

АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ

УДК 618

Аутоиммунные маркеры, прогнозирующие эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий

Г. Х. Сафарян¹, Л. Х. Джемлиханова^{1,2}, И. Ю. Коган^{1,2},
Д. А. Ниаури^{1,2}, О. Н. Беспалова^{1,2}, А. М. Гзгзян^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3

² Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Для цитирования: Сафарян Г.Х., Джемлиханова Л.Х., Коган И.Ю., Ниаури Д.А., Беспалова О.Н., Гзгзян А.М. Аутоиммунные маркеры, прогнозирующие эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. 2022. Т. 17. Вып. 4. С. 238–253. <https://doi.org/10.21638/spbu11.2022.401>

Существуют данные о том, что результативность протоколов экстракорпорального оплодотворения у пациенток с носительством антитиреоидных антител значительно ниже, чем у женщин, негативных на антитела. Однако существуют и противоположные данные об отсутствии эффекта антитиреоидных антител на исходы лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. В проспективное исследование включено 90 пациенток с бесплодием, проходящих лечение методами вспомогательных репродуктивных технологий. С помощью иммуноферментного анализа фолликулярная жидкость, полученная в день трансвагинальной пункции фолликулов, была исследована на наличие антител к тиреопероксидазе и тиреоглобулину. В основную группу (n = 45) вошли женщины с верифицированным диагнозом аутоиммунного тиреоидита и определяемыми в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости уровнями антител. Группа сравнения представлена 45 женщинами с отсутствием аутоиммунного поражения щитовидной железы. В основной группе отмечены достоверно более низкие показатели овариального резерва относительно группы сравнения. Установлено, что содержание антител к тиреопероксидазе в фолликулярной жидкости негативно ассоциировано с количеством двупронуклеарных зигот. Более того, сывороточные уровни антител к тиреопероксидазе более 305 МЕ/мл достоверно ассоциированы с возрастанием частоты субоптимального ответа на контролируруемую овариальную

стимуляцию и снижением частоты клинической беременности в программах экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: антитела, АТ-ТРО, ЭКО/ИКСИ, субоптимальный ответ, эмбрионы, клиническая беременность.

Введение

Несмотря на широкое внедрение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), по различным сведениям, частота бесплодия в супружеских парах составляет 8–15 % [1–3].

Существуют многочисленные данные, указывающие на то, что аутоиммунные процессы могут влиять на фертильность и проявляться в виде бесплодия или потери беременности. Предполагается, что большое количество аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку, антифосфолипидный синдром и тиреодит Хашимото, могут вызывать бесплодие и потерю беременности через различные механизмы. Примечательно, что снижение женской фертильности может обнаруживаться при бессимптомном носительстве аутоантител, независимо от клинических проявлений аутоиммунного заболевания. Аутоиммунитет может оказывать влияние на все звенья репродуктивной системы, приводя к яичниковой недостаточности, многочисленным неудачам имплантации и потере беременности.

В последние годы особенно актуальной становится проблема сопутствующих аутоиммунных заболеваний при бесплодии, особенно аутоиммунного тиреодита, что, возможно, объясняется фактом более частой встречаемости данной патологии среди женщин репродуктивного возраста [4]. Гипотиреоз представляет наиболее распространенную патологию щитовидной железы среди субфертильных женщин, а также среди женщин с диагнозом бесплодия.

Наиболее частой причиной гипотиреоза является аутоиммунный тиреодит, при котором аутореактивный процесс направлен против непосредственной ткани щитовидной железы. Гистологически данный процесс характеризуется мононуклеарной инфильтрацией, преимущественно лимфоцитарной, в результате которой происходит замещение функционирующей гормонально активной ткани щитовидной железы на фиброзную. Вышеперечисленное приводит к постепенному снижению функции органа, что сопровождается рядом осложнений. По различным данным, встречаемость аутоиммунного тиреодита среди женщин детородного возраста достигает 15 % [4; 5]. Диагностическими маркерами заболевания служат определяемые сывороточные титры аутоантител против тиреопероксидазы (ТПО) и тиреоглобулина (ТГ) [6]. Выделяют манифестный гипотиреоз, лабораторными признаками которого являются повышение сывороточных значений тиреотропного гормона (ТТГ) более 10 мМЕ/л, снижение свободных фракций тироксина (FT4) и трийодтиронина (FT3), а также клинически менее выраженный субклинический гипотиреоз, при котором происходит изолированное повышение уровня ТТГ при неизменных показателях тиреоидных гормонов [5]. Частота субклинического гипотиреоза в популяции составляет около 5–10 %, изолированного носительства антитиреоидных аутоантител — 8–14 % среди женщин репродуктивного возраста [6].

Рядом авторов были получены данные о снижении результативности программ по лечению бесплодия при наличии циркулирующих антитиреоидных

аутоантител [7–11]. Однако, несмотря на многочисленные исследования в области иммунологии репродукции в течение уже трех десятилетий, на сегодняшний день сведения о значении аутоантител к ткани щитовидной железы в репродуктивной функции женщины и их значении в эффективности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО или ЭКО/ИКСИ) характеризуются разрозненностью и неоднозначностью, что диктует необходимость дальнейшего изучения данной проблемы.

Методы исследования

На базе Отделения вспомогательных репродуктивных технологий Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта было обследовано 90 пациенток (заведующий отделением — д-р мед. наук, проф. А. М. Гзгзян) с сентября 2019 г. по апрель 2021 г. Проведение исследования было одобрено локальной комиссией по этике медицинских исследований Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта (выписка № 107 от 15.03.2021 г.). Работа представляет собой проспективное когортное исследование сравнительного характера.

Основная группа — женщины с бесплодием различного генеза и верифицированным диагнозом аутоиммунного тиреоидита в состоянии эутиреоза с определяемыми уровнями антител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО) и антител к тиреоглобулину (АТ-ТГ) более 60 МЕ/мл ($n = 45$), группа сравнения — женщины с бесплодием различного генеза в состоянии эутиреоза без аутоиммунного тиреоидита ($n = 45$).

