

激光辅助孵化对冻融囊胚移植妊娠结局的影响

刘婷婷¹ 纪冬梅¹ 陈大蔚^{1,2} 陈蓓丽¹ 郝燕¹ 邹薇薇¹ 章志国^{1,2} 曹云霞^{1,2}

摘要 目的 探讨激光打孔法辅助孵化对复苏周期中囊胚移植妊娠结局的影响。方法 收集复苏周期中行囊胚移植患者的568个周期,其中352个周期于冻存囊胚复苏后,行激光打孔辅助孵化后移植(AH组),216个复苏周期囊胚移植未行激光打孔辅助孵化(非AH组);分析两组的生化妊娠率、临床妊娠率、种植率、流产率、继续妊娠率、多胎妊娠率及单卵双胎率。结果 两组患者的年龄、不孕原因、排卵日内膜厚度、平均移植胚胎数组间差异无统计学意义。AH组生化妊娠率、临床妊娠率、种植率、继续妊娠率显著高于非AH组($P < 0.05$),流产率显著低于非AH组($P < 0.05$),多胎妊娠率及单卵双胎率略高于非AH组,但差异无统计学意义。结论 复苏周期囊胚移植前采用激光打孔辅助孵化可以提高妊娠率,降低流产率。

关键词 激光辅助孵化;囊胚培养;临床妊娠;种植率;单卵双胎

中图分类号 R 321.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0749-04

卵母细胞外围的透明带对于早期人类胚胎的形成非常重要,不仅有利于正常受精,还对早期胚胎起到保护作用,防止发生多精受精、胚胎被细菌和真菌污染及生理损伤,保持胚胎的完整性^[1]。透明带随着胚胎的发育发生变化,当胚胎到达囊胚阶段时,透明带会逐渐变薄,为胚胎从透明带中孵出做准备;若孵出过程发生障碍,则意味着着床失败。胚胎在体外培养或者低温贮存过程中,透明带会发生硬化^[2],导致囊胚阶段胚胎孵出失败。研究^[3]证明在体外培养环境下滋养层细胞分泌的透明带溶解酶的数量和质量均下降。体外培养条件下,培养过程中缺乏细胞溶解酶,可使透明带发生硬化。为了解决上述问题,多种多样的辅助孵化技术被广泛地应用于临床。例如使用机械方法、激光或者化学物进行

透明带削薄、透明带打孔、透明带解离^[4]。研究^[5]证实,在移植前使用辅助孵化技术,可以提高临床妊娠率。最近辅助孵化技术对多胎妊娠率和单卵双胎率的影响开始引起人们的关注。应用辅助孵化技术必然会提高多胎妊娠率,虽然大部分多胎是由于移植了多枚胚胎,但有研究^[6]表明单卵双胎率也有所提高。该研究旨在探讨激光辅助孵化对复苏周期囊胚移植临床结局的影响,通过比较生化妊娠率、临床妊娠率、多胎妊娠率及单卵双胎率,进一步评价激光辅助孵化技术在临床中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与器材 促性腺激素释放激素激动剂购自法国 Ipsen Pharma 公司;重组促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 购自瑞士 Merck Serono 公司;人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 购自中国 Livzon Pharmaceutical 公司;戊酸雌二醇购自德国 Bayer 公司;COOK 胚胎培养液、Culture Oil 购自美国 COOK 公司;玻璃化冷冻液、解冻液购自日本 BioPharma 公司;冷冻胚胎载杆购自日本 Cryotop 公司。

1.1.2 主要仪器设备 体视显微镜购自日本 Nikon 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;ZILOS-tk 激光系统购自美国 Hamilton Thorne Biosciences 公司;Galaxy 三气培养箱购自德国 Eppendorf 公司;超声及穿刺取卵系统购自日本 Toshiba 公司。

1.2 病例资料 收集2011年11月~2014年1月在安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心行复苏周期囊胚移植患者的568个周期。其中352个周期于冻存囊胚复苏后,行激光打孔辅助孵化后移植,为激光辅助孵化组(AH组);216个复苏周期囊胚移植未行激光打孔辅助孵化,为非激光辅助孵化组(非AH组)。被排除周期的标准:解冻囊胚过程中囊胚复苏失败;没有后期随访结果。

