

ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ У ЖЕНЩИН В ЦИКЛАХ ЭКО

«Белорусский государственный медицинский университет»,
УЗ «Городской клинический родильный дом № 2»*

Актуальность проблемы бесплодного брака не вызывает сомнения. По данным ВОЗ, частота бесплодных браков колеблется в широких пределах и не имеет тенденции к снижению. При этом в настоящее время растет число проводимых программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Одной из причин неудач имплантации эмбрионов в программах ВРТ является патология эндометрия, в том числе и хронический эндометрит (ХЭ). В статье описана методика введения в полость матки аутологичной плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов в циклах ЭКО с целью повышения результативности ЭКО за счет восстановления механизма нормального функционирования базального и функционального слоев эндометрия у пациенток с хроническими эндометритами в анамнезе [1].

Плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), является аутологичным биотерапевтическим препаратом периферической крови, оказывающим регенеративное действие на поврежденные ткани за счет содержания факторов роста, противовоспалительных цитокинов, антимикробных субстанций [2]. При лечении эндометрита эффект заживления связывают с наличием в ПОРФТ трансформирующего ростового фактора β (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 синергетически, предотвращая апоптоз клеток, оказывая противовоспалительный эффект и содействуя ангиогенезу [3].

Исследование проведено у 137 пациенток репродуктивного возраста с бесплодием в циклах ЭКО. На 6–9 день стимулированного цикла женщинам, в анамнезе у которых был хронический эндометрит, внутриматочно вводилась аутоплазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов. Результативность метода оценивалась по биохимической и клинической беременности с положительным анализом крови β -ХГЧ через 2 недели после пере-

носа эмбрионов и наличие сердцебиения плода трансвагинальным УЗИ в сроке беременности 5 нед. 5 дней.

Ключевые слова: бесплодие, BPT, хронический эндометрит, аутоплазма.

O. K. Doronina, E. N. Deilidka, O. N. Mordus

**APPLICATION OF PLASMA ENRICHED
IN SOLUBLE FACTORS PLATELETS
IN WOMEN IN IVF CYCLES**

The urgency of the problem of infertile marriage is not in doubt. According to who, the frequency of infertile marriages varies widely and has no tendency to decrease. At the same time, the number of assisted reproductive technology (art) programmes is increasing. The effectiveness of the treatment methods of art is growing from year to year.

One of the reasons for the failure of embryo implantation in art programs is the pathology of endometrium, including chronic endometritis (CE).

The article describes the technique of introducing into the uterine cavity autologous plasma enriched with soluble platelet factors in IVF cycles in order to increase the effectiveness of IVF by restoring the mechanism of normal functioning of the basal and functional layers of the endometrium in patients with chronic endometritis in the anamnesis.

Rich plasma soluble platelet factors (PORT) is autologous biotherapeutic drug peripheral blood, providing a regenerative effect on damaged tissue due to the content of growth factors, inflammatory cytokines, antimicrobial substances [2]. In the treatment of endometritis. the healing effect is associated with the presence in the PORT of transforming growth factor β (TGF- β 1 and TGF- β 2), thrombocytic growth factors (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB), insulin-like growth factor 1 (IGF-I), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF). These growth factors act synergistically, preventing cell apoptosis, providing an anti-inflammatory effect and promoting angiogenesis [3].

The study was conducted in 137 patients of reproductive age with infertility in IVF cycles. On the 6–9 day of the stimulated cycle, women with a history of chronic endometritis were intramuscularly injected with autoplasm enriched with soluble platelet factors. The effectiveness of the method was evaluated by biochemical pregnancy and clinical pregnancy with a positive blood test β -HCG 2 weeks after embryo transfer and the presence of fetal heartbeat by transvaginal ultrasound in 5 weeks 5 days.

Key words: infertility, art, chronic endometritis, autoplasm.

Одной из ведущих проблем охраны репродуктивного здоровья является проблема бесплодия.

