

УДК 618.177-089.888.11:611.013:57.043

М. Петрушко\*, В. Піняєв, Т. Юрчук

## Клінічні результати циклів лікування безпліддя з використанням двічі кріоконсервованих ембріонів

UDC 618.177-089.888.11:611.013:57.043

M. Petrushko\*, V. Piniayev, T. Yurchuk

### Clinical Outcomes of Infertility Treatment Cycles for Repeatedly Cryopreserved Embryos

**Реферат:** У дослідженні проведено аналіз частоти виживання, реекспандування та імплантації передімплантаційних ембріонів людини на стадії бластоцисти після одного та двох раундів кріоконсервування методом вітрифікації. Ембріони, які піддавались повторному кріоконсервуванню, продемонстрували значно нижчу частоту виживання, реекспандування та імплантації порівняно з тими, що були кріоконсервовані один раз ( $p < 0,05$  для виживання,  $p < 0,001$  для реекспандування та імплантації). Найвища частота імплантації була виявлена у групі з перенесенням ембріонів, які було кріоконсервовано один раз ( $p < 0,001$ ). Отримані результати свідчать про те, що повторне кріоконсервування негативно впливає на життєздатність та імплантацію ембріонів, що може бути зумовлено структурними і функціональними порушеннями. Одержані результати підкреслюють важливість ретельного оцінювання та врахування потенційних ризиків при плануванні лікування безпліддя з використанням повторно кріоконсервованих ембріонів.

**Ключові слова:** кріоконсервування, вітрифікація, передімплантаційні ембріони, кріопшкодження.

**Abstract:** The study analyzed the survival, re-expansion, and implantation rates of human preimplantation embryos at the blastocyst stage following one and two rounds of cryopreservation using vitrification. Embryos subjected to repeated cryopreservation showed significantly lower survival, re-expansion, and implantation rates compared to those cryopreserved once ( $p < 0.05$  for survival,  $p < 0.001$  for re-expansion and implantation). The highest implantation rate was observed in the group with embryos cryopreserved once ( $p < 0.001$ ). The results indicate that repeated cryopreservation negatively affects the viability and implantation of embryos, potentially due to structural and functional impairments. These findings highlight the importance of carefully assessing and considering potential risks when planning infertility treatment using repeatedly cryopreserved embryos.

**Key words:** cryopreservation, vitrification, pre-implantation embryos, cryodamage.

Кріоконсервування ембріонів передімплантаційних стадій розвитку знайшло своє широке застосування при лікуванні безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) та для збереження фертильності пацієнтів, які планують хіміо- або променеви терапію. Останнім часом показання до кріоконсервування ембріонів розширилися, оскільки використання цієї технології забезпечує гнучкість та безпеку протоколів лікування, що дозволяє подружнім парам робити репродуктивний вибір, який найкраще відповідає їх особистим обставинам та медичним показанням [11, 15].

Введені обмеження щодо перенесення одного ембріона в порожнину матки пацієнтки в циклі лікування безпліддя методами ДРТ зумовили необхідність оптимального використання раніше кріоконсервованих ембріонів. Спеціалісти стикнулись із проблемою повторного кріоконсерву-

Cryopreservation of pre-implantation embryos has been widely used in the treatment of infertility by assisted reproductive technologies (ART) and when preserving the fertility in the patients planning chemotherapy or radiotherapy. Recently, the indications for cryopreservation of embryos have expanded, as the use of this technology provides flexibility and safety of treatment protocols, allowing couples to make reproductive choices that suit best their personal circumstances and medical indications [11, 15].

The restrictions imposed on the transfer of one embryo into the uterine cavity of a patient in an ART infertility treatment cycle have necessitated the optimal use of previously cryopreserved embryos. Specialists have encountered the problem of repeated cryopreservation of embryos. This situation arises, in particular, due to the placement of several embryos on one carrier. After thawing, for transfer

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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

\*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:

\*To whom correspondence should be addressed:

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

Надійшла 26.06.2024

Прийнята до друку 12.09.2024

Received May, 26, 2024

Accepted September, 12, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

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.

