероятности наступления беременности разрабатываются методики по усилению приживаемости перенесенных в полость матки эмбрионов.

Цель исследования: изучение влияния внутриматочного введения мононуклеарных клеток периферической крови на частоту имплантации эмбрионов пациенткам в возрасте старше 35 лет в программе лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона. При этом в анамнезе у пациентов было не менее 2 или более попыток экстракорпорального оплодотворения с отрицательным конечным результатом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод применения мононуклеарных клеток периферической крови заключается в следующем. В день проведения пункции фолликулов у женщины берут 30 мл крови из кубитальной вены, кровь обрабатывают для получения чистой фракции мононуклеарных клеток периферической крови по методу Воуш (1968), основанному на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколлаурографина. Фиколл в данной смеси выступает как агент, агрегирующий эритроциты, а изопак (или урографин) нужен для создания изотоничности и плотности $1,077 \text{ г/см}^3$. Гепаринизированную кровь разводят в 3 раза культуральной средой и аккуратно наслаивают на градиент фиколлаурографина. Кровь задерживается над фиколлом и не смешивается с ним. Постепенно эритроциты склеиваются фиколлом и опускаются на дно пробирки. Гранулоциты, имеющие плотность большую, чем седиментирующий раствор, оседают вместе с эритроцитами. Лимфоциты вместе с моноцитами остаются в интерфазе, их собирают, переносят в другую пробирку и отмывают центрифугированием. После центрифугирования собирают интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, в отдельную пробирку. Эритроциты склеиваются фиколлом и оседают на дно пробирки вместе с гранулоцитами. Затем в течение 2 сут мо-

нонуклеарные клетки периферической крови культивируют в присутствии хорионического гонадотропина, который стимулирует их к продукции специальных факторов, увеличивающих вероятность имплантации [1]. Через 48 ч после пункции у женщины вновь берут 30 мл крови из вены, получают свежую порцию мононуклеарных клеток периферической крови, которую соединяют с клетками, культивирующимися с момента пункции [3]. Суспензию клеток вводят пациентке внутриматочно через внутриматочный катетер под контролем УЗИ, мононуклеарные клетки при этом продуцируют вещества, воздействующие как на клетки эндометрия, так и на клетки эмбриона (трофобласт), подготавливая успешную имплантацию. Перенос эмбрионов в таких циклах проводят на третьи или пятые сутки развития. Ввиду использования аутологических (собственных) клеток крови, побочные эффекты после введения мононуклеарных клеток периферической крови обычно не наблюдаются [4].

В течение 1,5 года была отобрана 41 семейная пара, с двумя и более неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения в анамнезе. Пациенты были разделены на 2 группы: I группа – 20 пациенток, II – 21 пациентка. В состав I группы вошли 20 пациенток, средний возраст которых на момент обращения в клинику составил $36,3 \pm 2,4$ года. Для контролируемой стимуляции яичников пациенток I группы применяли протокол с антагонистами гонадотропного рилизинг-гормона. Внутриматочное введение мононуклеарных клеток периферической крови до переноса эмбриона у пациенток I группы не проводили. Во II группу вошла 21 пациентка, средний возраст составил $38,5 \pm 3,4$ года. При этом для пациенток II группы было применено внутриматочное введение мононуклеарных клеток периферической крови до момента переноса эмбриона. Объем переносимой клеточной культуры не превышал 0,2–0,25 мл.

Контролируемую стимуляцию яичников у пациенток II группы проводили также по протоколу с антагонистами гонадотропного рилизинг-гормона. На момент трансвагинальной пункции размер фолликулов в среднем достигал 18–20 мм. Для поддержки лютеиновой фазы у пациенток двух групп применяли препараты прогестеронового ряда [2], а также вводили хорионический гонадотропин. Полученные после трансвагинальной пункции ооциты и зиготы в течение двух дней культивировались в средах СООК. Ооциты и полученные после оплодотворения эмбрионы культивировались при температуре $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$, при содержании CO_2 6,0%. У всех пациенток I и II групп часть эмбрионов была получена методом ИКСИ. Эмбриотрансфер выполняли на третьи или на пятые сутки развития эмбрионов. Пациенткам переносили не более 2–3 эмбрионов в зависимости от пожеланий. Для каждого переноса путем селекции были выбраны эмбрионы лучшего качества.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В день переноса эмбрионов у пациентов обеих групп толщина эндометрия составляла не менее 8–10 мм. Наличие клинической беременности подтверждалось с помощью ультразвукового исследования через три недели после эмбриотрансфера.

