

Вплив внутрішньоматкового введення моноклеарних клітин периферичної крові на частоту імплантації ембріонів у пацієнток із численними невдалими спробами естракорпорального запліднення

О.М. Феськов¹, Є.С. Жилкова¹, Г.В. Нестерук¹, О.М. Зозуліна², О.В. Блажко¹

¹Центр репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.», Харків, Україна

²Центр репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.» (київська філія), Київ, Україна

Анотація. Досліджено вплив внутрішньоматкового введення свіжоізолюваних моноклеарних клітин периферичної крові на частоту імплантації та настання клінічної вагітності у свіжих циклах та кріопротоколах у пацієнток із численними невдалими спробами естракорпорального запліднення. Частота настання клінічної вагітності була статистично значуще вищою при проведенні кріопротоколу у жінок віком старше 39 років після введення моноклеарних клітин периферичної крові ($p < 0,001$). Отримані результати підтверджують значну роль імунної системи в процесах імплантації ембріонів і розвитку вагітності на ранніх термінах, зокрема вплив імунної системи на «вікно імплантації». Доведено перспективність методу внутрішньоматкового введення моноклеарних клітин периферичної крові з метою підвищення частоти імплантації серед пацієнток старшої вікової групи з ≥ 2 невдалими спробами естракорпорального запліднення.

Ключові слова: естракорпоральне запліднення, частота імплантації, моноклеарні клітини периферичної крові, клінічна вагітність.

Вступ

Проблема ненастання або невиношування вагітності за умови переносу до порожнини матки пацієнток ембріонів високої морфологічної якості при лікуванні безпліддя методом естракорпорального запліднення (ЕКЗ) є актуальною у сучасному акушерстві [1, 2]. Для успішної імплантації ембріона необхідне узгодження в часі готовності ендометрію до імплантації з розвитком ембріона (так зване вікно імплантації). Принципову роль у підготовці слизової оболонки матки до імплантації відіграє прогестерон. Встановлено, що для циклів індукованої овуляції досить часто характерне асинхронне щодо овуляції дозрівання ендометріальних залоз та стромы [3, 4]. Своєчасне дозрівання ендометрію при контрольованій стимуляції овуляції з наступним перенесенням ембріонів при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій виявлено у $< 50\%$ пацієнток [5]. За результатами низки досліджень встановлено, що у лімфоцитах периферичної крові в нормі наявні рецептори прогестерону. За відсутності вагітності кількість лімфоцитів, що містять рецептори прогестерону, є порівняно невеликою. Однак вона збільшується у разі настання вагітності. Кількість цих клітин зростає пропорційно до терміну вагітності. Ймовірно, таке збільшення кількості рецепторів прогестерону може бути спричинене ембріоном, який виступає в ролі аллоантигена, що стимулює лімфоцити крові [6–8]. З'являється все більше даних на користь того, що імуномодулювальна дія гормонів має важливе значення для підтримання нормальної функції ендометрію [9]. Важливим фактором успішної імплантації є стан імунної системи, рівень рецеп-

торів прогестерону в імунокомпетентних клітинах та їх функціональна активність [10].

Мета: дослідити вплив внутрішньоматкового введення свіжоізолюваних моноклеарних клітин периферичної крові (МКПК) на частоту імплантації та настання клінічної вагітності у свіжих циклах та кріопротоколах у пацієнток з ≥ 2 невдалими спробами ЕКЗ в анамнезі.

Об'єкт та методи дослідження

Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проводили в «Клініці професора Феськова О.М.» (Харків). Проведення дослідження схвалено Етичним комітетом ТОВ «Сана-Мед» (Центр репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.») відповідно до протоколу від 11.01.2021 р. № 2. Протягом 2021 р. розглянуто дані 368 пацієнток з нормальним жіночим каріотипом 46, XX з численними невдалими спробами ЕКЗ в анамнезі, яких було поділено на чотири групи:

- 1-ша — 27 пацієнток віком $38,2 \pm 4,6$ року, яким внутрішньоматково вводили МКПК у рамках проведення програми ЕКЗ з переносом ембріонів у свіжому циклі;
- 2-га — 177 пацієнток віком $36,1 \pm 5,7$ року, у яких виконано перенос ембріонів у ході кріопротоколу із застосуванням МКПК;
- 3-тя — 104 пацієнтки віком $35,0 \pm 5,4$ року з переносом ембріонів у свіжому циклі при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій;
- 4-та — 60 пацієнток віком $34,1 \pm 5,7$ року, яким перенесено ембріон у результаті проведення кріопротоколу.