Критерии включения в исследование:

- возраст от 20 до 40 лет;
- показания для лечения бесплодия различного генеза методами ЭКО (ЭКО/ИКСИ);
- овариальная стимуляция в коротком протоколе ЭКО с применением антагонистов ГнРГ;
- значения антимюллерова гормона (АМГ) выше 1,0 нг/мл;
- значения ТТГ менее 2,5 мМЕ/л;
- диагностические титры определяемых аутоантител в крови АТ-ТПО и/или АТ-ТГ более 60 МЕ/мл;
- согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения женщин из исследования:

- индекс массы тела менее 18 кг/м² и более 35 кг/м²;
- прочие заболевания эндокринной системы (помимо аутоиммунного тиреоидита);
- наружный генитальный эндометриоз III–IV степени распространенности;
- оперативные вмешательства на яичниках;
- оперативные вмешательства на щитовидной железе;
- нефертильная сперма у партнера (критерии Всемирной организации здравоохранения 2010 г.);
- аномальный кариотип одного из супругов.

Стандартное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, согласно приказу Минздрава № 107 от 30.08.2012 г., необходимое для начала лечения бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения, проводилось всем больным, включенным в исследование.

У всех включенных в исследование женщин проводился анализ соматического, акушерско-гинекологического анамнеза и анализ ранее проведенного лечения бесплодия и его результативности. Особое внимание уделяли оценке структуры экстрагенитальных заболеваний в анамнезе, а также перенесенных гинекологических заболеваний и методов их лечения. Стандартные объективный осмотр, осмотр и пальпация молочных желез, осмотр наружных половых органов были проведены всем пациентам.

Гормональное обследование перед началом лечения бесплодия включало определение всем женщинам сывороточного содержания фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), антимюллерова гормона, пролактина на 2–5-й день спонтанного менструального цикла методами иммуноферментного и иммунохемилюминисцентного анализов. Определение в сыворотке крови ТТГ, FT₄, АТ-ТПО и АТ-ТГ проводилось вне зависимости от дня менструального цикла иммуноферментным и иммунохемилюминисцентным анализом.

Овариальная стимуляция овуляции у всех женщин, включенных в исследование, проводилась по «гибкому» протоколу с применением препаратов — антагонистов гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ). Протокол стимуляции начинался со 2–3 дня менструального цикла препаратами рекомбинантных и/или мочевых гонадотропинов. Выбор стартовой дозы препаратов определялся возрастом пациентки, индексом массы тела и показателями овариального резерва в индивидуальном порядке.

При помощи ультразвукового мониторинга проводили оценку темпа роста фолликулов и эндометрия. При достижении лидирующим фолликулом диаметра 13–14 мм начинали ежедневные подкожные инъекции антагонистов ГнРГ до дня введения триггера овуляции включительно.

При средних размерах трех лидирующих фолликулов более 17 мм применяли триггер созревания ооцитов — препарат хорионического гонадотропина человека или препараты агониста ГнРГ. В день трансвагинальной пункции с помощью специальной вакуумной помпы Cook Aspiration Unit под эхографическим контролем проводили забор ооцитов через задний свод влагалища. Процедура выполнялась амбулаторно в условиях кратковременного внутривенного наркоза.

После попадания в стерильные, заранее подогретые пробирки аспирированная фолликулярная жидкость в кратчайшие сроки передавалась эмбриологу. Найденные ооцит-кумулюсные комплексы переносили в приготовленную накануне чашку Петри диаметром 35 мм и после обрезания основной массы кумулюса помещали в инкубатор со стабильными показателями температуры (37 °С) и рН среды. В зависимости от показателей эякулята определяли метод оплодотворения.

При нормозооспермии (согласно критериям ВОЗ) через 3–5 часов после пункции производили оплодотворение методом ЭКО. При отклонении показателей спермограммы от нормы применяли технику ИКСИ. При наличии в перивителлиновом пространстве полярного тельца, свидетельствующего о завершении процессов созревания и достижении им стадии метафазы второго мейотического деления (МII), миоцит считали зрелым.

Показателем нормального оплодотворения служило наличие двух пронуклеусов (2PN), такие зиготы назывались двупронуклеарными. Критериями качества эмбрионов на третьи сутки эмбрионального развития служили скорость дробления, степень фрагментации, форма, симметричность и относительные размеры бластомеров. Для третьего дня культивирования оптимален 8-клеточный эмбрион с равными одноядерными бластомерами и фрагментацией менее 10 % [12].

Качество эмбрионов на четвертые сутки развития оценивали по степени компактизации бластомеров [13]. Морулы категории Grade 3 и 4 считали эмбрионами оптимального качества.

Оценку морфологии эмбрионов на пятые сутки проводили по классификации Гарднера. В данной классификации степень экспансии (развития) и хетчинга бластоцисты имеет цифровое выражение от 1 до 6, качество внутренней клеточной массы и трофобластической оболочки — буквенное (A, B, C, D по убыванию). Эмбрионами оптимального качества на пятый день культивирования считали бластоцисты не менее 3BB [14].

Перенос в полость матки на 3–5-е сутки культивирования не более двух эмбрионов осуществляли индивидуально под ультразвуковым контролем с применением катетеров Wallace или Cook. Оставшиеся морфологически качественные эмбрионы подвергались криоконсервации методом витрификации.

Для посттрансферной поддержки применялись прогестагенные препараты и/или препараты прогестерона («Утрожестан» производства Besins Healthcare SA, Бельгия; «Крайнон» производства Serono Limited, Великобритания; «Дюфастон» производства Abbott Healthcare Products B. V., Нидерланды).

Получение фолликулярной жидкости осуществляли при аспирации в день трансвагинальной пункции фолликулов. Только образцы, не содержащие примеси крови, использовались для анализа. После выделения ооцита фолликулярную жидкость центрифугировали при 2000 g (g — единица относительного центробежного ускорения, гравитационная постоянная, равная 980 м/с²) при комнатной температуре в течение 15 минут. Аликвотированные образцы фолликулярной жидкости отбирали в стерильные промаркированные пробирки Eppendorf в объеме 0,5–0,6 мл и хранили при температуре –80 °С до проведения измерений. В день проведения анализа фолликулярной жидкости все образцы подвергались размораживанию при комнатной температуре.

Для количественного определения содержания аутоантител к тиреопероксидазе и тиреоглобулину класса IgG в фолликулярной жидкости применяли метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих иммуноферментных наборов (E01T0531, E01T0767; BlueGene, Китай). В состав каждого набора входили 96-луночные полистироловые планшеты. Процедура количественного измерения аутоантител проводилась в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителей наборов.