1.3 方法

1.3.1 促排卵方案 患者均在黄体期使用促性腺激素释放激素激动剂,包括达菲林(3.75 mg/支)、达必佳(0.1 mg/支)。在达到垂体抑制后,开始使

2015-04-14 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金(编号:9021333201)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心;²安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心,合肥 230022

作者简介:刘婷婷,女,硕士研究生;

曹云霞,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: caoyunxia6@126.com;

章志国,男,副研究员,责任作者,E-mail: zzg_100@163.com

用促性腺激素,促性腺激素为果纳芬(75 IU/支)在至少有2个卵泡直径达18 mm时,注射HCG 10 000 IU,34~36 h行阴道B超,引导下取卵。

1.3.2 胚胎培养 根据精子的情况,在取卵后4~6 h行体外受精技术或者卵胞浆内单精子显微注射技术,16~18 h后(即第1天,取卵日被称为第0天)观察受精情况。胚胎培养在卵裂期培养液中。第3天观察胚胎并进行形态学评分,将除异常受精以外的胚胎移至囊胚培养液(COOK,澳大利亚)在囊胚培养液中继续培养2~3 d。

1.3.3 囊胚分级、冷冻及复苏 根据囊胚扩张情况将囊胚分为6级;根据内细胞团和滋养层细胞的细胞数及细胞间紧密程度将内细胞团和滋养层分为3级,即A级、B级、C级。对分级在CC以上的第5天或者第6天囊胚进行玻璃化冷冻。

在囊胚玻璃化冷冻前,先进行激光皱缩,即在內细胞团对侧滋养层细胞数相对较少的细胞连接处激光打孔,观察到滋养层细胞从透明带剥离,放回培养箱内培养5~10 min。冷冻囊胚方法是将囊胚在平衡液中放置5 min,随后转移至冷冻保护液,在1 min内装载到胚胎载杆的叶片上,立刻将载杆叶片浸入液氮中,装好套管,把胚胎保存在液氮中。

胚胎解冻过程:将载杆从液氮中取出,放入解冻液中,将胚胎迅速移至稀释液、洗涤液1、洗涤液2中各3 min后,最后移至解冻移植皿。

1.3.4 激光打孔辅助孵化 倒置显微镜安装ZILOS-tk激光系统,通过匹配软件进行操作。将囊胚放置在37℃热台上,根据激光靶点进行定位。把激光靶点移至內细胞团对侧的透明带,先在透明带上打一个孔径为20 μm的孔,在这个小孔的基础上,把孔径扩大至60 μm(图1)。激光打孔后的囊胚在体积分数6% CO₂、5% O₂、90% N₂三气培养箱中培养,待移植。胚胎复苏后2 h,在倒置显微镜下,观察胚胎重新扩张的情况,判断胚胎是否存活。胚胎复苏后2~3 h,在超声引导下,进行胚胎移植。

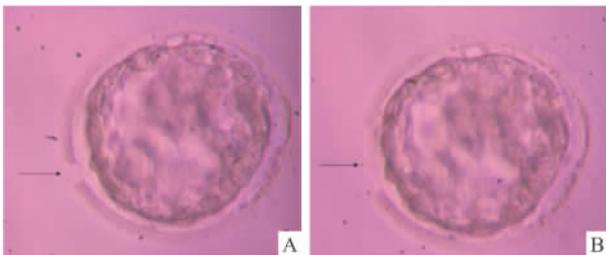


图1 复苏周期囊胚激光打孔过程 ×500

A:打孔孔径为20 μm的囊胚;B:打孔孔径为60 μm的囊胚(↑:打孔处)

1.3.5 准备内膜和判断怀孕 囊胚移植可以是人工周期也可以是自然周期。人工周期患者在月经第3天口服戊酸雌二醇4~8 mg,在内膜厚度达到8 mm后,口服或肌肉注射黄体酮。在开始使用黄体酮后5天,进行胚胎移植。自然周期是在排卵后第5天进行胚胎移植。

