

УДК 618.14

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109077>

Научная статья



Клеточная терапия синдрома тонкого эндометрия

Н.И. Тапильская, К.В. Обьедкова, А.М. Гзгзян, О.Н. Беспалова

Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Из известных причин маточного фактора бесплодия наиболее часто выделяют синдром Ашермана или так называемые внутриматочные синехии, хронический эндометрит и гипопластические процессы эндометрия. Синдром тонкого эндометрия характеризуется снижением его толщины до 7 мм и менее в пролиферативную фазу менструального цикла и кратным снижением частоты имплантации эмбриона.

Проведено проспективное открытое исследование по оценке эффективности применения клеточной терапии у пациенток с бесплодием, обусловленным синдромом тонкого эндометрия, и двумя и более неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения. В исследование включены 36 пациенток в возрасте от 28 до 36 лет (средний возраст $34,2 \pm 1,1$ года). Все пациентки получили 3 цикла внутриматочного введения суспензии выделенных аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Для выделения стволовых клеток выполняли забор красного костного мозга в объеме не менее 20 мл из гребня подвздошной кости. Выделение фракции мононуклеарных клеток проводили в градиенте плотности по стандартной методике. Клеточный материал хранился в криовиалах и размораживался непосредственно перед введением. Процедура трансплантации выделенных, но не культивированных клеток проводилась на 5–7-й день менструального цикла.

Толщина эндометрия до и после лечения составила $2,39 \pm 0,64$ и $6,56 \pm 0,94$ мм ($p = 0,0001$) соответственно. Удельный вес пациенток с толщиной эндометрия более 7 мм после лечения составил 77,8 %. Результативность вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с восстановленным клеточной терапией эндометрием ($n = 28$) составила 32,1 %. Иммуногистохимические данные за наличие хронического эндометрита до и после лечения имели место у 22 (61,1 %) и 19 (52,8 %) пациенток соответственно, при этом после лечения установлено значимое снижение количества провоспалительных маркеров.

Ключевые слова: бесплодие; вспомогательные репродуктивные технологии; клеточная терапия; регенеративная медицина; синдром тонкого эндометрия; стволовые клетки костного мозга; хронический эндометрит.

Как цитировать:

Тапильская Н.И., Обьедкова К.В., Гзгзян А.М., Беспалова О.Н. Клеточная терапия синдрома тонкого эндометрия // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2023. Т. 42. № 1. С. 23–28. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109077>

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109077>

Research Article

Cell-based therapy in thin endometrium syndrome

Natalya I. Tapil'skaya, Kseniya V. Ob'edkova, Alexander M. Gzgzyan, Olesya N. Bespalova

Ott Research institute of obstetrics, gynecology and reproductology, Saint Petersburg, Russia

Of the known causes of uterine factor infertility, Asherman's syndrome or the so-called intrauterine synechia, chronic endometritis and endometrial hypoplastic processes are most often distinguished. Thin endometrial syndrome is characterized by a decrease in the thickness of the endometrium to 7 mm or less in the proliferative phase of the menstrual cycle and a multiple decrease in the frequency of embryo implantation.

Numerous treatment strategies have so far been proposed for treating refractory thin endometrium syndrome. Recently, cell therapy has been proposed as an ideal alternative for endometrium regeneration, including the employment of stem cells, platelet-rich plasma, and growth factors as therapeutic agents. Single center, prospective, open-label study of efficacy of cell-based therapy in the complex treatment of thin endometrium syndrome in patients with infertility was conducted. The study involved 36 women aged 28 to 36 years, the middle age was 34.2 ± 1.1 years. All patients included in the study received 3 cycles of intrauterine administration of a suspension of autologous stem cells isolated from bone marrow. Bone marrow was successfully aspirated from the iliac crest in all patients. Mononuclear cells was isolated by density gradient centrifugation according to the standard method. The cell material was cryopreserved and thawed immediately before administration. The procedure for intrauterine transplantation of isolated but not cultured cells was performed on the 5th–7th day of the menstrual cycle. There were no significant adverse events related to harvest or administration. The thickness of the endometrium before and after treatment was 2.39 ± 0.64 and 6.56 ± 0.94 mm ($t = -21.94$, $p = 0.0001$), respectively. The rate of patients with an endometrial thickness of more than 7 mm after treatment was 77.8%. The effectiveness of assisted reproductive technology in patients with normal endometrial ($n = 28$) was 32.1%. Immunohistochemistry confirms the presence of chronic endometritis before and after treatment in 22 (61.1%) and 19 (52.8%) patients, respectively, while after treatment a significant decrease in the levels inflammatory markers was found.

