

网络出版时间:2023-07-13 16:36:49 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230713.1441.044.html

◇ 临床医学研究 ◇

解冻复苏囊胚行植入前遗传学检测临床结局分析

匡 丹^{1,2,3}, 郝 燕^{1,2,3}, 陈大蔚^{1,4,5,6}, 章志国^{1,4,5,6}, 张 清^{1,4,5,6},
尹奕琪^{1,4,5,6}, 王 凝^{1,4,5,6}, 周 平^{1,4,5,6}, 魏兆莲^{1,4,5,6}, 曹云霞^{1,4,5,6}

摘要 目的 分析二次冷冻、二次活检 (DFDB) 囊胚和二次冷冻、一次活检 (DFSB) 囊胚行植入前遗传学检测 (PGT) 的临床结局相关资料,旨在扩大现有数据,为冻融胚胎 PGT 的临床价值和安全性问题提供一定的指导。方法 回顾性分析 38 例行解冻复苏囊胚患者的 PGT 周期临床资料,依据囊胚活检次数的不同,分为 DFDB 组和 DFSB 组。冷冻方法均为玻璃化冷冻。结果 DFDB 组共 24 例患者,上个 PGT 周期未获诊断的囊胚共 34 枚,解冻后存活 32 枚,解冻囊胚存活率为 94.12%。这 32 枚囊胚二次活检后,行遗传学检测,正常囊胚 15 枚 (46.88%),异常囊胚数 17 枚 (53.13%)。DFSB 组共 14 例患者,共解冻复苏上个单精子胞浆内显微注射 (ICSI) 周期剩余的 50 枚囊胚,50 枚囊胚解冻后均存活。活检这 50 枚囊胚,再进行遗传学分析,47 枚囊胚诊断明确,其中正常囊胚 9 枚 (18%),异常囊胚 28 枚 (56.00%),嵌合体囊胚为 10 枚 (20.00%),未获诊断的囊胚数为 3 枚 (6.00%)。DFDB 组和 DFSB 组分别有 8 例患者和 5 例患者解冻移植,解冻后囊胚均存活,分别临床妊娠 5 例和 3 例,各活产 1 例,活产婴儿均健康。结论 DFDB、DFSB 胚胎均可获得可接受的妊娠率,有其应用的临床价值。但是该研究样本量较小,故还需要扩大样本量,进一步探索其安全性。

关键词 囊胚;活检;玻璃化冷冻;解冻;植入前遗传学检测
中图分类号 R 715.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1380-07

2023-05-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82001631);安徽省科技重大专项(编号:202003a07020012);安徽医科大学第一附属医院博士人才基金(编号:1465)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

² 国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室,合肥 230032

³ 出生人口健康教育部重点实验室,合肥 230032

⁴ 生殖健康与遗传安徽省重点实验室,合肥 230032

⁵ 安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心,合肥 230032

⁶ 安徽省转化医学研究院,合肥 230032

作者简介:匡 丹,女,硕士研究生;

郝 燕,女,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: yan1987215@126.com

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.022

常规植入前遗传学检测技术 (preimplantation genetic testing, PGT) 中尚有一定比例的胚胎无法得到明确诊断,胚胎不能诊断率在不同的文献报道有所不同^[1]。未获诊断的胚胎若含有正常胚胎则可能在一定程度上造成了胚胎的“浪费”。但对未获诊断的胚胎行再次 PGT,胚胎会多经历一次冷冻和活检过程,即“二次冷冻、二次活检 (double frozen double biopsy, DFDB)”。此外,对于移植常规体外受精周期胚胎出现不良妊娠结局或者之后查出有遗传缺陷的患者会要求对剩余冷冻的胚胎进行解冻复苏后活检,活检后的囊胚会再次冷冻等待遗传学结果,这些胚胎与常规 PGT 胚胎相比,多经历一次冷冻解冻复苏过程,即“二次冷冻、一次活检 (double frozen single biopsy, DFSB)”。操作是否会影响囊胚的种植潜能有待进一步研究,可供参考的数据非常有限^[2-5]。