Таблиця Частота імплантації у свіжих циклах ЕКЗ та кріопроотоколах із та без введення МКПК

Вид циклу ЕКЗ	Застосовано МКПК			Без МКПК			p
	Кількість пацієнток, n	Частота імплантації, n	Частота імплантації, %	Кількість пацієнток, n	Частота імплантації, n	Частота імплантації, %	
ЕКЗ: свіжий цикл	27	7	25,9	104	31	29,8	p>0,05
Кріопроотокол, загальна група	177	84	47,5	60	31	51,7	p>0,05
Кріопроотокол, вік ≥39 років	51	24	47,0*	18	5	27,7*	p<0,01
Дані статистики	df=1; $\chi^2=7,959$; $\chi^2_{\text{крит.}}=6,635$; p=0,005						

n — кількість жінок у групі; % — частка; p — рівень значущості.

Внутрішньоматкове введення МКПК не застосовано для пацієнток 3-ї та 4-ї групи.

Створено дві контрольні групи:

- 1-ша — 90 жінок віком $34,2 \pm 3,7$ року без акушерської патології, яким перенесено ембріон у свіжому циклі ЕКЗ з причин чоловічого фактора безпліддя;
- 2-га — 145 здорових жінок віком $35,1 \pm 2,3$ року, яким виконано перенос ембріона у рамках кріопроотоколу з причин чоловічого фактора безпліддя.

МКПК пацієнткам груп контролю не вводили.

Для контрольованої стимуляції овуляції у свіжому циклі ЕКЗ застосовували довгий протокол з агоністами гонадотропін-рилізінг гормону. У кожному випадку період контрольованої стимуляції овуляції займав не менше 10 днів. На момент трансвагінальної пункції розмір фолікулів у середньому сягав 18 мм. Для підтримки лютеїнової фази застосовано препарати прогестерону. Розмір фолікулів та стан ендометрію пацієнток оцінено за допомогою ультразвукового дослідження. Отримані після трансвагінальної пункції ооцити запліднено методом Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI). Культивування ембріонів до стадії бластоцисти виконано в середовищах GAIN medium Early Stage і GAIN medium Blastocyst (Австрія) за температури $36,8-37,0^\circ\text{C}$ і вмісту CO_2 5,5–5,7% [11].

Напередодні проведення кріопроотоколів застосовано метод швидкої кріоконсервації ембріонів — вітрифікацію. Кріоконсервацію проведено на 5- або 6-й день культивування, на стадії бластоцисти [12]. Вітрифікацію та розморожування бластоцист виконано відповідно до протоколів Medicult (Італія).

Особливості розвитку ембріонів на 5- та 6-й дні культивування *in vitro* оцінювали на підставі їх морфології: розмір (обсяг порожнини бластоцисти), внутрішня клітинна маса, якість трофодерми, наявність/відсутність природного хетчингу [13].

Для виділення МКПК та їх подальшого культивування кров у пацієнток у свіжому циклі ЕКЗ брали безпосередньо у день трансвагінальної пункції. У рамках кріопроотоколу забір крові проводили за 4 дні до переносу ембріона. МКПК виділяли за допомогою центрифугування Ficoll-Huраque. Після центрифугування МКПК відмивали у середовищі Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), а після відмивання поміщали у середовище для культивування. Складовими для середовища культивування МКПК стали RPMI 1640 (в концентрації не менше 5 МО/мл), Serum Substitute Supplement (Irvine Scientific, США). Виділені МКПК культивували протягом 48 год за температури $37,0^\circ\text{C}$ та за вмісту CO_2 5,5% [14, 15]. Після 48 год культивування МКПК у пацієнток повторно брали кров. Свіжовиділені МКПК після певної обробки змішували з вирощеними МКПК. Отриману суміш клітин переносили в порожнину матки пацієнтки, використовуючи катетер для внутріш-

ньоматкової інсемінації. Об'єм клітинної культури, що вводили, не перевищував 0,2 мл.