移植2周后测量血HCG,移植后28 d阴道超声下可看见胎心,为临床妊娠。单卵双胎的判断依据:在一个孕囊中看到两个胎心,孕囊数超过移植的胚胎数。

1.4 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 或率(%)表示;两组间差异采用t检验,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 患者基本情况比较 本研究收集了568个周期,其中AH组为352个周期,患者年龄20~49(30.9±13.0)岁,排卵日内膜厚度为(10.6±2.3)mm,移植胚胎数为(2.24±0.60)枚;非AH组为216个周期,患者年龄21~45(30.9±4.3)岁,排卵日内膜厚度为(10.3±2.5)mm,移植胚胎数为(2.33±0.70)枚。患者年龄、排卵日内膜厚度、移植胚胎数、不孕原因构成组间差异均无统计学意义,见表1。

表1 基本情况比较

项目	AH组	非AH组
移植周期数(n)	352	216
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	30.9±13.0	30.9±4.3
不孕原因		
原发/继发(n)	187/165	116/100
男方因素[n(%)]	60(17.04)	36(16.67)
女方因素[n(%)]	203(57.67)	132(61.11)
混合因素[n(%)]	89(25.28)	48(22.22)
排卵日内膜厚度(mm, $\bar{x} \pm s$)	10.6±2.3	10.3±2.5
平均移植胚胎数(n, $\bar{x} \pm s$)	2.24±0.60	2.33±0.70

2.2 临床结局比较 AH组生化妊娠率、临床妊娠率、种植率、继续妊娠率显著高于非AH组,流产率显著低于非AH组,多胎妊娠率和单卵双胎率略高于非AH组,但差异无统计学意义。见表2。

3 讨论

本研究的目的是评估激光辅助孵化技术对复苏周期囊胚移植临床结局的影响及激光辅助孵化技术的安全性。结果表明,激光打孔辅助孵化技术可以

表2 AH组与非AH组临床结局比较

临床结局	AH组(n=352)	非AH组(n=216)	P值	χ^2 值
生化妊娠率(%)	57.39(202/352)	40.28(87/216)	<0.001	15.68
临床妊娠率(%)	47.44(167/352)	31.48(68/216)	<0.001	14.06
种植率(%)	31.73(250/788)	19.44(98/504)	<0.001	23.56
继续妊娠率(%)	91.62(153/167)	77.94(53/68)	0.004	8.35
流产率(%)	8.38(14/167)	22.06(15/68)	0.004	8.35
多胎妊娠率(%)	44.91(75/167)	33.82(23/68)	0.118	2.44
单卵双胎率(%)	4.79(8/167)	2.94(2/68)	0.779	0.08

提高复苏周期囊胚移植的临床妊娠率及种植率,而对多胎妊娠率尤其是单卵双胎率并无显著影响。

囊胚移植是辅助生殖技术新的发展方向。囊胚培养有助于淘汰卵裂期发育阻滞的胚胎,从而选择发育潜能更好的胚胎移植。在临床中,通常移植第3天形态学评分优质的胚胎,但卵裂期胚胎形态学评分存在局限性,形态学评分为次级的胚胎仍可能发育到优质囊胚。研究^[7]证实约16%的次级卵裂期胚胎可以形成优质囊胚。Thomas et al^[8]将全部原核期胚胎培养114~120 h,获得囊胚率可达49.8%,这表明了囊胚培养的可行性。囊胚移植可以提高临床妊娠率、种植率。Zhu et al^[9]比较了复苏周期囊胚移植和卵裂期胚胎移植的临床结局,囊胚移植组临床妊娠率(59.5% vs 35.4%, $P < 0.001$)、种植率(46.5% vs 22.2%, $P < 0.001$)显著高于卵裂期胚胎移植。本研究中AH组临床妊娠率为47.44%,种植率为31.73%;非AH组临床妊娠率为31.48%,种植率为19.44%。这是因为不同研究者对囊胚的评分有一定主观性,而且本研究中移植囊胚中包含了部分评分较低的囊胚。