该研究主要分析 DFDB 和 DFSB 胚胎 PGT 的临床结局相关资料,为解冻复苏胚胎 PGT 安全性问题提供一定的指导。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾性分析 2020 年 8 月—2022 年 7 月安徽医科大学第一附属医院生殖中心 24 例 DFDB 病例和 14 例 DFSB 病例。24 例行 DFDB 患者因常规 PGT 周期无正常可移植囊胚或移植正常囊胚未获妊娠,选择对未获诊断的囊胚行解冻后再次活检。14 例 DFSB 患者因移植常规 ICSI 周期胚胎,出现反复流产、反复种植失败或出生子代为单基因病患者,这 14 对夫妇选择对剩余冷冻保存的囊胚行解冻后活检。

1.1.1 DFDB 组 共纳入 24 例患者,女方年龄为 25~42 (30.67 ± 4.45) 岁,体质量指数 (body mass index, BMI) 为 (21.89 ± 2.69),促卵泡激素 (follicle-

stimulating hormone, FSH) 为 (8.15 ± 2.66) IU/L。男方年龄 $24 \sim 42$ (31.38 ± 4.52) 岁。这 24 例患者中有 16 例男方或者女方染色体异常,有 4 例为单基因病(ADPKD 2 例,Joubert 综合征 1 例,家族性多发性内分泌瘤病 1 例),余 4 例为反复流产或者反复种植失败患者。

1.1.2 DFSB 组 共纳入 14 例患者,女方年龄 $24 \sim 42$ (30.79 ± 5.73) 岁,BMI 为 (22.72 ± 3.91) ,FSH 为 (7.58 ± 2.10) IU/L。男方年龄 $25 \sim 44$ (31.36 ± 5.05) 岁。这 14 例患者解冻移植常规卵胞浆内单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)周期胚胎,均出现不良妊娠结局:其中有 11 例移植后有反复流产和反复种植失败史,还有 2 例(病例 30 和病例 37)移植 ICSI 胚胎后出生的婴儿发育异常,遂对患儿行基因检测,为单基因病(均为 X 连锁遗传病),女方分别为 KAT6A 基因突变和 FMR1 基因前突变携带者,有 PGT 指征,故再生育时拟对 ICSI 剩余冷冻胚胎行 PGT。病例 8 男方之后查出 Y 染色体微缺失,因 ICSI 周期活产婴儿性别为男性,再生育时行囊胚解冻后的 PGT(性别选择女胚+染色体非整倍体筛查)。该研究的开展已获得安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准,伦理批号是 2017002。所有患者均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 控制性超促排卵、取卵、受精和胚胎培养 采用中心常规促排方案进行超促排卵,当阴道超声监测优势卵泡有 1 个直径 ≥ 18 mm 或 2 个直径 ≥ 17 mm 或 3 个直径 ≥ 16 mm 时,注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG) 10 000 IU 或艾泽 250 μ g,36 h 后在阴道超声引导下经阴道后穹窿穿刺取卵,取卵后 4~6 h 行 ICSI,后将胚胎转入胚胎培养液培养至第 5 天或第 6 天囊胚阶段,囊胚质量的评级采用 Gardner 评分标准。HCG 购于珠海丽珠公司,艾泽购于德国默克雪兰诺公司,胚胎培养液购于澳大利亚 COOK 公司。

1.2.2 胚胎冷冻和活检

1.2.2.1 DFDB 组 培养至第 5 日或第 6 日的评级为 4CC 级别以上囊胚,用活检针吸取 6~10 个滋养层细胞(trophoblast cell, TE),活检后的囊胚行玻璃化冷冻。活检后的 TE 用拉制好的巴斯德管转移至含有 2 μ l PBS 的 0.2 ml PCR 管中,全基因组扩增后利用高通量测序技术(next-generation sequencing,