По данным специальных исследований, число бесплодных браков достигает 20 %, однако, некоторые международные эксперты приводят цифру 24–25 %. По результатам медицинской статистики удельный вес бесплодных супружеских пар в Республике Беларусь составляет 15 %. По данным Министерства здравоохранения Республики Беларусь в стране зарегистрировано 9856 случаев женского бесплодия и 1794 мужского. Впервые данный диагноз установлен 2912 женщинам и 473 мужчинам. Бесплодие влияет не только на демографические показатели, но и на увеличение числа разводов, снижает социальную адаптацию. Недавние исследования показали высокую распространенность у пациентов с бесплодием хронического эндометрита – до 46 % [4] и его взаимосвязь с рецидивирующим абортom и повторной имплантационной недостаточностью [6]. Помимо этого, новыми клиническими исследованиями показано, что значительная роль в снижении вероятности успеха оплодотворения при ЭКО принадлежит эндометриозу, который также сопровождается хроническим эндометритом в 53 % слу-

чаев [5]. Есть сведения о том, что хронический эндометрит как причина бесплодия был диагностирован у около 40 % пациенток с повторными проблемами имплантации эмбриона после ЭКО, у 30 % пациентов с необъяснимым бесплодием и у 12 % пациенток с необъяснимыми повторными абортами. Увеличение количества пациенток, страдающих бесплодием, наблюдается, главным образом, за счет хронических эндометритов с субклиническим течением, большинство из которых являются неспецифическими, и поиск возбудителя обычно не требуется [6]. Бесплодие неясного генеза также сопровождается структурно-функциональными изменениями эндометрия со снижением его рецептивности, что препятствует успешному наступлению и развитию беременности. Терапия бесплодия относится к числу сложных и не решенных до конца проблем практической гинекологии, что еще более подчеркивает важность поиска современных эффективных методов лечения. Несмотря на широкий спектр применяемых вариантов консервативного лечения этой патологии (антибиотики, синтетические эстроген-гестагенные препараты) эффект их остается относительно невысоким, что ограничивает или делает

неэффективным применение различных методов лечения бесплодия, в том числе и вспомогательных репродуктивных технологий [11]. Существующие консервативные методы лечения хронических эндометритов не обеспечивают полного устранения местных морфологических проявлений заболевания, не обеспечивают длительных ремиссий, требуют продолжительных сроков лечения – иногда до 3-х курсов антибиотикотерапии. Для лечения также часто используется комплексная терапия, включающая гормональную и противовоспалительную терапию, редко – факторы роста. Эффективного лечения этих состояний до настоящего времени не разработано. Новым подходом в лечении данного заболевания представляются вновь разрабатываемые методы регенеративной медицины, из которых одним из наиболее доступных и перспективных на сегодняшний день считается применение плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) в последние годы широко вошли в практику во многих развитых странах мира, в том числе и в Республике Беларусь. Они во многом заменили малоэффективные традиционные методы лечения и вывели проблему бесплодия из тупика, позволив добиться беременности у большого числа супружеских пар, ранее обреченных на бездетность. Огромное количество ученых разных стран пытаются найти факторы достоверно прогнозирующие результаты вспомогательных репродуктивных технологий, для того, чтобы найти ключ к решению проблемы неэффективного лечения бесплодия [10]. Наличие внутриматочной патологии является независимым фактором риска бесплодия, увеличивающим его вероятность в четыре раза. Эти данные подтверждают существующее мнение о ключевой роли эндометрия в имплантации и плацентации. Наступление беременности сопряжено с важнейшим биологическим процессом ангиогенеза, с которым связано нормальное развитие сосудистой сети плаценты, опосредующей формирование маточно-плацентарной циркуляции [3]. Следовательно, очевидна необходимость морфофункциональной оценки эндометрия у женщин с бесплодием и привычным самопроизвольным выкидышем. Хронический эндометрит – это клинкоморфологический синдром, при котором в результате персистирующего повреждения эндометрия инфекционным или другим повреждающим агентом возникают множественные вторичные морфофункциональные изменения, нарушающие циклическую трансформацию и рецептивность слизистой оболочки тела матки. При хроническом эндометрите в эндометрии пациенток, страдающих бесплодием, экспрессия факторов роста снижена, что препятствует успешной имплантации эмбриона [5] и является одной из основных причин бесплодия, неудачных попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Факторы роста участвуют в формировании таких фундаментальных процессов, как рост и дифференцировка клеток, межклеточная кооперация, гемопоз и ангиогенез, образование сосудов *de novo*, являются стимуляторами ангиогенеза и повышают проницаемость сосудов внутри плацентарного ложа, при этом регулируют инвазию,