在本研究中,激光辅助孵化对囊胚移植的生化妊娠率、临床妊娠率、种植率的提高是显著的,流产率显著降低。Wan et al^[5]对由次级卵裂期胚胎发育形成的囊胚进行激光打孔辅助孵化,得到了相似的结果,激光辅助孵化组临床妊娠率、种植率(51.0% vs 35.3%, 34.2% vs 23.6%)显著高于对照组,但是两组流产率并没有显著差异。而本研究中AH组的流产率显著低于非AH组,继续妊娠率显著高于非AH组。目前没有充分的证据证明激光打孔辅助孵化技术可以降低流产率、提高继续妊娠率(活产率) Razi et al^[10]对第2天新鲜胚胎移植前行激光打孔辅助孵化,与对照组相比,临床妊娠率及活产率无显著提高。而本研究为复苏周期囊胚移植,激光打孔辅助孵化对流产率的影响尚不清楚,为了更好地了解激光辅助孵化技术的安全性,应更进一步统计活产率。因此,激光打孔辅助孵化对囊胚活产率

的影响还需要更多数据进行印证。

激光打孔辅助孵化可以提高临床妊娠率及种植率,然而同时可能提高多胎妊娠率和单卵双胎率,增加了妊娠并发症。Wan et al^[5]研究结果中激光打孔辅助孵化组多胎妊娠率和对照组无差异,这与本研究结果是一致的。单卵双胎比双卵双胎更具有危害性,单卵双胎更易引起胎儿死亡和新生儿出生缺陷^[11-12]。随着辅助生殖技术的发展,辅助生殖技术对单卵双胎的影响引起人们的关注。激光辅助孵化技术与单卵双胎可能有密切关系,激光辅助孵化在囊胚移植中的应用,可能导致单卵双胎^[13]。研究^[6]显示辅助孵化技术可能会引起单卵双胎。激光打孔辅助孵化技术是在透明带上人工打孔,但囊胚经过透明带上的孔时,可能被卡在孔中^[14],不能完全孵化,导致内细胞团分裂形成两个独立的胚胎。由此可以推测,孔径的大小对单卵双胎的产生有一定影响。在动物实验^[15]中,孔径越大越有利于胚胎的完全孵出,当孔径达到80 μm 时,胚胎并未出现部分孵出。本研究中,激光打孔达到60 μm ,单卵双胎率没有组间差异。可以推测孔径为60 μm 时,激光打孔辅助孵化技术对单卵双胎的产生无促进作用。

激光对囊胚透明带打孔的大小,各个研究中心各不相同。Hiraoka et al^[16]将多次移植失败的患者复苏周期卵裂期胚胎继续培养至囊胚期,研究激光打孔孔径大小对临床妊娠率、种植率、活产率的影响;孔径为透明带周长一半的实验组临床妊娠率、种植率、活产率显著高于孔径为40 μm 和对照组。Wan et al^[5]研究中激光打孔孔径大小为透明带周长的1/4,本中心孔径大小为60 μm ,均取得了较好的临床结局。可见激光打孔孔径较大时对临床结局更有利。

综上所述,激光打孔辅助孵化技术有利于临床结局,提高了临床妊娠率、种植率,使单囊胚移植成为可能,有助于患者在移植较少胚胎的情况下,获得高妊娠率,从而降低多胎率,减少辅助生殖技术带来的副作用。未发现激光打孔辅助孵化技术对多胎妊娠率和单卵双胎率有促进作用。虽然本研究表明激光打孔辅助孵化技术可以降低流产率、增加继续妊娠率,但是对活产率的影响还需要进一步搜集数据。

参考文献

- [1] Herler A, Beier H M. Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview [J]. Cells Tissues Organs 2000, 166(2):233-46.