NGS)行染色体拷贝数分析。如果是单基因病,进入取卵周期前,需构建家系有效单核苷酸多态性(SNP)位点,行家系 SNP 单体型预实验,主要过程包括:引物设计、DNA 纯化、建库和 NGS。预实验通过的有效单体型可用于判断胚胎是否携带目标基因突变。对于 SNP 单体型分析正常的囊胚再行染色体拷贝数分析。对于周期中未明确诊断的囊胚,解冻后予以再次活检,活检后的囊胚行再次玻璃化冷冻。

1.2.2.2 DFSB 组 培养至第 5 天或第 6 天的评级为 4CC 级别以上囊胚行玻璃化冷冻。因解冻移植该周期胚胎后有反复流产和反复种植失败史以及出生单基因病患儿,拟对 ICSI 剩余冷冻胚胎行 PGT。囊胚解冻后行 TE 活检,活检后的囊胚行再次玻璃化冷冻。活检后的 TE 用拉制好的巴斯德管转移至含有 2 μ l PBS 的 0.2 ml PCR 管中,全基因组扩增后利用 NGS 行遗传学分析,具体步骤与 DFDB 组相同。

1.3 胚胎解冻与移植 对于月经周期规律的患者,采用自然周期方案,对于月经周期不规律的患者,采用人工周期方案。解冻 DFDB 和 DFSB 组 NGS 检测结果正常的囊胚,移植入子宫内。临床妊娠定义为移植胚胎 35 d 后阴道超声显示宫腔内可见孕囊。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件处理数据,符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用两独立样本的 t 检验,非正态分布的计量资料比较采用 Mann-Whitney 非参数检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DFDB 病例

2.1.1 上个 PGT 周期促排方案和取卵、受精以及囊胚形成情况 24 例患者中有 11 例患者使用常规长方案超促排卵,另外的 13 例患者使用拮抗剂方案促排卵,促性腺激素(gonadotropins, Gn)用量为 $(2\,337.50 \pm 727.49)$ IU, Gn 时间为 (10.25 ± 1.85) d(表 1)。上个 PGT 周期共获卵 377 枚,其中成熟卵子 294 枚,受精 260 枚,卵裂 250 枚,获得第 5 天或第 6 天囊胚 139 枚,卵子成熟率为 77.98% (294/377),受精率为 88.44% (260/294),卵裂率为 96.15% (250/260),囊胚率为 55.60% (139/250),

表1 DFDB组和DFSB组患者基本临床信息

病例编号	女方年龄 (岁)	男方年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	Gn用量 (IU)	Gn时间 (d)
DFDB组					
1	36	36	20.70	2 700	12
2	25	28	23.60	2 025	9
3	30	32	20.80	2 250	10
4	27	27	20.90	1 575	9
5	32	36	23.30	1 800	8
6	27	28	21.70	2 675	13
7	33	39	19.70	2 925	13
8	26	29	21.00	1 800	8
9	30	32	23.30	2 375	11
10	38	42	27.90	4 125	12
11	27	31	20.40	2 600	9
12	30	29	24.80	1 600	8
13	26	24	22.00	1 600	8
14	30	29	20.40	3 600	12
15	27	28	19.00	1 425	8
16	30	29	19.90	1 050	7
17	33	33	22.40	2 925	11
18	27	30	22.90	1 950	11
19	26	29	18.60	1 950	13
20	34	32	20.50	2 700	12
21	42	39	23.00	2 475	11
22	34	26	29.70	3 375	10
23	29	29	19.30	2 350	11
24	37	36	19.50	2 250	10
DFSB组					
25	31	30	19.30	2 400	16
26	31	30	25.40	1 600	8
27	30	30	17.40	2 550	13
28	42	38	23.50	2 075	10
29	32	31	21.70	2 200	11
30	24	31	22.00	1 050	7
31	32	33	21.10	2 288	12
32	26	26	24.40	2 775	14
33	42	44	30.18	3 300	11
34	34	34	23.90	2 400	8
35	31	33	21.30	1 950	13
36	24	25	19.70	2 288	11
37	26	28	30.11	3 600	14
38	26	26	18.10	1 350	9