дифференцировку и метаболическую активность трофобласта в момент плацентации. Ангиогенез – это процесс образования новых кровеносных сосудов из уже существующей сосудистой системы. Он играет важную роль в развитии, нормальном росте ткани, заживлении ран, репродуктивном цикле у женщин (развитие плаценты и желтого тела, овуляция). Выделяют следующие стадии неангиогенеза: увеличение проницаемости эндотелия и разрушение базальной мембраны; миграция эндотелиальных клеток; пролиферация эндотелиальных клеток; «созревание» эндотелиальных клеток и ремоделирование сосудов. Главным механизмом регуляции процессов неангиогенеза является высвобождение ангиогенных факторов, источниками которых могут быть эндотелиальные и тучные клетки, макрофаги и др. Под действием ангиогенных факторов происходит активация эндотелиоцитов (преимущественно в посткапиллярных венулах) и миграция их за пределы базальной мембраны с формированием ответвлений основных сосудов. Предполагается, что в механизме миграции эндотелиоцитов большое значение играет активация экспрессии эндотелиальных молекул адгезии, например, E-селектина. В стабильном состоянии эндотелиоциты не пролиферируют и лишь изредка (1 раз в 7–10 лет) делятся. Под действием ангиогенных факторов роста и цитокинов происходит активация пролиферации эндотелиоцитов, которая завершается ремоделированием сосуда, после чего вновь сформированный сосуд приобретает стабильное состояние. Рост новых сосудов детерминирован балансом между его стимуляторами и ингибиторами. При низком значении соотношения стимуляторов к ингибиторам образования сосудов неангиогенез блокируется или малоинтенсивен, напротив, при высоких значениях соотношения происходит активный запуск неангиогенеза. Стимуляторы неангиогенеза: васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиогенин, эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующие факторы роста α (TGF- α) и β (TGF- β), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), NO, интерлейкин-8 и неспецифические факторы, такие, как матриксные металлопротеиназы (MMPs). Ингибиторы неангиогенеза: эндостатин, растворимые рецепторы VEGF (sVEGFR), тромбоспондин, ангиостатин (фрагмент плазминогена), вазостатин, ингибиторы MMP (TIMP-1, TIMP-2). VEGF – гетеродимерный гликопротеиновый ростовой фактор, продуцируемый различными типами клеток. Идентифицированы, по крайней мере, 5 вариантов VEGF-A: VEGF121, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206. VEGF – потенциальный митоген для эпителиальных клеток сосудов. Он оказывает сильное влияние на проницаемость сосудов, является мощным ангиогенным белком в различных экспериментальных системах, принимает участие в процессах неоваскуляризации в патологических ситуациях. Наблюдается синергизм действия между VEGF и bFGF на индукцию ангиогенеза. Из способности VEGF воздействовать на проницаемость сосудов следует возможность вовлечения этого ростового фактора в изменение функций гематоэнцефали-

