

# Az embriók vitrifikációja és hagyományos mélyfagyasztásuk eredményességének összehasonlítása in vitro fertilizációs kezelések során



Lehner Ádám, Kaszás Zita, Murber Ákos dr., Rigó János Jr. dr., Urbancsek János dr., Fancsovits Péter dr. Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika (igazgató: Rigó János Jr. dr., egyetemi tanár), Asszisztált Reprodukciós Osztály (osztályvezető: Urbancsek János dr., egyetemi tanár)

## ÖSSZEFOGLALÁS

**Célkitűzés:** A beültetésre nem kerülő embriók fagyasztva tárolása elengedhetetlen része az in vitro fertilizációs (IVF) kezeléseknek. A korábban kizárólagosan alkalmazott hagyományos lassú programozott embriófagyasztást egyre több intézetben váltja fel a vitrifikáció.

**Anyag és módszer:** Jelen retrospektív tanulmányunkban a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán, fagyasztott embriók felolvasztásával és beültetésével 2013–2014 között elvégzett 96 IVF kezelés adatait értékeltük. A fagyasztás 53 esetben hagyományos módszerrel, 43 esetben pedig zárt rendszerű, Rapid-I (Vitrolife, Göteborg, Svédország) hordozóval végzett vitrifikációval történt. Vizsgáltuk az embriók felolvasztás utáni túlélését, az embriók minőségét, valamint a beágyazódási és terhességi arányokat. A túlélés vizsgálatánál három kategóriát állítottunk fel a fagyasztás után épen maradt blasztomérák aránya szerint ( $\geq 50\%$ ,  $\geq 80\%$  és  $100\%$ ).

**Eredmények:** Szignifikánsan több embrió élte túl a vitrifikációt, mint a hagyományos fagyasztást ( $92,1\%$  vs.  $55,1\%$ ;  $p < 0,001$ ), és a teljesen épen maradt embriók aránya is magasabb volt ( $57,2\%$  vs.  $21,2\%$ ;  $p < 0,001$ ). Az embriók sejtszáma ( $7,5 \pm 2,4$  vs.  $6,1 \pm 2,1$ ;  $p < 0,001$ ) és morfológiai pontértéke ( $2,3 \pm 0,7$  vs.  $2,1 \pm 0,6$ ;  $p = 0,001$ ) magasabb, fragmentáltsága ( $16,7 \pm 12,1\%$  vs.  $21,6 \pm 14,4\%$ ;  $p = 0,003$ ) pedig alacsonyabb volt vitrifikációt követően. Bár a beágyazódási ( $25,3\%$  vs.  $16,5\%$ ;  $p = 0,125$ ) és klinikai terhességi arány ( $47,6\%$  vs.  $32,7\%$ ;  $p = 0,145$ ) is magasabb volt a vitrifikációs csoportban, a különbség az alacsony esetszám miatt nem volt szignifikáns.

**Következtetések:** Az osztódási stádiumú embriók nagyobb eséllyel élnek túl a fagyasztva tárolást Rapid-I hordozóval végzett zárt rendszerű vitrifikáció után, mint lassú fagyasztást követően, és átlagos sejtszámuk, valamint minőségük is jobb. Ugyanakkor a Rapid-I módszerrel történő vitrifikáció utáni embrióbeültetés nem eredményez magasabb beágyazódási és terhességi arányt, jóllehet a tendencia egyértelműen a vitrifikáció kedvező hatásaira utal.

## KULCSSZAVAK

vitrifikáció, lassú fagyasztás, embrió krioprezerváció, Rapid-I

Ádám Lehner, Zita Kaszás, Ákos Murber, MD, János Rigó Jr., MD, János Urbancsek, MD, Péter Fancsovits, MD

## Comparison of the efficacy of vitrification versus slow freezing in vitro fertilization treatments

### ABSTRACT

**Objectives:** The cryopreservation of supernumerary embryos in an in vitro fertilization (IVF) treatment is beneficial. Conventional slow freezing is now replaced in more and more IVF units by vitrification.

**Methods:** In the present study, we retrospectively analyzed the data of 96 frozen embryo replacements performed at the Division of Assisted Reproduction, Semmelweis University in the last two years (2013–2014). In 49 cases, slow cooling,

in 42 cases, vitrification was performed using the Rapid-I closed system (Vitrolife). Survival rates, the quality of the survived embryos ( $\leq 50\%$  blastomere loss), implantation and clinical pregnancy rates were compared. Three different categories were made according to the rate of intact blastomeres after thawing ( $\geq 50\%$ ,  $\geq 80\%$  és  $100\%$ ).