见表2。

2.1.2 囊胚解冻和活检结果 纳入研究的24例患者共行24个PGT周期,这24个周期均含未获诊断的囊胚。24个PGT周期共活检135枚囊胚,其中诊断正常/平衡的囊胚一共是8枚,诊断异常的囊胚数一共是82枚,嵌合的囊胚数为11枚,未获诊断的囊胚数为34枚,各型囊胚所占比例分别为5.93% (8/135)、60.74% (82/135)、8.15% (11/135)、25.19% (34/135) (表2)。有34枚未被明确诊断的胚胎中,包含优质囊胚10枚,非优质囊胚24枚,非

优质囊胚占比70.59%。本中心同时期活检的总胚胎数至少为1 200枚,总体胚胎不能诊断率大约为2.83%。

这24例患者因在PGT周期无正常可移植囊胚或者因移植正常或者嵌合囊胚未获得成功妊娠,要求对剩余未获诊断的囊胚解冻后行二次活检,等待遗传学检测结果择期移植。一共解冻34枚囊胚,其中存活32枚,解冻后囊胚存活率为94.12%。这32枚囊胚在解冻二次活检后,行遗传学检测,均获得明确诊断。其中诊断正常的囊胚一共是15枚,诊断异常的囊胚数一共是17枚,所占比例分别为46.88% (15/32)和53.13% (17/32),嵌合的囊胚数和未获诊断的囊胚数目均为0。见表3。

2.1.3 临床妊娠结局 24例行DFDB的患者,有13例患者无正常胚胎可供移植,剩余的11例患者目前已移植8例,共移植9枚胚胎(其中1名患者移植两次),移植患者的胚胎解冻后均存活并扩张。移植患者平均年龄分别为(31.5±4.57)岁,其中有5例临床妊娠,3例未孕,临床妊娠率为62.5% (表3)。临床妊娠的5例患者,有1例已足月剖宫产1健康女婴(病例6,女方年龄27岁),体质量3 300 g,身长50 cm,发育良好,无妊娠合并症发生。还有4例继续妊娠中,均为单胎。

2.2 DFSB病例

2.2.1 上个周期促排方案和取卵、受精以及囊胚形成情况 纳入的14例患者中有9例患者使用长方案促排卵,5例患者使用拮抗剂方案促排卵,平均Gn用量为(2 273.21±686.49) IU,平均Gn时间为(11.21±2.64)d (表1)。新鲜ICSI周期共获卵231枚,其中成熟卵子200枚,受精192枚,卵裂173枚,获第5天或第6天囊胚102枚,卵子成熟率为86.58% (200/231),受精率为96.00% (192/200),卵裂率为90.10% (173/192),囊胚率为59.00% (102/173)。见表4。

2.2.2 囊胚解冻和活检结果 这14例患者解冻移植常规ICSI周期胚胎,均出现不良妊娠结局,要求对剩余囊胚行活检检测。一共解冻复苏ICSI周期剩余的50枚囊胚,50枚囊胚解冻后均存活。活检这50枚囊胚,活检后的TE经过全基因组扩增,再进行遗传学分析,47枚囊胚诊断明确,其中诊断正常/平衡的囊胚一共是9枚,诊断异常的囊胚数一共是28枚,嵌合的囊胚数为10枚,未获诊断的囊胚数

表2 DFDB 组上个 PGT 周期胚胎体外受精、卵裂及活检诊断情况(*n*)

