

УДК 612.613.1:57.086.13

Т.О. Юрчук<sup>1,3\*</sup>, М.П. Петрушко<sup>1,2</sup>

## Результати 25-річного досвіду кріоконсервування ооцитів людини методом вітрифікації. Чого ми досягли і що далі?

UDC 612.613.1:57.086.13

T. O. Yurchuk<sup>1,3\*</sup>, M.P. Petrushko<sup>1,2</sup>

### Quarter-Century Experience in Cryopreservation of Human Oocytes by Vitrification. What Has Been Achieved and What is Next?

**Реферат:** Кріоконсервування ооцитів людини методом вітрифікації увійшло в щоденну практику допоміжних репродуктивних технологій у боротьбі з безпліддям та збереженні репродуктивного потенціалу жінки. Огляд літератури вмістив результати досліджень, виконаних представниками різних наукових шкіл протягом останніх 25 років; історичні передумови розробки технології кріоконсервування ооцитів людини за допомогою вітрифікації; особливості та складнощі, які виникають під час її реалізації; медичні та соціальні показники збереження фертильності. Особливу увагу приділено питанням генетичної безпеки вказаного методу щодо збереження здоров'я нащадків. У статті викладено погляд на розв'язання проблем вітрифікації ооцитів людини та визначено шляхи їх подолання.

**Ключові слова:** вітрифікація, ооцити людини, осмотична реакція, оксидативний стрес, мейотичне веретено, епігенетичні зміни, анеуплоїдія, кріопротектори, автоматична вітрифікація.

**Abstract:** Cryopreservation of human oocytes by the vitrification has become a part of the daily practice of assisted reproductive technologies to fight an infertility and to preserve the woman's reproductive potential. This literature review covers the results of the studies performed by various scientific schools during 25 years; historical prerequisites for the development of cryopreservation of human oocytes by vitrification; medical and social indices to apply this method, features and complications arising during vitrification of human oocytes. Special attention has been paid to the issues regarding the genetic safety of the method mentioned in respect of the health of future descendants. The paper presents the insight on unsolved tasks in vitrification of oocytes and that of identified ways to overcome the challenges.

**Key words:** vitrification, human oocytes, osmotic reaction, oxidative stress, meiotic spindle, epigenetic changes, aneuploidy, cryoprotective agents, automated vitrification.

#### Історія розробки технології кріоконсервування ооцитів людини методом вітрифікації

Засновником вітрифікації прийнято вважати Basil J. Luyet — професора біології Університету Сент-Луїса, який у 1938 р. вперше опублікував результати досліджень з переохолодженими розчинами, що утворювали прозорий скляний стан. Процес склування пізніше був названий «вітрифікацією». В його експериментах склування розчинів досягалося виключно понадвисокими швидкостями охолодження. Над розв'язанням проблеми вітрифікації ембріонів миші понад десять років працювали G. Fahy та B. Rall, які за допомогою кріомікроскопії встановили

#### History of the development of the technique to cryopreserve human oocytes by vitrification

Basil J. Luyet, professor of biology at the University of St. Louis, is considered the founder of vitrification, in 1938 he for first time published the results of research with supercooled solutions that formed a transparent glass state. The glass forming process was later called 'vitrification'. In his experiments, vitrification of the solutions was achieved exclusively by extremely high cooling rates. For more than ten years, G. Fahy and B. Rall worked on solving the problem of vitrification of mouse embryos, and using cryomicroscopy he established the fact that the viscosity of

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна;

<sup>2</sup> ДРТ клініка репродуктивної медицини, м. Харків, Україна;

<sup>3</sup> Інститут репродукції тварин і дослідження харчування Польської академії наук, м. Ольштин, Польща

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine;

<sup>2</sup> DRT clinic of Reproductive Medicine, Kharkiv, Ukraine;

<sup>3</sup> Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

**\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: taisiya.yur@gmail.com

**\*To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: taisiya.yur@gmail.com

Надійшла 16.03.2023

Прийнята до друку 18.09.2023

Received 16, March, 2023

Accepted 18, September, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

факт підвищення в'язкості цитоплазми клітин після додавання у середовище кріопротекторів (КП) у високій концентрації та застосування понадвисоких швидкостей охолодження [26].

З часом удосконалювалися наукові підходи, розроблялися нові методи кріоконсервування різних типів клітин, тканин, ембріонів людини і тварин [2, 11, 16, 40, 62]. З 1990 р. розпочалися дослідження у напрямку освоєння методу вітрифікації. Особливу увагу науковці приділяли питанню зниження цитотоксичності високих концентрацій КП. Було з'ясовано, що скорочення тривалості експозиції розчинів для склування зменшує їхню токсичність [66], та запропоновано використання суміші КП, яка дозволяє зберегти високу концентрацію КП у захисному розчині, але істотно знижує їхній токсичний ефект на клітини [35].

Проте можливість кріоконсервування ооцитів людини викликала у дослідників великий сумнів. Основна проблема низькотемпературного консервування ооцитів зумовлена особливостями їхньої будови, а саме: великим розміром, високим вмістом води, наявністю глікопротеїнової оболонки *Zona pellucida* (ZP) та низьким співвідношенням площі поверхні до об'єму клітини [4].

Значним проривом у розвитку технології кріоконсервування ооцитів людини стала робота відомої вченої, українки Лілії Кулешової [41], яка вперше успішно вітрифікувала ооцити людини в 1–2 мкл середовища з 40% етиленгліколю (ЕГ) та 0,6 моль/л сахарози у відкритих витягнутих соломинках. Однак протягом наступних років дослідження з вітрифікації ооцитів людини демонстрували суперечливі результати щодо ефективності та безпеки даного методу, перед усім генетичної, що стало основним обмеженням для широкого клінічного використання [57].

Проте ситуація змінилася завдяки напрацюванням М. Куwayama та співавт., які у 2005 р. заявили про створення методу вітрифікації «Cryotop» [42]: після 10-хвилинної еквілібрації ооцитів у розчині, що містив 7,5% об./об. ЕГ та 7,5% об./об. ДМСО, їх переміщували у вітрифікаційний розчин із 15% об./об. ЕГ та 15% об./об. ДМСО з додаванням 0,5 моль/л сахарози. Після цього ооцити у мінімально можливому об'ємі середовища (до 1 мкл) переносили на спеціальний кріоносій відкритого типу та занурювали в рідкий азот. Саме такий протокол вітрифікації став широковживаним в індустрії допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) з огляду на кріобанкінг ооцитів і використання у світовій практиці.

the cell cytoplasm increases after the addition of cryoprotectants (CPAs) in a high concentration to the medium and the use of extremely high cooling rates [26].

Over time, scientific approaches were improved, new cryopreservation methods for various types of human and animal cells, tissues, and embryos were developed [2, 11, 16, 40, 62]. Since 1990, the studies were targeted to mastering the vitrification. Scientists paid special attention to the issue of reducing the cytotoxicity of high concentrations of CPA. It was found that reducing the duration of exposure to vitrification solutions decreased their toxicity [66], and the use of a CPA mixture was proposed, that enabled maintaining a high concentration of CPA in protective solution, but significantly reduced their toxic effect on cells [35].

However, the possibility of cryopreservation of human oocytes caused a great doubt among researchers. The main problem of low-temperature preservation of oocytes is caused by the peculiarities of their structure, namely: large size, high water content, the presence of a *Zona pellucida* (ZP) glycoprotein shell, and a low ratio of surface area to cell volume [4].

A significant breakthrough in the development of the cryopreservation technique for human oocytes was done with the research of a well-known scientist, our compatriot and colleague Dr. Lilia Kuleshova [41], she for the first time successfully vitrified human oocytes in 1–2  $\mu$ l of medium with 40% ethylene glycol (EG) and 0.6 mol/l sucrose in open drawn straws. However, during the following years, the studies on vitrification of human oocytes demonstrated conflicting results regarding its effectiveness and safety, primarily genetic, which became the main limitation for the wide clinical use of this method [57].

However, M. Kuwayama *et al.* has changed the situation, in 2005 he announced the creation of the 'Cryotop' vitrification [42]: after 10-min equilibration of oocytes in a solution containing 7.5% vol./vol. EG and 7.5% vol./vol. DMSO, they were removed into a vitrification solution with 15% v/v. EG and 15% vol./vol. DMSO with the addition of 0.5 mol/l sucrose. Afterwards, oocytes in the minimum possible medium volume (up to 1  $\mu$ l) were transferred to a special open-type cryocarryer and immersed in liquid nitrogen. This vitrification protocol became widely used in the industry of assisted reproductive technologies (ART) in view of cryobanking oocytes and their use in global practice.

In 2012, the American Society of Reproductive Medicine, after a thorough meta-analysis of rando-



У 2012 р. Американське товариство репродуктивної медицини після ретельного метааналізу рандомізованих багатоцентрових досліджень прийняло рішення зняти з технології кріоконсервування ооцитів статус «експериментальної». Це дозволило її використовувати в клініках з лікування безпліддя методами ДРТ [64].

