



О. К. Доронина¹ Э. Н. Дейлидко²

¹ ФГАОУ ВО РУДН, Москва

² Московская академическая клиника ЭКО (МАК ЭКО), Москва

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ АУТОПЛАЗМЫ В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА

Ключевые слова: бесплодие, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), хронический эндометрит, обогащенная тромбоцитами аутоплазма (PRP)

Относительная частота бесплодия в супружеских парах варьирует от 15 до 25% и зависит от многих факторов. По мнению экспертов ВОЗ, превышение этим показателем отметки 15% может отразиться на демографической ситуации в стране. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) на современном этапе — один из наиболее эффективных методов преодоления супружеского бесплодия. Цель данного исследования — оценить эффективность применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в циклах ЭКО у пациенток с хроническим эндометритом в анамнезе.

В связи с остротой проблемы бесплодия к ее решению привлечено внимание различных специалистов, занимающихся разработкой новых технологий лечения: акушеров-гинекологов, урологов, андрологов. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) на современном этапе — один из наиболее эффективных методов преодоления супружеского бесплодия. Частой причиной снижения результативности ЭКО может быть недостаточность эндометрия (рефрактерный эндометрий, гипоплазированный эндометрий, синдром Ашермана) и его нечувствительность из-за перенесенного хронического субклинического эндометрита, повторных выскабливаний матки, консервативной миомэктомии, а также в связи с другими заболеваниями [1, 2, 3, 4].

Недавние исследования показали высокую распространенность у бесплодных пациенток хронического эндометрита — до 46%, а также его взаимосвязь с рецидивирующим абортom и повторной имплантационной недостаточностью [5, 6]. Проблема лечения хронических эндометритов сохраняет свою актуальность в связи с недостаточной эффективностью существующих методов лечения и неизвестной длительностью заболевания. Несмотря на широкий спектр применяемых вариантов консервативного лечения (антибиотики, синтетические эстроген-гестагенные препараты), результат их остается относительно невысоким, что ограничивает или снижает эффективность методов лечения бесплодия, в том числе и

вспомогательных репродуктивных технологий. Новыми в лечении данного заболевания представляются разрабатываемые методы регенеративной медицины, а одним из наиболее доступных и перспективных на сегодняшний день считается применение плазмы, обогащенной тромбоцитами (platelet-rich plasma, или PRP) [7]. Плазма, обогащенная тромбоцитами — аутологичный биотерапевтический препарат периферической крови, который оказывает регенеративное действие на поврежденные ткани за счет повышенного содержания факторов роста, противовоспалительных цитокинов, антимикробных субстанций, содержащихся в тромбоцитах и выделяющихся в процессе их активации [8]. При лечении эндометрита эффект заживления связывают с наличием среди растворимых факторов тромбоцитов трансформирующего ростового фактора — (TGF- β 1 и TGF- β 2), тромбоцитарных ростовых факторов (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB), инсулиноподобного фактора роста 1

(IGF-I), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста фибробластов (FGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Эти факторы роста действуют синергически, предотвращая апоптоз клеток, оказывая противовоспалительный эффект и содействуя ангиогенезу [9]. Лабораторные тесты показали жизнеспособность тромбоцитов в препаратах, полученных с помощью изделий медицинского назначения RegenLab. Тромбоциты функционально активны на протяжении более 4 часов и сохраняют способность к агрегации, экспрессии CD62P на мембране (P-Селектин) и устойчивость к гипотоническому стрессу (Biobridge Foundation, 2015). Еще одна особенность метода — очистка PRP на 99,9% от клеток, представляющих собой потенциальные источники нежелательных реакций. Клеточно-селективная мембрана позволяет удалить более чем 99,7% эритроцитов и свыше 88% лейкоцитов, преимущественно гранулоцитов. Поскольку плазму, обогащенную тромбоцитами, по-