病例 编号	获卵数	成熟 卵子数	受精数	卵裂数	囊胚数	活检 囊胚数	正常 囊胚数	异常囊 胚数	嵌合体 囊胚数	未获诊断 囊胚数
1	12	11	11	10	6	5	0	3	1	1
2	16	15	14	14	8	8	0	7	0	1
3	13	9	8	8	5	5	1	2	0	2
4	20	13	9	8	7	7	0	6	0	1
5	11	10	10	10	6	6	0	5	0	1
6	13	10	9	9	7	7	1	4	1	1
7	20	14	14	13	5	5	0	4	0	1
8	11	7	6	4	4	4	1	1	0	2
9	13	10	8	8	4	4	1	1	1	1
10	19	12	11	10	2	2	0	1	0	1
11	14	11	11	11	4	4	0	2	1	1
12	32	27	22	22	13	13	0	11	0	2
13	26	19	16	16	8	8	0	6	1	1
14	20	18	15	15	6	6	0	5	0	1
15	16	11	7	7	5	5	1	3	0	1
16	10	8	7	6	6	6	1	3	1	1
17	9	7	6	6	4	4	1	1	1	1
18	22	18	17	17	10	10	0	4	3	3
19	17	14	11	11	7	7	1	2	0	4
20	16	11	13	13	8	5	0	4	0	1
21	18	13	11	11	5	5	0	3	1	1
22	3	2	2	2	2	2	0	0	0	2
23	12	11	9	9	2	2	0	0	0	2
24	14	13	13	10	5	5	0	4	0	1

表3 DFDB 组二次活检胚胎诊断情况和临床妊娠结局(*n*)

病历 编号	解冻 胚胎数	解冻后 存活囊胚数	二次活检 胚胎数	二次活检 正常胚胎数	二次活检 异常胚胎数	二次活检嵌 合体胚胎数	二次活检未获 诊断胚胎数	是否 临床妊娠
1	1	1	1	0	1	0	0	
2	1	1	1	0	1	0	0	
3	2	1	1	0	1	0	0	
4	1	1	1	1	0	0	0	
5	1	1	1	1	0	0	0	是
6	1	1	1	1	0	0	0	是
7	1	1	1	1	0	0	0	否
8	2	2	2	2	0	0	0	
9	1	1	1	0	1	0	0	
10	1	1	1	1	0	0	0	是
11	1	1	1	1	0	0	0	是
12	2	2	2	0	2	0	0	
13	1	1	1	0	1	0	0	
14	1	1	1	0	1	0	0	
15	1	1	1	0	1	0	0	
16	1	1	1	0	1	0	0	
17	1	1	1	0	1	0	0	
18	3	2	2	2	0	0	0	否
19	4	4	4	3	1	0	0	否
20	1	1	1	1	0	0	0	
21	1	1	1	0	1	0	0	
22	2	2	2	0	2	0	0	
23	2	2	2	0	2	0	0	
24	1	1	1	1	0	0	0	是

表4 DFDB 组上个 ICSI 周期体外受精及 PGT 结局

病历 编号	获卵数	成熟 卵子数	受精数	卵裂数	囊胚数	解冻复苏 囊胚数	解冻后 存活数	活检数	正常 囊胚数	异常囊 胚数	嵌合体 囊胚数	未获 诊断数	是否临床 妊娠
25	24	21	21	20	6	4	4	4	0	3	1	0	
26	16	15	15	11	8	6	6	6	2	3	1	0	
27	12	8	7	7	7	3	3	3	0	1	1	1	
28	18	14	14	14	5	3	3	3	1	1	0	1	是
29	15	15	12	11	5	3	3	3	0	2	0	1	
30	17	14	13	13	11	6	6	6	1	5	0	0	是
31	28	27	27	26	18	8	8	8	2	3	3	0	否
32	12	10	10	9	3	2	2	2	0	2	0	0	
33	13	11	11	11	8	2	2	2	0	2	0	0	
34	12	12	10	10	6	4	4	4	1	2	1	0	是
35	21	16	14	13	8	4	4	4	2	1	1	0	否
36	17	11	9	10	3	1	1	1	0	1	0	0	
37	10	10	20	9	6	2	2	2	0	1	1	0	
38	16	16	9	9	8	2	2	2	0	1	1	0	

为3枚(4BC、4BB和3BB级别囊胚),所占比例分别为18.00%(9/50)、56.00%(28/50)、20.00%(10/50)、6.00%(3/50)。见表4。

2.2.3 临床妊娠结局 14例行DFSB患者中有4例患者既无正常胚胎也无嵌合体胚胎可供移植,剩余的10例患者目前已移植5例,共移植5枚胚胎,移植患者的胚胎解冻后均存活并扩张。移植患者的平均年龄为(32.6±6.47)岁,3例临床妊娠,2例未孕,临床妊娠率为60%(表4)。临床妊娠的3例患者,有1例足月剖宫产1健康男婴(病例28,女方年龄42岁),体质量3 050 g,身长50 cm,发育良好,无妊娠合并症发生;有2例继续妊娠中,均为单胎。