Полученные результаты титров антител в фолликулярной жидкости в единицах измерения нг/мл были конвертированы в МЕ/мл, с использованием стандартных коэффициентов конвертации для каждого вида аутоантител.

Оценивали частоту субоптимального (менее 9 ооцитов в день трансвагинальной пункции (ТВП)) и оптимального (9–15 ооцитов в день ТВП) ответа яичников на контролируемую овариальную стимуляцию (КОС), количество зрелых ооцитов

МП, количество двупронуклеарных (2PN) зигот, количество эмбрионов оптимального качества на 3, 4 и 5-й дни культивирования, количество криоконсервированных эмбрионов, толщину эндометрия на момент переноса эмбрионов и частоту имплантации.

Доля зрелых ооцитов определялась отношением ооцитов на стадии МП к общему числу полученных ооцитов пациентки. Частота оплодотворения вычислялась отношением диплоидных зигот к общему числу полученных ооцит-кумулюсных комплексов. Частота имплантации определялась как отношение визуализируемых плодных яиц к количеству перенесенных в полость матки эмбрионов. Основными параметрами, по которым оценивали клиническую эффективность протоколов, являлись частота клинической беременности и частота живорождений на начатый цикл ЭКО. Статистический анализ данных проведен на индивидуальном компьютере с помощью Microsoft Excel и прикладных программ Statistica для Windows v.10.0, Statistical Package for the Social Sciences (США).

В каждой исследуемой группе распределение данных на нормальность определяли при помощи критерия Шапиро — Уилка. При помощи критерия Левена оценивали однородность дисперсий. Переменные с ненормальным распределением представлены как медиана (Me), нижний и верхний квартили — LQ и UQ.

Для расчета межгрупповых различий использовали методы непараметрической статистики, а именно критерий Манна — Уитни (для сравнения данных в двух группах). С целью сравнения качественных результатов и выявления достоверных различий между ними использовали критерий χ^2 , при малых выборках критерий рассчитывался с поправкой Йейтса либо использовался двусторонний точный критерий Фишера.

Для анализа взаимосвязи между отдельными показателями использовали ранговую корреляцию Спирмена (Rs).

Связь между исходом и фактором риска вычислялась с помощью определения отношения шансов (ОШ) с приведенным 95-процентным доверительным интервалом (ДИ).

Построение линейной модели связи между набором предикторов в фолликулярной жидкости и зависимыми переменными эффективности контролируемой овариальной стимуляции осуществляли с помощью множественной линейной регрессии. Логистическая регрессия использовалась для выявления диагностически значимых показателей, предсказывающих вероятность отсутствия параметров, характеризующих эффективность лечения бесплодия.

При величине p-value < 0,05 отличие принимали за статистически значимое, < 0,01 — очень значимое, < 0,001 — максимально значимое.

Результаты

Общая характеристика включенных в исследование женщин представлена в табл. 1. Согласно полученным данным, пациентки обеих групп были сопоставимы по возрасту, индексу массы тела, возрасту менархе. Сравнение регулярности и количественных характеристик менструального цикла в исследуемых группах статистически значимых различий не выявило.

Таблица 1. Сравнительная характеристика возрастных, антропометрических и количественных параметров менструальной функции обследованных женщин

Параметр	Основная группа (n = 45)		Группа сравнения (n = 45)		p-value
	Me	LQ/UQ	Me	LQ/UQ	
Возраст, лет	35	31/37	33	31/36	0,3
Индекс массы тела, кг/м ²	24	21/28	23	21/27	0,5
Менархе, лет	13	12/14	13	12/14	0,2
Продолжительность менструации, дни	4	3/5	4	3/5,5	0,3
Регулярный менструальный цикл (28–32 дня), n/%	43	95,6	42	93,3	0,6

Примечание: использованы U-критерий Манна — Уитни и критерий χ^2 Пирсона; различия в группах значимы при $p < 0,05$.

Таблица 2. Характеристика репродуктивной функции обследованных женщин

Параметр	Основная группа (n = 45)		Группа сравнения (n = 45)		p-value
	n	%	n	%	
Бесплодие:					
первичное	20	44,4	27	60,0	0,1
вторичное	25	58,1	18	40,0	0,1
Фактор бесплодия:					
ановуляция	2	4,4	4	8,9	0,4
трубно-перитонеальный	15	33,3	14	31,1	0,8
мужской	22	48,9	25	55,6	0,5
эндометриоз	4	8,9	2	4,4	0,4
неясного генеза	2	4,4	0	0	0,2

Примечание: использованы критерий χ^2 Пирсона, критерий χ^2 Йейтса, двусторонний точный критерий Фишера; различия в группах значимы при $p < 0,05$.

На момент вступления в протокол стимуляции суперовуляции все пациентки с сопутствующими соматическими заболеваниями имели компенсированное состояние. В основной группе соматические заболевания в анамнезе определялись у 48,9 % женщин, в группе сравнения — в 51,1 % случаев ($p = 0,8$). Наиболее распространенными заболеваниями среди исследуемых были доброкачественные опухоли молочных желез (основная группа — 11 из 45 чел. (24,4 %), группа сравнения — 8 из 45 чел. (17,8 %)) и заболевания желудочно-кишечного тракта (в равной степени для женщин обеих групп — 7 из 45 чел. (15,6 %)). При сравнении встречаемости соматических заболеваний в анамнезе у пациенток исследуемых групп статистически значимых различий выявлено не было.

Сравнительный анализ реализации репродуктивной функции среди обследованных, представленный в табл. 2, статистически значимых отличий в обследуемых группах не выявил.

Среди обследованных указание на первичное бесплодие имели 52,3 % (47 из 90 чел.) женщин, вторичное бесплодие встречалось в 47,7 % случаев (43 из 90 чел.).

Женщины обеих групп были сопоставимы по длительности бесплодия (основная группа — 4 (3;5) года, группа сравнения — 4 (3;6) года, $p=0,8$).