ческого барьера в субнормальных и патологических условиях [7]. Получение и применение аутоплазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, – одно из инновационных направлений тканевой инженерии и клеточной терапии, которая привлекает внимание врачей разных специальностей. Тромбоциты обычно известны своей ролью в гемостазе, но они также играют ключевую роль как промежуточное звено в процессе заживления поврежденной ткани за счёт способности выделять из своих α -гранул факторы роста. Тромбоциты содержат пулы хранения факторов роста, включая полученный из тромбоцитов фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), тромбоцитозепидермальный фактор роста (PDEGF), сосудистый фактор эндотелиального роста (VEGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), фибробластический фактор роста (FGF) и эпидермальный фактор роста (EGF). Идея использования аутоплазмы обоснована тем, что она служит носителем полипептидных факторов роста, многие из которых обладают выраженным ангиогенным эффектом. При увеличении концентрации тромбоцитов повышается концентрация факторов роста [8].

Цель исследования. Повысить результативность процедур ЭКО за счет восстановления механизма нормального функционирования базального и функционального слоев эндометрия у пациенток с хроническими эндометритами в анамнезе с применением аутологичной плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов.

Материалы и методы

При проведении исследования использовались следующие методы: клинический, инструментальный, лабораторный, статистический. Исследование: выборочное, проспективное. В исследование было включено 137 пациенток с диагнозом бесплодие, у которых были показания для ЭКО. Исследование проводилось на базе УЗ «Городской клинический родильный дом № 2» г. Минска. Критерии включения: пациентки репродуктивного возраста с бесплодием в циклах ЭКО с подтвержденным морфологически хроническим эндометритом в анамнезе. Критерии исключения составили пациентки с низким качеством эмбрионов. На 6–9 день менструального цикла с помощью аспирационного зонда «Юнона» или пайпель – катетером производилась аспирационная биопсия эндометрия. Морфологическое исследование эндометрия проводилось двумя методами: световая микроскопия мазка и иммуногистохимия. В гистологических ответах преобладали: наличие лимфоидных инфильтратов, состоящих преимущественно из лимфоидных элементов, расположенных вокруг желез и кровеносных сосудов, в ряде случаев с «лимфоидными фолликулами», фиброз стромы, склероз стенок спиральных артерий эндометрия. Методом иммуногистохимии определялась экспрессия CD138 (кластер дифференциации 138: мембранный белок, который используют в качестве иммунологического маркера плазматических клеток) [9]. Было сформировано 2 группы наблюдения. Первую группу (I) составили пациентки, которым не вво-

дилась аутоплазма в циклах стимуляции ($n = 43$). Эта группа являлась группой сравнения для второй группы пациенток. Вторую группу составили пациентки, которым на 6–8 день стимулированного цикла внутриматочно вводилась аутоплазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов ($n = 94$). Приготовление аутоплазмы проходило по следующей методике: Путем забора венозной крови в объеме 9,0 мл в пробирку, которая содержит в качестве антикоагулянта 3,8 % раствор цитрата натрия в количестве 1,0 мл, после чего забранную венозную кровь центрифугировали в течение 10 минут в режиме 1500 оборотов в минуту (286g), затем осуществляли отбор в стерильную пробирку полученной после центрифугирования плазмы и осуществляли её повторное центрифугирование в течение 10 минут в режиме 5000 (2800 g) оборотов в минуту, затем из пробирки удаляли плазму, обедненную тромбоцитами, а оставшуюся обогащенную тромбоцитами плазму набирали посредством стерильного внутриматочного катетера данную субстанцию в шприц в объеме 1,5–2,0 мл и за 5 минут до введения в матку пациентки к аутоплазме добавляли 100 мкл. 10 % стерильного раствора глюконата кальция. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием параметрических и непараметрических методов исследования, в том числе методов описательной статистики, оценки достоверности (критерий Стьюдента; Chi-square, χ^2). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5 % ($p = 0,05$). Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 10».