2.3 2组结果统计学比较 DFDB组和DFSB组女方年龄、男方年龄、BMI、Gn用量和天数比较采用两独立样本的*t*检验或Mann-Whitney非参数检验,差异均无统计学意义。DFDB组和DFSB组囊胚复苏率分别为94.12%和100%,临床妊娠率分别为62.5%和60%。采用 χ^2 检验对两组复苏率和妊娠率进行比较,差异无统计学意义。

3 讨论

目前,国内外大多数中心PGT过程多采用囊胚活检的方式,活检后囊胚行玻璃化冷冻。这两项技术也被认为是安全有效的。然而,在一些病例当中,需要进行DFDB或DFSB的操作。这些胚胎的临床结局如何,目前报道的并不多。本研究主要分析了PGT周期和DFDB以及DFSB胚胎的解冻复苏效果和PGT临床妊娠结局。

胚胎不能被诊断是PGT过程中经常面临的问

题,而这些胚胎的再诊断对于患者的意义重大,特别是对于高龄患者。本研究中,采用NGS方法对这些未获诊断的胚胎进行诊断,均诊断明确。DFDB组在上个PGT周期中未被诊断的胚胎比例大约为2.83%,DFSB组未获诊断胚胎比例约为6%,这与文献报道的(2%~6%)^[1,3-4,6-7]基本类似,在可控范围之内。

胚胎不能被诊断的原因有很多,囊胚TE质量差是导致胚胎不能诊断的主要原因^[3-8]。因为囊胚TE中,会有7%~8%的细胞发生凋亡,对于质量差的囊胚,这一比例会上升到27%,因此,活检这部分质量差囊胚会导致凋亡的TE细胞比例上升从而影响活检细胞的质量。此外,活检过程中激光打孔和切割可能会损伤细胞核,进而影响到活检TE细胞质量从而导致无法诊断。但Cimadomo et al^[1]研究表明PGT胚胎未诊断率与胚胎质量无关,与活检细胞的数量有关(从第6天完全扩张的囊胚中活检8个细胞是比较合适的)。由于活检的细胞数量是可控的,所以他们认为胚胎不能被诊断是操作技术层面的问题,而与患者年龄、PGT指征等无关。

本研究中DFDB组上个PGT周期未获诊断的34枚囊胚中,非优质囊胚占比70.59%,DFSB组未获诊断的囊胚数为3枚,含1枚非优质囊胚。本研究活检细胞的数量平均在6~10个,一些TE相对“致密”或者“纤维化”的囊胚,活检难度增加,激光切割时间较长,“热效应”可能损伤一部分细胞,导致有效细胞数量下降,也可能是本研究中胚胎未获诊断的原因之一。对于DFDB组和DFSB组囊胚,均采用在解冻囊胚培养扩张后再行活检,此方法的

目的主要为了评估囊胚的扩张程度从而间接评价囊胚质量。采用该方法,DFDB 组囊胚均获得明确诊断,DFSB 组诊断率也可达到 94%。所以,倾向于认为囊胚质量是影响 PGT 诊断率的因素之一。

DFDB 组,诊断正常的囊胚为 46.88%,与文献报道的 44%~67%^[1-3,9]类似。DFSB 组,经 PGT 诊断正常的囊胚占比为 18.00%,虽然低于文献的报道,但是还有 20%的嵌合体囊胚,这些嵌合体囊胚也可作为移植候选胚胎^[10]。移植后,DFDB 组和 DFSB 组分别妊娠 4 例和 3 例。这一数据显示 DFDB 和 DFSB 均有应用的临床价值。