вання ембріонів. Така ситуація виникає, зокрема, через розміщення на одному носії декількох ембріонів. Після відігріву обирають один ембріон для трансферу, а решту ембріонів потрібно знову кріоконсервувати для використання в подальших циклах лікування. Крім того, подібна ситуація виникає під час проведення передімплантаційно-генетичного тестування раніше кріоконсервованих ембріонів [13]. У такому випадку ембріони відігрівають, з них вилучають декілька клітин трофектодерми для проведення генетичного аналізу, а потім знову кріоконсервують. Після отримання результатів у сприятливому циклі проводять трансфер ембріона з еуплоїдним набором хромосом. Додатково повторне кріоконсервування може бути необхідним у випадках, коли перенесення ембріонів відкладається через непередбачені медичні причини, необхідність лікування супутніх захворювань чи зміни в особистих планах. Хоча такий підхід є загальноприйнятним через потенційні ризики для подальшого розвитку ембріонів, він може бути актуальним у певних клінічних ситуаціях. Тому метою нашого дослідження було оцінити ефективність циклів лікування безпліддя, які включають перенесення передімплантаційних ембріонів людини на стадії бластоцисти після їх повторного кріоконсервування методом вітрифікації.

### Матеріали та методи

Дослідження проведено на базі медичного центру ТОВ «ДРТ-клініка репродуктивної медицини» (м. Харків, Україна). Проаналізовані ембріологічні та клінічні протоколи пацієнтів, які проходили курс лікування безпліддя методами ДРТ з перенесенням передімплантаційних ембріонів на стадії бластоцисти. Для аналізу частоти виживання, реекспандування та імплантації передімплантаційних ембріонів було сформовано групи пацієнок на основі застосованого типу ембріотрансферу: група 1 ( $n = 80$ ) — трансфер одного свіжовиділеного ембріона, група 2 ( $n = 70$ ) — трансфер кріоконсервованого ембріона, група 3 ( $n = 63$ ) — трансфер повторно кріоконсервованого ембріона. Для включення пацієнок до груп дослідження використовували наступні критерії: вік 25–38 років, регулярний менструальний цикл, відсутність важких форм ендометріозу або інших гінекологічних патологій, отримання більше 4 ембріонів на стадії бластоцисти, придатних до кріоконсервування. Критерії виключення пацієнок з груп дослідження: відсутність або недостатня відповідь на стимуляцію яєчників.

Допоміжні репродуктивні технології проводили відповідно до загальноприйнятих стан-

one embryo is selected, and the remaining embryos must be cryopreserved again to be used in subsequent treatment cycles. In addition, a similar situation arises during pre-implantation genetic testing of previously cryopreserved embryos [13]. In this case, the embryos are thawed; several trophectoderm cells are removed from them for genetic analysis, and then they are cryopreserved again. After obtaining the results in a favorable cycle, an embryo with a euploid set of chromosomes is transferred. Additionally, repeated cryopreservation may be necessary in the cases when an embryo transfer is postponed because of unforeseen medical reasons (need to treat concomitant diseases) or changes in personal plans. Although this approach is not generally accepted due to potential risks to further embryo development, it may be relevant in certain clinical situations. Therefore, the aim of our study was to evaluate the effectiveness of infertility treatment cycles that include the transfer of pre-implantation human embryos at the blastocyst stage after their repeated cryopreservation by vitrification.