Keywords: assisted reproductive technology; bone marrow stem cells; cell-based therapy; chronic endometritis; infertility; regenerative medicine; thin endometrium.

To cite this article:

Tapil'skaya NI, Ob'edkova KV, Gzgzyan AM, Bespalova ON. Cell-based therapy in thin endometrium syndrome. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2023;42(1):23–28. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109077>

Received: 29.06.2022

Accepted: 14.07.2022

Published: 31.03.2023

АКТУАЛЬНОСТЬ

Численность населения, его структура и репродуктивный потенциал являются важнейшими факторами, определяющими экономическое развитие страны. В настоящее время Российская Федерация находится на краю «демографической пропасти», при этом колоссальные материальные и человеческие ресурсы затрачиваются на преодоления infertility при бесплодном браке [1]. Одним из самых сложных вопросов репродуктивной медицины, за исключением мужского бесплодия, остается маточный фактор женского бесплодия, к которому относится прежде всего синдром тонкого эндометрия¹ [2]. Несмотря на невысокую распространенность данного синдрома, снижение толщины эндометрия до 7 мм и менее уменьшает частоту имплантации эмбриона в 2 раза, а в некоторых случаях делает беременность практически невозможной, вследствие чего в качестве плодовместилища остается только вариант суррогатного материнства [3]. Следует отметить, что, за исключением эстрогенов, в настоящее время нет зарегистрированных лекарственных средств, влияющих на пролиферацию эндометрия [4]. Вариантами лечения, прошедшими проверку временем, остаются рекомбинантный сосудисто-эндотелиальный фактор, проангиогенные генотерапевтические препараты и клеточная терапия [5].

Цель исследования — изучить эффективность инвазивного внутриматочного введения некультивированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на динамику роста эндометрия у пациенток с синдромом тонкого эндометрия и повторными неудачами имплантации в протоколах ЭКО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика итоговой выборки

В исследование включены 36 пациенток в возрасте от 28 до 36 лет (средний возраст $34,2 \pm 1,1$ года) с наличием синдрома тонкого эндометрия и двумя и более неудачными попытками ЭКО. Основным условием для проведения клеточной терапии перед протоколом переноса эмбриона было наличие криоконсервированных эмбрионов высокого качества. У всех пациенток до начала исследования путем трехкратного измерения М-эха диагностирован синдром тонкого эндометрия, при этом у всех них зарегистрирован гипопластический эндометрий, подтвержденный при выполнении гистологического

¹ В англоязычной научной литературе имеется устоявшийся термин thin endometrium, что дословно переводится как «тонкий эндометрий». В русскоязычной научной литературе, клинических рекомендациях в настоящее время нет конкретной дефиниции данному состоянию, однако в обиход врачей акушеров-гинекологов входит понятие синдрома тонкого эндометрия, включающего соответствующие эхографические признаки в сочетании с бесплодием и/или невынашиванием беременности.

исследования биоптата эндометрия. Длительность заместительной терапии эстрогенами составила не менее 6 мес, при этом было зарегистрировано отсутствие ответа на комплексную терапию, включающую помимо терапии эстрогенами физиотерапевтическое лечение.