### **Показання щодо низькотемпературного банкінгу ооцитів**

Сьогодні кріоконсервування — невід’ємна частина технології, спрямованої на збереження фертильності людини. На початку двохтисячних років кріоконсервування використовувалося в протоколах лікування онкологічних пацієнтів виключно через ризик втрати оваріальної функції після променевої, радіо- або хіміотерапії. Пізніше сфера застосування кріоконсервування ооцитів людини поширилась на програми донорства гамет, які гарантували виключення інфікування ВІЛ, гепатитом та іншими інфекційними агентами, які передаються статевим шляхом, завдяки витримці у окремому репозитарії протягом 6 місяців. У разі підтвердження негативної реакції на антитіла до блідої трепонеми, антитіла класу М, G, ВІЛ 1, ВІЛ 2 або вірусів гепатитів В та С донорський матеріал дозволено застосовувати.

Завдяки впровадженню методів молекулярної біології у практику ДРТ розширився перелік показань щодо збереження фертильності шляхом кріоконсервування ооцитів. Так, у разі виявлення у пацієнтів поліморфних варіантів деяких генів, зокрема мутації гена-супресора пухлин (BRCA), що асоційовані з високим ризиком розвитку раку яєчників, показано кріоконсервування ооцитів перед профілактичною сальпінгоофоректомією [15].

Сучасні кріотехнології і молекулярно-генетичні методи передімплантаційно-генетичної діагностики дозволяють зберегти ооцити жінок з метою подальшої селекції та уникнення таких порушень, як мозаїчна форма синдрому Шерешевського-Тернера, делеції X хромосоми, премутації X ламкої хромосоми та ін. [30]. Кріоконсервування статевих клітин показано жінкам з виснаженням оваріального резерву та передчасною недостатністю яєчників [12].

В останні десятиліття через підвищення середнього віку жінок на момент першої вагітності великої популярності набула концепція «age banking». Відсутність партнера, фінансові причини, прагнення до самореалізації та кар’єрного зростання — фактори, які спонукають жінок відкладати народження дитини, тому

mized multicenter studies, decided to withdraw the oocyte cryopreservation technique from the ‘experimental’ status. This allowed it to be used in infertility treatment clinics using ART methods [64].

### **Indications for low-temperature banking of oocytes**

Today, cryopreservation is an integral part of technology aimed at preserving human fertility. At the beginning of the 2000s, cryopreservation was used in the treatment protocols for oncology patients exclusively at a risk of ovarian function loss after radiation, radio-, or chemotherapies. Later, the application field of cryopreservation of human oocytes expanded to gamete donation programs, that guaranteed the exclusion of infection with HIV, hepatitis and other sexually transmitted infectious agents because of aging in a separate repository for 6 months. In case of confirmed negative reaction to antibodies to pale treponema, class M, G antibodies to HIV 1, HIV 2 or hepatitis B and C viruses the donor material is allowed to be used.

Due to the implementation of molecular biology in the practice of ART, the list of indications for preserving fertility by cryopreservation of oocytes has expanded. Thus, when detecting the polymorphic variants of some genes in patients, in particular mutations of the tumor suppressor gene (BRCA), associated with a high risk of developing ovarian cancer, cryopreservation of oocytes before prophylactic salpingo-oophorectomy is indicated [15].

Modern cryotechniques and molecular genetics methods of pre-implantation genetic diagnosis make it possible to preserve the oocytes of women for further selection and avoidance of such disorders as the mosaic form of Shereshevsky-Turner syndrome, deletion of the X chromosome, pre-mutation of the fragile X chromosome, *etc.* [30]. Cryopreservation of asexual cells is indicated for women with depleted ovarian reserve and premature ovarian failure [12].

In recent decades, with a rise in the average age of women at the time of their first pregnancy, the concept of ‘age banking’ has gained great popularity. The lack of a partner, financial reasons, the desire for self-realization and career growth are factors that encourage women to postpone the birth of a child, so only banking cells can provide an opportunity to conceive their own genetic offspring in future [72].

In European countries, wherein a moratorium on embryo freezing has been introduced, or if



тільки банкінг ооцитів може надати можливість зачати власне генетичне потомство у майбутньому [72].

У європейських країнах, де введено мораторій на заморожування ембріонів, або якщо ця процедура не може бути здійснена з релігійних, етичних чи інших причин єдиною альтернативою збереження фертильності є кріоконсервування ооцитів [6].

Попри широке впровадження кріотехнологій у практику медичних закладів, які займаються лікуванням безпліддя за допомогою ДРТ, науковці продовжують фундаментальні дослідження наслідків потужного фізико-хімічного навантаження клітинних структур та генетичної цілісності ооцитів після їх низькотемпературного консервування методом вітрифікації [46, 60].

### **Підходи та принципи кріоконсервування ооцитів методом вітрифікації**

Основними проблемами кріоконсервування різних типів клітин (зокрема, ооцитів) є утворення кристалів льоду та токсичний вплив високих концентрацій КП. Для успішного кріоконсервування одна частина молекул води цитоплазми ооцита має бути замінена на молекули КП, тоді як інша — перебуває у зв'язаному стані з іншими органічними молекулами. Така система приводить до зниження температури фазового переходу та зменшення внутрішньоклітинної кристалізації під час низькотемпературного охолодження [55]. Ступінь дегідратації ооцита залежить від проникності його клітинної мембрани для молекул води та КП. Слід зазначити, що даний показник у окремих ооцитів, які перебувають на стадії метафази II (MII), може відрізнятись в 7 разів [25]. У процесі кріоконсервування методом вітрифікації кристали льоду не утворюються, а клітинна та позаклітинна рідина одразу переходить у склоподібний стан. Це досягається комбінацією високих концентрацій (4–8 моль/л) КП та надвисокими (10000–30000 °C/хв) швидкостями охолодження [21].

Важливо зазначити, що під час вітрифікації для життєздатності клітин виникає потенційний ризик через використання високих концентрацій розчинів КП, які можуть бути токсичними. Змішування різних КП дозволяє зменшити відносну концентрацію кожної речовини та скоротити тривалість експозиції ооцитів до мінімальної. Для вітрифікації ооцитів людини використовують проникні (EG, ДМСО, 1,2-пропандіол) та непроникні КП (сахароза, трегалоза, поліетиленгліколь, фікол, полівінілпіролі-

this procedure cannot be performed because of religious, ethical or other reasons, the only alternative to preserving fertility is cryopreservation of oocytes [6].

Despite the wide implementation of cryotechniques in the practice of medical institutions engaged in treating an infertility with the help of ART, scientists continue fundamental research into the consequences of powerful physical and chemical stress on cell structures and the genetic integrity of oocytes after their low-temperature preservation by vitrification [46, 60].

### **Approaches and principles of cryopreservation of oocytes by vitrification**

The main problems of cryopreservation of various types of cells (in particular, oocytes) are the formation of ice crystals and the toxic effect of high concentrations of CPA. For successful cryopreservation, part of the water molecules of the cytoplasm of the oocyte must be replaced by CPA molecules, while the rest part is in a bound state with other organic molecules. This leads to a decrease in the temperature of the phase transition and a decrease in intracellular crystallization during low-temperature cooling [55]. The rate of oocyte dehydration depends on the permeability of its cell membrane to water molecules and CPA. It should be noted that this index of individual oocytes that are at the stage of metaphase II (MII) can differ by 7 times [25]. During cryopreservation using the vitrification, ice crystals are not formed, but cellular and extracellular liquids immediately turn into a glassy state. This is achieved by a combination of high concentrations (4–8 mol/l) of CPA and ultrahigh (10,000–30,000°C/min) cooling rates [21].

It is important to note that during vitrification, there is a potential risk for the cell viability because of the use of high concentrations of CPA solutions, which can be toxic. Mixing different CPAs allows you to reduce the relative concentration of each substance and decrease the duration of oocyte exposure to a minimum. For vitrification of human oocytes, permeable (EG, DMSO, 1,2-propanediol and impermeable CPAs (sucrose, trehalose, polyethylene glycol, ficol or polyvinylpyrrolidone, etc.) are used) [44]. Another condition for successful vitrification of oocytes is a minimum volume (0.1–2 µl) of vitrification solution [19]. With this aim, special carriers have been developed, *i. e.* microstraws, copper meshes, polypropylene plates [72]. Open-type carriers are elongated straws [34], 'Cryoloops' [27], 'Cryotops' [42] a very thin film on which the oocyte is



дон та ін.) [44]. Ще однією умовою успішної вітрифікації ооцитів є мінімальний об'єм (0,1–2 мкл) вітрифікаційного розчину [19]. Для цього розроблено спеціальні носії: мікросоломинки, мідні сітки, поліпропіленові пластики [72]. Носії відкритого типу — витягнуті соломинки [34], «Cryoloops» [27], «Cryotops» [42] з дуже тонкою плівкою, на яку розміщують ооцит. Такі соломинки забезпечують понадвисоку швидкість охолодження при занурюванні у рідкий азот. Тривалий час клініцисти віддавали перевагу саме використанню таких кріоносіїв, але вимоги біобезпеки низькотемпературного зберігання репродуктивних клітин обумовили необхідність розроблення асептичних носіїв закритого типу, які здатні забезпечити понадвисокі швидкості охолодження та відігріву [50]. Задля цього були запропоновані закриті системи [13], однак результати кріоконсервування виявилися нижчими за отримані при використанні відкритих носіїв [70].