**Results:** Blastomere survival was superior in any of the categories following vitrification (cat.  $\geq 50\%$ : 55.1% vs. 92.1%;  $p < 0.001$ ; cat.  $\geq 70\%$ -os: 35.1% vs. 69.1%;  $p < 0.001$ ; cat.  $100\%$ : 21.2% vs. 57.2%;  $p < 0.001$ ). Blastomere number ( $6.1 \pm 2.1$  vs.  $7.5 \pm 2.4$ ;  $p < 0.001$ ) and morphology score ( $2.1 \pm 0.6$  vs.  $2.3 \pm 0.7$ ;  $p = 0.001$ ) were higher, fragmentation rate ( $21.6 \pm 14.4\%$  vs.  $16.7 \pm 12.1\%$ ;  $p = 0.003$ ) was lower of the survived embryos following vitrification. Neither the implantation rate (16.5% vs. 25.3%;  $p = 0.125$ ), nor the clinical pregnancy rate (32.7% vs. 47.6%;  $p = 0.145$ ) differed, although a trend was perceptible.

**Conclusions:** Cleavage stage embryos have higher chance to survive cryopreservation following vitrification compared to slow freezing. The average cell number and the quality of these embryos are also superior. However, we cannot conclude that vitrification using the Rapid-I carrier results in higher implantation or pregnancy rates, even though a trend was noticeable.

## KEY WORDS

Vitrification, slow freezing, embryo cryopreservation, Rapid-I

## CÉLKITŰZÉS

Az in vitro fertilizációs (IVF) kezelések során a beültetésre kerülő embriókon kívül is gyakran rendelkezésre állnak olyan embriók, amelyek életképessége megfelelő lehet ahhoz, hogy beágyazódjanak és terhességet hozzanak létre fagyasztást követően is. Ezen embriók mélyfagyasztásának, fagyasztva tárolásának, majd felolvasztásának (krioprezerváció) és későbbi beültetésének számos előnye van. Ilyen kezelés végzése esetén nincs szükség újabb gonadotropinstimulációra, és a kumulatív terhességi arány is magasabb lehet [1, 2], sőt bonyolult és költséges laboratóriumi módszerekre sincs szükség. Az 1980-as évek közepe óta, amikor az első humán embrió fagyasztását és felolvasztást követő sikeres terhességet publikáltak [3], a kezelést rutinszerűen végzik szerte a világon.

Ma világszerte az embriók fagyasztásának két alapvető technikáját alkalmazzák. A hagyományos módszer során az embriókat először sejtmembránon átjutó és át nem jutó fagyvédő oldatokban inkubálják, majd számítógéppel vezérelt fagyasztókészülék segítségével lassan és szabályozott módon, általában  $-0,3^\circ\text{C}/\text{perc}$  körüli sebességgel hűtik  $-30^\circ\text{C}$ -ig, ahonnan közvetlenül a  $-196^\circ\text{C}$ -os folyékony nitrogénbe kerülnek a minták. A másik módszer az ultragyors fagyasztás, a vitrifikáció, amelynek eredményeképpen az embrió sejteinek víztartalma üvegszerű állapotba kerül. Ahhoz, hogy ez létrejöjjön a sejtek víztartalmának csökkentése és a citoplazma nagy viszkozitásúvá tétele szükséges [4], ezért az embriókat rövid ideig magas koncentrációjú fagyvédő oldatba teszik, majd közvetlenül folyékony nitrogénbe merítik. Így a fagyasztásra kerülő minták nagyon gyorsan, kevesebb, mint egy másodperc alatt hűlnek le szobahőmérsékletéről  $-196^\circ\text{C}$ -ra, a hűtési sebesség pedig akár a  $-23000^\circ\text{C}/\text{perc}$ et is elérheti [1].

A vitrifikáció nem igényel költséges felszerelést és sokkal rövidebb időt vesz igénybe, mint a hagyományos fagyasztás. Bár egémbriók esetében már 1985-ben eredményesen alkalmazták [4], az első kevésbé sikeres kísérletek után [5] a 90-es évek második felében sikerült humán embriók vitrifikációja után terhességet elérni [6, 7]. Az utóbbi években pedig egyre több helyen váltotta fel a hagyományos módszert a vitrifikáció, és számos közlemény született a módszer eredményességéről és biztonságosságáról [8-12].