После выполнения программы экстракорпорального оплодотворения с эмбриотрансфером у пациенток I группы клиническая беременность наступила в 5 случаях (25 %). 60% этих беременностей (3 случая) были диагностированы после переносов эмбрионов на 5-е сутки культивирования, 40% клинических беременностей (2 пациентки) – после переноса эмбрионов на 3-и сутки развития.

Среди пациенток II группы, у которых было проведено введение мононуклеарных клеток периферической крови в матку, клиническая беременность наступила в 42,9 % случаев (9 клинических беременностей). При этом 7 из этих беременностей (77,1 %) были диагностированы после переноса эмбрионов на 5-е сутки развития, 2 клинические беременности (22,9%) – после переносов эмбрионов на 3-и сутки развития. Из 9 полученных во II группе беременностей все прогрессируют. На данный момент 4 из них закончились родами, 5 клинических беременностей продолжают развиваться.

Застосування мононуклеарних клітин периферійної крові у програмах допоміжних репродуктивних технологій
В.А. Питько, О.І. Ткачев, О.О. Логінова

Вивчені клінічні результати застосування у програмах екстракорпорального запліднення методики внутрішньоматкового введення мононуклеарних клітин периферійної крові. Як свідчать результати спостереження за пацієнтками, застосування мононуклеарних клітин периферійної крові підвищує відсоток приживлення ембріонів до ендометрія та підвищує відсоток клінічних вагітностей.

Ключові слова: мононуклеарні клітини периферійної крові, екстракорпоральне запліднення, імплантація.

ВЫВОДЫ

По представленным результатам можно сделать вывод о том, что применение внутриматочного введения мононуклеарных клеток периферической крови перед переносом эмбрионов пациенткам, повторно проходящим курс лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения, значительно ($p < 0,05$) повышает возможность имплантации эмбриона и наступления клинической беременности. Учитывая, что мононуклеарные клетки периферической крови в момент имплантации обладают способностью усиливать инвазию эмбриона, можно использовать данный метод для повышения шансов наступления беременности у пациенток с неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения в прошлом.

Учитывая высокий процент наступления клинических беременностей при применении методики внутриматочного введения мононуклеарных клеток периферической крови, перспективным, на наш взгляд, является его использование на практике для подготовки эндометрия к имплантации (формирование полноценного «имплантационного окна»). Рекомендовано более широкое использование данного метода для пациенток, проходящих лечение методом экстракорпорального оплодотворения, беременность у которых не наступает при переносе эмбрионов высокого качества.

The use of peripheral blood mononuclear cells in assisted reproductive technologies
V.A. Pitko, A.I. Tkachev, O.A. Loginova

This is the study of the clinical result of the application program of the vitro fertilization techniques intrauterine injection of mononuclear cells in peripheral blood. According to the observations of patients, the use of mononuclear cells in peripheral blood increases the share of engraftment of the embryo to the endometrium and increases the positive results of clinical pregnancies.

Key words: mononuclear cells of peripheral blood, in vitro fertilization, implantation.

Сведения об авторах

Питько Валерий Анатольевич – ГУ «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии Министерства здравоохранения Украины», 61020, г. Харьков, ул. Тимирязева, 10; тел.: (057) 376-21-49. E-mail: center_agr@ukr.net

Ткачев Алексей Игоревич – ГУ «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии Министерства здравоохранения Украины», 61020, г. Харьков, ул. Тимирязева, 10; тел.: (057) 376-11-00, факс: (057) 376-21-49. E-mail: center_agr@ukr.net

Логінова Ольга Александровна – ГУ «Украинский медицинский центр акушерства, гинекологии и репродуктологии Министерства здравоохранения Украины», 61020, г. Харьков, ул. Тимирязева, 10; тел.: (057) 376-21-49. E-mail: center_agr@ukr.net

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айламазян Э.К. Материалы XXV научной сессии НИИ акушерства и гинекологии / Под редакцией Э.К. Айламазян. – 1996–1997. – С. 17–19.
2. Киндарова Л.В., Кузьмичев Л.Н. Применение препарата – Дюфастон – период после переноса эмбрионов

в программе экстракорпорального оплодотворения // Гинекология. – 2005. – Т. 7, № 2. – С. 24–26.
3. Феськов А.М., Феськова И.А., Жилкова Е.С., Зозулина А.Н. Исследование влияния внутриматочного введения мононуклеарных клеток перифе-

рической крови на частоту имплантации эмбриона у пациенток при лечении бесплодия методом ЭКО / Вісник проблем біології і медицини – 2010. – Вип. 1. – С. 270–272.

4. Yosiwaka S., Fujiwara H., Nakayama T., Kosaka L., Mon T.,

Fujii S. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer / Human Reproduction. – 2006. – V. 21, № 12. – P. 3290–3294.

Статья поступила в редакцию 15.06.2015