### Materials and methods

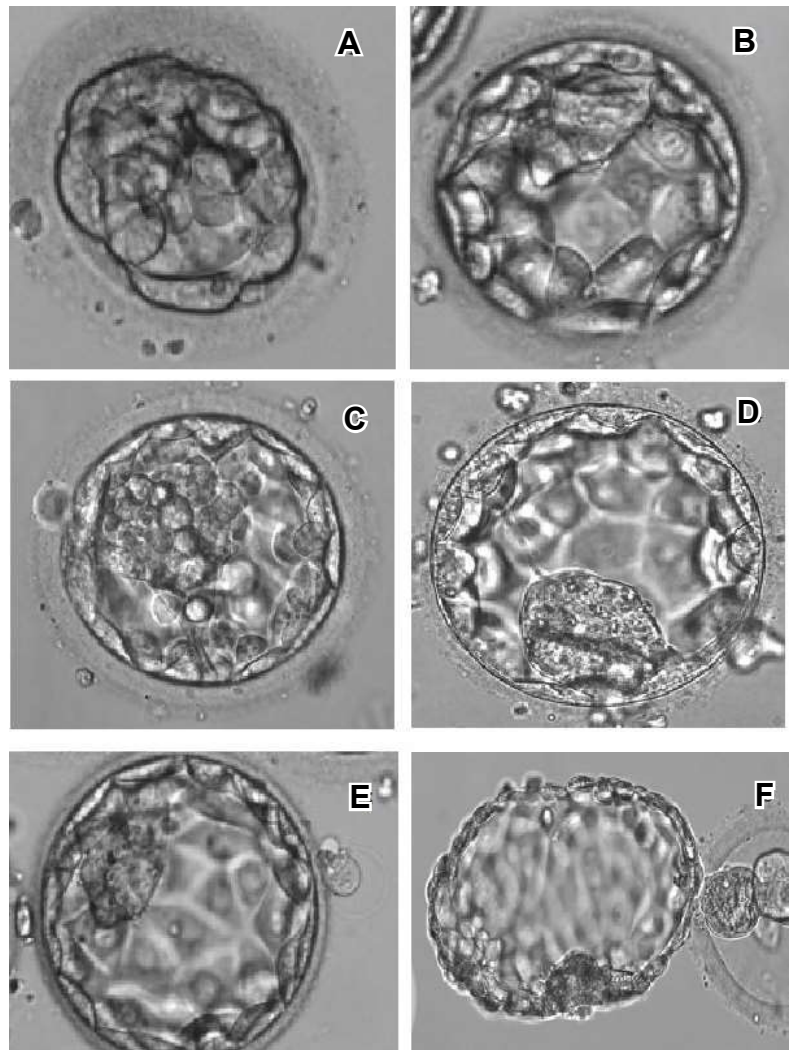
The study was performed at the medical center LLC 'ART-clinic of reproductive medicine'. Embryological and clinical protocols of the patients who underwent infertility treatment using ART methods with the transfer of pre-implantation embryos at the blastocyst stage were analyzed. To consider the survival rate, re-expansion and implantation of embryos, the groups of patients were formed based on the type of embryo transfer used: group 1 ( $n = 80$ ) – transfer of one freshly isolated embryo, group 2 ( $n = 70$ ) – cryopreserved embryo, group 3 ( $n = 63$ ) – re-cryopreserved embryo. The following criteria were used to include patients in the study groups: age 25–38 years, regular menstruation, absence of either severe endometriosis or other gynecological pathologies, obtaining more than 4 embryos at the blastocyst stage suitable for cryopreservation. Criteria for excluding patients from the study groups: absence or insufficient response to ovarian stimulation.

Superovulation induction and ART procedures were performed according to generally accepted standard protocols [4]. Mature oocytes were fertilized by intracytoplasmic injection of a single sperm, after which the embryos were cultured *in vitro* in a CO<sub>2</sub> incubator (temperature 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for 5 days. Embryos that reached the blastocyst stage were evaluated by the stage of development and morphological characteristics of the intracellular mass and trophectoderm according to D. Gardner criteria [10]. Depending on the stage



дартних протоколів [4]. Запліднення зрілих ооцитів проводили методом інтрацитоплазматичної ін'єкції поодинокого сперматозоїда, після чого ембріони культивували *in vitro* в умовах CO<sub>2</sub> інкубатора (температура 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) протягом 5 діб. Ембріони, які досягли стадії бластоцисти, оцінювали за стадією розвитку та морфологічними характеристиками внутрішньоклітинної маси та трофектодерми згідно з критеріями D. Gardner [10]. Залежно від стадії розвитку кожний з ембріонів п'ятої доби культивування класифікували таким чином: рання бластоциста з бластоцелем менше половини об'єму ембріона; бластоциста з бластоцелем половини і більше об'єму ембріона; повна бластоциста; розширена бластоциста з витонченою *Zona Pellucida* (ZP); бластоциста з початком хетчингу; повністю вилуплена бластоциста (рис. 1).