Kezdetben vitrifikáció során az embriókat valamilyen kisméretű, könnyen lehűthető hordozón közvetlenül helyezték folyékony nitrogénbe, így érve el minél nagyobb hűtési sebességet. Ez a nyílt rendszer azonban magában hordozza a folyékony nitrogénben túlélő kórokozók általi fertőzések és keresztfertőzések lehetőségét. Bár lehetőség van a nitrogén sterilizálására [14], biztonságosabb és egyszerűbb megoldást jelent a zárt rendszerű vitrifikáció, amelynek során a hordozó és az azon lévő embriók nem érintkeznek közvetlenül a folyékony nitrogénnel. A módszer hátránya, hogy alkalmazásával a hűtési sebesség jelentősen, akár  $-1220^\circ\text{C}/\text{perc}$  körüli értékre is csökkenhet [15]. Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a zárt rendszerű vitrifikációs módszerek eredményessége nem marad el a nyílt rendszerekétől [15]. Ennek oka lehet, hogy a fagyasztással kapcsolatos sérülések feltehetően inkább kapcsolatba hozhatók a visszamelegítés során kialakuló átkristályosodással, mint az üvegszerű állapot elérésének sikertelenségével [16, 17].

Ilyen zárt rendszerű vitrifikációs eszköz a Rapid-I (Vitrolife, Göteborg, Sweden), amelynek lényege, hogy az embriókat nem közvetlenül folyékony nitrogénbe, hanem minimális oldatmennyiséggel együtt a Rapid-I pálcica végén lévő lyukba cseppentjük, majd egy, a nitrogénbe már előre behelyezett műanyagcsőbe tesszük, amelyben

a levegő már túlhűtött állapotba került[18]. Jelen tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy ez a módszer a programozott lassú fagyasztással összehasonlítva hogyan befolyásolja az osztódási fázisú embriók túlélését a felolvasztás követően, illetve milyen hatással van a krioprezervált embriókkal végzett IVF kezelések eredményességére.

## ANYAG ÉS MÓDSZEREK

A Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán az IVF kezelések során beültetésre nem került, de fagyasztásra alkalmas embriók krioprezervációja 2012.decemberéig hagyományos programozott lassú fagyasztással, azt követően pedig minden esetben vitrifikációval történt.

A tanulmány során 2013. január 1. és 2014. december 31. között, fagyasztott-felolvasztott embriók beültetésével végzett 96 IVF kezelés (Krio-ET) adatait értékeltük. A tanulmányba minden olyan Krio-ET ciklus bevonásra került, amelyben a beteg embrióinak legalább egy hordozója felolvasztásra került. Nem vizsgáltuk azon kezeléseket adatait, amelyek során mind hagyományos, mind vitrifikációval krioprezervált embriók egyazon Krio-ET ciklusban kerültek felolvasztásra.

### IVF ciklusok és embriófagyasztás

Az IVF kezelések során a petefészek stimulációja hosszú GnRH(Gonadotropin-releasinghormone)-agonista + gonadotropin, vagy GnRH-antagonista + gonadotropin protokoll szerint történt. A petesejtet a petesejtnyerést követő 4-6 órával, hagyományos IVF vagy intracitoplazmatikus spermiuminjekciós (ICSI) módszerrel termékenyítettük meg. Az embrióbeültetésre a folliculuspunkciót követő harmadik napon került sor. Azokat az embriókat, amelyek nem kerültek beültetésre, de jó minőségük ezt lehetővé tette, krioprezerváltuk. A fagyasztás 2013. előtt minden esetben hagyományos módon, 2013-tól vitrifikációval történt. A programozott lassú fagyasztás előtt az embriókat fagyvédő oldatsoron vittük végig. Ez lehetett saját készítésű oldat, ekkor az embriókat 5-5 percig 0,5M és 1M 1,2-propán-diolt tartalmazó, 10 percig 1,5M 1,2-propán-diolt tartalmazó, végül 1-2 percig 1,5M-os, szukrózzalkiegészített fagyasztóoldatban inkubáltuk. 2011 után FreezeKit 1 (Vitrolife)oldatsort használtunk. A gyártó protokollja szerint az embriókat először 2-5 percig fagyvédő anyagot nem tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS), 10-20 percig 1,5M 1,2-propán-diolt tartalmazó, végül 15 percig 1,5M-os, szukrózzal kiegészített oldatban inkubáltuk. Mind a két módszer Lasarre [19] protokollján alapul. Az embriók 1,5 ml-es fagyasztócsövekben (Nunc, Rochester, USA) kerül-

tek lefagyasztásra és tárolásra (2-4 embrió/cső). A fagyasztás Planer (Planer, Sunbury-On-Thames, UK) fagyasztókészülékkel az alábbi hűtési körülmények között történt: +22°C-tól -7°C-ig, -2°C/perc, -7°C-tól -30°C-ig -0,3°C/perc hőmérsékletcsökkenéssel. A -7°C-os hőmérsékleten kiváltottuk a jégkristályképződést (seeding). A számítógéppel vezérelt szakasz után a fagyasztócsövek a -30°C-ról közvetlenül a -196°C-os folyékony nitrogénbe kerültek.