лучают из аутологичной крови, то риск передачи болезней, иммунногенных реакций минимизирован. Имеются исследования, доказывающие эффективность данного продукта при заживлении ран и регенерации тканей в ортопедии, стоматологической практике, офтальмологии, реконструктивной хирургии. Исследования, проведенные на коровах, показали, что аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами, вызывает восстановление рецепторов к прогестерону, пролиферацию клеток эндометрия, подавление воспаления, спровоцированного бактериальными эндотоксинами [10]. В клинических наблюдениях показано, что PRP оказывает лечебное действие на эндометрий женщин при синдроме Ашермана и восстанавливает его нормальную гистологическую структуру и функцию [11]. Это связывают со способностью аутологичной PRP стимулировать рост эндометрия, повышать чувствительность к гормонам и способность к имплантации, улучшать васкуля-

Таблица

Концентрации и функциональная активность основных факторов роста, входящих в состав PRP, получаемой с помощью изделий медицинского назначения RegenLab® [28]

Наименование факторов	Концентрации	Характеристика функциональной активности
PDGF — тромбоцитарный фактор роста	12,71 ng/ml	Активация миграции и пролиферации ММСК, фибробластов, гладкомышечных клеток, остеобластов; активация миграции моноцитов, макрофагов, нейтрофилов; активация макрофагов
TGF- β 1 — трансформирующий фактор роста	67,37 ng/ml	Индукция синтеза МКМ, регуляция пролиферации кератиноцитов и стимуляция продукции коллагена
VEGF — фактор роста эндотелия сосудов	0,87 ng/ml	Стимуляция пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза, стимуляция лимфоангиогенеза, повышение проницаемости сосудистой стенки
EGF — эпидермальный фактор роста	0,93 ng/ml	Стимуляция пролиферации эпителиальных, мезенхимальных клеток и фибробластов; стимуляция миграции и пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза; регуляция продукции коллагена
FGF — основной фактор роста фибробластов	0,06 ng/ml	Индукция пролиферации фибробластов; стимуляция роста эндотелиальных клеток; стимуляция ангиогенеза
IGF — инсулиноподобный фактор роста	82,22 ng/ml	Стимуляция пролиферации фибробластов, синтез коллагена

Несмотря на недолгую историю развития этого направления применение PRP можно рассматривать как эффективное средство восстановления функции эндометрия для обеспечения имплантации зародыша при проведении процедуры экстракорпорального оплодотворения

ризацию эндометрия, оказывать противовоспалительное и антибактериальное действие, стимулировать эндометриальные стволовые клетки. Установлено, что лучшие терапевтические результаты по сравнению с высококонцентрированными препаратами характерны для PRP с концентрацией тромбоцитов, превышающей физиологическую не более чем в 2,5 раза. В связи с этим на сегодняшний день в качестве оптимальной для PRP-терапии рассматривают физиологическую концентрацию тромбоцитов от 1,5 до 2,5X концентрации в образце цельной крови. Следует отметить, что содержание факторов роста, выделяемых тромбоцитами, высоко варьирует у разных индивидов и всегда пропорционально количеству тромбоцитов. Разработка специальных пробирок компанией RegenLab (Швейцария) позволила достичь высокой сохранности жизнеспособности тромбоцитов и максимальной концентрации факторов роста в препаратах PRP

(это подтверждено результатами иммуноферментного анализа), что обеспечивает максимальную реализацию биологических эффектов. Несмотря на недолгую историю развития этого направления применение PRP можно рассматривать как эффективное средство восстановления функции эндометрия для обеспечения имплантации зародыша при проведении процедуры ЭКО [12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы провели собственные исследования по изучению возможности применения аутологичной PRP с целью повышения эффективности процедур ЭКО при бесплодии у женщин с хроническим эндометритом в анамнезе. В исследовании было включено 73 пациентки с бесплодием, ассоциированным с хроническим эндометритом, у которых имелись показания для ЭКО. Исследование проводилось на базе УЗ Клинический родильный дом № 2 г. Минска. Дизайн

планируемых исследований был рассмотрен и одобрен этической комиссией Клинического родильного дома № 2, протокол № 9 от 16.01.2017 года.

Критерии включения: пациентки репродуктивного возраста с бесплодием и хроническим эндометритом в анамнезе, подтвержденным морфологически, взятые в цикл ЭКО.

Критерии исключения: пациентки с низким качеством эмбрионов. Все пациентки, включенные в исследование, подписывали информированное согласие на применение аутологичной PRP в цикле ЭКО.