- [2] De Vos A , Van Steirteghem A. Zona hardening , zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction [J]. *Cells Tissues Organs* ,2000 ,166(2) :220 – 7.
- [3] Schiewe M C , Hazeleger N L , Scimienti C , et al. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model [J]. *Fertil Steril* ,1995 ,63(2) :288 – 94.
- [4] Feng H L , Hershlag A , Scholl G M. A retrospective study comparing three different assisted hatching techniques [J]. *Fertil Steril* 2009 ,91(4 Suppl) :1323 – 5.
- [5] Wan C Y , Song C , Diao L H , et al. Laser-assisted hatching improves clinical outcomes of vitrified-warmed blastocysts developed from low-grade cleavage-stage embryos: a prospective randomized study [J]. *Reprod Biomed Online* 2014 ,28(5) :582 – 9.
- [6] Schieve L A , Meikle S F , Peterson H B , et al. Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through *in vitro* fertilization? [J]. *Fertil Steril* ,2000 ,74(2) :288 – 94.
- [7] Shaw-Jackson C , Bertrand E , Becker B , et al. Vitrification of blastocysts derived from fair to poor quality cleavage stage embryos can produce high pregnancy rates after warming [J]. *J Assist Reprod Genet* 2013 ,30(8) :1035 – 42.
- [8] Thomas M R , Sparks A E , Ryan G L , et al. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer [J]. *Fertil Steril* 2010 ,94(2) :543 – 8.
- [9] Zhu L , Xi Q , Zhang H , et al. Blastocyst culture and cryopreservation to optimize clinical outcomes of warming cycles [J]. *Iran J Reprod Biomed Online* 2013 ,27(2) :154 – 60.
- [10] Razi M H , Halvaei I , Razi Y. Laser assisted zona hatching does not improve live birth rate in patients undergoing their first ICSI cycles [J]. *Iran J Reprod Med* 2013 ,11(12) :1021 – 6.
- [11] Jauniaux E , Ben-Ami I , Maymon R. Do assisted-reproduction twin pregnancies require additional antenatal care? [J]. *Reprod Biomed Online* 2013 ,26(2) :107 – 19.
- [12] Benirschke K. Intrauterine death of a twin: mechanisms , implications for surviving twin , and placental pathology [J]. *Semin Diagn Pathol* ,1993 ,10(3) :222 – 31.
- [13] Knopman J M , Krey L C , Oh C , et al. What makes them split? Identifying risk factors that lead to monozygotic twins after *in vitro* fertilization [J]. *Fertil Steril* 2014 ,102(1) :82 – 9.
- [14] Malter H E , Cohen J. Blastocyst formation and hatching *in vitro* following zona drilling of mouse and human embryos [J]. *Gamete Res* ,1989 ,24(1) :67 – 80.
- [15] Ishibashi H , Motohashi H H , Kumon M , et al. Effect of the size of zona pellucida opening on hatching in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) embryo [J]. *Anim Sci J* ,2013 ,84(11) :740 – 3.
- [16] Hiraoka K , Fuchiwaki M , Hiraoka K , et al. Effect of the size of zona pellucida opening by laser assisted hatching on clinical outcome of frozen cleaved embryos that were cultured to blastocyst after thawing in women with multiple implantation failures of embryo transfer: a retrospective study [J]. *J Assist Reprod Genet* 2008 ,25(4) :129 – 35.

Effects of laser-assisted hatching on the outcomes of the frozen-thawed blastocyst transfer

Liu Tingting¹ , Ji Dongmei¹ , Chen Dawei^{1,2} , et al

(¹*Reproductive Medicine Center ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,*

²*Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Biopreservation and Artificial Organs ,Hefei 230022)*

Abstract Objective To explore the effects of artificial drilling by laser-assisted hatching (AH) on the outcomes of frozen-thawed blastocyst transfer. **Methods** 568 frozen-thawed blastocyst transfer cycles were selected . 352 cycles underwent transfer after drilling by laser-assisted hatching (AH group) ,216 cycles transfer without laser-assisted hatching (non-AH group). The rates of biochemical pregnancy , clinical pregnancy , implantation , abortion , ongoing pregnancy , multiple pregnancy and monozygotic twins were statistically analysed in the two groups. **Results**

There was no difference in the patients age , the cause of infertility , endometrium thickness on ovulation day , and average numbers of the embryos transferred. Biochemical pregnancy rate , the clinical pregnancy rate , implantation rate , ongoing pregnancy rate in AH group were significantly higher than those in non-AH group ($P < 0.05$). The abortion rate was significantly lower than in non-AH group ($P < 0.05$) , and the multiple pregnancy rate and monozygotic twinning rate were slightly higher than in non-AH group , without significant difference. **Conclusion** Drilling by laser-assisted hatching before frozen-thawed blastocyst transfer can increase the rates of implantation and pregnancy , while reduce the abortion rate.

Key words laser-assisted hatching; blastocyst culture; clinical pregnancy; implantation rate; monozygotic pregnancy