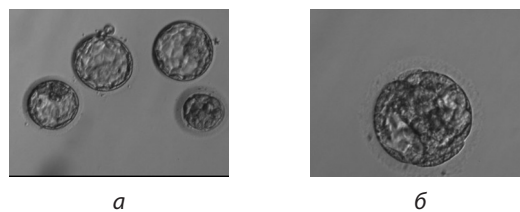
Аналіз каріотипу пацієнток виконано із застосуванням цитогенетичних методів. Культивування лімфоцитів проводили з використанням середовища для культивування PB-MAX Karyotyping (Gibco) протягом 72 год за рівня CO_2 5,5–6% та температури $36,9^\circ\text{C}$. Фарбування цитогенетичних препаратів здійснювали за допомогою методів GTG (G-метод) та CBG (C-метод) [16]. Аналіз проведено з використанням Міжнародної цитогенетичної номенклатури (International System for Cytogenetic Nomenclature — ISCN) [17].

Статистичний аналіз даних, які не підпорядковуються закону нормального розподілу, проводили непараметричними методами з використанням критерію χ^2 [18].

Результати

При проведенні кріопроотоколу загальна частота імплантації статистично не відрізнялася серед пацієнток із внутрішньоматковим введенням МКПК та без застосування зазначеної процедури. Втім виявлено, що частота настання клінічної вагітності є статистично значущо вищою при проведенні кріопроотоколу у жінок віком старше 39 років після введення МКПК порівняно з пацієнтками зазначеної старшої вікової групи, у яких не застосовували введення МКПК у порожнину матки напередодні перенесення ембріона ($df=1$; $\chi^2=7,959$; $\chi^2_{\text{крит.}}=6,635$; $p=0,005$). Отримані дані про частоту імплантації ембріонів у розглянутих експериментальних групах наведено в таблиці. У кожному випадку пацієнтці виконано перенос однієї бластоцисти високої морфологічної якості. Фото ембріонів людини на стадії бластоцист з різними морфологічними особливостями наведено на рисунку.

Рисунок Особливості морфології бластоцист за класифікацією D.K. Gardner *in vitro*: а) 1АА–5АА, б) 2 СС. Прижиттєве дослідження. Збільшення $\times 250$



Частота настання вагітності у 1-й контрольній групі у результаті перенесення ембріона у свіжому циклі становила 42,2% (38 вагітностей після проведення 90 переносів). Отримана у 1-й контрольній групі частота імплантації є статистично вищою, ніж серед пацієнток 1-ї групи, яким вводили МКПК у порожнину матки у свіжому циклі ($df=1$; $\chi^2=5,916$; $\chi^2_{\text{крит.}}=3,841$; $p=0,016$).



У 2-й контрольній групі вагітність настала у 53,8% жінок (78 вагітностей після 145 перенесень ембріонів у рамках кріопротоколів). Не виявлено значущої різниці у частоті імплантації між жінками 2-ї контрольної групи та пацієнтками з численними спробами ЕКЗ при виконанні кріопротоколу, як із, так і без введення МКПК у порожнину матки до перенесення ембріонів. Встановлено, що частота настання вагітності у пацієнток віком ≥ 39 років після введення МКПК статистично не відрізняється від результатів 2-ї контрольної групи (47,0 та 53,8% відповідно; $p > 0,05$). З іншого боку, частота імплантації серед пацієнток старшої вікової групи без застосування МКПК у рамках кріопротоколу є статистично нижчою у порівнянні з 2-ю групою контролю ($df=1$; $\chi^2=14,107$; $\chi^2_{\text{крит.}}=6,635$; $p < 0,001$).