常规 PGT 胚胎解冻复苏率大约为 98.4%^[2],二次解冻囊胚复苏率被报道的在 87.5%~100%之间^[1-3,9]。本研究中 DFDB 组和 DFSB 组第一次囊胚解冻复苏存活率分别为 94.12%和 100%,两组移植患者的胚胎解冻后均存活并扩张,与文献报道的基本类似。虽然 DFDB 组第一次囊胚解冻复苏存活率低于 DFSB 组,但差异不显著。本研究结果表明:囊胚基本可以耐受两轮玻璃化冷冻。DFDB 似乎并没有降低囊胚的复苏率,显示了囊胚良好的“抗压能力”。

Ding et al^[5]将常规 PGT 组为对照组,认为 DFSB 检测不会影响胚胎质量或 PGT 临床结果。Cimadomo et al^[1]研究中,把 DFDB 作为病例组,常规 DFSB 作为对照组,发现临床妊娠率和活产率无差异,这些数据说明 DFDB 并没有降低囊胚种植潜能。但也有学者认为^[4,11]DFDB 会损伤囊胚的存活力。本研究中 DFDB 组囊胚解冻复苏存活率略低于 DFSB 组,但由于样本量较小,并没有统计学意义,所以需要扩大样本量进行研究。本研究中 DFDB 组和 DFSB 组的临床妊娠率分别达到 62.5%和 60%,与安徽医科大学第一附属医院生殖中心常规 PGT 临床妊娠率相当,充分说明了这些囊胚的临床应用价值。

本研究中,对于冷冻解冻胚胎的 PGT 作了明确区分,不仅仅只是分析了上个 PGT 周期诊断失败的胚胎。DFDB 组和 DFSB 组分别涉及囊胚二次活检和一次活检操作。虽然囊胚滋养层活检已被证明比卵裂期活检侵入性小^[11],但它对于产科结局和新生儿健康随访的相关报道并不多^[12-13]。在一项小样本规模的队列研究中,与囊胚滋养层活检相关的先兆子痫风险增加^[11],但在另一项针对 1 721 例儿童

的回顾性队列研究中,囊胚滋养层活检与对照组相比不会增加新生儿结局的任何额外风险^[12]。本研究中,DFDB 组和 DFSB 组分别足月产 1 例婴儿,均无妊娠期并发症发生,婴儿随访至今均健康。

总之,该研究表明,DFDB 及 DFSB 组均可获得可接受的妊娠率,有其应用的临床价值。但是由于该研究样本量较小,故还需要多中心的、大样本量和更加严格的科研设计研究用以评估其安全性。

参考文献

- [1] Cimadomo D, Rienzi L, Romanelli V, et al. Inconclusive chromosomal assessment after blastocyst biopsy: prevalence, causative factors and outcomes after re-biopsy and re-vitrification. A multi-center experience[J]. Hum Reprod, 2018, 33(10):1839-46.
- [2] Bradley C K, Livingstone M, Traversa M V, et al. Impact of multiple blastocyst biopsy and vitrification-warming procedures on pregnancy outcomes[J]. Fertil Steril, 2017, 108(6):999-1006.
- [3] Neal S A, Sun L, Jallas C, et al. When next-generation sequencing-based preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) yields an inconclusive report: diagnostic results and clinical outcomes after re biopsy[J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(10):2103-9.
- [4] De Vos A, Van Landuyt L, De Rycke M, et al. Multiple vitrification-warming and biopsy procedures on human embryos: clinical outcome and neonatal follow-up of children[J]. Hum Reprod, 2020, 35(11):2488-96.
- [5] Ding M, Diao Z, Zhou J. The preimplantation genetic testing clinical outcomes of biopsy on vitrification-warming embryos: a retrospective study[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2022, 48(7):1621-31.
- [6] Bradley C K, Traversa M V, Hobson N, et al. Clinical use of mononucleated zygotes following blastocyst culture and preimplantation genetic screening, including verification of biparental chromosome inheritance[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 34(6):567-74.
- [7] Minasi M G, Fiorentino F, Ruberti A, et al. Genetic diseases and aneuploidies can be detected with a single blastocyst biopsy: a successful clinical approach[J]. Hum Reprod, 2017, 32(8):1770-7.
- [8] Zhu X, Dongye H, Lu S, et al. Pregnancy outcomes after fresh versus vitrified-warmed embryo transfer in women with adenomyosis: a retrospective cohort study[J]. Reprod Biomed Online, 2022, 44(6):1023-9.
- [9] Parriego M, Coll L, Vidal F, et al. Inconclusive results in preimplantation genetic testing: go for a second biopsy? [J]. Gynecol Endocrinol, 2019, 35(1):90-2.
- [10] Greco E, Minasi M G, Fiorentino F. Healthy babies after intrau-