Забор костного мозга, выделение, хранение и трансплантация стволовых клеток

После подписания информированного согласия всем включенным в протокол женщинам с соблюдением всех стандартных правил асептики и антисептики под местной анестезией выполняли забор красного костного мозга в объеме не менее 20 мл из гребня подвздошной кости вне зависимости от дня менструального цикла. Выделение фракции моноклеарных клеток проводили в градиенте плотности по стандартной методике. Посев, экспансия, криоконсервирование, реинициация клеточной культуры выполнялись согласно стандартным операционным процедурам и протоколам манипуляций с клетками человека. Для реинициации культуры мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), находящиеся в криовиалах, размораживались в водной среде до 37 °С. Клетки ресуспендировались в указанном температурном режиме и помещались в CO₂-инкубатор. По достижении 80 %-ной конфлюэнтности производился сбор клеток. Полученные клетки трехкратно отмывали физиологическим раствором путем центрифугирования и удаления супернатанта ММСК в концентрации 5 млн/мл и в асептических условиях расфасовывались в виалы емкостью 1,0 мл. Следует отметить, что на всех этапах производился забор проб для контроля качества выделенных клеток. Емкости с ММСК транспортировались в перевозных контейнерах для последующего введения пациенткам. Культура ММСК вводилась им внутриматочно [6, 7]. Процедура трансплантации выделенных, но не культивированных клеток проводилась на 5–7-й день менструального цикла. Катетер с заблаговременно набранной суспензией объемом 1 мл, содержащей около 5 млн ММСК, вводился по проводнику в полость матки под эхографической навигацией. Каждой пациентке проводилось 3 введения клеточной суспензии, после чего дважды в течение менструального цикла: на 9–10-й и 19–21-й дни каждого цикла, выполнялось ультразвуковое исследование органов малого таза с определением состояния эндометрия.

Забор эндометрия и иммуногистохимическое исследование

За 1–2 менструальных цикла до начала терапии и на 4-м менструальном цикле от начала терапии на 19–22-й день выполнялась пайпель-биопсия эндометрия с последующим гистологическим исследованием и иммуногистохимическим анализом на определение уровня экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону, а также маркеров хронического воспаления. При получении морфологических и эхографических показателей

Таблица 1. Иммуногистохимические критерии степени выраженности хронического эндометрита

Определяемый антиген	CD8+	CD20+	CD138+	CD4+
Наименование клеточной субпопуляции	Цитотоксические Т-лимфоциты	В-лимфоциты	Плазматические клетки	Т-хелперы
Оцениваемый критерий	Количество клеток в поле зрения			
Норма	До 10	До 3	0	До 10
Слабо выраженный	Увеличение в 2 раза и более		Единичные клетки	Ассоциированы с количеством CD8+
Умеренно выраженный	Увеличение в 3 раза и более		Увеличение в 2–3 раза и более	
Выраженный	Увеличение в 5 раз и более	Увеличение в 4–5 раз и более	Увеличение в 5 раз и более	

эндометрия, приемлемых для проведения подготовки эндометрия в протоколе переноса размороженных эмбрионов, пациентка включается в протокол подготовки эндометрия для переноса размороженного эмбриона в полость матки.

Гистологическое исследование проводили по классической методике на микроскопе Olympus CX31 (Япония) при увеличении $\times 100$, $\times 400$. Для обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин. Иммуногистохимическое исследование выполняли по стандартной схеме с использованием антител к ER, PR, CD4, CD8+, CD20+ и CD138+. Результаты иммуногистохимической реакции оценивались по 3-балльной шкале по методике McCarthy et al. (Hscore) или по удельному количеству клеток (%), экспрессирующих искомым антиген. Степень выраженности хронического эндометрита определяли в соответствии с общепринятыми критериями (см. табл. 1) [7].

Этические правила и нормы

Исследование было проведено в полном соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека», действующими порядками и стандартами оказания медицинской помощи и другими применимыми регуляторными требованиями к проведению клинических исследований и наблюдательных программ в Российской Федерации. Протокол наблюдения за пациентками, программа лечения и обследования были одобрены локальным этическим комитетом. С учетом отсутствия этапа культивирования ММСК исследование не подпадало под действие Федерального закона РФ от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

Используемые методы описательной статистики

В статистическом анализе описание количественных признаков, соответствующих нормальному распределению, представлено в виде среднего значения и стандартного квадратичного отклонения, признаки, отличающиеся от нормального распределения, — в виде медианы

