

УДК 611.013.15/17:615.014.41

Н.О. Будерацька^{1,2}, М.П. Петрушко^{1,3*}

Ооцити як альтернатива ембріонам при кріоконсервуванні для використання у допоміжних репродуктивних технологіях

UDC 611.013.15/17:615.014.41

N.O. Buderatska^{1,2}, M.P. Petrushko^{1,3*}

Oocytes as Alternative to Embryos in Cryopreservation Applied in Assisted Reproductive Technologies

Реферат: Використання методів кріобіології в репродуктивній медицині дозволяє успішно кріоконсервувати гамети та ембріони пацієнтів, які проходять курс лікування безпліддя. У науковій літературі описано підходи щодо кріоконсервування як ооцитів, так і ембріонів, але порівняльний аналіз ефективності використання цих програм відсутній. У роботі вивчали основні ембріологічні та клінічні показники (частота запліднення та формування бластоцист; середня кількість ембріонів для перенесення до порожнини матки пацієнтки; частота настання вагітності; частота імплантації; кількість багатоплідних вагітностей) ооцитів або ембріонів після кріоконсервування. Досліджували ооцити на стадії метафази II мейозу та ембріони людини п'ятої доби розвитку (стадія бластоцисти). Показано, що кріоконсервування ооцитів методом витрифікації не впливає на їх запліднюючу здатність, проте показник частоти формування бластоцист значуще нижчий, ніж у свіжовиділених ооцитів. Основні клінічні показники ефективності лікування співставні в групах із витрифікацією ооцитів і ембріонів та в контролі. Доведено, що кріоконсервування ооцитів є альтернативою зберіганню ембріонів в умовах низьких температур.

Ключові слова: кріоконсервування, витрифікація, ооцити, ембріони, бластоциста, лікування безпліддя.

Реферат: Использование методов криобиологии в репродуктивной медицине позволяет успешно криоконсервировать гаметы и эмбрионы пациентов, проходящих курс лечения бесплодия. В научной литературе описаны подходы к криоконсервированию как ооцитов, так и эмбрионов, но сравнительный анализ эффективности использования этих программ отсутствует. В работе изучали основные эмбриологические и клинические показатели (частота оплодотворения и формирования бластоцист; среднее количество эмбрионов для переноса в полость матки; частота наступления беременности; частота имплантации; количество многоплодных беременностей) ооцитов или эмбрионов после криоконсервирования. Исследовали ооциты на стадии метафазы II мейоза и эмбрионы человека пятых суток развития (стадия бластоцисты). Показано, что криоконсервирование ооцитов методом витрификации не влияет на их оплодотворяющую способность, однако показатель частоты формирования бластоцист значимо ниже, чем у свежевыделенных ооцитов. Основные клинические показатели эффективности лечения сопоставимы в группах с витрификацией ооцитов и эмбрионов, а также в контроле. Установлено, что криоконсервирование ооцитов является альтернативой сохранению эмбрионов при низких температурах.

Ключевые слова: криоконсервирование, витрификация, ооциты, эмбрионы, бластоциста, лечение бесплодия.

Abstract: Application of the cryobiological techniques in reproductive medicine enables the successful cryopreservation of gametes and embryos of the patients undergoing treatment for infertility. The scientific publications describe the approaches to cryopreservation of oocytes and embryos, but the comparative analysis of efficiency of using these programs is not available. In the paper we described the basic embryological and clinical parameters (frequency of fertilization and blastocyst formation; the average number of embryos per a transfer into the uterus, the pregnancy rate, implantation rate, number of multiple pregnancies) after cryopreservation of either oocytes or embryos. There were examined the oocytes at metaphase II stage of meiosis and human embryos of the fifth day of development (the blastocyst stage). It has been demonstrated that oocyte cryopreservation by vitrification did not affect their fertilizing capacity, but the rate of blastocyst formation was significantly lower than those of freshly isolated oocytes. Basic clinical cure rates were comparable in the groups with vitrification of oocytes and embryos, as well as in the control. The cryopreservation of oocytes has been found as an alternative to preservation of embryos at low temperatures.

Key words: cryopreservation, vitrification, oocytes, embryos, blastocyst, infertility treatment.

Використання кріобіологічних методів у медицині дозволило успішно зберігати гамети та ембріони пацієнтів, які проходять курс лікування безпліддя [1].

За допомогою сучасних методів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) можливо отри-

Application of cryobiological methods in medicine allowed to successfully preserve gametes and embryos of the patients undergoing fertility treatment [15].