Досягнення високих показників виживання вітрифікованих ооцитів можливе лише шляхом дотримання оптимальної швидкості нагрівання та поступового видалення кріозахисного розчину. Для запобігання утворенню внутрішньоклітинної рекристалізації важливо, щоб швидкість нагрівання була більш високою за швидкість охолодження [22]. При цьому рівень осмотичного стресу ооцитів при видаленні КП необхідно регулювати поступовим зменшенням концентрації непроникних КП у середовищі [63].

За останні 25 років підвищилась ефективність методу вітрифікації і відкрились нові практичні перспективи в сфері ДРТ, однак для його стандартизації потрібно вирішити низку питань, які будуть розглянуті у наступних розділах.

### **Вплив вітрифікації на структурно-функціональні характеристики ооцитів**

Кріоконсервування може призвести до відтермінованих сублетальних порушень: структурні та функціональні зміни плазматичних мембран, пошкодження внутрішньоклітинних органел та апарату мейотичного веретена, передчасне затвердіння *ZP*, фрагментація ДНК, партеногенез, порушення експресії генів, епігенетичні наслідки, старіння *in vitro* (рисунок).

Плазматичні мембрани ооцитів є структурами, які зазнають механічного пошкодження, спричиненого осмотичними змінами та втратою плинності ліпідних компонентів [65]. На різних етапах кріоконсервування, в результаті дії високих концентрацій КП на мембрані ооцита

placed. Such straws provide an extremely high cooling rate when immersed in liquid nitrogen. For a long time, clinicians preferred the use of such cryocarriers, but the biosafety requirements of low-temperature storage of reproductive cells necessitated the development of closed aseptic carriers capable of providing extremely high cooling and rewarming rates [50]. For this purpose, closed systems were proposed [13], however, the results of cryopreservation turned out to be lower than those obtained when using open media [70].

Achieving high survival rates of vitrified oocytes is possible only by observing the optimal heating rate and gradual removal of cryoprotective solution. To prevent the formation of intracellular recrystallization, it is important that the rate of heating is higher than the one of cooling [22]. At the same time, the level of osmotic stress for cells during the CPA removal must be regulated by a gradual decrease in the concentration of impermeable CPA in the medium [63].

Over the past 25 years, the vitrification method has achieved significant success and opened new practical prospects in the field of ART, however, for its standardization, a number of issues need to be resolved, which will be discussed in the following sections.

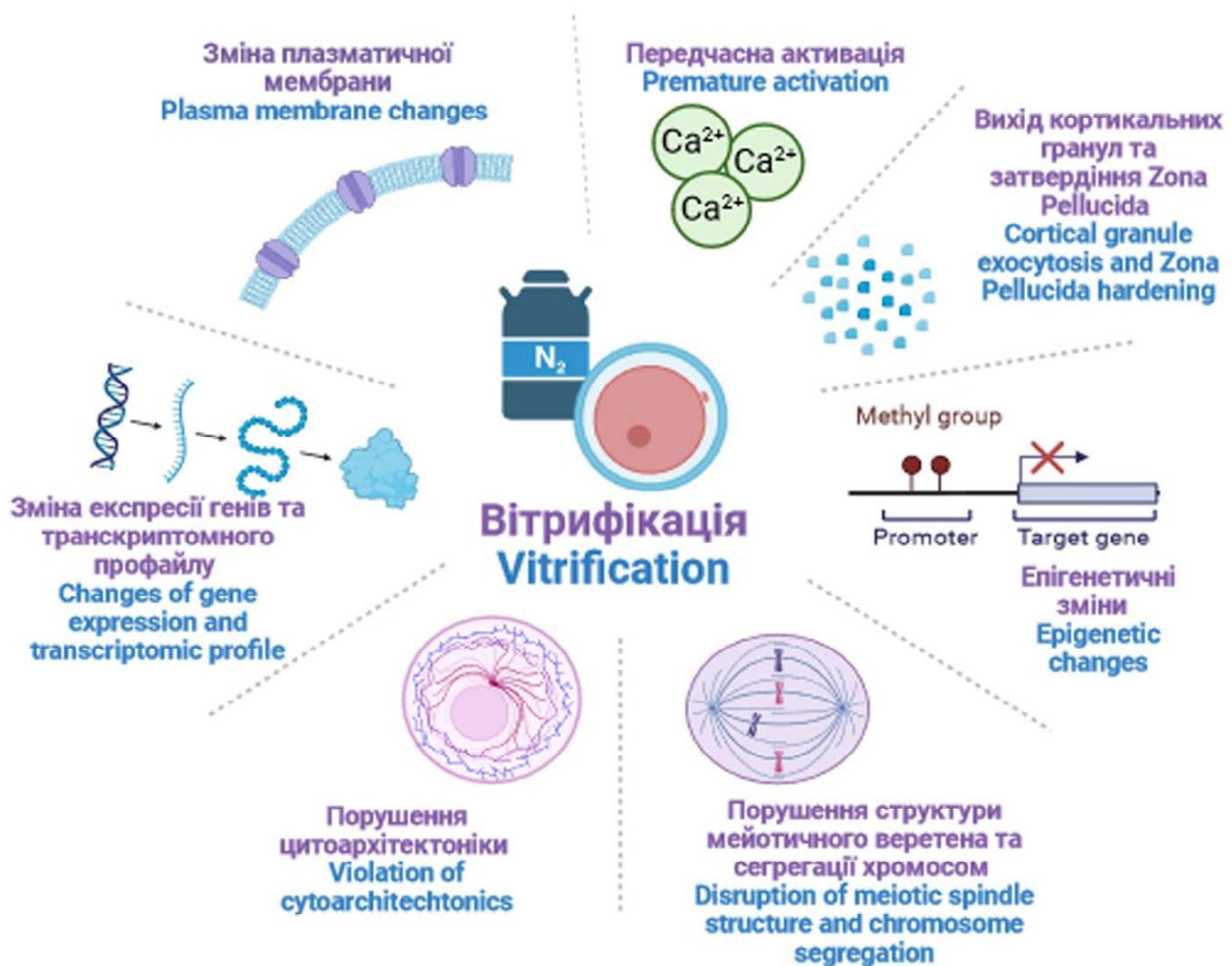
### **Effect of vitrification on structure and functions of oocytes**

Cryopreservation can lead to delayed sublethal disorders: structural and functional changes in plasma membranes, damage to intracellular organelles and the meiotic spindle apparatus, premature hardening of the *ZP*, DNA fragmentation, parthenogenesis, disruption of gene expression, epigenetic consequences, aging *in vitro* (Figure).

Plasma membranes of oocytes are structures that undergo mechanical damage caused by osmotic changes and loss of fluidity of lipid components [65]. At different stages of cryopreservation, as a result of the action of high concentrations of CPA, the concentration gradients on the oocyte membrane alter, and as a consequence, the structural and functional characteristics of the cell change.

In addition, the oolemma contains proteins in which, under the influence of sufficiently high concentrations of cytotoxic CPAs, stability may decrease and denaturation may occur, that leads to the loss of their functional properties. Also, some membrane proteins are associated with cytoskeleton proteins, namely microtubule proteins,





Структурно-функціональні зміни після криоконсервування ооцитів методом вітрифікації.  
Structural and functional changes after cryopreservation of oocytes by vitrification.

змінюються концентраційні градієнти, а внаслідок — структурно-функціональні характеристики клітини.

Крім того, плазмолема містить білки, у яких під впливом досить великих концентрацій цитотоксичних КП може знижуватись стабільність та відбуватися денатурація, що призводить до втрати їх функціональних властивостей. Крім того, деякі мембранні білки зв'язані з білками цитоскелета, а саме з білками мікротрубочок, які, як відомо, відіграють головну роль у формуванні мейотичного веретена [28]. Тому спричинені вітрифікацією зміни структури мембранних білків можуть викликати порушення веретена поділу та опосередковано збільшити рівень хромосомних анеуплоїдій після завершення мейозу [31, 43].