Az embriók ultragyors hűtését Rapid-I (Vitrolife) zárt vitrifikációs rendszerrel végeztük, amelyhez VitriFreeze ES (FertiPro, Beernem, Belgium) fagyvédő oldatsort használtunk. A fagyasztást szobahőmérsékleten végeztük, az embriókat először egy sóoldatban 2 percig előinkubáltuk, majd 5 és 4 percet töltöttek 5% és 10%, végül 40-60 másodpercet 20% dimetil-szulfoxidot (DMSO) és etilén-glikolt (EG) tartalmazó fagyvédő oldatokban. Ezt követően az embriókat maximum 30nL-es oldatmennyiségben a vitrifikációs pálcán lévő 400 mm átmérőjű lyukbacseppentettük, majd közvetlenül a már folyékony nitrogénben álló Rapid-I csőbe helyeztük. A Rapid-i pálcát tartalmazó műanyagcsövet hermetikusan lezártuk, és felolvasztásig folyékony nitrogénben tároltuk.

### Fagyasztott-felolvasztott embriók beültetésével végzett IVF kezelések

A tervezett Krio-ET-t megelőző ciklus sárgatest-fázisának közepétől 10-14 napos GnRH-agonista előkezelést követően ösztadiol és LH meghatározással igazoltuk a desensitatio létrejöttét, majd a GnRH-agonista analóg folytatása mellett kombinált transdermalisösztadiol és intravaginális-progeszteron készítménnyel endometriumfelépítést kezdtünk. Embrió beültetésre akkor került sor, ha a nőbeteg szérum ösztadiol szintje legalább 150 pg/ml, az endometrium vastagsága >7 mm volt.

A hagyományos módszerrel lefagyasztott embriók felolvasztásához VitrolifeThaw Kit-1 felolvasztó oldatsort használtunk. A fagyasztócsöveket 30°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a csőben lévő oldatot a jégkristályok eltűnését követően petricsészébe pipettáztuk. Az oldatban lévő embriókat a gyártó által megadott protokoll szerint végigvittük a felolvasztó oldatsoron. Az embriók 5-5 percet töltöttek a szobahőmérsékletű 0,2M szukrózt és 1,0M, 0,5M, 0M 1,2-propán-diolt tartalmazó oldatokban, majd további 6 percet szobahőmérsékletű, illetve 4 percet 37°C-os melegítőlapra helyezett, fagyvédő anyagot nem tartalmazó PBS oldatban.

A vitrifikációval lefagyasztott minták felolvasztásához DMSO és EG, valamint PBS, szukróz, ficoll és humán szérum albumin (HSA) tartalmú VitriThaw ES (FertiPro) vitrifikációs felolvasztó oldatsort használtunk. Az embriókat a -196°C-os folyékony nitrogénben lévő pálcá-

ról közvetlenül 37°C-os médiumba helyeztük 1 percig, majd a gyártó protokollja szerint végigvittük az embriókat a további 5 szobahőmérsékletű oldaton. Az embriók túlélését és minőségét mindkét esetben közvetlenül a felolvasztás után értékeltük. A túlélés megállapításához a sértetlen és a fagyasztás-felolvasztás során degenerálódott sejtek számát vettük figyelembe. A felolvasztást követően az embriókat G-2.5<sup>+</sup> (Vitrolife) tápoldat 25ml-es cseppjeiben tenyésztettük további 2-4 órán keresztül. Az embriók minőségét a beültetés előtt újra értékeltük. A beültetésre kerülő embriókat az embriótranszfert megelőzően 5-15 percig hialuronsav tartalmú transzfermédiumban (EmbryoGlue, Vitrolife) inkubáltuk.

A terhesség létrejöttét 11 és 13 nappal az embrióbeültetést követően levett szérumminták teljes  $\beta$ -hCG-szintjének (human chorionic gonadotropin) meghatározásával állapítottuk meg. Amennyiben az meghaladta a 25 IU/l értéket, mely a második vérvétel során tovább emelkedett, biokémiai terhességet állapítottunk meg. Klinikai terhesség létrejöttét 7-10 nappal a második hCG-tesztet követően elvégzett ultrahangvizsgálat során látható petezsák igazolta. Ebben az esetben a beágyazódott embriók számát is regisztráltuk.

### Adatok értékelése

A vizsgált Krio-ET kezeléseket a fagyasztás módja szerint két csoportra osztottuk. Az első csoportba (Hagyományos csoport) kerültek azok a ciklusok, amelyekben programozott lassú fagyasztást alkalmaztunk. A második csoportba (Vitrifikációs csoport) pedig azok a ciklusok kerültek, ahol az embriókat vitrifikáció módszerével krioprezerváltuk.