Using the contemporary methods of the assisted reproductive technology (ART) one can get a pool of oocytes and embryos with quality morphofunc-

¹Лабораторія кріоконсервування гамет та ембріонів, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Інститут генетики репродукції, м. Київ

³ДРТ-клініка репродуктивної медицини, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, 61016;
тел.: (+38 057) 373-42-84, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: petrushkomarina@gmail.com

Надійшла 04.10.2016

Прийнята до друку 20.10.2016

¹Laboratory of Cryopreservation of Gametes and Embryos, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Institute of Reproductive Genetics, Kyiv, Ukraine

³ART-Clinic of Reproductive Medicine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 4284, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: petrushkomarina@gmail.com

Received October, 04, 2016

Accepted October, 20, 2016

мати пул ооцитів та ембріонів із якісними морфофункціональними характеристиками та забезпечити їх високий імплантаційний потенціал.

Для виключення появи багатоплідних вагітностей до порожнини матки пацієнтки рекомендовано переносити один ембріон, який має високі морфофункціональні характеристики, тому отримання декількох ембріонів є недоцільним.

Використання кріоконсервованих ембріонів у репродуктивній медицині пов'язано з виникненням етичних та юридичних проблем, зокрема, це стосується права на володіння ембріонами у випадку розлучення подружжя. Критерії заморожування ооцитів визначено комісією з етичних норм Американської асоціації репродуктивної медицини [3].

У науковій літературі описано методики щодо кріоконсервування ооцитів та ембріонів, проте відсутній порівняльний аналіз результатів лікування.

Мета роботи – провести порівняльний аналіз ембріологічних та клінічних показників ефективності кріоконсервування ооцитів та ембріонів людини методом вітрифікації.

Для досягнення поставленої мети визначали частоту виживання, запліднення та формування бластоцист; кількість ембріонів для перенесення до порожнини матки пацієнтки; частоту настання вагітності; частоту імплантації; кількість багатоплідних вагітностей.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з доімплантаційними ембріонами проводили відповідно до Європейського протоколу з захисту ембріонів [17] та рішення, затвердженого комітетом із біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (Харків).

Пацієнток, яким призначався курс лікування безпліддя, було розділено на групи: 1 ($n = 43$) – з циклом кріоконсервування ооцитів; 2 ($n = 200$) – з перенесенням кріоконсервованих ембріонів; 3 (контроль, $n = 306$) – лікування в натуральних або стимульованих циклах із перенесенням нативних ембріонів.

Усі етапи програми ДРТ проводили за стандартними протоколами (Наказ МОЗ України №787 від 09.09.2013 «Про затвердження Порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні»).

Вітрифікацію ооцитів та ембріонів здійснювали за методом М. Kuwayama в модифікації [14]. Перед кріоконсервуванням ооцити та ембріони витримували в культуральному розчині з 20%-м альбуміном «HSA» («Life Global», США) протягом години. Етап насичення кріопротекторами ооцитів та ембріонів здійснювали при температурі 20–24°C. Далі їх еквілібрували протягом 10–14 хв у розчинах 7,5% диметилсульфоксиду (ДМСО) та етилен-

тional characteristics and provide their high implantation potential.

To eliminate the appearance of multiple pregnancies the transfer to the patient's uterus of one embryo with high morphological characteristics is recommended, so getting multiple embryos is unnecessary.

The use of cryopreserved embryos in reproductive medicine is related to the emergence of ethical and legal problems, in particular, it concerns the ownership of embryos in case of divorce. Criteria for freezing oocytes are defined by the Commission of Ethics of the American Association of Reproductive Medicine [1].

The scientific publications describe the methods for cryopreservation of oocytes and embryos, but there is no comparative analysis of the treatment outcomes.

The research goal was a comparative analysis of embryological and clinical efficiency of human oocyte as well as embryo cryopreservation by means of vitrification method.

To achieve this goal there was determined the rate of survival, fertilization, formation of blastocysts; the number of embryos to transfer into a patient uterus; pregnancy rate; implantation rate; number of multiple pregnancies.

Materials and methods

All the manipulations with preimplantation embryos were performed in accordance with the European Protocol on Embryo Protection [16] and the decision approved by the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine).

Patients undergoing infertility treatment were divided into three groups: 1 ($n = 43$) those with the cycle of oocyte cryopreservation; 2 ($n = 200$) the ones with the transfer of cryopreserved embryos; 3 (control, $n = 306$) women treated either in natural or stimulated cycles with a native embryo transfer.

All the stages of ART programs were carried out by standard protocols (Order of the Ministry of Health Care of Ukraine dated of September 9, 2013 №787 'On the Approval of the Use of Reproductive Technologies in Ukraine').