Таблица 3. Результаты гормонального обследования женщин обеих групп

Показатель	Основная группа (n = 45)		Группа сравнения (n = 45)		p-value
	Me	LQ/UQ	Me	LQ/UQ	
ФСГ (мМЕ/мл)	7,8	5,7/9,5	6,7	5,3/8,5	0,1
ЛГ (мМЕ/мл)	4,8	3,5/6,9	5,7	4,3/7,4	0,2
ТТГ (МЕ/л)	2,0	1,6/2,2	1,9	1,7/2,3	0,9
FT4 (пмоль/л)	12,4	11,3/13,8	12,0	11,1/14,2	0,5
Пролактин (мкМЕ/мл)	290,1	193,0/442,0	339,5	251,7/430,0	0,3

Примечание: использованы U-критерий Манна — Уитни; различия в группах значимы при $p < 0,05$.

Основными факторами бесплодия у обследованных супружеских пар были: мужской, трубный, эндокринный (ановуляция) и эндометриоз-ассоциированное бесплодие. Достоверных различий по фактору бесплодия между группами не установлено.

Предшествующее лечение бесплодия с применением ВРТ имели 66 из 90 пациенток (73,3%), однако настоящий протокол являлся первым для достоверно большего числа женщин из основной группы относительно группы сравнения (46,7% vs 8,9%, $p=0,0001$).

Всем пациенткам перед началом программы ЭКО было проведено гормональное исследование, результаты которого представлены в табл. 3.

Сравнительный анализ гормонального статуса обследованных женщин на момент начала стимуляции суперовуляции не выявил статистически значимых различий между группами. Следует отметить, что женщины обеих групп были сопоставимы по содержанию ТТГ в сыворотке крови, что обусловлено заместительной терапией (L-тироксин, эутирокс) в постоянном режиме в дозах до 75 мкг/сутки у большинства женщин с аутоиммунным тиреоидитом — 32 из 45 чел. (71,1%).

В основной группе средние сывороточные значения аутоантител к тиреоидной пероксидазе составили 481,8 (269,0; 723,2) МЕ/мл, к тиреоглобулину — 44,0 (15,7; 62,5) МЕ/мл. В группе сравнения значения АТ-ТРО в сыворотке были равны 2,7 (1,0; 8,6) МЕ/мл, уровни АТ-TG не определялись. При количественном определении исследуемых аутоантител в фолликулярной жидкости (FF), полученной в день трансвагинальной пункции фолликулов, у женщин обследованных групп отмечены достоверно значимые различия в их содержании. Средние значения АТ-ТПО в основной группе женщин составили 199,8 (85,9; 298) МЕ/мл, АТ-ТГ — 10,0 (8,6; 15,5) МЕ/мл.

При исследовании корреляционных зависимостей по методу Спирмена была обнаружена прямая корреляционная связь между содержанием АТ-ТПО в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости женщин основной группы ($R_s=0,99$, $p < 0,05$). Аналогичным образом обнаруженные АТ-ТГ в фолликулярной жидкости достоверно коррелировали с сывороточными значениями в основной группе пациенток ($R_s=0,9$, $p < 0,05$).

Оценка показателей овариального резерва среди обследованных женщин выявила достоверное снижение сывороточных значений АМГ среди женщин-носительниц антитиреоидных аутоантител относительно негативных на антитела женщин. В основной группе данный показатель составил 1,7 (1,4; 3,5), в группе сравнения — 3,6 (2,2; 6,3) ($p=0,0007$). При этом достоверных различий в уровне ФСГ между группами отмечено не было.

Также определялось достоверное снижение количества антральных фолликулов, определяемых на 2-й или 3-й день менструального цикла среди носительниц антител относительно негативных на антитела женщин (8 (6; 10) vs 11 (9; 17), соответственно $p=0,00007$) (рис. 1, 2, где тремя звездочками обозначена достоверность $p < 0,001$).

В ходе корреляционного анализа нами была выявлена обратная взаимосвязь между титрами антитиреоидных аутоантител в фолликулярной жидкости и показателями овариального резерва (АМГ, КАФ) ($R_s = -0,3$ и $-0,3$ соответственно; $p < 0,05$). Таким образом, согласно полученным нами данным, у женщин с аутоиммунным поражением щитовидной железы определяется снижение основных параметров овариального резерва.

Во всех случаях стимуляция суперовуляции в программе ЭКО проводилась в «гибком» протоколе с применением антагонистов ГнРГ. Стимуляция препаратами рекомбинантного ФСГ (рФСГ) проводилась 66 женщинам (73,4%), препараты человеческого менопаузальных гонадотропинов (ЧМГ) вводили 11 пациенткам (12,2%), комбинированное применение препаратов рФСГ и ЧМГ имело место в 14,4% случаев (13 чел.). Достоверных различий по использованным для КОС препаратам между группами не выявлено.

Анализ ответа яичников на КОС среди женщин обеих групп определил, что доля пациенток с оптимальным ответом (10–15 ооцитов) оказалась достоверно ниже в основной группе пациенток и составила 24,4% (11 из 45 чел.), в группе сравнения этот показатель был равен 71,1% (32 из 45 чел.) ($p=0,0001$). Напротив, субоптимальный ответ в группе сравнения (менее 9 ооцитов) зафиксирован лишь у 12 из 45 пациенток (26,7%), составив 60,0% (27 из 45 чел.) в основной группе женщин ($p=0,0001$). Применение метода хи квадрат выявило достоверное снижение вероятности оптимального ответа на КОС среди женщин — носительниц антитиреоидных аутоантител относительно негативных на антитела женщин (ОШ 6,55 [ДИ 3,43–12,51], $p < 0,01$).

Для оценки значения определяемых аутоантител в сыворотке крови в прогнозировании субоптимального ответа яичников на КОС был проведен логистический регрессионный анализ, в котором в качестве предикторов рассматривались определяемые в сыворотке аутоантитела к тиреопероксидазе и тиреоглобулину. В результате были выявлены достоверно значимые предсказательные вероятности сывороточных значений АТ-ТРО в отношении снижения количества полученных в день ТВП ооцитов. На основании полученных результатов была получена формула:

$$p = 1 / (1 + \exp(-z)),$$

где p — вероятность субоптимального ответа в программе ЭКО (ЭКО/ИКСИ), $z = -0,218 - 0,002x$, x — сывороточные значения АТ-ТРО, МЕ/мл.