Локалізація веретена поділу в ооплазмі, екструзія другого полярного тільця, міграція пронуклеусів та дроблення бластомерів залежать від функціонального стану F-актину. Після вітрифікації кількість ооцитів з його

які є відомі, що грають важливу роль у формуванні мейотичного веретена [28]. Тому, зміни в структурі мембранних білків, спричинені вітрифікацією, можуть призвести до порушення структури веретена поділу та опосередковано збільшити рівень хромосомних анеуплоїдій після завершення мейозу [31, 43].

Локалізація веретена поділу в ооплазмі, екструзія другого полярного тільця, міграція пронуклеусів та фрагментація бластомерів залежать від функціонального стану F-актину. Після вітрифікації, кількість ооцитів з його нормальною розподілом зменшується майже вдвічі, що може призвести до порушення сегрегації хромосом та збільшити частоту хромосомних анеуплоїдій ембріонів [7].

Фактори криоконсервування здатні спричинити ультраструктурні зміни мітохондрій та шорсткого ендоплазматичного ретикулуму, які залучені до сигнального механізму  $Ca^{2+}$  після проникнення сперми [49]. Передчасне звільнення  $Ca^{2+}$  після вітрифікації може спричинити партогенетичну акти-



нормальним розподілом знижується майже у 2 рази, що врешті може порушити сегрегацію хромосом та збільшити частоту хромосомних анеуплоїдій ембріонів [7].

Фактори кріоконсервування здатні викликати ультраструктурну модифікацію мітохондрій та гладкого ендоплазматичного ретикулу, які беруть участь у механізмі передачі сигналів  $Ca^{2+}$ , після проникнення сперматозоїда [49]. Передчасне вивільнення  $Ca^{2+}$  після вітрифікації може викликати партеногенетичну активацію ооцита, що унеможливує його подальше запліднення сперматозоїдом [56].

Нефізіологічне вивільнення кортикальних гранул разом із затвердінням *ZP* внаслідок кріоконсервування може знизити частоту запліднення [46]. Наразі дане питання вирішено, оскільки запліднення шляхом інтрацитоплазматичного введення сперматозоїда в ооцит (ICSI) дозволяє оминати бар'єр, який створює затверділа *ZP*.

Питання впливу кріоконсервування на фрагментацію ДНК ооцитів наразі не з'ясовано, оскільки результати досліджень досить обмежені, а дані, які отримані на модельних об'єктах, є суперечливими [49, 58].

Показано, що вітрифікація суттєво не впливає на загальну експресію генів, попри це, вона може впливати на транскрипцію окремих функціональних генів [78]. Так, результати секвенування транскриптомів показали, що вітрифікація збільшує експресію проапоптотичного гена *Bax*, та відповідно знижує експресію антиапоптотичного гена *Bcl-2* [22, 32, 37, 74]; знижує експресію генів, пов'язаних із раннім ембріональним розвитком [29] та змінює експресію деяких імпринтованих генів через збільшення метилювання ДНК [24, 48].

Дані сучасної літератури свідчать про те, що епігенетичні та транскриптомічні профілі ооцитів та отриманих із них ембріонів чутливі до факторів кріоконсервування [5, 17, 73]. Доведено, що у потомства першої генерації лінії мишей, отриманих з вітрифікованих ооцитів, підвищувався рівень тригліцеридів і діастолічний артеріальний тиск [33].

Крім того, важливо враховувати віковий фактор, який впливає на ефективність кріотехнологій. Насамперед це пов'язано з вадами енергетичного метаболізму мітохондрій та збільшенням хромосомних аномалій, які виникають протягом дозрівання гамет [76]. Кількість хромосомних еуплоїдій ембріонів, отриманих із вітрифікованих ооцитів жінок пізнього репродуктивного віку, більша за кількість у нативних клітинах (31,2 проти 24,4%,  $p < 0,05$ ), при цьому кіль-

vation of the oocyte, making its further fertilization by sperm impossible [56].

Non-physiological release of cortical granules together with hardening of *ZP* as a result of cryopreservation can reduce the frequency of fertilization [46]. Currently, this issue has been resolved, as fertilization by intracytoplasmic sperm injection into the oocyte (ICSI) allows bypassing the barrier created by the hardened *ZP*.

The question of the effect of cryopreservation on DNA fragmentation of oocytes has not yet been clarified, since the results of research are quite limited, and the data obtained in model objects are contradictory [49, 58].

Vitrification has been shown not to significantly affect the general expression of genes, however, it may do the transcription of individual functional genes [78]. Thus, the results of transcriptome sequencing showed that vitrification increased the expression of the pro-apoptotic gene *Bax*, and accordingly decreased the expression of the anti-apoptotic gene *Bcl-2* [22, 32, 37, 74]; reduced the expression of genes associated with early embryonic development [29] and altered the expression of some imprinted genes through increased DNA methylation [24, 48].

Current published data demonstrate that the epigenetic and transcriptomic profiles of oocytes and embryos obtained from them are sensitive to cryopreservation factors [5, 17, 73]. It has been proven that the level of triglycerides and diastolic blood pressure increased in the offspring of the first generation of the line of mice obtained from vitrified oocytes [33].

In addition, it is important to consider the age factor, which affects the effectiveness of cryotechniques. This is primarily due to defects in the energy metabolism of mitochondria and an increase in chromosomal abnormalities that occur during the maturation of gametes [76]. The number of chromosomal euploidy of embryos obtained from vitrified oocytes of women of late reproductive age is higher than the number in native cells (31.2 versus 24, 4%,  $p < 0.05$ ), while the number of embryos with a euploid set of chromosomes per patient was  $0.8 \pm 0.1$ , which is too few to obtain high pregnancy rates. This is due to the low rate of survival of oocytes, so the number of gametes available for fertilization and development is significantly reduced in patients of this group [10].

Age-related changes in female gametes also occur as a result of 'mitochondrial aging'. Therefore, in order to reduce an oxidative stress and to increase the energy potential of oocytes, modern



кість ембріонів з еуплоїдним набором хромосом на пацієнтку становила  $0,8 \pm 0,1$ , що є занадто мало для отримання високих показників вагітності. Це зумовлено низькою частотою виживання ооцитів, тому кількість гамет, доступних для запліднення та розвитку, суттєво зменшується у пацієнток зазначеної групи [10].

Вікові зміни в жіночих гаметах відбуваються також внаслідок «старіння мітохондрій». Тому для зниження оксидативного стресу та підвищення енергетичного потенціалу ооцитів сучасні методи репродуктивної медицини включають різні способи їх реювінації [76]. Проте слід вважати на рекомендації міжнародних гайдлайнів щодо доцільності кріоконсервування гамет жінок віком до 35 років [20]. Важливо зазначити, що рішення відносно кріоконсервування ооцитів пацієнток старшого репродуктивного віку має прийматися індивідуально з урахуванням перспектив отримання повноцінних ембріонів, шансів на настання вагітності та народження здорової дитини [38].

Деякі з описаних вище ультраструктурних, молекулярно-генетичних та епігенетичних порушень можуть бути тимчасовими. Часткове або повне їхнє відновлення може відбутися після запліднення або протягом раннього розвитку ембріона внаслідок репаративних процесів та ремоделювання органел. Ці зміни можуть мати прихований характер та відповідати за дефекти, які стають видимими лише під час внутрішньо-утробного та постнатального життя, тому необхідне подальше спостереження за ними [39]. Крім того, перед клініцистам постають важливі питання: чи можна результати, отримані на тваринних моделях, екстраполювати на ембріони людини і чи можуть зміни, спричинені кріоконсервуванням, мати довгострокові наслідки для здоров'я майбутнього покоління.

### **Майбутні технології низькотемпературного банкування жіночих гамет**

*Кріоконсервування незрілих ооцитів.* Однією з важливих невирішених проблем залишається визначення можливості низькотемпературного консервування незрілих ооцитів. Дискусійним залишається питання: кріоконсервувати незрілі ооцити з подальшим їх дозріванням після відігріву чи, навпаки, спочатку досягти дозрівання ооцитів *in vitro* і після кріоконсервувати? Вітрифікація ооцитів саме на стадіях, які передують МІІ, має цілу низку переваг, оскільки є варіантом збереження фертильності дівчат, які не досягли репродуктивного віку [75]. Перспективність застосування вітрифікованих незрілих ооцитів

methods of reproductive medicine comprise various methods for their rejuvenation [76]. However, the recommendations of international guidelines regarding the feasibility of cryopreservation of gametes for women under the age of 35 [20] should be considered. It is important to note that the decision regarding cryopreservation of oocytes of the patients of older reproductive age should be taken individually, taking into account the prospects of obtaining full-fledged embryos, the chances of pregnancy and the birth of a healthy child [38].

Some of the ultrastructural, molecular-genetic, and epigenetic disorders described above may be temporary. Partial or complete recovery may occur after fertilization or during early embryo development as a result of reparative processes and remodeling of organelles. These changes may have a hidden nature and be responsible for defects that become visible only during intrauterine and postnatal life, therefore further observation of them is necessary [39]. As well the vital questions for clinicians are whether the results obtained in animal models can be extrapolated to human embryos and whether the changes caused by cryopreservation may have long-term consequences for the health of future generations.