Oocytes and embryos were vitrified according to the modified M. Kuwayama method [12]. Prior to cryopreservation the oocytes and embryos were kept in culture solution with 20% albumin HSA (Life Global, USA) for an hour. The oocytes and embryos were saturated with cryoprotectants at 20–24°C. Later they were equilibrated for 10–14 min in 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol solutions.

After equilibration the cells were placed on a bottom of drops with 15% DMSO and 15% ethylene glycol



гліколю. Після еквілібрації клітини поміщали на дно краплі з розчинами 15% ДМСО та 15% етиленгліколю. Після 30-секундної експозиції переносили на носій «CryoTec» («Cryotech», Японія) та занурювали в рідкий азот. Вітрифіковані ооцити та ембріони зберігали в посудинах Дьюара від місяця до року.

Після вилучення носія з рідкого азоту його одразу занурювали в 1 М розчин сахарози. Через 1 хв ооцити та ембріони за температури 37°C переносили в 0,5 М розчин сахарози на 3 хв і культивували *in vitro* в середовищі Global total («Life Global», США).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стьюдента з використанням програми «Excel» («Microsoft», США). Статистично значущими вважали відмінності кількісних показників при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Відмінності клінічних показників у пацієток досліджуваних груп не були статистично значущими (табл. 1).

Для кріоконсервування використовували тільки зрілі ооцити на стадії метафази II мейозу, про що свідчила наявність першого полярного тіла в перивітеліновому просторі (рис. 1, А).

Показник частоти виживання ооцитів після кріоконсервування дорівнював ($85,6 \pm 9,3$)%. Решта клітин мала ознаки дегенерації (рис.1, В).

Таблиця 1. Клінічні показники у пацієток досліджуваних груп ($M \pm m$)
Table 1. Clinical scores in patients of the studied groups ($M \pm m$)

Показники Indices	Групи Groups		
	1	2	3
Число пацієток Number of patients	43	200	306
Вік Age	$27,7 \pm 2,8$	$32,9 \pm 2,9$	$33,1 \pm 4,2$
Кількість фолікулів Number of follicles	$10,7 \pm 5,1$	$12,2 \pm 4,4$	$8,7 \pm 3,9$
Кількість ооцитів Number of oocytes	$9,7 \pm 3,4$	$8,8 \pm 4,1$	$8,2 \pm 3,3$

solutions. After a 30-second exposure they were transferred to a CryoTec carrier (Cryotech, Japan) and immersed into liquid nitrogen.

The frozen oocytes and embryos were stored in Dewar vessels during one month up to a year.

Oocytes and embryos were thawed at 37°C. After removal of the carrier out of liquid nitrogen it was immediately immersed into 1 M sucrose solution. After 1 min the oocytes and embryos were transferred into 0.5 M sucrose solution for 3 min and cultured *in vitro* in the medium Global Total (Life Global, USA).

Experimental data were statistically analyzed with the Student's test using the Excel software (Microsoft, USA). The differences of quantitative indices were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

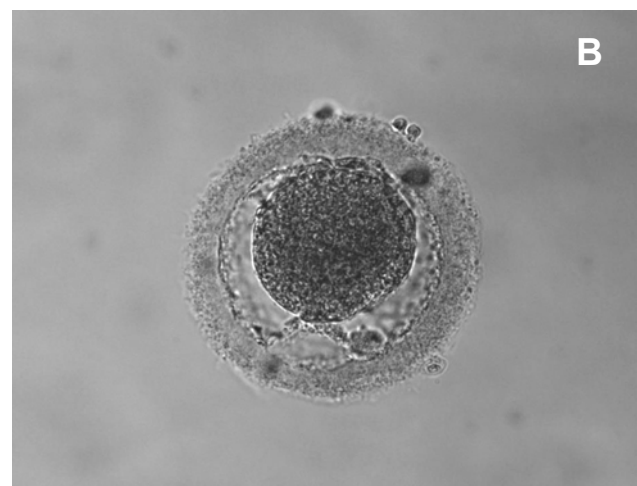


Рис. 1. Зрілі ооцити людини на стадії метафази II мейозу. Нативний препарат: **А** – ооцит до кріоконсервування; **В** – дегенерований ооцит після кріоконсервування, $\times 400$.

Fig. 1. Human mature oocytes at metaphase II. Fresh oocyte: **A** – oocyte prior to cryopreservation; **B** – degenerated oocyte after cryopreservation, $\times 400$.