Усі ембріони, які не підлягали перенесенню в порожнину матки пацієнтки, піддавали вітрифікації за М. Kuwayama методом кріотоп з власними модифікаціями [9]. Для цього ембріони переносили у розчин 7,5% етиленгликолю (ЕГ) та 7,5% диметилсульфоксиду (ДМСО) у середовищі «Global total» (Cooper Surgical, США) при кімнатній температурі (25–26°C) та витримували до відновлення їх початкового об'єму, після чого поміщали у розчин 15% ЕГ, 15% ДМСО та 0,5 М сахарози. Ембріони (у мінімальній краплі кріозахисного розчину) по одному розміщували на носії (Cryotech, Японія) і відразу занурювали у рідкий азот. Відігрів зразків здійснювали шляхом занурення носія в 1,0 М розчин сахарози у середовищі «Global total» при 37°C. Через 1 хв ембріони поступово переносили у 0,75, 0,5, 0,25 М розчини сахарози та витримували у кожному з них протягом 2 хв. Після цього ембріони розміщували в середовищі «Global total» за стандартних умов CO<sub>2</sub>-інкубатора. Через 2 години культивування *in vitro* відмічали відновлення бластоцелю після реекспансії та здійснювали ембріотрансфер. У випадку повторного кріоконсервування, після відігріву та



**Рис. 1.** Стадії розвитку ембріона людини на п'яту добу культивування *in vitro*: **A** — рання бластоциста з бластоцелем менше половини об'єму ембріона; **B** — бластоциста з бластоцелем, що становить половину об'єму ембріона; **C** — повна бластоциста; **D** — розширена бластоциста з витонченою ZP; **E** — початок хетчингу; **F** — бластоциста, яка повністю вийшла із ZP.

**Fig. 1.** Stages of human embryo development on the fifth day of development *in vitro*: **A** — early blastocyst with a blastocoel of less than half the volume of the embryo; **B** — blastocyst with a blastocoel that is half the volume of the embryo; **C** — complete blastocyst; **D** — expanded blastocyst with a refined ZP; **E** — beginning of hatching; **F** — blastocyst fully hatched out of the ZP.

of development, each of the embryos of the fifth day of development was classified as follows: early blastocyst with a blastocoel of less than half the volume of the embryo; blastocyst with a blastocoel of half or more of the volume of the embryo; complete blastocyst; expanded blastocyst with a thin *Zona Pellucida* (ZP); blastocyst with the beginning of hatching; fully hatched blastocyst (Fig. 1).

All embryos that were not subject to transfer to the patient's uterine cavity were vitrified according to M. Kuwayama's 'Cryotop method' with our own modifications [9]. For this purpose, the embryos



культивування протягом 2 годин ембріони кріоконсервували за вищевказаним методом. Частоту виживання ембріонів оцінювали за збереженістю бластомерів. При збереженні більше ніж 50% клітин ембріон вважали живим.

Для оцінки значущості відмінностей показників досліджуваних груп використовували критерій Фішера. Отримані дані вважали значущими при  $p < 0,05$ . Для статистичного аналізу отриманих даних використовували програмне забезпечення «GraphPad Prism Software» (Graph Pad Software Inc., США).

### Результати та обговорення

Вік пацієнок, ембріони яких досліджували, сумарні дози фолікокулостимулюючого гормону (ФСГ), які були застосовані при стимуляції овуляції, середня кількість яйцеклітин, вилучених при аспірації фолікулів, частота їх запліднення та утворення бластоцист значущо не відрізнялися (табл. 1).

were transferred to a solution of 7.5% ethylene glycol (EG) and 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) in the “Global total” medium (CooperSurgical, USA) at room temperature (25–26°C) and kept until their initial volume was restored, after which they were placed in a solution of 15% EG, 15% DMSO and 0.5 M sucrose. Embryos (in a minimal drop of cryoprotective solution) were placed one by one on a carrier (Cryotech, Japan) and immediately immersed in liquid nitrogen. Samples were warmed by immersing the carrier in a 1.0 M sucrose solution in the ‘Global total’ medium at 37°C. After 1 min, embryos were gradually transferred to 0.75, 0.5, 0.25 M sucrose solutions and kept in each of them for 2 min. Afterwards, the embryos were placed in the ‘Global total’ medium under standard CO<sub>2</sub> incubator conditions. After 2 hours of *in vitro* culturing, the restoration of the blastocoel after re-expansion was noted and embryo was transferred. During repeated cryopreservation, after warming and cultivation for 2 hours, the embryos were

**Таблиця 1.** Клінічні та ембріологічні характеристики досліджуваних груп пацієнок,  $M \pm m$   
**Table 1.** Clinical and embryological characteristics of the studied groups of patients,  $M \pm m$