При проведении исследования использовались следующие методы: клинический, инструментальный, лабораторный, статистический. Дизайн исследования: выборочное, проспективное.

На 6–9-й день менструального цикла с помощью аспирационного зонда «Юнона» или катетером Пайпеля выполнялась аспирационная биопсия эндометрия. Морфологическое исследование эндометрия проводилось двумя методами: световая микроскопия мазка и иммуногистохимия. В гистологических ответах пациенток, взятых в исследование, присутствовали следующие изменения: наличие лимфоидных инфильтратов, состоящих преимущественно из лимфоидных элементов, расположенных вокруг желез и кровеносных сосудов у 49 (67,1%) пациенток; в ряде случаев — у 37 (50,7%) — с «лимфоидными фолликулами». Фиброз стромы отмечался у 15 (20,5%), склероз стенок спиральных артерий эндометрия — у 24 (32,9%) пациенток. Указанные морфологические изменения отмечались в различных сочетаниях, что морфологически подтверждало перенесенный хронический эндометрит. Методом иммуногистохимических исследований определялась экспрессия

CD138 (кластер дифференциации 138 — мембранный белок, использующийся в качестве иммунологического маркера плазматических клеток).

Все пациентки с хроническим эндометритом были пролечены курсом противовоспалительной терапии согласно действующим протоколам, и через 2–3 месяца после лечения выполнялась повторная аспирационная биопсия эндометрия с последующим морфологическим исследованием.

По критериям включения и исключения были сформированы две группы наблюдения. Пациенткам обеих групп стимуляция яичников проводилась с применением длинных и коротких протоколов контролируемой овариальной стимуляции, в зависимости от показаний и сопутствующей гинекологической патологии. Перенос эмбрионов осуществлялся как в лечебных циклах стимуляции яичников, так и в криоциклах.

Первую группу (I) составили пациентки, которым в циклах стимуляции не вводилась аутологичная PRP (n=43). Эта группа стала группой сравнения для второй группы пациенток.

Вторую группу (II) составили пациентки (n=30), которым на 6–10-й день стимулированного или синхронизированного цикла в асептических условиях без обезболивания внутриматочно вводился препарат аутологичной PRP, приготовленный с помощью набора пробирок для забора крови Regen BCT-SP производства RegenLab SA для получения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы с пролонгированной дегрануляцией тромбоцитов, обеспечивающей максимальный эффект регенерации тканей.

Приготовление препарата PRP для II группы проводилось с помощью набора пробирок для забора крови Regen BCT-SP производства

RegenLab SA. Это пробирки для получения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы с пролонгированной дегрануляцией тромбоцитов и максимальным эффектом регенерации тканей.

Вакуумная пробирка выполнена из медицинского боросиликатного стекла и содержит тиксотропный запатентованный инертный сепарирующий гель. Из 8 мл цельной крови получается 4–5 мл А-PRP с содержанием в получаемом препарате плазмы не менее 80–90% жизнеспособных тромбоцитов из количества, содержащегося в образце цельной крови. Такие уровни извлечения функционально активных тромбоцитов достигаются благодаря свойствам сепарационного геля RegenLab. Удельная плотность геля позволяет сохранить в плазме крови тромбоциты и максимальный уровень концентрации факторов роста.