Внаслідок того, що на стадії метафази II ооцити мають великий розмір, високу чутливість до низької температури через значний вміст води, а також низьке співвідношення площі поверхні до об'єму виникають певні труднощі. Так, цілісність веретена поділу має вирішальне значення для подій після запліднення й мейозу [15].

У нашому дослідженні кріоконсервування не впливало на здатність ооцитів до запліднення. Так, показник частоти формування зигот у групі 1 був на рівні нативних клітин (табл. 2).

Слід зазначити, що після заморожування-відігріву 100% ооцитів були запліднені шляхом інтрацитоплазматичної ін'єкції (ICSI), оскільки за результатами попередніх досліджень показана неефективність їх запліднення за допомогою рутинної техніки інсемінації *in vitro*. Частка ICSI циклів у групах 2 та 3 становила не більше 50% [8].

Крім того встановлено, що інтегральний показник ефективності ембріологічного етапу програми лікування безпліддя за допомогою ДРТ – частота формування бластоцист – був найвищим у пацієнок групи 2.

Встановлено, що після кріоконсервування методом вітрифікації показник частоти виживання бластоцист дорівнював ($96,8 \pm 3,3$)%, різниця якого є статистично значущою порівняно з даними щодо ефективності кріоконсервування ооцитів (табл. 2).

Незважаючи на те, що в роботі були вітрифіковані бластоцисти з різними морфофункціональними характеристиками (від ранньої до експандованої з початком виклюву з *zona pellucida*) (рис. 2, А), усі вони мали високий рівень життєздатності після відігріву (рис. 2, В).

Аналіз основних показників ефективності програм лікування безпліддя показав, що у пацієнок із циклами кріоконсервування ооцитів та ембріонів був високий рівень частоти настання вагітності, причому у групі 2 він перевищував контрольний. Ці дані свідчать про те, що вітрифікація ооцитів та ембріонів дозволяє зберегти біологічний потенціал клітин та забезпечити настання нормальної вагітності.

Таблиця 2. Ембріологічні та клінічні показники ефективності кріоконсервування ооцитів у пацієнок досліджуваних груп
Table 2. Embryological and clinical characteristics of cryopreservation efficiency of oocytes in patients of the studied groups

Показники Indices	Групи Groups		
	1	2	3
Кількість ооцитів Number of oocytes	417	1760	2509
Частота виживання ооцитів, % Survival rate of oocytes, %	$85,6 \pm 9,3$	–	–
Кількість ICSI циклів Number of ICSI cycles	43	99	152
Частота запліднення, % Fertilization rate, %	$92,7 \pm 8,8$	$96,6 \pm 7,8$	$95,3 \pm 6,5$
Частота формування бластоцист, % Frequency of blastocyst formation, %	$46,1 \pm 5,2$	$58,0 \pm 4,4^*$	$48,8 \pm 4,2$
Частота виживання бластоцист, % Survival rate of blastocysts, %	–	$96,8 \pm 3,3$	–
Кількість перенесених ембріонів на цикл, од. Number of transferred embryos per cycle, units	$2,0 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,2$
Частота настання вагітності, % Frequency of pregnancy onset, %	53,4	68	57,8
Частота імплантації, % Implantation frequency, %	27	29	18,8
Багатоплідні вагітності, % Multifetal pregnancy, %	9,3	18,5	15,8

Примітка: * – відмінність значуща у порівнянні з групами 1 та 3, $p < 0,01$.

Note: * – difference is statistically significant if compared with the groups 1 and 3, $p < 0.01$.

Results and discussion

Differences of clinical scores in the patients of the studied groups were not statistically significant (Table 1). For cryopreservation only mature oocytes at metaphase II of meiosis were used, that was evidenced by the presence of the first polar body in perivitelline space (Fig. 1A).

The survival rate of oocytes after cryopreservation was equal to (85.6 ± 9.3)%. The remaining cells had the signs of degeneration (Fig. 1B).

Since the oocytes at metaphase II are large, highly sensitive to low temperature due to significant water content, have a low ratio of surface area to volume, some difficulties appear. So, the integrity of the spindle apparatus is crucial for the events after fertilization and meiosis [13].

