

## Беременность и роды после трансплантации деконсервированных эмбрионов человека

В.И.Грищенко, М.П.Петрушко, А.Г.Геродес, И.В.Терпячая, Т.М.Гурина  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Pregnancy and Labour After Transplantation of Frozen-Thawed Human Embryos

GRISCHENKO V.I., PETRUSHKO M.P., GERODES A.G., TERPYACHAYA I.V., GURINA T.M.  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy  
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Описан случай наступления беременности и родов после переноса деконсервированных эмбрионов человека, замороженных по медленной программе с 1,2-пропандиолом и сахарозой.

**Ключевые слова:** медленное замораживание, криопротектор, 1,2-пропандиол.

Описано випадок настання вагітності і пологів після переносу деконсервованих ембріонів людини, заморожених за повільною програмою з 1,2-пропандіолом і сахарозою.

**Ключові слова:** повільне заморожування, криопротектор, 1,2-пропандіол.

There was described the case of pregnancy and labour onset after transferring the frozen-thawed human embryos, frozen by slow program with 1,2- propanediol and sucrose.

**Key-words:** slow freezing, cryoprotectant, 1.2-propanediol.

В мировой литературе описаны случаи беременности и родов после криоконсервирования эмбрионов человека различными методами [7, 9]. Однако отмечается невысокая жизнеспособность деконсервированных эмбрионов [11]. Считается, что эмбрион успешно перенес процедуру замораживания-отогрева при повреждении менее 50% бластомеров.

Дискутируется также вопрос о необходимости культивирования эмбрионов человека после криоконсервирования. Одни авторы настаивают на проведении данной процедуры, объясняя это дополнительной селекцией жизнеспособных эмбрионов [12]. Другие отвергают, ссылаясь на то, что культивирование предполагает субоптимальные условия и может отрицательно сказываться на жизнеспособности эмбрионов, снижая тем самым их имплантационный потенциал [6].

Совершенствование методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволило увеличить частоту наступления беременности в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) до 50% [3]. Вместе с тем по данным Всемирной организации здравоохранения резко возросла частота многоплодных беременностей, что принято считать осложнением ВРТ [10]. В связи с этим возникает необходимость селективного переноса ограниченного числа эмбрионов и очевидным становится вопрос хранения так

The cases of pregnancy and labour onset after human embryo cryopreservation using different methods have been described in the world literature [7, 9]. However a slight viability of frozen-thawed embryos is noted [11]. The freeze-thawing procedure for embryo is considered to be successful, when blastomere damage makes less than 50%.

The question about the necessity of human embryo culturing after cryopreservation is discussed as well. Some authors insist on this procedure performance, explaining this fact by an additional selection of viable embryos [12]. Others reject it, by referring to the fact, that the culturing supposes the suboptimal conditions and it can negatively affect the embryos viability, reducing thereby their implantation potential [6].

The improvement of the methods for assisted reproductive technologies (ART) allowed augmenting the pregnancy onset in cycles of extracorporeal fertilisation (IVF) up to 50% [3]. However, according to the WHO data there is an increase in the frequency of multiple pregnancies, that is used to be considered as the ART complication [10]. In this connection there is the necessity for a selective transfer of the limited number of embryos and the question for so-called "surplus" embryos storage becomes evident [4].

Nowadays the dozens of protocols of human embryo cryopreservation using slow, rapid, extrarapid freezing rates and vitrification have been described [2, 5, 7, 8].

**Адрес для корреспонденции:** Петрушко М.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7721119, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Petrushko M.P., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

называемых “избыточных” эмбрионов [4].

На сегодняшний день описаны десятки протоколов криоконсервирования эмбрионов человека с использованием медленных, быстрых, сверхбыстрых скоростей замораживания и витрификации [2,5,7,8].

Продолжается поиск методов, исключающих введение высоких концентраций криопротекторов и вместе с тем обеспечивающих высокий уровень сохранности биообъектов, оптимизации температурного режима замораживания-отогрева, а также улучшения субоптимальных условий культивирования эмбрионов человека.

Мы хотим поделиться первым удачным опытом наступления беременности и родов после переноса деконсервированных эмбрионов человека пациентке, проходившей курс лечения бесплодия методом ЭКО в Центре репродукции человека г.Харькова.

### Материалы и методы

Эмбрионы были получены в цикле лечения бесплодия методом ЭКО путем инсеминации аспирированных ооцитов пациентки спермией мужа *in vitro*.