Обговорення

Одним із факторів повторних невдач імплантації ембріонів високої морфологічної якості у рамках проведення програм ЕКЗ є імунологічні зміни [19]. Це дослідження показало, що внутрішньоматкове введення МКПК до етапу перенесення ембріона при лікуванні жінок з безпліддям методами допоміжних репродуктивних технологій підвищує частоту настання вагітності серед пацієнток віком старше 39 років із численними невдалими спробами ЕКЗ. Отримані у цій роботі результати підтверджують значну роль імунної системи в процесах імплантації ембріонів і розвитку вагітності на ранніх термінах, зокрема вплив імунної системи на «вікно імплантації» [20]. Однак точний механізм того, як ці процеси імунологічно регулюються, досі невідомий, тому подальші дослідження мають бути проведені для вивчення цього процесу.

Висновок

Доведено позитивний вплив внутрішньоматкового застосування МКПК на частоту імплантації ембріонів у кріопротокolah у пацієнток із численними невдалими спробами ЕКЗ. Частота імплантації серед жінок віком від 39 років у кріопротокolah є значно вищою за умови введення МКПК до моменту перенесення ембріонів ($p < 0,001$). Показано перспективність методу внутрішньоматкового введення МКПК з метою формування повноцінного «вікна імплантації» серед пацієнток старшої вікової групи з повторними невдалими спробами ЕКЗ.

Список використаної літератури:

- Sharon-Weiner M., Gluska H., Farlandasky-Gershenabel S. et al. (2020) Conception after early IVF pregnancy loss: should we wait? *Reproductive BioMedicine Online*, 42 (2): 413–419. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.10.019>
- Robinson G.E. (2014) Pregnancy loss. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 28:169–178. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.08.012>
- Khalil A., Syngelaki A., Maiz N. et al. (2013) Maternal age and adverse pregnancy outcome: a cohort study. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 42:634–643. DOI: <https://doi.org/10.1002/uog.12494>
- Schumacher A., Zencius A. (2019) Human Chorionic Gonadotropin-Mediated Immune Responses That Facilitate Embryo Implantation and Placentation. *Front. Immunol.*, 10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02896>
- Csabai T., Pallinger E., Kovacs A.F. et al. (2020) Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice. *Front. Immunol.*, 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00349>
- Robertson S.A., Care A.S., Moldenhauer L. (2018) Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.*, 128(10): 4224–4235. DOI: [10.1172/JCI122182](https://doi.org/10.1172/JCI122182)
- Mor G., Cardenas I., Abrahams V., Guller S. (2011) Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x>
- Griffith O.W., Chavan A.R., Protopapas S. et al. (2017) Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction. *PNAS*, 114 (32): E6566–E6575. DOI: <https://orcid.org/0000-0001-9703-7800>
- Парницька О.І. (2013) Порушення формування «вікна імплантації» у пацієнток із ріперпластичними процесами ендометрія. *Патологія*, 3: 5–12. DOI: <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2013.3.22349>
- Bellver J., Simon C. (2018) Implantation failure of endometrial origin: what is new? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 30: 229–236. DOI: [10.1097/gco.0000000000000468](https://doi.org/10.1097/gco.0000000000000468)
- Lambalk C.B., Banga F.R., Huirne J.A. et al. (2017) GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Hum Reprod Update*, 23: 560–579. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx017>
- Rienzi L., Gracia C., Maggiulli R. et al. (2017) Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update*, 23 (2): 139–155. DOI: [10.1093/humupd/dmw038](https://doi.org/10.1093/humupd/dmw038)
- Hardarson T., Van Landuyt L., Jones G. (2012) The blastocyst. *Human Reproduction*, 27 (1): i72–i91. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/des230>
- Lan K., Verma S.C., Murakami M. et al. (2007) Isolation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *Curr. Protoc. Microbiol.*, 6: A.4C.1–A.4C.9. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04c6>
- Feskov O., Zhylkova Ye., Feskova A. et al. (2020) Intrauterine administration of peripheral mononuclear cells and platelet-rich plasma in poor endometrium patients with repeated implantation failures. In: Abstracts of the 2-nd IVF-worldwide online Congress in Reproductive Medicine, September 12–13, p. 15.
- Зерова-Любимова Т.Е., Горovenko Н.Г. (2003) Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації. Київ, 25 с.
- Shaffer K.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (2009) ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger, 138 p.
- Атраментова Л.О., Утевська О.М. (2007) Статистичні методи в біології: підруч. для студ. біол. спец. вищих навч. закладів. Харків, 286 с.
- Vomstein K., Voss P., Molnar K. et al. (2020) Two of a kind? Immunological and clinical risk factors differ between recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *J. Reprod. Immunol.*, 141: 103166. DOI: [10.1016/j.jri.2020.103166](https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103166)
- Huang J., Qin H., Yang Y. et al. (2017) A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproduction*, 153(6): 749–758. DOI: [10.1530/REP-16-0574](https://doi.org/10.1530/REP-16-0574)