Összehasonlítottuk a beágyazódási, illetve a terhességi arányokat a két csoportban, valamint a 11. és 13. napi  $\beta$ -hCG szinteket is egyes, illetve kettős fogamzás esetén. Megvizsgáltuk továbbá azt a 2001. januártól elvégzett 90 friss IVF ciklust, amelyekből a vizsgált időszakban felolvasztásra kerültek az embriók. Összehasonlításra került a betegek életkora (donor petesejtekkel végzett kezeléseknél a petesejtdonorok életkora), a meddőség oka, a stimulációs ciklusok típusa és hossza (hCG adásának napja), a nyert petesejtek száma, a megtermékenyítés módja, a fagyasztásra kerülő embriók száma és minősége.

Összehasonlítottuk a különböző módszerekkel fagyasztott embriók felolvasztás utáni túlélését. Az általánosan elfogadott gyakorlat szerint akkor tekintünk túléltnek egy embriót, ha sejtjeinek legalább 50 %-a sértetlen maradt a felolvasztás után [12]. A vitrifikáció várhatóan jobb hatékonysága miatt a 80%-os és 100 %-os túlélést is megvizsgáltuk a felolvasztást követően. További vizsgált paraméter volt a felolvasztott embriók minősége, illetve a beültetett embriók minősége. Összehasonlítottuk az embriók

sejtszámát, a fragmentáció mértékét, valamint a bírálótanács által adott morfológiai pontértéket (0-4, a magasabb érték jobb minőséget jelent) a két csoportban.

### Statisztikai vizsgálatok

A statisztikai vizsgálatokat Statistica 7 (StatSoft, USA) szoftverrel végeztük. A független változók összehasonlítására, mint az embriók sejtszáma, morfológiai pontértéke, fragmentációja, stb. Mann-Whitney U-próbát alkalmaztunk. A csoportos változók összehasonlítását (pl. túlélési vizsgálatok, klinikai terhességi arányok, beágyazódási arányok, stb.) Pearson-féle  $\chi^2$  próbát, illetve alacsony mintaszámok esetén Fisher-féle egzakt próbát végeztünk. A vizsgált csoportok közötti különbségeket  $P < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

A tanulmány időszakában 96 Krio-ET ciklust végeztünk, ebből 53 esetben hagyományos, 43 esetben vitrifikációs módszerrel, összesen 90 friss IVF ciklusból (Vitrifikációs csoport: 38, Hagományos csoport: 52) származó 343 (Vitrifikációs csoport: 149, Hagományos csoport: 164) krioprezervált embrió felolvasztására került sor. A friss IVF ciklusok klinikai paramétereiben nem találtunk különbséget a két csoport között (1. táblázat). Összevetettük a meddőség okait a két csoportban, azonban az alacsony esetszám miatt a statisztikai értékelés nem volt lehetséges.

A fagyasztott embriók száma kezelésként megegyezett a két csoportban (Vitrifikációs csoport:  $6,5 \pm 2,4$ ; Hagományos csoport:  $6,2 \pm 3,2$ ;  $p = 0,319$ ), azonban az embriók minősége nem volt azonos. A Vitrifikációs csoportban magasabb sejtszámú ( $7,7 \pm 2$  vs.  $6,9 \pm 1,8$ ;  $p < 0,001$ ), kevésbé fragmentált ( $12,2 \pm 6,4\%$  vs.  $14,1 \pm 8,4\%$ ;  $p = 0,039$ ), magasabb morfológiai pontértékkel rendelkező ( $2,3 \pm 0,6$  vs.  $2,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ) embriók kerültek lefagyasztásra.

A programozott lassú fagyasztás esetében a felolvasztott 245 embrióból 15 (6,1%), míg vitrifikáció után 152-ből mindössze egyetlen embrió (0,7%) nem került elő a fagyasztócsőből, illetve a vitrifikációs pálcáról ( $p = 0,007$ ). Az embriók 50%-os túlélése (tehát a sejtek legalább fele sértetlen maradt a felolvasztás után) vitrifikáció esetén szignifikánsan magasabb volt, mint a hagyományos fagyasztás alkalmazásával (92,1% vs. 55,1%;  $p < 0,001$ ). Hasonló különbséget találtunk a 80%-os (69,1% vs. 35,1%;  $p < 0,001$ ), valamint a teljes, 100%-os túlélés vizsgálata esetén is (57,2% vs. 21,2%;  $p < 0,001$ ). Mivel a lefagyasztott embriók minősége a két csoportban különbözött, elvégeztük az összehasonlítást úgy is, hogy csak a 7-12 sejtes embriók adatait vettük figyelembe. Mind az 50%-os (93,0% vs. 80,9%;  $p = 0,004$ ), a 80%-os