Методика приготовления препарата PRP с помощью набора пробирок для забора крови Regen довольно проста: медсестра (или врач) вскрывает стерильный набор в присутствии пациента и производит забор венозной крови с помощью иглы-«бабочки», поочередно соединяемой с вакуумными пробирками из набора. После этого на область забора крови накладывается стерильная повязка. Пробирки после их заполнения необходимо 3 раза слегка прокрутить вокруг горизонтальной оси для полного перемешивания крови и антиагреганта, затем их аккуратно устанавливают в центрифугу, закрывают, центрифугируют в течение 5 минут на скорости 1500g. Процесс приготовления PRP в пробирке Regen не зависит от навыков оператора, поэтому гарантирует воспроизводимость описанных выше характеристик. При изготовлении PRP в замкнутой системе из 8 мл крови пациента получают 4–5 мл стерильной и безопасной PRP.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием непараметрических методов ввиду отсутствия согласия данных с нормальным распределением (критерий Шапиро-Уилка). При проведении статистического анализа для описания количественных признаков использовали метод описательной статистики с расчетом медианы (Me), интерквартильный размах (25-й и 75-й процентиля), данные представлены в виде Me (25%; 75%). Общее межгрупповое различие для качественных признаков рассчитывали с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) с поправкой Йейтса на непрерывность, для малых выборок использовали точный критерий Фишера. Шансы возникновения изучаемого события в группах оценивали по отношению шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p=0,05$). Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием лицензионного пакета прикладных программ «Statistica 10».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В I группе (ЭКО без применения PRP, 43 пациентки) и во II группе (ЭКО с применением PRP, 30 пациенток) преобладали женщины в возрастной группе до 35 лет, удельный вес которых в каждой из групп составил 53,5% и 65,0% соответственно. С учетом того, что после 28–30 лет у женщин начинается снижение синтеза половых стероидных гормонов, оказывающих непосредственное влияние на процессы, связанные с фертильностью, мы приняли решение представить непрерывные количественные данные, отражающие возраст пациенток, в виде порядковых категорий. Критерием выбора диапазона значений в рамках каждой из них явился четырехлет-

ний возрастной интервал (28–31; 32–35; 35–38). Сформированные группы были однородны по возрасту ($\chi^2=2,31$, $p=0,13$). Средний же возраст исследуемых в группе ЭКО без применения плазмы (I группа) составил 34,4 года (32,8–35,9), с применением плазмы (II группа) — 33,0 года (32,2–33,9).

Хронический эндометрит у пациенток обеих групп был подтвержден морфологически. Все пациентки прошли курс лечения хронического эндометрита согласно действующим клиническим протоколам. Через 2–3 месяца после лечения проводилась контрольная аспирационная биопсия эндометрия. Остаточные морфологические признаки эндометрита были выявлены у 27 (62,8%) пациенток I группы и у 18 пациенток (61,0%) II группы. В I группе 27 (63%) пациенткам на пятые сутки были перенесены эм-

брионы на стадии бластоцисты, а 16 (37%) пациенткам — на третьи сутки на стадии дробления. Один эмбрион был перенесен 16 пациенткам (37,2%) I группы, два эмбриона — 27 (62,7%) из этой группы. Во II группе 16 пациенткам (53,3%) были перенесены эмбрионы на пятые сутки на стадии бластоцисты, и 14 пациенткам (46,6%) на третьи сутки на стадии дробления. По количеству попыток в обеих группах анализ статистических данных не выявил значимых различий. Один эмбрион был перенесен 12 (40,0%) пациенткам, два эмбриона — 18 (60,0%) пациенткам. В группе без применения плазмы медиана составила 1,6 (1,4–1,8), в группе с применением плазмы — 1,8 (1,5–2,1). У пациенток из II группы, для приготовления препарата PRP которым применялись пробирки Regen BCT-SP, удельный вес пациенток

с наступившей (клинической) беременностью составил 66,7% (20 пациенток). В группе ЭКО без применения плазмы (I группа) удельный вес женщин с наступившей беременностью составил 32,6% (14 из 43 пациенток): 7% — с биохимической и 25,6% с клинической. Следует отметить, что удельный вес женщин с наступившей беременностью статистически значимо выше (Chi-square test: $\chi^2_{\text{да-нет}}=12,45$; $p=0,0004$) в группе пациенток с применением плазмы, чем в группе пациенток без применения плазмы. Установлено также, что частота родов в группе пациенток с применением плазмы составила 41,3 (95% ДИ 31,2–51,4) случая в расчете на 100 пациенток и была статистически значимо выше (Chi-square test: $\chi^2=8,26$; $p=0,004$; $t=3,28$; $p<0,05$), чем в группе без применения плазмы, — 16,3 (95% ДИ 5,2–27,3) случая в расчете на 100 пациенток.