(с указанием границ доверительного интервала), качественные признаки представлены в виде долей (%) абсолютных чисел. Распределение признака в группах определяли по тесту Харке–Бера. Сравнение количественных признаков (толщина эндометрия до и после лечения) в группе выполнялось в зависимости от варианта распределения признака: *t*-теста Стьюдента при нормальном распределении признака, *U*-критерия Манна–Уитни — при ненормальном. Соотношение частот при расщеплении признаков в группах проводилось с использованием критерия χ^2 (хи-квадрат) К. Пирсона. Во всех случаях критический уровень значимости принимался при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все пациентки, включенные в исследование, получили 3 цикла внутриклеточного введения суспензии выделенных ММСК. Средние показатели М-эхо эндометрия до и после введения ММСК составили $2,39 \pm 0,64$ и $6,56 \pm 0,94$ мм соответственно (*t*-тест Стьюдента: $t = -21,94$, $p = 0,0001$). Удельный вес пациенток с толщиной эндометрия 7 мм и более составил 77,8 %, именно им впоследствии был проведен модифицированный естественный цикл переноса размороженных эмбрионов. Результативность вспомогательных репродуктивных технологий у данных 28 пациенток была следующей: удельный вес наступления клинической беременности составил 32,1 % (9 пациенток), однако только у 21,6 % (6 пациенток) беременность достигла срока 12 нед.

При сравнении экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену в железистом и стромальном компонентах эндометрия до и после лечения статистически достоверных различий выявлено не было. Иммуногистохимические данные за наличие хронического эндометрита до и после лечения имели место у 22 (61,1 %) и 19 (52,8 %) пациенток соответственно, при этом после лечения у оставшихся 19 пациенток установлено диагностически значимое (5-кратное) снижение количества провоспалительных маркеров — цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), В-лимфоцитов (CD20+) и плазмоцитов в стромальном

Таблица 2. Показатели хронического эндометрита до и после клеточной терапии

Показатель	До лечения n (%)	После лечения n (%)	χ^2	p
Удельный вес хронического эндометрита	22 (61,1)	19 (52,8)	0,227	0,635
Изменение интенсивности воспаления на фоне лечения	–	12 (54,5 %*)	2,100	<0,001
Степень выраженности хронического эндометрита				
Выраженный	11 (50,0)	2 (10,5)	5,627	0,018
Умеренно выраженный	7 (31,8)	10 (52,6)	1,063	0,303
Слабо выраженный	4 (18,1)	7 (36,8)	0,983	0,322

Примечание. * — от первичного количества пациенток с ХЭ (n = 22).

компоненте эндометрия в 9 случаях (47,4 %), в 3 случаях (15,8 %) отмечено 3-кратное снижение экспрессии провоспалительных маркеров (табл. 2).

ВЫВОДЫ

Применение 3 введений выделенных, но не культивированных аутологичных ММСК для лечения синдрома тонкого эндометрия приводило к достоверному увеличению его толщины, снижению экспрессии маркеров аутоиммунного воспаления, а также по своей эффективности превосходит все имеющиеся средства медикаментозного и/или комплексного лечения, при которых ответ на лечение не превышает 5 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тапильская Н.И., Будилова О.В., Крысанова А.А., и др. Микробиота эндометрия женщин с хроническим эндометритом и идиопатическим бесплодием // *Акушерство и гинекология*. 2020. № 4. С. 72–81.
2. Тапильская Н.И., Гзгзян А.М., Коган И.Ю. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор как ключевой регулятор инвазивного потенциала эмбриона и рецептивности эндометрия // *Журнал акушерства и женских болезней*. 2019. Т. 68, № 1. С. 83–92.
3. Тапильская Н.И., Джемлиханова Л.Х., Крихели И.О., и др. Комбинированное применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора у пациенток с повторными неудачами имплантации // *Проблемы репродукции*. 2020. Т. 26, № 2. С. 62–68.
4. Abuwala N., Tal R. Endometrial stem cells: origin, biological function, and therapeutic applications for reproductive disorders // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2021. Vol. 33, No. 3. P. 232–240. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000702

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Финансирование данной работы проводилось в рамках фундаментальной научной темы, № гос. регистрации 122041500061-8.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта (протокол № 11/10 от 11.10.2021).

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

5. Тапильская Н.И. Роль иммунной системы в патогенезе невынашивания беременности. Предпосылки для фармакологической коррекции // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2002. Т. 1, № 2. С. 15–26.
6. Кузнецова И.В., Землина Н.С., Мусина Р.А. и др. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток с целью восстановления эндометрия у пациенток со сниженной фертильностью // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2019. Т. 18, № 6. С. 34–40. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-6-34-40
7. Gharibeh N., Aghebati-Maleki L., Madani J. et al. Cell-based therapy in thin endometrium and Asherman syndrome // *Stem. Cell Res. Ther.* 2022. Vol. 13, No. 1. P. 33. DOI: 10.1186/s13287-021-02698-8
8. Толибова Г.Х., Траль Т.Г., Клещев М.А. Эндометриальная дисфункция: алгоритм клинико-морфологического исследования. Санкт-Петербург, 2016. 44 с.