- terine transfer of mosaic aneuploid blastocysts[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(21): 2089–90.
- [11] Scott R T Jr, Upham K M, Forman E J, et al. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial[J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3): 624–30.
- [12] Zhang W Y, von Versen-Höyneck F, Kappahn K I, et al. Maternal and neonatal outcomes associated with trophectoderm biopsy [J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(2): 283–90. e2.
- [13] He H, Jing S, Lu C F, et al. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children[J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(1): 82–8.

Clinical outcomes of preimplantation genetic testing of vitrification-thawing blastocysts

Kuang Dan^{1,2,3}, Hao Yan^{1,2,3}, Chen Dawei^{1,4,5,6}, Zhang Zhiguo^{1,4,5,6}, Zhang Qing^{1,4,5,6}, Yin Yiqi^{1,4,5,6}, Wang Ning^{1,4,5,6}, Zhou Ping^{1,4,5,6}, Wei Zhaolian^{1,4,5,6}, Cao Yunxia^{1,4,5,6}

[¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²NHC Key Laboratory of Study on Abnormal Gametes and Reproductive Tract (Anhui Medical University), Hefei 230032; ³Key Laboratory of Population Health Across Life Cycle (Anhui Medical University), Ministry of Education of the People's Republic of China, Hefei 230032; ⁴Anhui Province Key Laboratory of Reproductive Health and Genetics, Hefei 230032; ⁵Anhui Provincial Engineering Research Center of Biopreservation and Artificial Organs, Hefei 230032; ⁶Anhui Provincial Institute of Translational Medicine, Hefei 230032]

Abstract Objective To analyze the data related to the clinical outcome of preimplantation genetic testing (PGT) for double frozen, double biopsied blastocysts and double frozen, once biopsied blastocysts, in order to expand the existing data and provide some guidance for the clinical value and safety of PGT for frozen-thawed embryos. **Methods** Retrospective analysis was made on the 38 PGT cycles of frozen-thawed blastocysts. According to the frequency of biopsy, cases in the study were divided into two groups: double frozen, double biopsy (DFDB) group and double frozen, single biopsy (DFSB) group. The freezing method was vitrification. **Results** There were 24 patients in DFDB group, 34 blastocysts were not diagnosed in the last PGT cycle, 32 blastocysts survived after thawing, and the survival rate of thawed blastocysts was 94.12%. After the second biopsy of these 32 blastocysts, genetic testing was performed, and all of them were definitely diagnosed, including 15 normal blastocysts (46.88%) and 17 abnormal blastocysts (53.13%). There were 14 patients in DFSB. The remaining 50 blastocysts in the last ICSI cycle were thawed and all blastocysts survived after thawing. Biopsy of these 50 blastocysts and genetic analysis showed that 47 blastocysts were diagnosed, including 9 normal blastocysts (18.00%), 28 abnormal blastocysts (56.00%), 10 mosaic blastocysts (20.00%), and 3 undiagnosed blastocysts (6.00%). In DFDB group and DFSB group, 8 patients and 5 patients transferred the normal blastocysts which all survived after thawing. There were 5 clinical pregnancies and 3 clinical pregnancies, respectively. One healthy live birth was obtained respectively in each group. **Conclusion** Acceptable pregnancy rate can be obtained whatever DFSB or DFDB blastocyst, which is of clinical value. However, due to the small sample size, we need to expand the sample size to further explore its safety.

Key words blastocyst; biopsy; vitrification; thawing; preimplantation genetic testing