Полученные при использовании модели значения $p < 0,42$ прогнозируют высокую вероятность субоптимального ответа на овариальную стимуляцию. Площадь

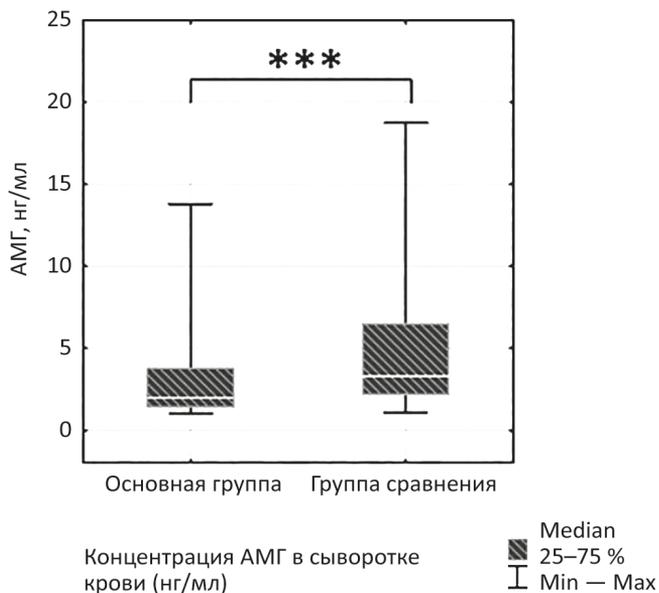


Рис. 1. Сравнительная характеристика сывороточных значений антимюллера гормона (АМГ) в исследуемых группах (использован U-критерий Манна — Уитни; различия в группах значимы при уровне $p < 0,05$)

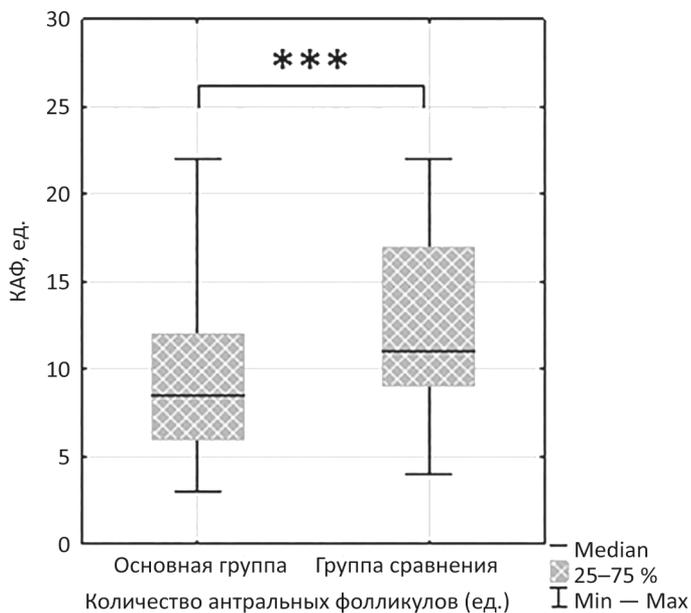


Рис. 2. Сравнительная характеристика количества антральных фолликулов (АФ) в исследуемых группах (использован U-критерий Манна — Уитни; различия в группах значимы при уровне $p < 0,05$)

AUC составила 0,674 (95-процентный доверительный интервал от 0,530 до 0,818), указывая на хорошую точность прогнозирования субоптимального ответа на КОС при использовании данной математической модели.

Оптимальные показатели чувствительности (62,2 %) и специфичности (62,5 %) теста определены для АТ-ТРО $\geq 305,0$ МЕ/мл, в связи с чем данное значение можно считать пороговым уровнем.

В основной группе женщин классическое оплодотворение ооцитов *in vitro* (ЭКО) было проведено 21 женщине (46,7 %), техника интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки (ЭКО/ИКСИ) применялась у 24 пациенток (53,3 %). В группе сравнения методику ЭКО провели 19 супружеским парам (42,2 %), у остальных 26 пациентов (57,8 %) применили технику ИКСИ. Табл. 4 содержит основные эмбриологические характеристики обследуемых групп.

Согласно полученным результатам, количество зрелых ооцитов, двупронуклеарных зигот и морфологически качественных эмбрионов 3-го дня культивирования *in vitro* статистически значимо были ниже в группе пациенток — носительниц антитиреоидных аутоантител относительно негативных на анти-тела женщин.

Кроме того, прослеживалась обратная корреляционная зависимость между аутоантителами к тиреопероксидазе в сыворотке крови и количеством зрелых ооцитов МП ($R_s = -0,3$; $p < 0,05$), количеством двупронуклеарных зигот ($R_s = -0,3$; $p < 0,05$) и количеством эмбрионов оптимального качества на 3-й день культивирования *in vitro* ($R_s = -0,3$; $p < 0,05$).

Доля циклов с эмбриотрансфером в проведенных в рамках исследования программах ЭКО (ЭКО/ИКСИ) составила 90 % (81 из 90 чел.), отмена переноса эмбрионов определялась в 10 % случаев.

Толщина срединного маточного эхо в день переноса была сопоставима между включенными в исследование женщинами, составив $9,9 \pm 1,8$ мм в основной группе пациенток и $9,6 \pm 1,5$ мм в группе сравнения ($p = 0,6$).

В общей сложности частота клинической беременности на цикл экстракорпорального оплодотворения составила 37,8 % (34 из 90 чел.), частота родов живым плодом на начатый цикл ЭКО (ЭКО/ИКСИ) — 27,8 % (25 из 90 чел.). При анализе результативности программ ВРТ у пациенток обследованных групп частота наступления клинической беременности на начатый цикл оказалась ниже в основной группе женщин относительно группы сравнения (24,4 % vs 51,1 %, $p = 0,009$).

Для идентификации концентрации аутоантител с максимальной предиктивной значимостью в прогнозировании результативности программ вспомогательных репродуктивных технологий у женщин — носительниц антитиреоидных аутоантител был использован анализ логистической регрессии, в ходе которого с чувствительностью (60,6 %) и специфичностью (65,0 %) были определены пороговые сывороточные титры АТ-ТРО $\geq 305,0$ МЕ/мл, прогнозирующие отсутствие клинической беременности на цикл ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

Таким образом, сывороточные значения аутоантител к тиреопероксидазе, превышающие значения 305,0 МЕ/мл, являются неблагоприятным фактором для получения оптимального количества ооцитов и наступления клинической беременности в программе ЭКО (ЭКО/ИКСИ).