### **Future techniques of low-temperature banking of female gametes**

*Cryopreservation of immature oocytes.* There is one of the important unsolved tasks, *i. e.* determination of possible low-temperature preservation of immature oocytes. The question is still debatable: to cryopreserve immature oocytes, followed by their maturation after rewarming, or, on the contrary, first mature oocytes *in vitro* and then to cryopreserve? Vitrification of oocytes precisely at the stages that preceded by MII, has a number of advantages, as it is an option to preserve the fertility of girls who have not reached reproductive age [75]. The perspective of using vitrified immature oocytes also lies in the fact that important subcellular compartments (cortical granules, endoplasmic reticulum, mitochondria), which have not strongly been damaged after heating, have time to recover before fertilization, which cannot be achieved in mature oocytes at the MII stage [61]. For the first time, the birth of a child after *in vitro* maturation and vitrification of an oocyte was reported in 2013 [18]. This occurred 14 years after the birth of a baby from a vitrified mature oocyte at the stage of metaphase II, confirming the complexity of oocyte maturation *in vitro*. Currently, there are single reports on effective





полягає ще в тому, що важливі субклітинні компартменти (кортикальні гранули, ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії), що не зазнали значних пошкоджень після відігріву, мають час на відновлення перед заплідненням, чого не можна досягти у зрілих ооцитах на стадії МІІ [61]. Вперше про народження дитини після дозрівання *in vitro* та вітрифікації ооцита повідомили у 2013 р. [18]. Це відбулося через 14 років після народження малюка з вітрифікованого зрілого ооцита на стадії метафази ІІ, що підтверджує складність дозрівання ооцитів в умовах *in vitro*. Наразі існують поодинокі повідомлення про ефективне дозрівання ооцитів, починаючи зі стадії гермінального везикулу (GV) та ведеться дискусія щодо оптимальної стадії зрілості ооцитів, на якій потрібно проводити вітрифікацію [8, 52, 74, 77].

На відміну від ооцитів МІІ незрілі клітини стадії GV не мають мейотичного веретена, мікротрубочки якого досить чутливі до температурних коливань. На підставі цього факту можна вважати, що генетичний матеріал незрілих ооцитів характеризується більшою кріостабільністю. Однак на противагу цьому твердженню існують дані щодо порушень розходження хромосом та зміни структури мейотичного веретена після відновлення мейозу в цих клітинах [46].

Після вітрифікації дозрілих *in vitro* ооцитів збільшувалася частота ембріонів з анеуплоїдним набором хромосом [36]. Цей факт пов'язують зі збільшенням кінетохорової відстані між сестринськими хроматидами, яка виникає внаслідок вітрифікації, що, в свою чергу, може впливати на щільність зв'язку між хроматидами. Схожий ефект було відмічено після вітрифікації зрілих ооцитів людини: збільшення кількості випадків порушення розходження акроцентричних хромосом. Таке несиметричне розташування сестринських хроматид та негативний вплив кріоконсервування на їхні когезивні зв'язки врешті призводять до нерівномірного розходження хромосом [9]. Оскільки навіть незначні температурні коливання, можуть викликати деполімеризацію мікротрубочок цитоскелета, було запропоновано підвищити стандартну температуру еквілібрації незрілих ооцитів у кріозахисному розчині до 37°C [45].

Інша проблема кріоконсервування незрілих ооцитів полягає у виборі стратегії підготовки клітин до кріоконсервування: повна денудація чи недоторканий ооцит-корона-кумуляосний комплекс, завдяки якому регулюється відновлення мейозу та відбувається обмін енергетичними

матеріалами, починаючи з стадії дозрівання ооцитів від гермінального везикулу (GV) стадії, і є дискусія про оптимальну стадію зрілості ооцита, на якій вітрифікація повинна бути виконана [8, 52, 74, 77].

На відміну від МІІ ооцитів, незрілі GV стадії клітини не мають мейотичного веретена, мікротрубочки якого досить чутливі до температурних коливань. На підставі цього факту можна вважати, що генетичний матеріал незрілих ооцитів характеризується більшою кріостабільністю. Однак на противагу цьому твердженню існують дані щодо порушення розходження хромосом та зміни структури мейотичного веретена після відновлення мейозу в цих клітинах [46].

Після вітрифікації дозрілих *in vitro* ооцитів збільшувалася частота ембріонів з анеуплоїдним набором хромосом [36]. Цей факт пов'язують зі збільшенням кінетохорової відстані між сестринськими хроматидами, яка виникає внаслідок вітрифікації, що, в свою чергу, може впливати на щільність зв'язку між хроматидами. Схожий ефект було відмічено після вітрифікації зрілих ооцитів людини: збільшення кількості випадків порушення розходження акроцентричних хромосом. Таке несиметричне розташування сестринських хроматид та негативний вплив кріоконсервування на їхні когезивні зв'язки врешті призводять до нерівномірного розходження хромосом [9]. Оскільки навіть незначні температурні коливання, можуть викликати деполімеризацію мікротрубочок цитоскелета, було запропоновано підвищити стандартну температуру еквілібрації незрілих ооцитів у кріозахисному розчині до 37°C [45].

Інша проблема кріоконсервування незрілих ооцитів полягає у виборі стратегії підготовки клітин до кріоконсервування: повна денудація чи недоторканий ооцит-корона-кумуляосний комплекс, завдяки якому регулюється відновлення мейозу та відбувається обмін енергетичними матеріалами, починаючи з стадії дозрівання ооцитів від гермінального везикулу (GV) стадії, і є дискусія про оптимальну стадію зрілості ооцита, на якій вітрифікація повинна бути виконана [8, 52, 74, 77].

метаболітами та сигнальними молекулами [68]. Кріоконсервування зрілих та незрілих недудованих ооцитів призводить до низької частоти виживання та значного пошкодження соматичних клітин, що унеможливило їх участь у подальшому дозріванні гамет [59]. Пошкодження клітин кумулюсу та їхньої ДНК відбувається, зокрема, вже на етапі еквілібрації з криозахисними речовинами, що, в свою чергу, негативно впливає на частоту запліднення ооцитів та подальший розвиток ембріонів [47, 67]. Вітрифікація незрілих ооцит-короно-кумуляосних комплексів викликає порушення не тільки щільних контактів [14], але й до пошкодження трансональних виступів мембрани ооцита [69, 71]. Враховуючи важливу роль клітин кумулюсу у дозріванні та заплідненні гамет, їх пошкодження, спричинене вітрифікацією, врешті компрометує фізіологічні процеси, що впливає на частоту запліднення та морфокінез ембріонів [59].

Імовірно, подальший успіх вітрифікації незрілих ооцитів обумовлений розробкою технології кріоконсервування клітин кумулюсу та системи відновлення контактів між клітинами, а також вдосконаленням методів дозрівання ооцитів *in vitro*.

*Персоніфікований підхід до кріоконсервування ооцитів.* Сучасний напрям у збереженні ооцитів людини пов'язаний з підвищенням ефективності та безпеки протоколів кріоконсервування. Наприклад, індивідуальними морфологічними та функціональними характеристиками ооцитів, навіть у межах однієї когорти, залежить від їхньої чутливості до кріоконсервування. Це призводить до зниження показників виживання ооцитів та змін морфокінетичних характеристик утворених із них ембріонів. На жаль, методичні підходи оцінки вихідних властивостей клітин обмежені, оскільки більшість із методів, які застосовуються, є інвазивними. Тому пошук альтернативних та інформативних способів оцінки ооцитів для визначення порога їх криочутливості триває. Одним із таких прижиттєвих методів є оцінювання тургору оолеми кріоконсервованих ооцитів під час запліднення методом ICSI [63]. Клітини з низьким тургором оолеми мають знижені показники життєздатності та потребують розробки індивідуальних протоколів кріоконсервування, а саме — етапів, на яких діють осмотичні фактори.

Використання прижиттєвого барвника діамантового крезилу синього дозволяє виявити найбільш компетентні ооцити в умовах дозрівання *in vitro* [51] та провести селекцію найбільш резистентних до факторів кріоконсервування

gamete maturation and fertilization, the vitrification-induced damage to them ultimately compromises physiological processes, affecting fertilization rates and embryo morphokinesis [59].

Presumably, the further successful vitrification of immature oocytes is stipulated by the development of the cryopreservation technique for cumulus cells and the approach of restoration of contacts between cells, as well as the improvement of oocyte *in vitro* maturation methods.