Аспирацию фолликулов, оплодотворение, культивирование эмбрионов выполняли в соответствии со стандартным протоколом программы ЭКО [1].

Процедуру замораживания-оттаивания проводили по медленной программе. В качестве криопротекторов использовали 1,2-пропандиол и сахарозу. Криоконсервирующие растворы были приготовлены на основе фосфатного буфера (Medi-Cult, Дания).

Инкубацию эмбрионов в растворах криопротекторов проводили следующим образом. Эмбрионы в микрокапле среды были перенесены из среды культивирования Menezo B2 в фосфатно-буферную среду на 5 мин. Затем эмбрионы поместили в 1,5 М раствор 1,2-пропандиола, а через 10 мин в 1,5 М раствор 1,2-пропандиола с 0,1 М раствором сахарозы. Спустя 5 мин эмбрионы помещали в соломинки для криоконсервирования (CryoBioSystem, Франция), которые немедленно переносили в программный замораживатель CryoSon.

Эмбрионы охлаждали от 22 до  $-5,5^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Производили “сиддинг”, после которого их охлаждали со скоростью  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-35^{\circ}\text{C}$ . Затем пайеты погружали в жидкий азот.

Для оттаивания эмбрионов соломинки выдерживали при комнатной температуре и помещали в водяную баню с температурой воды  $37^{\circ}\text{C}$  на 30 с.

После высвобождения из пайеты эмбрионы переносили в среды с убывающей концентрацией

There is in progress the search for the methods, excluding the introduction of high concentrations of cryoprotectants and, nevertheless, providing a high level of bioobject integrity, optimisation of temperature regimen for freeze-thawing, as well as the improvement of suboptimal conditions for human embryo culturing.

We wish to share our first successful experience of the pregnancy and labour onset after transferring the frozen-thawed human embryos to the patient, being treated at the Kharkov Centre of Human Reproduction using the IVF method.

### Materials and methods

The embryos were obtained within the pregnancy treatment cycle by IVF method via inseminating the aspirated oocytes of the patient with husband's spermatozoa *in vitro*.

The follicle aspiration, fertilisation, the embryo culturing were carried-out according to the standard protocol of IVF program [1].

The freeze-thawing procedure was performed using a slow program. As cryoprotectant we used 1,2-propanediol and sucrose. Cryopreserved solutions were prepared at the phosphate buffer base (Medi-Cult, Denmark).

The embryo incubation in cryoprotectant solutions was carried-out in the following way. The embryos in a microdrop of the medium were transferred from the Menezo B2 culturing medium into the phosphate-buffer solution for 5 min. Afterwards the embryos were placed into the 1.5 M 1,2-propanediol solution, and in 10 min into that with 0.1M of sucrose solution. After 5 min the embryos were put into the straws for cryopreservation (CryoBioSystem, France), which were immediately transferred into the CryoSon Programmable Freezer.

The embryos were cooled from  $23^{\circ}\text{C}$  down to  $-5.5^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . The “seeding” was done, afterwards they were cooled with the rate of  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  down to  $-35^{\circ}\text{C}$ . Then the straws were immersed into a liquid nitrogen.

For embryo freeze-thawing the straws were maintained under room temperature and placed on the  $37^{\circ}\text{C}$  water bath for 30 sec.

After removal from a straw the embryos were transferred into the media with the 1,2-propanediol and sucrose descending concentration for cryoprotectant removing. For this purpose the embryos were kept up for 5 min in 1 M 1,2-propanediol solution and 0.2 M sucrose solution, afterwards they were placed for 5 min into the 0.5 M propanediol solution and 0.2 M sucrose solution, maintained during 10 min in 0.2 M sucrose solution and placed into the culturing medium.

The morphology evaluation was performed with microscope.

1,2-пропандиола и сахарозы для выведения растворов криопротекторов. Для этого эмбрионы выдерживали 5 мин в 1 М растворе 1,2-пропандиола и 0,2 М растворе сахарозы, после чего переносили на 5 мин в 0,5 М раствор пропандиола и 0,2 М раствор сахарозы, выдерживали 10 мин в 0,2 М растворе сахарозы и помещали в среду культивирования.

Оценку морфологии производили при помощи микроскопирования (ув.600).