In our study cryopreservation did not affect the ability of oocytes to fertilize. Thus, the rate of zygote



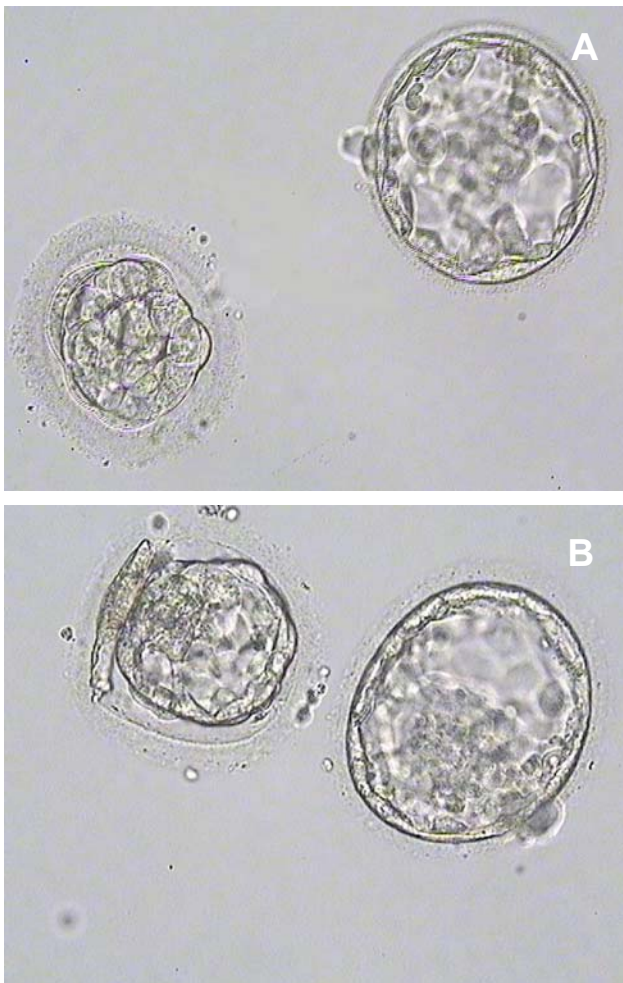


Рис. 2. Ембріони людини на стадії бластоцисти до (А) та після (В) криоконсервування. Нативний препарат; $\times 400$.

Fig. 2. Human embryos at blastocyst stage prior (A) and after (B) cryopreservation. Fresh oocyte; $\times 400$.

За даними Всесвітньої Організації Охорони здоров'я лікування безпліддя з використанням ДРТ вважається успішним, якщо вагітність мала перебіг із одним нормально розвиненим плодом [16]. Багатоплідна вагітність розглядається як ускладнення, оскільки виникає ризик передчасних пологів, народження дітей із надмірно малою масою тіла тощо [9].

На даний час перед фахівцями постає важливе питання, як знизити ризик багатоплідності та в той самий час підвищити основний показник процедур ДРТ – кількість народжених живих дітей. Розглядаються два підходи: перенесення до порожнини матки тільки одного ембріона [10] та використання інструментальної редукції для корекції числа плодів. Однак, у першому випадку істотно знижується ефективність програми ДРТ, а в другому – збільшується ризик мимовільного аборту [2].

formation in group 1 was at the level of native cells (Table 2). It should be noted that after freeze-thawing 100% of oocytes were fertilized by intracytoplasmic injection (ICSI), as the previous studies have shown the ineffectiveness of fertilization using routine techniques of *in vitro* insemination. The share of ICSI cycles in groups 2 and 3 was not more than 50% [6].

It has also been found that the integral efficiency of embryological stage of the program for treating infertility using assisted reproduction, *i.e.* the frequency of forming blastocysts, was the highest in group 2 patients.

After cryopreservation by vitrification the blastocyst survival rate made $(96.8 \pm 3.3)\%$, that was statistically significant if compared with the data on the efficiency of oocyte cryopreservation (Table 2).

Despite the fact that in this research there were vitrified the blastocysts with various morphological characteristics (from early to expanded one with the onset of *zona pellucida* hatching) (Fig. 2A), all of them had high viabilities after warming (Fig. 2B).

Analysis of key indices of efficiency of fertility treatments showed that patients with the cycles of oocyte and embryo cryopreservation had a high pregnancy onset rate, and in group 2 it exceeded the control. These data suggest that vitrification of oocytes and embryos allows preserving the biological potential of cells and providing the onset of normal pregnancy.

According to the World Health Organization the treatment of infertility using the assisted reproductive technologies is considered as successful if the pregnancy is monofetal with normal development of the fetus [14]. Multiple pregnancy is seen as a complication because there is a risk of premature birth, birth of children with extremely low birth weight *etc.* [7].

Currently the experts face big challenges as to reduce the risk of multiple fetation and at the same time to increase the basic rate of IVF procedures, the number of live born children. We are considering two approaches: transfer to the uterus of only one embryo [8] and use of reduction tool to correct the number of fetuses. However, in the first case the effectiveness of ART procedures greatly reduces and in the second the risk of spontaneous abortion appears [17].