*Personalized approach to cryopreservation of oocytes.* The modern direction in the preservation of human oocytes is related to increasing the efficiency and safety of cryopreservation protocols. For example, individual morphological and functional characteristics of oocytes, even within one cohort, depend on their sensitivity to cryopreservation. This leads to a decrease in oocyte survival rates and changes in the morphokinetic characteristics of embryos formed from them. Unfortunately, methodical approaches to the evaluation of initial cell properties are limited, since most of the methods used are invasive. Therefore, the search for alternative and informative methods of evaluating oocytes to determine the threshold of their cryosensitivity continues. One of these supravital methods is the evaluation of the turgor of oolemma cryopreserved oocytes during fertilization by the ICSI method [63]. Cells with low oolemma turgor have reduced viability and require the development of individual cryopreservation protocols, namely, the stages at which osmotic factors act.

The use of the supravital dye diamond cresyl blue allows to identify the most competent oocytes for *in vitro* maturation [51] and to select the most resistant to oocyte cryopreservation factors [53]. The safety of using this dye has been proven on cumulus cells, which can be useful for assessing the development potential of immature oocyte-crown-cumulus complexes [1].

Polarization microscopy is a powerful tool for determining the state of the chromosomal apparatus as a predictor of fertilization efficiency and development of embryos obtained from cryopreserved female gametes [9]. Using this method, before the start of cryopreservation, it is possible to determine the phase of meiotic division. It is interesting that the morphological features of the spindle and its location in relation to the first polar body are also related to its cryoresistance. Therefore, the criteria for evaluating the meiotic spindle state are helpful in the selection of competent oocytes.



ооцитів [53]. Безпека використання цього барвника доведена на клітинах кумулюсу, що може бути корисним для оцінки потенціалу розвитку незрілих ооцит-корона-кумулясних комплексів [1].

Полярizzaційна мікроскопія є потужним інструментом визначення стану хромосомного апарату як предиктора ефективності запліднення та розвитку ембріонів, отриманих із кріоконсервованих жіночих гамет [9]. За допомогою цього методу до початку кріоконсервування можна визначити фазу мейотичного поділу. Цікаво, що морфологічні особливості веретена та його розташування за відношенням до першого полярного тіла також пов'язані з його кріостійкістю. Отже, критерії оцінювання стану мейотичного веретена допомагають у відборі компетентних ооцитів.

*Автоматизація кріоконсервування ооцитів методом вітрифікації.* Одним з сучасних напрямів покращення ефективності кріотехнологій є створення автоматичних пристроїв. За 25-річну історію існування вітрифікації було не дуже багато спроб її автоматизувати. Так, розробники пристрою «Gavi», взявши за основу метод «Кріотоп», дійшли висновку, що частота настання вагітності не залежить від застосування автоматичного чи ручного способу вітрифікації [23]. Інший пристрій з мікропотоками, які переміщують ооцити у різних вітрифікаційних розчинах, також показав свою ефективність [54]. Спільними зусиллями вчених Ізраїлю, Італії, Китаю та Америки було розроблено пристрій «Sarah», принцип роботи якого полягає у тому, що ооцит, розміщений у пластиковій соломинці, через певний проміжок часу переноситься у вітрифікаційні середовища зі зростаючою концентрацією КП та занурюється в рідкий азот [3]. При цьому відігрів відбувається також автоматизовано. Автори винаходу заявляють про високу ефективність даного пристрою. Слід зазначити, що ембріон у соломинці розміщує ембріолог. Ймовірно, що автоматизація вітрифікації може мати більш інтенсивний та масштабний розвиток тільки за впровадження штучного інтелекту та роботизації ембріологічних процедур. При цьому для досягнення високоефективної роботи автоматичних методів необхідно створювати індивідуальні протоколи кріоконсервування гамет та ембріонів із урахуванням їх вихідного стану.

Поглиблені фундаментальні дослідження сприяють підвищенню результатів вітрифікації ооцитів, що є основною умовою збільшення кумулятивної частоти настання вагітності, особливо у пацієнок з мінімальними шансами.

*Automated cryopreservation of oocytes by vitrification.* One of the modern ways of improving the efficiency of cryotechniques is the creation of automated devices. During the 25-year history of vitrification, there have not been many attempts to automate it. Thus, the developers of the 'Gavi' device, based on the 'Cryotop', came to the conclusion that the frequency of pregnancy did not depend on the use of an automated or manual vitrification [23]. Another device with microflows, which move oocytes in different vitrification solutions, also showed its effectiveness [54]. With the mutual efforts of scientists from Israel, Italy, China and USA, the device 'Sarah' was developed, the operating principle of which consists in placing the oocyte into a plastic straw, after a certain period of time, is transferred to vitrification media with an increasing concentration of CPA and immersed in liquid nitrogen [3]. At the same time, heating is also automated. The authors of the invention claim this device high efficiency. It should be noted that an embryologist places an embryo in a straw. The automated vitrification can likely have a more intensive and large-scale development only with the involvement of artificial intelligence and robotics into embryological procedures. At the same time, for achieving the highly efficient automation, it is necessary to create the individual protocols for cryopreservation of gametes and embryos, taking into account their initial state.

In-depth basic research contributes to improving the results of vitrification of oocytes, that is the main condition to enhance the cumulative frequency of pregnancy, especially in the patients with minimal chances.

## Conclusions

1. Cryopreservation of oocytes by vitrification has become a routine practice in ART. Before it becomes a standardized procedure, it is necessary to solve the problems associated with the occurrence of structural changes of hardening membranes, cytoskeleton and meiotic spindle, ZP solidification, parthenogenetic activation, genetic and epigenetic changes.

2. Cryopreservation of oocytes of those stages of development that precede MII requires convincing data on the possibility and conditions of maturation of oocytes *in vitro*, as well as determination of the optimal stage of maturity of oocytes for their low-temperature banking.

3. In future, for the wide implementation of the oocyte vitrification, its automation with the involvement of artificial intelligence is needed.



## Висновки

1. Кріоконсервування ооцитів методом вітрифікації стало рутинною практикою у ДРТ. Перш ніж вона стане стандартизованою процедурою, необхідно розв'язати проблеми, пов'язані з виникненням структурних змін мембран, цитоскелета та мейотичного веретена, затвердінням ЗР, партеногенетичною активацію, генетичними та епігенетичними змінами.

2. Кріоконсервування ооцитів тих стадій розвитку, які передують МП, потребує переконливих даних щодо можливості та умов дозрівання ооцитів *in vitro*, а також визначення оптимальної стадії зрілості ооцитів для їхнього низькотемпературного банкування.

3. У майбутньому для широкого впровадження методу вітрифікації ооцитів у практику необхідна його автоматизація із залученням штучного інтелекту.

## Література

1. Alcoba DD, Conzatti M, Ferreira GD, et al. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells. *Zygote*. 2016; 24(1): 83–8.
2. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, et al. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod*. 1987; 2(8): 695–700.
3. Arav A, Natan Y, Kalo D, et al. A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2018; 35(7): 1161–8.
4. Argyle CE, Harper JC, Davies MC. Oocyte cryopreservation: where are we now? *Human Reproduction Update*. 2016; 22(4): 440–9.
5. Barberet J, Barry F, Choux C, et al. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clin Epigenet* [Internet]. 2020 Aug 10 [cited 2023 Mar 14]; 12:121. Available from: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-020-00911-8>
6. Benagiano G, Gianaroli L. The new Italian IVF legislation. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9(2): 117–25.
7. Bogliolo L, Murrone O, Piccinini M, et al. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(2):185–93.
8. Brambillasca F, Guglielmo MC, Cotichio G, et al. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet*. 2013; 30(12): 1531–9.
9. Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, et al. Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? *Cryobiology*. 2020; 93: 33–6.
10. Buderatska N, Gontar J, Petrushko M, et al. Embryological characteristics and preimplantation genetic testing for aneuploidy of embryos derived from cryopreserved oocytes of women of different reproductive ages. *Biopreserv Biobank* [Internet]. 2022 Nov 21 [cited 2023 Mar 14]. Epub ahead of print Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/bio.2022.0055>
11. Buriak I, Fleck RA, Goltsev A, et al. Translation of cryobiological techniques to socially economically deprived populations – part 1: cryogenic preservation strategies. *J Med Devices*. 2020; 14(1): 010801 1–14.