REFERENCES

1. Tapil'skaya NI, Budilovskaya OV, Krysanova AA, et al. Endometrial microbiota of women with chronic endometritis and idiopathic infertility. *Obstetrics and Gynecology*. 2020;(4):72–81. (In Russ.) DOI:10.18565/aig.2020.4.72.81
2. Tapil'skaya NI, Gzgzian AM, Kogan IY. Granulocyte colony-stimulating factor as a checkpoint of the embryo invasive potential and endometrial receptivity. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2019;68(1):83–92. (In Russ.) DOI: 10.17816/JOWD68183-92

3. Tapil'skaya NI, Dzhemlikhanova LKh, Krikheli IO, et al. Combined use of granulocyte colony stimulating factor in repeated implantation failure. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2020;26(2):62–68. (In Russ.) DOI: 10.17116/repro20202602162
4. Abuwala N, Tal R. Endometrial stem cells: origin, biological function, and therapeutic applications for reproductive disorders. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2021;33(3):232–240. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000702
5. Tapil'skaya NI. The role of the immune system in the pathogenesis of miscarriage. Prerequisites for pharmacological correction. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*. 2002;1(2):15–26 (In Russ.)
6. Kuznetsova IV, Zemlina NS, Musina RA, et al. The use of autologous mesenchymal stem cells for endometrial repair in patients with lower fertility. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology*. 2019; 18(6): 34–40. (In Russ.) DOI: 10.20953/1726-1678-2019-6-34-40
7. Gharibeh N, Aghebati-Maleki L, Madani J, et al. Cell-based therapy in thin endometrium and Asherman syndrome. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):33. DOI: 10.1186/s13287-021-02698-8
8. Tolibova GK, Tral' TG, Kleshchev MA. *Endometrial dysfunction: an algorithm for clinical and morphological studies*. Saint Petersburg; 2016. 44 p. (In Russ.)

ОБ АВТОРАХ

***Наталья Игоревна Тапильская**, докт. мед. наук профессор, заведующая отделом репродуктологии; адрес: Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская ул., д. 3; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5309-0087>; eLibrary SPIN: 3605-0413; Author ID: 167924; e-mail: tapnatalia@yandex.ru

Ксения Владимировна Обедкова, канд. мед. наук, научный сотрудник отдела репродуктологии; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2056-7907>; eLibrary SPIN: 2709-2890; Author ID: 1048781; e-mail: obedkova_ks@mail.ru

Александр Мкртичевич Гзгзян, докт. мед. наук, руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3917-9493>; eLibrary SPIN: 6412-4801; Author ID: 231438; e-mail: iagmail@ott.ru

Олеся Николаевна Беспалова, докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6542-5953>; Researcher Author ID: D-3880-2018; eLibrary SPIN: 4732-8089; e-mail: shiggerra@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

***Natalya I. Tapil'skaya**, M.D., D.Sc. (Medicine), Professor, the Head of Reproductology Department; address: 3, Mendeleevskaya str., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5309-0087>; eLibrary SPIN: 3605-0413; Author ID: 167924; e-mail: tapnatalia@yandex.ru

Kseniya V. Ob'edkova, M.D., Ph.D. (Medicine), research scientist of Reproductology Department; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2056-7907>; eLibrary SPIN: 2709-2890; Author ID: 1048781; e-mail: obedkova_ks@mail.ru

Alexander M. Gzgzyan, M.D., D.Sc. (Medicine), the Head of Assisted Reproductive Technologies Department; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3917-9493>; eLibrary SPIN: 6412-4801; Author ID: 231438; e-mail: iagmail@ott.ru

Olesya N. Bespalova, M.D., D.Sc. (Medicine), Professor, Deputy director for science; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6542-5953>; Researcher Author ID: D-3880-2018; eLibrary SPIN: 4732-8089; e-mail: shiggerra@mail.ru