Наши исследования показывают, что использование аутоплазмы, обогащенной растворимыми ростовыми факторами тромбоцитов (PRP), воздействует на процессы воспаления и репарации структур эндометрия. Ростовые факторы тромбоцитов, выброс которых происходит из везикулярно-тубулярной системы тромбоцитов, оказывают местный противовоспалительный и регенераторный эффект на поврежденный хроническим воспалением эндометрий. Наши клинические наблюдения показывают, что локальное применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, повышает частоту успешной имплантации эмбриона при проведении процедуры экстракорпорального оплодотворения на 15–25% по сравнению с традиционными протоколами.

Аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами, при местном введении в полость матки женщинам с бесплодием, ассоциированным с хроническим эндометритом, улуч-

Аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами, при местном введении в полость матки женщинам с бесплодием, ассоциированным с хроническим эндометритом, улучшает пролиферацию и рецептивность эндометрия, тем самым значительно улучшая исходы экстракорпорального оплодотворения

шает пролиферацию и рецептивность эндометрия, тем самым значительно улучшая исходы ЭКО.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты формируют новое отношение к внедрению в практику современных методов регенераторной медицины, модифицирующих циклы ЭКО и, несомненно, повышающих их эффективность. Простота получения препарата из аутоплазмы периферической крови пациентки, отсутствие побочных эффектов, возможность сочетания с препаратами стимуляции яичников, высокая эффективность, применение непосредственно в циклах стимуляции и простота введения дают данной методике возможность претендовать на включение в протоколы ЭКО в циклах стимуляции у женщин с хроническим эндометритом в анамнезе.

Литература

1. Спирина Ю.В., Евтушенко И.Д. Подготовка пациенток, страдающих хроническим эндометритом, к программам вспомогательных репродуктивных технологий // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 23 (4). С. 84–86.
2. Takebayashi A., Kimura F., Kishi Y., Ishida M., Takahashi A. et al. . The Association between Endometriosis and Chronic Endometritis // PLoS ONE. 2014. № 9(2). e88354. doi:10.1371/journal.pone.0088354.
3. Сухих Г.Т., Чернуха Г.Е., Табеева Г.И., Горюнов К.В., Силачев Д.Н. Современные возможности клеточной терапии синдрома Ашермана // Акушерство и гинекология. 2018. № 5. С. 20–28.
4. Kitaya K., Yasuo T. Immunohistochemical and clinicopathological characterization of chronic endometritis // American Journal of Reproductive Immunology. 2011. Vol. 66. P. 410–415.
5. Lessey B.A. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception // Steroids. 2003. Vol. 68. P. 809–815.
6. Nazari L., M.D., Salehpour S., M.D., Hoseini S., M.D., Zadehmodarres S., M.D., Ajori L. Effects of autologous platelet-rich plasma on implantation and pregnancy in repeated implantation failure: A pilot study // Int J Reprod BioMed. 2016 Oct. Vol. 14. № 10. P. 625–628.

7. Маринкин И.О., Трунченко Н.В., Волчек А.В., Агеева Т.А., Никитенко Е.В., Макаров К.Ю., Кулешов В.М., Омигов В.В., Айдагулова С.В. Маркеры воспаления в нормальном и тонком эндометрии при хроническом эндометрите // Акушерство и гинекология. 2018. № 2. С. 65–73.
8. Pietrzak W.S., Eppley B.L. Platelet rich plasma: biology and new technology // J Craniofac Surg. 2005. № 16. P. 1043–1054.
9. Marini M.G., Perrini C., Esposti P., Corradetti B., Bizzaro D., Riccaboni P. et al. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro // Reprod Biol Endocrinol. 2016. № 14. P. 58–75.
10. Polisseni F., Bambirra E.A., Camargos A.F. Detection of chronic endometritis by diagnostic hysteroscopy in asymptomatic infertile patients // Gynecol Obstet Investig. 2003. № 55. P. 205–210.
11. Zadehmodarres S., Salehpour S., Saharkhiz N., Nazari L. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study // JBRA Assisted Reproduction. 2017. № 21. P. 54–56.
12. Pietrzak W.S., Eppley B.L. Platelet rich plasma: biology and new technology // J Craniofac Surg. 2005. № 16. P. 1043–1054.
13. Доронина О. К., Дейлидко Э. Н., Мордус О. Н. Применение плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов у женщин в циклах ЭКО // Медицинский журнал. 2018. № 4. С. 53–57.