## References

1. Alcoba DD, Conzatti M, Ferreira GD, et al. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells. *Zygote*. 2016; 24(1): 83–8.
2. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, et al. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod*. 1987; 2(8): 695–700.
3. Arav A, Natan Y, Kalo D, et al. A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2018; 35(7): 1161–8.
4. Argyle CE, Harper JC, Davies MC. Oocyte cryopreservation: where are we now? *Human Reproduction Update*. 2016; 22(4): 440–9.
5. Barberet J, Barry F, Choux C, et al. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clin Epigenet* [Internet]. 2020 Aug 10 [cited 2023 Mar 14]; 12:121. Available from: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-020-00911-8>
6. Benagiano G, Gianaroli L. The new Italian IVF legislation. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9(2): 117–25.
7. Bogliolo L, Murrone O, Piccinini M, et al. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(2):185–93.
8. Brambillasca F, Guglielmo MC, Cotichio G, et al. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet*. 2013; 30(12): 1531–9.
9. Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, et al. Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? *Cryobiology*. 2020; 93: 33–6.
10. Buderatska N, Gontar J, Petrushko M, et al. Embryological characteristics and preimplantation genetic testing for aneuploidy of embryos derived from cryopreserved oocytes of women of different reproductive ages. *Biopreserv Biobank* [Internet]. 2022 Nov 21 [cited 2023 Mar 14]. Epub ahead of print Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/bio.2022.0055>
11. Buriak I, Fleck RA, Goltsev A, et al. Translation of cryobiological techniques to socially economically deprived populations – part 1: cryogenic preservation strategies. *J Med Devices*. 2020; 14(1): 010801 1–14.
12. Cacciottola L, Donnez J, Dolmans MM. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation prior to iatrogenic premature ovarian insufficiency. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2022; 81:119–33.
13. Cai H, Niringiyumukiza JD, Li Y, et al. Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: a systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2018 Dec 6 [cited 2023 Mar 14]; 16(1):123. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0440-0>
14. Casillas F, Ducolomb Y, López A, et al. Effect of porcine immature oocyte vitrification on oocyte-cumulus cell gap junctional intercellular communication. *Porc Health Manag* [Internet]. 2020 Nov 25 [cited 2023 Mar 14]; 6 (1): 37. Available from: <https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-020-00175-x>
15. Chaput L, Grémeau AS, Vorilhon S, et al. Fertility preservation in oncology. *Bull Cancer*. 2018; 105(1): 99–110.
16. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986; 1(8486): 884–6.
17. Chen H, Zhang L, Meng L, et al. Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes. *Clin Epigenet* [Internet]. 2022 Nov 3 [cited 2023 Mar.14]; 14:141. Available from: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-022-01355-y>
18. Chian RC, Gilbert L, Huang JY, et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril*. 2009; 91(2): 372–6.



12. Cacciottola L, Donnez J, Dolmans MM. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation prior to iatrogenic premature ovarian insufficiency. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2022; 81:119–33.
13. Cai H, Niringiyumukiza JD, Li Y, et al. Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: a systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2018 Dec 6 [cited 2023 Mar 14]; 16(1):123. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0440-0>
14. Casillas F, Ducolomb Y, López A, et al. Effect of porcine immature oocyte vitrification on oocyte-cumulus cell gap junctional intercellular communication. *Porc Health Manag* [Internet]. 2020 Nov 25 [cited 2023 Mar 14]; 6 (1): 37. Available from: <https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-020-00175-x>
15. Chaput L, Grémeau AS, Vorilhon S, et al. Fertility preservation in oncology. *Bull Cancer*. 2018; 105(1): 99–110.
16. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986; 1(8486): 884–6.
17. Chen H, Zhang L, Meng L, et al. Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes. *Clin Epigenet* [Internet]. 2022 Nov 3 [cited 2023 Mar.14]; 14:141. Available from: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-022-01355-y>
18. Chian RC, Gilbert L, Huang JY, et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril*. 2009; 91(2): 372–6.
19. Choi JK, El Assal R, Ng N, et al. Bio-inspired solute enables preservation of human oocytes using minimum volume vitrification. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2018 Jan [cited 2023 Mar 14]; 12(1):e142-e149. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/term.2439>
20. Cobo A, García-Velasco JA, Remohí J, Pellicer A. Oocyte vitrification for fertility preservation for both medical and nonmedical reasons. *Fertil Steril*. 2021; 115(5):1091–101.
21. Coello A, Pellicer A, Cobo A. Vitrification of human oocytes. *Minerva Ginecol*. 2018; 70(4): 415–23.
22. Dai J, Wu C, Muneri CW, et al. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. *Cryobiology*. 2015; 71(2): 291–8.
23. Dal Canto M, Moutier C, Brambillasca F, et al. Automated vitrification for embryo cryopreservation: preliminary comparative results and first live birth in Europe. *Fertil Steril*. 2019; 112 (3, Suppl):e116-e117.
24. Denomme MM, Mann MR. Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction*. 2012; 144(4): 393–409.
25. Edashige K. Permeability of the plasma membrane to water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Its relevance to vitrification. *Reprod Med Biol*. 2016; 16(1): 36–9.
26. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 1984; 21(4): 407–26.
27. Fuchinoue K, Fukunaga N, Chiba S, et al. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 307–9.
28. Goodson HV, Jonasson EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2023 Mar 14]; 10(6):a022608. Available from: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-022-01355-y>
29. Habibi A, Farrokhi N, Moreira da Silva F, et al. The effects of vitrification on gene expression in mature mouse oocytes by nested quantitative PCR. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27(11): 599–604.
30. Henry L, Labied S, Jouan C, Nisolle M. Preservation of female fertility: The current therapeutic strategy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2022; 156(1): 3–9.
31. Heydari L, Khalili MA, Mangoli E, et al. Morphokinetic evaluation of embryos generated from vitrified oocytes maintaining the meiotic spindle. *Cryobiology*. 2021; 100: 40–5.
32. Huang J, Ma Y, Wei S, et al. Dynamic changes in the global transcriptome of bovine germinal vesicle oocytes after vitrification followed by in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2018; 30(10): 1298–313.
33. Huo Y, Qin Q, Zhang L, et al. Effects of oocyte vitrification on the behaviors and physiological indexes of aged first filial generation mice. *Cryobiology*. 2020; 95: 20–8.
34. Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, et al. The open pulled straw vitrification of ovine GV oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Letters* 2001; 22: 157–62.
35. Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H. Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*. 1992;38(6): 1175–85.
36. Jia B, Wu T, Zhou G, et al. Effects of vitrification for germinal vesicle and metaphase II oocytes on subsequent centromere cohesion and chromosome aneuploidy in mice. *Theriogenology*. 2014; 82(3): 495–500.
37. Jia BY, Xiang DC, Quan GB, et al. Transcriptome analysis of porcine immature oocytes and surrounding cumulus cells after vitrification and in vitro maturation. *Theriogenology*. 2019; 134: 90–7.
38. Jia QP, Sun WQ. Perspective: Cryopreservation of human oocytes and the 'Carryover' effect on early embryo development. *CryoLetters*. 2021; 42(3): 120–8.



31. Heydari L, Khalili MA, Mangoli E, et al. Morphokinetic evaluation of embryos generated from vitrified oocytes maintaining the meiotic spindle. *Cryobiology*. 2021; 100: 40–5.
32. Huang J, Ma Y, Wei S, et al. Dynamic changes in the global transcriptome of bovine germinal vesicle oocytes after vitrification followed by in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2018; 30(10): 1298–313.
33. Huo Y, Qin Q, Zhang L, et al. Effects of oocyte vitrification on the behaviors and physiological indexes of aged first filial generation mice. *Cryobiology*. 2020; 95: 20–8.
34. Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, et al. The open pulled straw vitrification of ovine GV oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Letters* 2001; 22: 157–62.
35. Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H. Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*. 1992;38(6): 1175–85.
36. Jia B, Wu T, Zhou G, et al. Effects of vitrification for germinal vesicle and metaphase II oocytes on subsequent centromere cohesion and chromosome aneuploidy in mice. *Theriogenology*. 2014; 82(3): 495–500.
37. Jia BY, Xiang DC, Quan GB, et al. Transcriptome analysis of porcine immature oocytes and surrounding cumulus cells after vitrification and in vitro maturation. *Theriogenology*. 2019; 134: 90–7.
38. Jia QP, Sun WQ. Perspective: Cryopreservation of human oocytes and the 'Carryover' effect on early embryo development. *CryoLetters*. 2021; 42(3): 120–8.
39. Khalili MA, Shahedi A, Ashourzadeh S, et al. Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34(11): 1413–26.
40. Kopeika EF, Petrushko MP, Pinaiev VI, et al. Cryopreservation of Reproductive Cells and Embryos of Laboratory, Agricultural and Wild Animals. *Probl Cryob Cryomed*. 2019; 29(1): 3–18.
41. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, et al. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod*. 1999; 14(12): 3077–9.
42. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11(3): 300–8.
43. Kwan HCK. Reconsideration of the safety and effectiveness of human oocyte cryopreservation. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2023 Feb 27; [cited 2023 Mar 14]; 21(1):22. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-023-01071-z>
44. Liebermann J. Vitrification: A simple and successful method for cryostorage of human blastocysts. In: Wolkers WF, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol.2180. New York: Humana; 2021. P. 501–15. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_24)
45. Liu M, Zhou W, Chu D, et al. A modified vitrification method reduces spindle and chromosome abnormalities. *Syst Biol Reprod Med*. 2017; 63(3): 199–205.
46. Liu M-H, Zhou W-H, Chu D-P, et al. Ultrastructural changes and methylation of human oocytes vitrified at the germinal vesicle stage and matured in vitro after thawing. *Gynecol Obstet Invest*. 2017; 82(3): 252–61.
47. López A, Betancourt M, Duclomb, Y, et al. DNA damage in cumulus cells generated after the vitrification of in vitro matured porcine oocytes and its impact on fertilization and embryo development. *Porc Health Manag* [Internet]. 2021 Oct 18. [cited 2023 Mar 14]. 7(1): 56. Available from: <https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-021-00235-w>
48. Ma Y, Long C, Liu G, et al. WGBS combined with RNA-seq analysis revealed that Dnmt1 affects the methylation modification and gene expression changes during mouse oocyte vitrification. *Theriogenology*. 2022; 177: 11–21.
49. Martínez-Burgos M, Herrero L, Megías D, et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril*. 2011; 95(1): 374–7.
50. Masrat-Un-Nisa EY, Malik AA, Sofi KA, et al. Recent advancements in vitrification cryodevices for gamete and gonadal tissue. *CryoLetters*. 2022;43(3):129–39.
51. Mirshamsi SM, Karamishabankareh H, Ahmadi-Hamedani M, et al. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2013; 136(4): 245–51.
52. Molina I, Gómez J, Balasch S, Pellicer N, Novella-Maestre E. Osmotic-shock produced by vitrification solutions improves immature human oocytes in vitro maturation. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2016 May 11 [cited 2023 Mar 14]; 14(1):27. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-016-0161-1>
53. Mphaphathi ML, O'Neill HA, Nedambale TL. Effect of two different permitting and combination of cryoprotectants on cattle oocytes maturation rate following brilliant cresyl blue exposure. *Am J Anim Vet Sci*. 2022; 17(2):101-7.
54. Munuera C D, Lupiáñez LM, Vivres Y, et al. Development of a new device for automatic vitrification of oocytes. *Hum Reprod* [Internet]. 2022 June 30 [cited 2023 Mar 14]; 37 (Suppl 1): deac107.203. Available from: [https://academic.oup.com/humrep/article/37/Supplement\\_1/deac107.203/6620010](https://academic.oup.com/humrep/article/37/Supplement_1/deac107.203/6620010)



- appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril*. 2011; 95(1): 374–7.
50. Masrat-Un-Nisa EY, Malik AA, Sofi KA, et al. Recent advancements in vitrification cryodevices for gamete and gonadal tissue. *CryoLetters*. 2022;43(3):129–39.
  51. Mirshamsi SM, Karamishabankareh H, Ahmadi-Hamedani M, et al. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2013; 136(4): 245–51.
  52. Molina I, Gómez J, Balasch S, Pellicer N, Novella-Maestre E. Osmotic-shock produced by vitrification solutions improves immature human oocytes in vitro maturation. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2016 May 11 [cited 2023 Mar 14]; 14(1):27. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-016-0161-1>
  53. Mphaphathi ML, O'Neill HA, Nedambale TL. Effect of two different permitting and combination of cryoprotectants on cattle oocytes maturation rate following brilliant cresyl blue exposure. *Am J Anim Vet Sci*. 2022; 17(2):101-7.
  54. Munuera C D, Lupiáñez LM, Vivres Y, et al. Development of a new device for automatic vitrification of oocytes. *Hum Reprod* [Internet]. 2022 June 30 [cited 2023 Mar 14]; 37 (Suppl 1): deac107.203. Available from: [https://academic.oup.com/humrep/article/37/Supplement\\_1/deac107.203/6620010](https://academic.oup.com/humrep/article/37/Supplement_1/deac107.203/6620010)
  55. Nagy ZP, Shapiro D, Chang CC. Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril*. 2020; 113(2): 241–7.
  56. Nottola SA, Coticchio G, Sciajno R, et al. Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19(3): 17–27.
  57. Noyes N, Boldt J, Nagy ZP. Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27(2-3): 69–74.
  58. Ortiz I, Dorado J, Pereira B, et al. DNA fragmentation of equine cumulus cells from cumulus-jocyte complexes submitted to vitrification and its relationship to the developmental competence of the oocyte. *Reprod Domest Anim*. 2022; 57(5): 64–7.
  59. Ortiz-Escribano N, Smits K, Piepers S, et al. Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of mature bovine oocytes: Effects on survival, fertilization, and blastocyst development. *Theriogenology*. 2016; 86(2): 635–41.
  60. Paffoni A, Alagna F, Somigliana E, et al. Developmental potential of human oocytes after slow freezing or vitrification: a randomized in vitro study based on parthenogenesis. *Reprod Sci*. 2008; 15(10): 1027–33.
  61. Palmerini MG, Antinori M, Maione M, et al. Ultrastructure of immature and mature human oocytes after Cryotop vitrification. *J Reprod Dev*. 2014; 60(6): 411–20.
  62. Petrushko M, Piniaviev V, Yurchuk T. The history of assisted reproductive technologies: from prohibition to recognition. *History of science and technology*. 2021; 11(2): 315–28.
  63. Petrushko MP, Yurchuk TO, Buderatska NO, Piniaviev VI. Oolemma Invagination of fresh and cryopreserved human oocytes during in vitro fertilization by ICSI. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(3): 258–65.
  64. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2008; 90 (5, Suppl 3):S241-6.
  65. Segovia Y, Victory N, Peinado I, et al. Ultrastructural characteristics of human oocytes vitrified before and after in vitro maturation. *J Reprod Dev*. 2017; 63(4): 377–82.
  66. Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, et al. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev*. 1992; 33: 210–4.
  67. Szymańska KJ, Ortiz-Escribano N, Van den Abbeel E, et al. Connexin hemichannels and cell death as measures of bovine COC vitrification success. *Reproduction*. 2019; 157(1): 87–99.
  68. Taghizabet N, Khalili MA, Anbari F, et al. Human cumulus cell sensitivity to vitrification, an ultrastructural study. *Zygote*. 2018; 26(3): 224–31.
  69. Trapphoff T, El Hajj N, Zechner U, et al. DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. *Hum Reprod*. 2010; 25(12): 3025–42.
  70. Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*. 2015, 30(4): 325–33.
  71. Vandevort CA, Shirley CR, Hill DL, Leibo SP. Effects of cryoprotectants and cryopreservation on germinal vesicle-stage cumulus-oocyte complexes of rhesus monkeys. *Fertil Steril*. 2008; 90(3): 805–16.
  72. Walker Z, Lanes A, Ginsburg E. Oocyte cryopreservation review: outcomes of medical oocyte cryopreservation and planned oocyte cryopreservation. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2022 Jan 7 [cited 2023 Mar 14]; 20(1): 10. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-021-00884-0>
  73. Wang N, Li CY, Zhu HB, et al. Effect of vitrification on the mRNA transcriptome of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim*. 2017; 52(4): 531–41.



68. Taghizabet N, Khalili MA, Anbari F, et al. Human cumulus cell sensitivity to vitrification, an ultrastructural study. *Zygote*. 2018; 26(3): 224–31.
69. Trapphoff T, El Hajj N, Zechner U, et al. DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. *Hum Reprod*. 2010; 25(12): 3025–42.
70. Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*. 2015, 30(4): 325–33.
71. Vandervoort CA, Shirley CR, Hill DL, Leibo SP. Effects of cryoprotectants and cryopreservation on germinal vesicle-stage cumulus-oocyte complexes of rhesus monkeys. *Fertil Steril*. 2008; 90(3): 805–16.
72. Walker Z, Lanes A, Ginsburg E. Oocyte cryopreservation review: outcomes of medical oocyte cryopreservation and planned oocyte cryopreservation. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2022 Jan 7 [cited 2023 Mar 14]; 20(1): 10. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-021-00884-0>
73. Wang N, Li CY, Zhu HB, et al. Effect of vitrification on the mRNA transcriptome of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim*. 2017; 52(4): 531–41.
74. Yazdanpanah F, Khalili MA, Eftekhari M, et al. The effect of vitrification on maturation and viability capacities of immature human oocytes. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288: 439–44.
75. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B, Goltsev A. Oocyte cryopreservation in emergency situations: perspectives and reality. *EMJ Repro Health* [Internet]. 2020 Aug 25 [cited 2023 Mar 14]; 6(1): 54–62. Available from: <https://www.emjreviews.com/reproductive-health/article/oocyte-cryopreservation-in-emergency-situations-perspectives-and-reality/>
76. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. State of the art in assisted reproductive technologies for patients with advanced maternal age. *Zygote*. 2023; 31(2): 149–56.
77. Yurchuk T. Cryopreservation of immature oocytes at germinal vesicle stage. When gamete maturation performance seems to be most appropriate? *Probl Cryobiol Cryomed*. 2021; 31(2): 161–7.
78. Zhang L, Chen H, Cui C, et al. Effects of oocyte vitrification on gene expression in the liver and kidney tissues of adult offspring. *J Assist Reprod Genet*. 2022; 39(11): 2635–46.