Результаты и обсуждение

Сформированные группы были однородны по возрасту. Средний возраст исследуемых составил в группе I 34,4 лет (95 % ДИ 32,8–35,9), в группе II – 33,0 (95 % ДИ 32,2–33,9). По количеству попыток в двух группах анализ статистических данных не выявил значимых различий. В группе без применения плазмы средний уровень составил 1,6 (95 % ДИ 1,4–1,8), в группе с применением плазмы 1,8 (95 % ДИ 1,5–2,1). Результаты исследования показали, что в группе пациентов без применения плазмы удельный вес женщин с наступившей беременностью составил 32,6 % (14 из 43). У 67,4 % женщин в группе пациентов без применения плазмы беременность не наступила. В группе пациентов с применением плазмы удельный вес женщин с наступившей беременностью составил 64,9 % (61 из 94), в том числе 12,8 % – с биохимической и 52,1 % с клинической. У 35,1 % женщин в группе пациентов с применением плазмы беременность не наступила. Следует отметить, что удельный вес женщин с наступившей беременностью статистически значимо выше в группе пациентов с применением плазмы, чем в группе пациентов без применения плазмы (32,6 %), и соответственно составляет 64,9 %, причем значительно преобладают клинические беременности.

Таким образом, полученные результаты формируют принципиально новое отношение к внедрению в практику методов лечения непосредственно в циклах

ЭКО, которые несомненно повышают их эффективность. Простота получения аутоплазмы из периферической крови, отсутствие побочных эффектов, возможность сочетания с препаратами стимуляции, высокая эффективность (преобладание клинических беременностей), применение непосредственно в циклах стимуляции, простота введения дают возможность данной методике претендовать на включение в протоколы ЭКО как метод применения в циклах ЭКО у женщин с хроническими эндометриозами в анамнезе.

Литература

1. Спирина, Ю. В., Евтушенко И. Д. Подготовка пациенток, страдающих хроническим эндометритом, к программам вспомогательных репродуктивных технологий // Сибирский медицинский журнал – 2008. – С. 84–85.
2. Sampson, S., Gerhardt M., Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review.
3. Козырева, Е. В., Давидян Л. Ю. Роль факторов роста в патогенезе бесплодия и невынашивания беременности. – Ульяновск: ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет».
4. Спирина, Ю. В., Евтушенко И. Д. Подготовка пациенток, страдающих хроническим эндометритом, к программам вспомогательных репродуктивных технологий // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – С. 84–85.
5. Takebayashi, A., Kimura F., Kishi Y., Ishida M., Takahashi A. et al. (2014). The Association between Endometriosis and Chronic

Endometritis. PLoS ONE 9(2): e88354. doi:10.1371/journal.pone.0088354.

6. Кузнецова, И. В., Землина Н. С., Рашидов М. А. Проблема тонкого эндометрия и возможные пути ее решения // Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, «Эффективная фармакотерапия». «Акушерство и гинекология». – 2011. – № 1 (5).

7. К вопросу о новообразовании сосудов. Кафедра гистологии с курсом эмбриологии (заведующая – проф. И. А. Одинцова) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург. Горбулич А. В. Вопросы морфологии XXI века.

8. Effects of autologous platelet-rich plasma on implantation and pregnancy in repeated implantation failure: A pilot study / M. D. Leila Nazari, M. D. Saghar Salehpour, M. D. Sedighe Hoseini, M. D. Shahrzad Zadehmodarres, Ladan Ajori.

9. Kitaya, K., Yasuo T. Immunohistochemical and clinicopathological characterization of chronic endometritis // American Journal of Reproductive Immunology. – 2011. – Vol. 66. – P. 410–415.

10. Кливленд, Г. О., Ключаров И. В., Дзамуков Р. А., Цибулькина В. Н. Актуальные вопросы диагностики хронического эндометрита // Акушерство и гинекология. Практическая медицина. – 2016.

11. McQueen, D. B., Bernardi L. A., Stephenson M. D. Chronic endometritis in women with recurrent early pregnancy loss and/or fetal demise. Fertil Steril. 2014;101:1026-30. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.031.