**1. táblázat** Hagyományos lassú fagyasztással illetve vitrifikációval kiegészítettfriss in vitro fertilizációs (IVF) ciklusok adatainak összehasonlítása

	Hagyományos fagyasztás (n=52)	Vitrifikáció (n=38)	p-érték
Betegek életkora <sup>1</sup>	32,8±4,7	34,1±4,3	0,270
Stimulációs protokoll (GnRHa-agonista%) <sup>2</sup>	92,3%	92,1%	1,000
Stimuláció hossza (hCGb-adás napja) <sup>1</sup>	10,8 ± 0,8	11,0 ± 1,0	0,391
Nyert petesejtek száma <sup>1</sup>	13,7±4,9	15,0±4,6	0,263
Megtermékenyítés módja (ICSIc %) <sup>2</sup>	65,4%	57,9%	0,471
Fagyasztott embriók száma <sup>1</sup>	6,2±3,2	6,5±2,4	0,319

GnRH: gonadotropin-releasinghormone

hCG: human chorionicgonadotropin

ICSI: intracitoplazmatikus spermiuminjekció

<sup>1</sup>átlag±szórás<sup>2</sup>százalék**2. táblázat** A felolvasztást túlélő (sejtek ≥50%-a ép maradt), és a beültetésre került embriók minőségéshagyományos lassú fagyasztás és vitrifikáció alkalmazásával

		Hagyományos fagyasztás (n=135)	Vitrifikáció (n=140)	p-érték
A felolvasztást túlélő embriók minősége				
Morfológiai pontérték <sup>1</sup>	Sejtszám <sup>1</sup>	6,1±2,1	7,5±2,4	<0,001
Fragmentáció <sup>2</sup>				
		2,1±0,6	2,3±0,7	0,001
		21,6±14,4%	16,7±12,1%	0,003
A beültetésre kerülő embriók minősége				
Morfológiai pontérték <sup>1</sup>	Sejtszám <sup>1</sup>	7,1±2,5	8,3±2,5	<0,001
Fragmentáció <sup>2</sup>				
		2,1±0,6	2,4±0,7	0,001
		20±14,1%	14,1±9,0%	0,003

<sup>1</sup>átlag±szórás<sup>2</sup>százalék**3. táblázat** Klinikai terhességi és beágyazódási arányok, valamint a β-hCG-szintek 11 és 13 nappal az embrióbeültetést követően

	Hagyományos fagyasztás	Vitrifikáció	p-érték
Klinikai terhességi arány <sup>1,2</sup>	32,7% (16/49)	47,6% (20/42)	0,145
Beágyazódási arány <sup>1,2</sup>	16,5% (17/103)	25,3% (25/99)	0,125
Egyes fogamzás	13/16 <sup>5</sup> (81,3%)	15/20 (75,0%)	
β-hCG(1) <sup>3</sup>	123,1±116,9 IU/l	135,3±60,5 IU/l	0,274
β-hCG(2) <sup>4</sup>	350,6±265,8 IU/l	386,4±212,3 IU/l	0,496
Kettős fogamzás	2/16(12,5%)	5/20 (25,0%)	
β-hCG(1) <sup>3</sup>	332,5±109,6 IU/l	439,8±293,6 IU/l	0,857
β-hCG(2) <sup>4</sup>	809,5±331,6 IU/l	1282,2±858,7 IU/l	0,857

hCG: human chorionicgonadotropin

<sup>1</sup>Embrióbeültetésre vonatkoztatva<sup>2</sup>százalék<sup>3</sup>β-hCG-szint 11 nappal az embrióbeültetést követően<sup>4</sup>β-hCG-szint 13 nappal az embrióbeültetést követően<sup>5</sup>egy esetben méhen kívüli terhesség jött létre

(69,8% vs. 53,9%; p=0,011), mind a 100%-os túlélést vizsgálva (56,6% vs. 31,3%; p<0,001) jobb eredményeket kaptunk a Vitrifikációs csoportban.

A beültetésre kerülő embriók minőségén túl azon embriók minőségét is összehasonlítottuk, melyek sejteinek legáltalább fele sértetlen maradt a felolvasztás után (2. táblázat).

Mind a felolvasztást túlélte, mind pedig a beültetésre kerülő embriók minősége minden vizsgált paraméter alapján jobb volt az ultragyors hűtéssel krioprezervált embriók esetében.