An alternative approach might be the transfer of two embryos in a stimulated cycle, followed by cryopreservation of the embryos remaining. This will provide opportunities to establish clear morphological criteria for embryo development, *i.e.* their high implantation potential and genetic integrity.

In our study, the multiple pregnancy rate was the lowest in group 1, that could be considered as a positive result.

Альтернативним підходом може бути перенесення двох ембріонів у стимульованому циклі з подальшим кріоконсервуванням тих ембріонів, які залишилися. Це надасть можливості визначити чіткі морфологічні критерії розвитку ембріонів, тобто їх високий імплантаційний потенціал і генетичну повноцінність.

У нашому дослідженні показник частоти багатоплідних вагітностей був найменшим у групі 1, що можна вважати позитивним результатом.

Враховуючи те, що основні показники ефективності програм лікування безпліддя у пацієнок групи 1 були співставними з групами 2 та 3, можна вважати, що вітрифікація не впливала на подальшу здатність ооцитів до запліднення, розвиток та імплантацію.

Методичні підходи щодо кріоконсервування ооцитів та ембріонів п'ятої доби розвитку були ідентичними. Це пов'язане з тим, що одним із вирішальних показників при виборі методу кріоконсервування є стан цитоплазми ооцитів, яка містить 90% води. У той час ембріони на стадії бластоцисти складаються з трофектодерми та внутрішньоклітинної маси й мають розширену бластоцель, яка може займати від 50 до 90% об'єму бластоцисти.

D. Gook та співавт. [12] одержали високі показники виживання вітрифікованих ооцитів (90,5%) та частоти імплантації ембріонів (32,7%), а клінічні результати лікування безпліддя були співставними з даними без кріоконсервування. Після вітрифікації бластоцист частота виживання становила 94%, а частота імплантації – 31,5%.

У роботі J. Benard [4] увага акцентується на удосконаленні методів кріоконсервування ооцитів та ембріонів, особливо для збереження генофонду родини при онкологічних захворюваннях, але порівняльна оцінка ефективності їх кріоконсервування відсутня.

У роботі D. Gook [11] встановлено, що частота виживання ооцитів у відкритій системі дорівнює 89,7%, а у закритій – 90,5%. На відміну від нашого дослідження, автори трансплантували ембріони на другу добу розвитку, тому частота настання вагітності була нижчою.

У роботі P. Boyer [5] встановлено збільшення кумулятивного ефекту частоти клінічних вагітностей (62,0 та 69,6% відповідно) для циклів із використанням вітрифікованих ооцитів та ембріонів.

З результатами наших досліджень узгоджуються дані A. Cobo та співавт. [7]. У програмі донацій ооцитів з використанням великого матеріалу (більш 3000 «свіжих» та 3000 вітрифікованих ооцитів (92,5% виживання)) негативного впливу кріоконсервування не було виявлено.

F. Ubaldi та співавт. [18], які використовували вітрифікацію за методом M. Kuwayama, встано-

Keeping in mind that the main indices of efficiency of infertility treatment in group 1 patients were comparable with groups 2 and 3, we may assume that vitrification does not affect the following ability of oocytes for fertilization, implantation and development.

Methodological approaches to cryopreservation of oocytes and embryos up to the 5th day of development were identical. This is due to the fact that one of the critical parameters when choosing the cryopreservation method is the state of the oocyte cytoplasm, which contains 90% of water. While embryos at the blastocyst stage consist of trophoctoderm and intracellular weight and have an extended blastocoel, which can take from 50 to 90% of the blastocyst.

D. Gook *et al.* [10] obtained high survival rates of vitrified oocytes (90.5%) and embryo implantation rate (32.7%), as well as clinical outcomes were consistent with the fertility data without cryopreservation. After vitrification of blastocysts the survival rate was 94% and the implantation rate made 31.5%.

The report of J. Benard [2] focuses on improving the cryopreservation methods for oocytes and embryos, especially to preserving the family gene pool in case of oncology diseases, but a comparative evaluation of the efficiency of their cryopreservation is missing.

As reported by D. Gook [9] the survival rate of oocytes in an open system made 89.7%, and a closed one it made 90.5%. In contrast to our study, the authors transplanted the embryos on the second day of development, so the pregnancy rate was lower.

In the research of P. Boyer [3] an increase in cumulative effect of the frequency of clinical pregnancies (62.0 and 69.6%, respectively) for the cycles with the vitrified oocytes and embryos was found.