Таблица 4. Сравнительная характеристика эмбриологических показателей обследованных пациенток

Показатель	Основная группа (n = 45)		Группа сравнения (n = 45)		p-value
	Me	LQ/UQ	Me	LQ/UQ	
Количество зрелых (MII) ооцитов	5	3/9	9	8/11	0,0004*
Количество двупронуклеарных зигот	4	2/7	7	5/9	0,001*
Количество эмбрионов оптимального качества на 3-й день культивирования	3	0/4	3	2/5	0,02**
Количество эмбрионов оптимального качества на 4-й день культивирования	2	0/3	2	1/4	0,2
Количество эмбрионов оптимального качества на 5-й день культивирования	0	1/2	0	2/5	0,04**

Примечание: использованы U-критерии Манна — Уитни, критерий χ^2 Пирсона; различия в группах значимы при уровне $p < 0,05$; * $p < 0,001$; ** $p < 0,05$.

Обсуждение

Преодоление бесплодного брака представляет глобальную медико-социально значимую проблему ввиду прогрессирующего роста бесплодия, что объясняет бурное развитие и широкое внедрение в практику вспомогательных репродуктивных технологий. Тем не менее эффективность программ экстракорпорального оплодотворения не превышает 8,6–46,2 %, в связи с чем высоко актуальным становится определение факторов, влияющих на эффективность лечения методами вспомогательных репродуктивных технологий [15]. Одним из возможных путей повышения эффективности ЭКО является прогнозирование нарушений репродуктивного процесса и определение оптимальной тактики коррекции. В этом плане важное место принадлежит иммунологическим факторам, а именно циркулирующим аутоантителам, вовлеченным в патогенез органоспецифических аутоиммунных заболеваний, таких как аутоиммунный тиреоидит, и оказывающих непосредственное влияние на женскую фертильность.

В соответствии с задачами нашего исследования был проведен анализ протоколов ЭКО (ЭКО/ИКСИ) 90 женщин с бесплодием, 45 из которых имели подтвержденный диагноз аутоиммунного тиреоидита и надпороговые значения анти-тиреоидных аутоантител в сыворотке крови. Набор клинического материала был выполнен в строгом соответствии с критериями включения и исключения. Анализ общеклинических данных по всем критериям не выявил статистически значимых различий, что подтверждает возможность сопоставления обеих групп.

В ходе настоящего комплексного исследования при прочих равных условиях у женщин, участвующих в программах ЭКО (ЭКО/ИКСИ), установлено достоверное снижение основных показателей овариального резерва, а именно сывороточных значений АМГ, и количества антральных фолликулов только среди женщин с аутоиммунным поражением щитовидной железы.

В 2011 г. группой итальянских ученых была выдвинута гипотеза о возможном прямом механизме цитотоксического действия анти-тиреоидных аутоантител на фолликулы и, как следствие, на состояние будущего эмбриона. Авторами впервые было выявлено присутствие АТ-ТПО и АТ-ТГ в фолликулярной жидкости женщин с под-

твержденным диагнозом аутоиммунного тиреоидита и установлено наличие прямой корреляции между сывороточными и фолликулярными уровнями аутоантител [10]. Таким образом, исследователи сделали заключение о способности свободного прохождения аутоантител к ткани щитовидной железы через гемато-фолликулярный барьер и предположили, что названные аутоантитела обладают способностью связываться непосредственно с антигенами *zona pellucida*, негативно отражаясь на качестве ооцита и, следовательно, эмбриона. Также более поздние работы ряда авторов [16; 17] продемонстрировали данные о снижении показателя оплодотворения ооцитов, числа эмбрионов оптимального качества и частоты наступления клинической беременности среди женщин — носительниц анти tireоидных аутоантител, несмотря на состояние эутиреоза. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей и позволяют подтвердить предположение о непосредственном влиянии анти tireоидных антител на ооцит и качество предимплантационного эмбриона.

Ряд авторов объясняет нарушение процессов имплантации повышением активности НК-клеток [18; 19]. Была выявлена прямая взаимосвязь между наличием антител к тиреопероксидазе и возрастанием активности НК-клеток, их цитотоксических свойств и преобладанием проинфламаторных реакций среди женщин с бесплодием и повторными неудачами имплантации в протоколах ЭКО. Более того, авторы предполагают, что вышеописанные изменения начинают проявлять себя с ранних стадий заболевания [6; 18]. В ходе нашего исследования мы не проводили целенаправленного изучения состояния эндометрия в обеих клинических группах, но, согласно полученным клиническим результатам, более низкие показатели имплантации отмечены в группе женщин — носительниц анти tireоидных антител относительно группы сравнения.

Полученные достоверно значимые различия в частоте наступления беременности у исследованных групп пациенток свидетельствуют о влиянии аутоантител на клинические исходы программ экстракорпорального оплодотворения.

Исходя из вышесказанного, важным этапом настоящего исследования стала разработка прогностической модели эффективности программ экстракорпорального оплодотворения в зависимости от наличия анти tireоидных аутоантител. С применением логистического регрессионного анализа были выявлены наиболее значимые аутоиммунные маркеры для определения прогноза эффективности цикла ЭКО среди женщин репродуктивного возраста, а именно сывороточные значения аутоантител к тиреопероксидазе.

Исследование уровней аутоантител к тиреопероксидазе, превышение которых с высокой вероятностью прогнозирует отсутствие клинической беременности в цикле ЭКО (ЭКО/ИКСИ), определило значения в сыворотке крови, равные или более 305 МЕ/мл, что согласовывается со значениями указанных маркеров, определенных для прогнозирования снижения эффективности гонадотропной стимуляции яичников. В нашем исследовании показано, что наличие сывороточных титров циркулирующих аутоантител к тиреопероксидазе более 305,0 МЕ/мл приводило к снижению вероятности наступления клинической беременности в цикле ЭКО в 3,23 раза.