A beültetett embriók száma hasonló volt mindkét csoportban ( $2,4 \pm 0,6$  vs.  $2,1 \pm 0,6$ ;  $p=0,102$ ). A klinikai terhességi és beágyazódási arányokat, illetve a  $\beta$ -hCG-szinteket a 3. táblázat mutatja. A hagyományos lassú fagyasztáshoz képest a vitrifikáció alkalmazásával 15%-kal magasabb embrióbeültetésre vonatkoztatott klinikai terhességi arányt (47,6% vs. 32,7%;  $p=0,145$ ), valamint 9%-kal magasabb beágyazódási arányt (25,3% vs. 16,5%;  $p=0,125$ ) találtunk, azonban a két csoport közti különbség nem volt szignifikáns. A terhes betegek  $\beta$ -hCG szintje sem a 11., sem a 13. napon nem különbözött sem egyes, sem kettős fogamzás esetén.

## MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmányunkban két év, fagyasztott-felolvasztott embriók felhasználásával végzett embrióbeültetések adatait értékeltük. A vizsgálat ideje alatt mind programozott lassú fagyasztással, mind vitrifikációval krioprezervált embriók felolvasztásával végeztünk embrió beültetéseket. Megvizsgáltuk, hogy a Rapid-I módszerrel történő zárt rendszerű vitrifikáció milyen hatással van a lefagyasztott embriók túlélésére és minőségére a felolvasztás után, valamint az ilyen embriók beágyazódási arányára, illetve a terhességek létrejöttére. A hagyományos megítélés szerint egy embrió akkor tekinthető a fagyasztást túlélteknek, ha a felolvasztás után sejteinek legalább 50%-a ép maradt [12]. E szerint a hagyományos módszerrel fagyasztott embrióknak mindössze 55,1%-a élte túl a fagyasztást, ami jelentősen elmarad a vitrifikációval krioprezervált embriók túlélésétől (92,1%), mely eredményünk összhangban áll az irodalmi adatokkal [1, 2, 20-22]. Saját adatainkban a hagyományos fagyasztás utáni túlélés alacsonyabb, mint a publikált esetek nagy részében [1, 2, 23]. Ennek egyik oka az lehet, hogy korábbi gyakorlatunkban a fagyasztásra kerülő embriók kiválasztásánál kevésbé szigorú kritériumokat alkalmaztunk. Hagyományos fagyasztással történő krioprezervációt követően az embriók nagyjából egy ötödének (21,2%) maradt sértetlen minden sejtje a felolvasztás után, míg vitrifikáció esetében az embriók több mint felének minden blastomérája ép maradt (57,2%). Ez utóbbi arány kissé elmarad az irodalomban közölt adatoktól [12], miszerint akár az embriók 70%-a is teljesen ép maradhat vitrifikációval történő fagyasztás után. Meg kell azonban jegyezni, hogy a hordozók, oldatok és protokollok sokfélesége miatt az adatok nehezen hasonlíthatók össze egymással. Az azonos sejtszámú, 7-12 sejttes embriók esetében is jobb volt az embriók túlélési aránya (a sejtek legalább 50%-

a ép maradt) a vitrifikációt követően, mint programozott lassú fagyasztás után, ahogyan a 80%-os és teljes 100%-os túlélési arány is nagyobb gyakorisággal fordult elő. Utóbbi különösen lényeges paraméter, mivel korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy azon embriók beágyazódási aránya magasabb, melyeknek minden blastomérája ép maradt a felolvasztást követően, és ezen embriók beültetése magasabb terhességi arányt is eredményez [24, 25]. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy Gabrielsen és munkatársai nem tapasztalták a blastomérák elvesztésének negatív hatását [26]. Az ellentmondás oka az lehet, hogy – mint ahogyan a szerzők is megjegyzik – tanulmányukban viszonylag kevés sérült blastomérával rendelkező embrió került beültetésre.

Ahogyan a túlélési arányok, úgy a fagyasztást túlélte embriók minősége, illetve a beültetésre kerülő embriók minősége is jobb volt a vitrifikáció után. A beültetett embriók beágyazódási aránya (25,3%), valamint a klinikai terhességi arány is (47,6%) magasabb volt vitrifikációval történt krioprezerváció után, a különbség azonban, vélhetően az alacsony esetszám miatt, statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. Desai és munkatársai [15] osztódási fázisú embriók Rapid-I módszerrel történő vitrifikációja után eredményeinkkel megegyező klinikai terhességi arányt (47%) kaptak, míg a beágyazódási arányt valamivel magasabb volt (37%).

Nem találtunk különbséget a vitrifikáció utáni, illetve a hagyományos fagyasztást követő embrióbeültetésből fogant terhességek esetében a szérummintában mérhető  $\beta$ -hCG-szintekben. Ez ellentmond Xue és munkatársai [27]. eredményeinek, akik azt találták, hogy a fagyasztás módszere befolyásolja a 12. napi  $\beta$ -hCG-szintet.