Our findings are consistent with the ones of A. Cobo *et al.* [5]. Their studies were performed during donation of oocytes at quite large material (more than 3,000 'fresh' and 3,000 vitrified oocytes (92.5% survival)) cryopreservation had no negative impact on the results of fertility treatment.

F. Ubaldi *et al.* [18] used the vitrification according to M. Kuwayama method and revealed that in patients aged over 34 the pregnancy rate and frequency of implantation were decreased. Therefore, in our next studies it would be interesting to compare the survival rate of oocytes, their fertilizing capacity and dynamics of morphological characteristics of embryos in women of all the ages.

Some studies emphasized the futility of oocyte cryopreservation because of reduced quality of embryos and the small number of blastocysts derived from vitrified oocytes. D. Braga *et al.* [4] suggest that vitrification of oocytes followed by intracytoplasmic sperm injection reduces the embryo competence compared with 'fresh' cycles.



вили, що у пацієнок віком від 34 років знижувалася частота настання вагітності та частота імплантації. Тому в наших наступних дослідженнях було б цікаво порівняти показники виживання ооцитів, їх запліднюючу здатність та динаміку морфофункціональних характеристик ембріонів у жінок різного віку.

У деяких роботах вказується на безперспективність криоконсервування ооцитів через зниження якості ембріонів та малу кількість бластоцист, отриманих із вітрифікованих ооцитів. D. Braga та співавт. [6] вважають, що вітрифікація ооцитів із подальшою інтрацитоплазматичною ін'єкцією сперми призводить до зниження компетентності ембріона у порівнянні з «свіжими» циклами.

L. Herrero та співавт. [13] зробили висновок, що незважаючи на те, що криоконсервування ооцитів не впливає на подальший розвиток ембріона, необхідним є дослідження стану здоров'я народжених дітей для виключення будь-яких несприятливих наслідків криоконсервування.

Висновки

Таким чином, криоконсервування за допомогою вітрифікації не впливало на запліднюючу здатність ооцитів, проте показник частоти формування бластоцист був значуще нижчим, ніж у групах без криоконсервування. Незважаючи на це, основні клінічні характеристики ефективності лікування співставні в групах пацієнок із вітрифікацією ооцитів та ембріонів і в групі, в якій криоконсервування не проводилося.

Оскільки криоконсервування ооцитів дозволяє вирішити низку медичних, соціальних, морально-етичних, юридичних та правових проблем, то вони мають стати альтернативою для криоконсервування ембріонів із метою використання у допоміжних репродуктивних технологіях.

Література

1. Петрушко М.П. Использование криоконсервированных эмбрионов человека во вспомогательных репродуктивных технологиях // Проблемы криобиологии. – 2000. – №1. – С. 71–75.
2. Рябенко О.П., Туманова Л.Е., Берестовой О.А. Современное состояние проблемы супермногоплодных беременностей и селективной редукции эмбрионов // Здоровье женщины. – 2003. – Т. 14, №2. – С. 66–70.
3. ASRM Guidelines for Practice. Mature oocytes cryopreservation: the guideline // Fertil. Steril. – 2013. – Vol. 99, №1. – P. 37–43.
4. Benard J., Duros S., El Hachem H. et al. Freezing oocytes or embryos after controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients: the state of the art // Future Oncol. – 2016. – Vol.12, №14. – P. 1731–1741.
5. Boyer P. Controversy in ART: should we cryopreserve oocytes or embryos? Do prefer oocytes // Gynecol. Obstet. Fertil. – 2014. – Vol. 42, №9. – P. 628–629.

The paper of L. Herrero *et al.* [11] concluded that despite the fact that oocyte cryopreservation has no effect on the further development of the embryo, it is necessary to study the health of children born to rule out any adverse effects of cryopreservation.

Conclusions

Thus, cryopreservation by vitrification did not affect the fertilizing ability of oocytes, but the rate of blastocysts formation was significantly lower versus the groups with no cryopreservation. Nevertheless, the basic clinical characteristics of treatment efficiency were comparable in the groups of patients with oocyte and embryos vitrification, as well as in the group with no cryopreservation.

Since the cryopreservation of oocytes allows the solving of a number of medical, social, ethical, legal and juridical problems, then they could be an alternative when using in the assisted reproductive technologies.