### Результаты и обсуждение

У пациентки С. в цикле лечения бесплодия методом ЭКО, проведенном в июне 2002 года, было аспирировано 12 зрелых преовуляторных ооцитов. Через 16 ч после инсеминации в 9 клетках обнаружены цитологические признаки оплодотворения. Через 24 ч культивирования все 9 эмбрионов находились на стадии 4-х и 2 – на стадии 6-ти бластомеров. Для эмбриопереноса в полость матки пациентки были отобраны 4 эмбриона – 2 шестиклеточных и 2 четырехклеточных.

Оставшиеся эмбрионы были криоконсервированы. Морфологическая оценка эмбрионов позволила установить, что 3 эмбриона соответствовали категории 1 – бластомеры сферичные, четкие, ровные, цитоплазма – прозрачная, отсутствие фрагментов. Два эмбриона характеризовались наличием 10%-й фрагментации (категория 2).

После замораживания эмбрионы хранились в Низкотемпературном банке биологических объектов ИПКиК НАН Украины.

У пациентки попытка ЭКО закончилась безуспешно. В декабре 2002 года ей было предложено перенести деконсервированные эмбрионы в естественном цикле, затем их разморозили. После удаления криопротекторов и 1 ч культивирования произведена оценка морфологии эмбрионов. Все эмбрионы характеризовались 100%-й сохранностью бластомеров. Морфологические характеристики после криоконсервирования четко коррелировали с таковыми до замораживания.

На 18-й день менструального цикла пациентке проведена трансплантация трех эмбрионов. Назначена поддерживающая терапия. Через 2 недели тест на наличие хорионического гонадотропина – положительный. На 24-й день от эмбриопереноса под контролем УЗИ диагностирована маточная беременность, которая протекала с угрозой прерывания. Пациентка находилась на динамичном наблюдении в специализированном клиническом родильном доме №5 г. Харькова. 25 августа 2003 года беременность была родораз-

### Results and discussion

Twelve mature preovulatory oocytes were aspirated from the patient S. during the infertility treatment cycle using the IVF method, performed in June 2002. In 16 hrs after insemination the cytological signs of fertilisation were found out in 9 cells. In 24 hrs of culturing all 9 embryos were at the stage of 4 blastomeres and 2 at the stage of 6 blastomeres. For the embryo transfer into the patient's uterine cavity there were selected 4 embryos: 2 six-cells and 2 four-cells.

The rest embryos were cryopreserved. Morphological evaluation of embryos allowed to establish, that 3 embryos corresponded to the category 1: the blastomeres were spherical, distinct, even, cytoplasm was transparent, without fragments. Two embryos were characterised by the presence of 10% fragmentation (category 2).

After freezing the embryos were stored at the Low Temperature Bank of Biological Objects of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

The IVF attempt to the patient has failed. In December 2002 she was proposed to transfer the frozen-thawed embryos in natural cycle, afterwards they were frozen-thawed. After removing cryoprotectant and 1 hr of culturing the morphological evaluation of embryos was carried out. All the embryos were characterised by the 100% blastomere integrity. Morphological characteristics after cryopreservation distinctly correlated with those before freezing.

To the 18<sup>th</sup> day of menstrual cycle the transplantation of 3 embryos was done to the patient. The maintaining therapy was used. In 2 weeks the test for the chorionic gonadotropin presence was positive. To the 24<sup>th</sup> day after embryonic transfer the uterine pregnancy was diagnosed under the ultrasound control. It proceeded under the failure threat. The patient was under the dynamic observation at the Maternity House N5. The pregnancy was delivered by cesarean section in low uterine segment by Gusakov. The alive mature boy of 3100 g weight was born. To the 10<sup>th</sup> day the puerpera with a child left the clinic. The child develops in a normal way.

In this work a high efficiency of the method of slow cooling with 1,2-propanediol is demonstrated, because all the embryos are characterised with a high degree of blastomere integrity.

In this case the embryo transfer was performed without culturing. The implantation frequency made 33%.

### Conclusions

The presented cryopreservation method, based on a slow cooling with 1,2-propanediol and sucrose usage

решена путем операции кесарева сечения в нижнем маточном сегменте по Гусакову. Извлечен живой доношенный мальчик весом 3100 г. На 10-е сутки родильница с ребенком выписаны домой. Ребенок развивается нормально.

В представленной работе показана высокая эффективность метода медленного охлаждения с 1,2-пропандиолом, поскольку все эмбрионы характеризовались высокой степенью сохранности blastомеров.

В данном случае перенос эмбрионов был проведен без культивирования. Частота имплантации составила 33%.