The effect of intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells on the frequency of embryo implantation in patients with numerous unsuccessful in vitro fertilisation attempts

O.M. Feskov¹, Ye.S. Zhylkova¹, H.V. Nesteruk¹, O.M. Zozulina², O.V. Blazhko¹

¹Centre of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.», Kharkiv, Ukraine

²Centre of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.» (Kyiv branch), Kyiv, Ukraine

Abstract. The effect of intrauterine administration of freshly isolated peripheral blood mononuclear cells on the implantation rates and pregnancy rates in fresh cycles and cryoprotocols in patients with repeated in vitro fertilisa-

tion failures was studied. The clinical pregnancy rate was significantly higher in the cryoprotocol in women over the age of 39 after administration of peripheral blood mononuclear cells ($p < 0.001$). The results confirm the significant role of the immune system in the processes of embryo implantation and early pregnancy, in particular, the influence of the immune system on the «implantation window».

Відомості про авторів:

Феськов Олександр Михайлович — доктор медичних наук, професор, директор Центру репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.», Харків, Україна. ORCID: 0000-0003-3626-0229

Жилкова Євгенія Станіславівна — кандидат біологічних наук, завідувач біотехнологічної лабораторії Центру репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.», Харків, Україна. ORCID: 0000-0002-5706-3577

Нестерук Ганна Володимирівна — лікар-репродуктолог відділення ЕКЗ Центру репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.», Харків, Україна. ORCID: 0000-0001-5000-6484

Зозуліна Олександра Миколаївна — медичний директор Центру репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.» (київська філія), Київ, Україна
Блашко Олена Василівна — кандидат медичних наук, лікар-репродуктолог відділення ЕКЗ Центру репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.», Харків, Україна. ORCID: 0000-0001-5048-7273

Адреса для кореспонденції:

Жилкова Євгенія Станіславівна
61098, Харків, вул. Холодногірська, 15
E-mail: ievgeniia.zhyolkova@gmail.com

The perspective of the method of intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells in order to increase the implantation rate among the patients of older age group with ≥ 2 unsuccessful in vitro fertilisation attempts is proven.

Key words: IVF, implantation rate, peripheral blood mononuclear cells, clinical pregnancy.

Information about the authors:

Feskov Oleksandr M. — Doctor of Medicine, Professor, director of the Centre of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.», Kharkiv, Ukraine. ORCID: 0000-0003-3626-0229

Zhyolkova Yevheniia S. — PhD, a head of biotechnological laboratory of the Centre of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.», Kharkiv, Ukraine. ORCID: 0000-0002-5706-3577

Nesteruk Hanna V. — Reproductologist, IVF Department of the Centre of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.», Kharkiv, Ukraine. ORCID: 0000-0001-5000-6484

Zozulina Oleksandra M. — Medical director, the Centre of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.» (Kyiv branch), Kyiv, Ukraine

Blazhko Olena V. — PhD, Reproductologist, IVF Department of the Centre of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.», Kharkiv, Ukraine. ORCID: 0000-0001-5048-7273

Address for correspondence:

Yevheniia Zhyolkova
61098, Kharkiv, Holodnogorskay str., 15
E-mail: ievgeniia.zhyolkova@gmail.com

Надійшла до редакції/Received: 24.06.2022

Прийнято до друку/Accepted: 13.07.2022