References

1. ASRM Guidelines for Practice. Mature oocytes cryopreservation: the guideline. Fertil Steril 2013; 99(1): 37–43.
2. Benard J., Duros S., El Hachem H. et al. Freezing oocytes or embryos after controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients: the state of the art. Future Oncol 2016; 12(14): 1731–1741.
3. Boyer P. Controversy in ART: should we cryopreserve oocytes or embryos? Do prefer oocytes. Gynecol Obstet Fertil 2014; 42(9): 628–629.
4. Braga D., Setti A., Figueira R. et al. Freeze-all, oocyte vitrification, or fresh embryo transfer? Lessons from an egg-sharing donation program. Fertil Steril 2016; 106(3): 615–622.
5. Cobo A., Meseguer M., Remohi J. et al. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. Hum Reprod 2010; 25(9): 2239–2246.
6. Debra A., Gook M., Schiewe C. et al. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. Hum Reprod 1995; 10(10): 2637–2641.
7. Elster N. Less is more: the risks of multiple births. Fertil Steril 2000; 74(4): 617–623.
8. Eum J., Park J., Kim S., Paek S. Clinical outcomes of single versus double blastocyst transfer in fresh and vitrified-warmed cycles. Clin Exp Reprod Med 2016; 43(3): 164–188.
9. Gook D., Choo B., Bourne H. et al. Closed vitrification of human oocytes and blastocysts: outcomes from a series of clinical cases. J Assist Reprod Genet 2016; 33(9): 1247–1252.
10. Gook D., Edgar D. Implantation rates of embryos generated from slow cooled human oocytes from young women are comparable to those of fresh and frozen embryos from the same age group. J Assist Reprod Genet 2011; 28(12): 1171–1176.
11. Herrero L., Pareja S., Aragonés M. et al. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study. Reprod Biomed Online 2014; 29(5): 567–572.
12. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. Theriogenology 2007; 67(1): 73–80.
13. Mandawala A., Harvey S., Roy T. et al. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. Theriogenology 2016; 86(7): 1637–1644.



6. Braga D., Setti A., Figueira R. et al. Freeze-all, oocyte vitrification, or fresh embryo transfer? Lessons from an egg-sharing donation program // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 106, №3. – P. 615–622.
7. Cobo A., Meseguer M., Remohi J. et al. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, №9. – P. 2239–2246.
8. Debra A., Gook M., Schiewe C. et al. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №10. – P. 2637–2641.
9. Elster N. Less is more: the risks of multiple births // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 74, №4. – P. 617–623.
10. Eum J., Park J., Kim S. et al. Clinical outcomes of single versus double blastocyst transfer in fresh and vitrified-warmed cycles // *Clin. Exp. Reprod. Med.* – 2016. – Vol. 43, №3. – P. 164–168.
11. Gook D., Choo B., Bourne H. et al. Closed vitrification of human oocytes and blastocysts: outcomes from a series of clinical cases // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2016. – Vol. 33, №9. – P. 1247–1252.
12. Gook D., Edgar D. Implantation rates of embryos generated from slow cooled human oocytes from young women are comparable to those of fresh and frozen embryos from the same age group // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2011. – Vol. 28, №12. – P. 1171–1176.
13. Herrero L., Pareja S., Aragonés M. et al. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study // *Reprod. Biomed. Online.* – 2014. – Vol. 29, №5. – P. 567–572.
14. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method // *Theriogenology.* – 2007. – Vol. 67, №1. – P. 73–80.
15. Moussa M., Shu J., Zhang X. et al. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives // *Sci China Life Sci.* – 2014. – Vol. 57, №9. – P. 903–914.
16. Multiple gestation pregnancy. The ESHRE Capri Workshop Group // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15, №8. – P. 1856–1864.
17. Protocol on Embryo Protection A Working Party of the 24-th Meeting of the Steering Committee on Bioethics of the Council of Europe; Report. – Strasbourg, 2003. – 44 p.
18. Ubaldi F., Anniballo R., Romano S. et al. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, №5. – P. 1199–1205.
14. Multiple gestation pregnancy. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum Reprod* 2000; 15(8): 1856–1864.
15. Petrushko M.P. Application of cryopreserved human embryos in the assisted reproductive technologies. *Probl Cryobiol* 2000; (1): 71–75.
16. Protocol on Embryo Protection A Working Party of the 24-th Meeting of the Steering Committee on Bioethics of the Council of Europe; Report Strasbourg, 2003. – 44 p.
17. Ryabenko O.P., Tumanova L.E., Berestovoy O.A. Current state of problem of super-multifetal pregnancies and selective reduction of embryos. *Zdorovye Zhenschiny* 2003; 14(2): 66–70.
18. Ubaldi F., Anniballo R., Romano S. et al. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Hum Reprod* 2010; 25(5): 1199–1205.