## Выводы

Представленный метод криоконсервирования, основанный на медленном охлаждении с использованием 1,2-пропандиола и сахарозы в качестве криопротектора, позволяет добиться высокой жизнеспособности эмбрионов, результатом чего явилось рождение ребенка после 6-месячного пребывания эмбрионов в криоконсервированном состоянии.

## Литература

1. *Elder K.* IVF. Лабораторные процедуры.– Bourn-Hallam group, 1990.– 23 с.
2. *Barg P.E., Barad D.H.* Ultrarapid freezing of mouse and human preembryos: a modified approach // J. in Vitro Fert Embryo Transfer.– 1990.– Vol.7, N6.– P. 355-357.
3. *Ezra Y., Aceman P., Schenker J.G.* Update of in vitro fertilization // Isr J. Obstet. Gynec.– 1991.– Vol.2.– P. 149-152.
4. *Gardner D.K., Lane M.* Towards a single embryo transfer // Reproductive Biomedicine Online.– 2003.– Vol.6, N 4.– P. 470-482.
5. *Gordts S., Roziars P., Campo R., Noto V.* Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos // Fertil Steril.– 1990.– Vol.53, N3.– P. 469-72.
6. *Guerif F., Bidault R., Cadoret V. et al.* Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal // Hum.Rep.– 2002.– Vol.17, N5.– P. 1321-1326.
7. *Lai A.C., Lin B.P., Chang C.C. et al.* Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos // Assist Reprod Genet.– 1996.– Vol.13, N 8.– P. 625-628.
8. *Mukaida T., Wada S., Takahashi K. et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos // Hum Reprod.– 1998.– Vol.13, N1.– P. 2874-2879.
9. *Pereress M.R., Phillips H.M.* Quintuplet gestation following transfer of five cryopreserved embryos: conditions stimulating thawed-embryo implantation // J. Assist Reprod Genet.– 1998.– Vol.15, N 8.– P. 521-523.
10. *Schenker J.* Осложнения при лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения // Пробл. репродукции.– 1995.– Т.1.– С. 74-79.
11. *Van den Abbeel E., Camus M. et al.* Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // Hum Reprod.– 1997.– Vol. 12, N 9.– P. 1006-1010.
12. *Zeibe S., Bech B., Petersen K.* Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer// Hum. Reprod.– 1998.– Vol.13.– P. 178-181.

Поступила 14.10.2003

as cryoprotectant, allows to obtain a high viability for embryos, resulted in child birth after 6 months of embryo being in cryopreserved state.

## References

1. *Elder K.* IVF. Laboratory procedures.– Bourn-Hallam group, 1990.– 23 p.
2. *Barg P.E., Barad D.H.* Ultrarapid freezing of mouse and human preembryos: a modified approach // J. in Vitro Fert Embryo Transfer.– 1990.– Vol.7, N6.– P. 355-357.
3. *Ezra Y., Aceman P., Schenker J.G.* Update of in vitro fertilization // Isr J. Obstet. Gynec.– 1991.– Vol.2.– P. 149-152.
4. *Gardner D.K., Lane M.* Towards a single embryo transfer // Reproductive Biomedicine Online.– 2003.– Vol.6, N 4.– P. 470-482.
5. *Gordts S., Roziars P., Campo R., Noto V.* Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos // Fertil Steril.– 1990.– Vol.53, N3.– P. 469-72.
6. *Guerif F., Bidault R., Cadoret V. et al.* Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal // Hum.Rep.– 2002.– Vol.17, N5.– P. 1321-1326.
7. *Lai A.C., Lin B.P., Chang C.C. et al.* Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos // Assist Reprod Genet.– 1996.– Vol.13, N 8.– P. 625-628.
8. *Mukaida T., Wada S., Takahashi K. et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos // Hum Reprod.– 1998.– Vol.13, N 1.– P. 2874-2879.
9. *Pereress M.R., Phillips H.M.* Quintuplet gestation following transfer of five cryopreserved embryos: conditions stimulating thawed-embryo implantation // J. Assist Reprod Genet.– 1998.– Vol.15, N 8.– P. 521-523.
10. *Schenker J.* Complications at the infertility treatment using the method of extracorporal fertilisation // Problems of reproduction.– 1995.– Vol. 1.– P. 74-79.
11. *Van den Abbeel E., Camus M. et al.* Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // Hum Reprod.– 1997.– Vol. 12, N 9.– P. 1006-1010.
12. *Zeibe S., Bech B., Petersen K.* Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer// Hum. Rep.– 1998.– Vol.13.– P. 178-181.

Accepted in 14.10.2003