Литература

1. Kuharić M., Rozić D., Karner I. Thyroid Autoimmunity and Infertility // SEEMED. 2017. Vol. 1, no. 2. P. 1–10.

2. *Ombelet W., Cooke I., Dyer S., Serour G., Devroey P.* Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries // *Hum. Reprod. Update.* 2008. Vol. 14, no. 6. P.605–621.
3. *Shen X., Mo M.-L., Huang C.-Y., Diao L.-H., Li G.-G., Li Yu.-Ye., Lerner A., Shoenfeld Y., Zeng Y.* Association of serum autoantibodies with pregnancy outcome of patients undergoing first IVF/ICSI treatment: A prospective cohort study // *J.Reprod. Immunol.* 2017. Vol. 122. P.14–20.
4. *Перминова С.Г.* Бесплодие у женщин с заболеваниями щитовидной железы: принципы диагностики, тактика ведения // *Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучение.* 2013. Т.2. С.18–24.
5. *Фадеев В.В.* По материалам клинических рекомендаций по диагностике и лечению заболеваний щитовидной железы во время беременности и в послеродовом периоде Американской тиреоидной ассоциации // *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* 2012. Т.8, № 1. С.7–18.
6. *Сафарян Г.Х., Гзгзян А.М., Джемлиханова Л.Х., Ниаури Д.А.* Результативность протоколов ЭКО/ИКСИ у женщин с субклиническим гипотиреозом и носительством антител к щитовидной железе // *Журнал акушерства и женских болезней.* 2019. Т.68, № 4. С.83–94.
7. *Poppe K., Autin C., Veltri F., Kleynen P., Grabczan L., Rosenberg S., Ameje L.* Thyroid Autoimmunity and ICSI Pregnancy // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018. Vol. 103, no. 5. P.1755–1766.
8. *Vissenberg R., Manders U.D., Mastenbroek S., Fliers E., Afink G.B., Ris-Stalpers C., Goddijn M., Bisschop P.H.* Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorder/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction // *Hum. Reprod. Update.* 2015. Vol. 21, no. 3. P.378–387.
9. *Cline A., Kutteh W.* Is there a role of autoimmunity in implantation failure after in-vitro fertilization? // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2009. Vol. 21. P.291–295.
10. *Monteleone P., Parrini D., Faviana P., Carletti E., Casarosa E., Uccelli A., Cela V., Genazzani A.R., Artini P.G.* Female infertility related to thyroid autoimmunity: the ovarian follicle hypothesis // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011. Vol. 66, no. 2. P.108–114.
11. *Weghofer A., Himaya E., Kushnir V.A., Barad D.H., Gleicher N.* The impact of thyroid function and thyroid autoimmunity on embryo quality in women with low functional ovarian reserve: a case-control study // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015. Vol. 13, no. 1. P.43–49.
12. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting // *Hum. Reprod.* 2011. Vol. 26, no. 6. P.1270–1283.
13. *Tao J., Tamis R., Fink K., Williams B., Nelson-White T., Craig R.* The neglected morula/compact stage embryo transfer // *Hum. Reprod.* 2002. Vol. 17, no. 6. P.1513–1518.
14. *Gardner D.K., Sakkas D.* Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer — a review // *Placenta.* 2003. Vol. 24. P.5–12.
15. *Farquhar C., Marjoribanks J.* Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018. Vol. 8, no. 8. P.CD010537
16. *Zhong Y., Ying Y., Wu H., Zhou C., Xu Y., Wang Q., Li J., Shen X., Li J.* Relationship between Antithyroid Antibody and Pregnancy Outcome following in Vitro Fertilization and Embryo Transfer // *Int. J. Med. Sci.* 2012. Vol. 9. P.121–125.
17. *Medenica S., Garalejia E., Arsic B., Medjo B., Bojovic Jovic D., Abazovic D., Vukovic R., Zarkovic M.* Follicular fluid thyroid autoantibodies, thyrotropin, free thyroxine levels and assisted reproductive technology outcome // *PLoS ONE.* 2018. Vol. 13, no. 10. P.e0206652.
18. *Miko E., Meggyes M., Doba K., Farkas N., Bogar B., Barakonyi A., Szereday L., Szekeres-Bartho J., Mezosi E.* Characteristics of peripheral blood NK and NKT-like cells in euthyroid and hypothyroid women with autoimmunity, experiencing reproductive failure // *J.Reprod. Immunol.* 2017. Vol. 124. P.62–70.
19. *Sokolov D.I., Mikhailova V.A., Agnayeva A.O., Bazhenov D.O., Khokhlova E.V., Bespalova O.N., Gzgzyan A.M., Selkov S.A.* NK and trophoblast cells interaction: cytotoxic activity on recurrent pregnancy loss // *Gynecol. Endocrinol.* 2019. Vol. 35, no. 1. P.5–10.

Статья поступила в редакцию 25 января 2023 г.;
рекомендована к печати 20 февраля 2023 г.

Контактная информация:

Сафарян Галина Хачиковна — канд. мед. наук; Galasaf07@gmail.com
Джемлиханова Ляйля Харрясовна — д-р мед. наук, доц.; dzhemlikhanova_l@mail.ru
Коган Игорь Юревич — д-р мед. наук, чл.-корр. РАН, проф.; ikogan@mail.ru
Ниаури Дариго Александровна — д-р мед. наук, проф.; d.niauri@mail.ru
Беспалова Олеся Николаевна — д-р мед. наук; shiggerra@mail.ru
Гзгзян Александр Мкртичевич — д-р мед. наук, проф.; agzgzyan@hotmail.com

Autoimmune markers in prognosis of Assisted Reproductive Technology efficiency

G. Kh. Safarian¹, L. Kh. Dzemlikhanova^{1,2}, I. Yu. Kogan^{1,2},
D. A. Niauri^{1,2}, O. N. Bespalova^{1,2}, A. M. Gzgzyan^{1,2}

¹ D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproduction,
3, Mendeleevskaya liniya, St. Petersburg, 199034, Russian Federation

² St. Petersburg State University,

7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

For citation: Safarian G. Kh., Dzemlikhanova L. Kh., Kogan I. Yu., Niauri D. A., Bespalova O. N., Gzgzyan A. M. Autoimmune markers in prognosis of Assisted Reproductive Technology efficiency. *Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine*, 2022, vol. 17, issue 4, pp. 238–253. <https://doi.org/10.21638/spbu11.2022.401> (In Russian)