Osztályunkon, számos más asszisztált reprodukciós intézethez hasonlóan, a programozott lassú fagyasztásnak egy régóta alkalmazott módszerét használtuk az embriók fagyasztásához. A hagyományos fagyasztás egy módosított változatával azonban a korábbinál jobb eredmények érhetőek el, amelyek már összehasonlíthatók a vitrifikáció eredményeivel [12, 28]. Ugyanakkor a vitrifikációs módszereknek továbbra is előnyük marad a jóval olcsóbb eszköz- és jelentősen kisebb időigényük, a zárt rendszerek pedig – mint amilyen a Rapid-I is – biztonságosan alkalmazhatók humán embriók krioprezervációjára is.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a Rapid-I módszerrel történő zárt rendszerű vitrifikáció után az osztódási fázisú embriók túlélése és a krioprezervációt túlélte embriók átlagos sejtszáma, valamint minősége jobb, mint a hagyományos programozott lassú fagyasztás esetében. Ugyanakkor a Rapid-I módszerrel történő vitrifikáció utáni embrióbeültetés nem eredményez magasabb beágyazódási és terhességi arányt, jellemez a tendencia egyértelműen a vitrifikáció kedvező hatásaira utal.

## Érdekltségi nyilatkozat

A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

## IRODALOMJEGYZÉK

- [1] *Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 2005; 11(5): 608-614.
- [2] *Balaban B, Urman B, Ata B, et al.* A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod.* 2008; 23(9): 1976-1982.
- [3] *Trounson A and Mohr L.* Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983;305(5936): 707-709.
- [4] *Rall WF and Faby GM.* Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.* 1985; 313: 573-575.
- [5] *Quinn P, and Kerin JFP.* Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J In Vitro Fertil Em.* 1986;3(1): 40-45.
- [6] *Ohta N, Nohara M, Kojimabara T, et al.* Ultrarapid freezing of human embryos by vitrification method—a case of delivery. *Jpn J Fertil.* 1996; 41: 48-51.
- [7] *Mukaiida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod.* 1998; 13(10): 2874-2879.
- [8] *Kuleshova LL, and Lopata A.* Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril.* 2002; 78(3): 449-454.
- [9] *Vajta G and Nagy ZP.* Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(6): 779-796.
- [10] *Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC.* Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2008;90(1): 186-193.
- [11] *Son WY and Tan SL.* Comparison between slow freezing and vitrification for human embryos. *Expert Rev Med Devic.* 2009;6(1): 1.
- [12] *Edgar DH, and Gook DA.* A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2012;18(5): 536-554.
- [13] *Vajta G, Rienzi L, Ubaldi, FM.* Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod BioMed Online.* 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.12.012>
- [14] *Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M.* Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril.* 2010; 94(4): 1525-1528.
- [15] *Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T.* The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biol Endocrin.* 2013; 11(1): 41.
- [16] *Seki S and Mazur P.* The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology.* 2009; 59(1): 75-82.
- [17] *AbdelHafez F, Xu J, Goldberg J, Desai N.* Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. *BMC Biotechnol.* 2011; 11(1): 29.
- [18] *Larman MG and Gardner DK.* Vitrification of mouse embryos with super-cooled air. *Fertil Steril.* 2011; 95(4): 1462-1466.
- [19] *Lassalle B, Testart J, Renard JP.* Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fertil Steril.* 1985; 44(5): 645-651.
- [20] *Rama Raju, GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K.* Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online.* 2005; 11(4): 434-437.
- [21] *Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J.* Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14(2): 208-213.
- [22] *Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K.* Neonatal outcome after vitrified day 3 embryo transfers: a preliminary study. *Fertil Steril.* 2009;92(1): 143-148.
- [23] *Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, et al.* Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod.* 1998; 13(suppl 3): 161-174.
- [24] *Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC.* Viability of partially

- damaged human embryos after cryopreservation. *Hum Reprod.* 1997; 12(9): 2006-2010.
- [25] *El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, Andritsos V, Taylor A, Braude P.* Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. *FertilSteril.* 2003; 79(5): 1106-1111.
- [26] *Gabrielsen A, Fedder J, Agerholm I.* Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12(1): 70-76.
- [27] *Xue Y, Tong X, Jiang L, Zhu H, Yang L, Zhang S.* Effect of vitrification versus slow freezing of human day 3 embryos on  $\beta$ -hCG levels. *J Assist Reprod Gen.* 2014;31(8): 1037-1043.
- [28] *Jericho H, Wilton L, Gook DA, Edgar DH.* A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2003; 18(3): 568-571.

#### Levellezési cím

Lehner Ádám  
Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati  
Klinika  
Asszisztált Reprodukciós Osztály  
1088 Budapest, Baross u. 27.  
E-mail: lehner.adam@noi1.sote.hu