According to reports, the efficiency of IVF/ICSI protocols is decreased in antithyroid antibody-positive patients as opposed to antibody negatives. However, there are opposite data indicating the absence of the antibody's impact on the outcome of infertility treatment with assisted reproductive technologies. The prospective study enrolled 90 patients with infertility undergoing treatment with assisted reproductive technologies. The follicular fluid obtained on the day of oocyte retrieval was evaluated for antithyroid peroxidase and antithyroglobulin antibodies using commercial ELISA kits. The main group (n = 45) included women with verified autoimmune thyroiditis and measurable serum and follicular fluid levels of antithyroid antibodies. The comparison group was represented by 45 women without autoimmune thyroiditis. A reliably lower ovarian reserve parameters was noted in the study group relatively to the comparison group. It has been established that follicular fluid AT-TPO levels are negatively associated with the number of two-pronuclear zygotes. Moreover, the serum levels of AT-TPO $\geq 305,0$ IU/ml are reliably associated with a higher frequency of suboptimal response to COS and lower clinical pregnancy rate in IVF (IVF/ICSI) cycles.

Keywords: antibodies, AT-TPO, IVF/ICSI, suboptimal response, embryos, clinical pregnancy.

References

1. Kuharić M., Rozić D., Karner I. Thyroid Autoimmunity and Infertility. *SEEMEDJ*, 2017, vol. 1, no. 2, pp. 1–10.
2. Ombelet W., Cooke I., Dyer S., Serour G., Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum. Reprod. Update*, 2008, vol. 14, no. 6, pp. 605–621.
3. Chen X., Mo M.-L., Huang C.-Y., Diao L.-H., Li G.-G., Li Yu.-Ye., Lerner A., Shoenfeld Y., Zeng Y. Association of serum autoantibodies with pregnancy outcome of patients undergoing first IVF/ICSI treatment: A prospective cohort study. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, vol. 122, pp. 14–20.
4. Perminova S. G. Infertility in women with thyroid disease: Principles of diagnosis, management. *Akusherstvo i ginekologiya: Novosti. Mneniya. Obuchenie*, 2013, no. 2, pp. 18–24. (In Russian)
5. Fadeev V. V. According to the clinical recommendations of American thyroid association in thyroid pathology diagnosis and treatment during pregnancy and postpartum. *Clinical and experimental thyroidology*, 2012, vol. 1, no. 8, pp. 7–18. (In Russian)
6. Safaryan G. Kh., Gzgzyan A. M., Dzhemlikhanova L. Kh., Niauri D. A. The efficiency of IVF/ICSI protocols in female with subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2019, vol. 68, no. 4, pp. 83–94.
7. Poppe K., Autin C., Veltri F., Kleynen P., Grabczan L., Rosenberg S., Amey L. Thyroid Autoimmunity and ICSI Pregnancy Outcomes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2018, vol. 103, no. 5, pp. 1755–1766.
8. Vissenberg R., Manders U. D., Mastenbroek S., Fliers E., Afink G. B., Ris-Stalpers C., Goddijn M., Bisschop P. H. Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorder/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 2015, no. 21, vol. 3, pp. 378–387.
9. Cline A., Kutteh W. Is there a role of autoimmunity in implantation failure after in-vitro fertilization? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2009, vol. 21, pp. 291–295.

10. Monteleone P, Parrini D, Faviana P, Carletti E, Casarosa E, Uccelli A, Cela V, Genazzani A.R., Artini P.G. Female infertility related to thyroid autoimmunity: the ovarian follicle hypothesis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, vol. 66, no. 2, pp. 108–114.
11. Weghofer A., Himaya E., Kushnir V. A., Barad D.H., Gleicher N. The impact of thyroid function and thyroid autoimmunity on embryo quality in women with low functional ovarian reserve: a case-control study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2015, vol. 13, no. 1, pp. 43–49.
12. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum. Reprod.*, 2011, vol. 26, no. 6, pp. 1270–1283.
13. Tao J., Tamis R., Fink K., Williams B., Nelson-White T., Craig R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 2002, vol. 17, no. 6, pp. 1513–1518.
14. Gardner D.K., Sakkas D. Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer — a review. *Placenta*, 2003, vol. 24, pp. 5–12.
15. Farquhar C., Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2018, vol. 8, no. 8, p. CD010537.
16. Zhong Y., Ying Y., Wu H., Zhou C., Xu Y., Wang Q., Li J., Shen X., Li J. Relationship between Antithyroid Antibody and Pregnancy Outcome following in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *Int. J. Med. Sci.*, 2012, vol. 9, pp. 121–125.
17. Medenica S., Garalejia E., Arsic B., Medjo B., Bojovic Jovic D., Abazovic D., Vukovic R., Zarkovic M. Follicular fluid thyroid autoantibodies, thyrotropin, free thyroxine levels and assisted reproductive technology outcome. *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, no. 10, p. e0206652.
18. Miko E., Meggyes M., Doba K., Farkas N., Bogar B., Barakonyi A., Szereday L., Szekeres-Bartho J., Mezosi E. Characteristics of peripheral blood NK and NKT-like cells in euthyroid and hypothyroid women with autoimmunity, experiencing reproductive failure. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, vol. 124, pp. 62–70.
19. Sokolov D.I., Mikhailova V.A., Agnayeva A.O., Bazhenov D.O., Khokhlova E.V., Bespalova O.N., Gzgzyan A.M., Selkov S.A. NK and trophoblast cells interaction: cytotoxic activity on recurrent pregnancy loss. *Gynecol. Endocrinol.*, 2019, vol. 35, no. 1, pp. 5–10.

Received: January 25, 2023
Accepted: February 20, 2023

Authors' information:

Galina K. Safarian — PhD; Galasaf07@gmail.com

Lyailya Kh. Dzhemlikhanova — MD, Associate Professor; dzhemlikhanova_1@mail.ru

Igor Yu. Kogan — MD, Professor; ikogan@mail.ru

Darico A. Niauri — MD, Dr. Sci. in Medicine, Professor; d.niauri@mail.ru

Olesya N. Bespalova — MD; shiggerra@mail.ru

Alexandr M. Gzgzyan — MD, Dr. Sci. in Medicine, Professor; agzgzyan@hotmail.com