Характеристика Characteristics	Групи Groups		
	1 (n = 80)	2 (n = 70)	3 (n = 63)
Середній вік пацієнок, роки Average patients, age	32,7 ± 4,7	33,2 ± 4,6	31,6 ± 4,6
Сумарная доза ФСГ, МО Total dose of FSH, MO	1800 ± 275	2200 ± 225	1800 ± 225
Середня кількість яйцеклітин Average number of oocytes	8,85 ± 2,1	8,97 ± 2,02	9,09 ± 1,63
Частота запліднення, % Fertilization frequency, %	92,12 ± 6,49	91,22 ± 6,48	94,99 ± 5,98
Частота розвитку до стадії бластоцисти, % Frequency of development up to blastocyst, %	87,8 ± 8,08	84,0 ± 7,22	88,8 ± 7,3

У більшості випадків для кріоконсервування та подальшого ембріотрансферу використовували ембріони на стадії експандованої бластоцисти. Частота виживання ембріонів групи 3 була значущо нижчою, порівняно з ембріонами групи 2 ( $p < 0,05$ ). Ембріони групи 3, які не мали видимих морфологічних порушень, значуще рідше відновлювали свій об'єм та форму-

cryopreserved according to the above method. The survival rate of embryos was assessed by the preservation of blastomeres. If more than 50% of cells were preserved, the embryo was considered alive.

To assess the significance of the differences in the values of the studied groups, Fisher's test was used. The findings were considered significant

вали бластоцель після відігріву порівняно з ембріонами групи 2 ( $p < 0,001$ ), що свідчить про вплив повторного кріоконсервування на їхню життєздатність та потенціал до реекспандування.

Цікаві результати були отримані після аналізу частоти імплантації серед досліджуваних груп. Виявилось, що цей показник був максимальним у групі 2, а в групі 3 — значущо нижчим порівняно з групами 2 та 1 ( $p < 0,001$ ) (табл. 2). Це свідчить про те, що повторне кріоконсервування впливає не лише на частоту виживання та ефективність реекспандування, але й на здатність ембріона до імплантації.

at  $p < 0.05$ . For statistical analysis of the obtained data, the software 'GraphPad Prism Software' (GraphPad Software Inc., USA) was used.

### Results and discussion

The age of the patients whose embryos were studied, the total doses of follicle-stimulating hormone (FSH) that were used during ovulation stimulation, the average number oocytes extracted during follicle aspiration, the frequency of their fertilization and the formation of blastocysts did not differ significantly (Table 1).

Assessment of human embryos according to the distribution of blastocyst development stages

**Таблиця 2.** Параметри життєздатності передімплантаційних ембріонів людини досліджуваних груп  
**Table 2.** Viability parameters of pre-implantation human embryos of the studied groups

Параметри Parameters	Група 1 ( $n = 80$ )	Група 2 ( $n = 70$ )	Група 3 ( $n = 63$ )
Частота виживання, % Survival frequency, %	-	68/70 (97,1)	53/63 (84,1)*
Частота реекспандування, % Re-expanding frequency, %	-	66/68 (94,3)	49/66 (74,2) <sup>&amp;</sup>
Частота імплантації, % Implantation frequency, %	33/80 (41,3)	39/66 (59,0)	11/49 (22,4) <sup>&amp; #</sup>

**Примітки:** \* — різниця значуща відносно групи 2 ( $p < 0,05$ ); & — різниця значуща відносно групи 2 ( $p < 0,001$ ), # — різниця значуща відносно груп I ( $p < 0,001$ ).

**Notes:** \* – significant difference for groups 2 ( $p < 0.05$ ); & – significant difference for groups II ( $p < 0.001$ ); # – significant difference for groups 1 ( $p < 0.001$ ).

Представлені результати вказують на те, що повторне кріоконсервування призводить до низки порушень як структурної, так і функціональної цілісності передімплантаційних ембріонів. Відомо, що фізико-хімічні фактори кріоконсервування можуть спричиняти клітинні пошкодження; зокрема, великий об'єм рідини в порожнині бластоцелю підвищує імовірність утворення кристалів льоду [5]. Показано, що від 1 до 5% вітрифікованих бластоцист можуть не вижити після розморожування [1]. Згідно з результатами дослідженням X. Zheng та співавт.[17], повторне кріоконсервування негативно впливає на розвиток ембріонів людини та їх імплантацію, що вказує на кумулятивний ефект пошкодження клітин під час багатократних циклів кріоконсервування.

При кріоконсервуванні біооб'єктів важливим фактором є час, відведений на їх відновлен-

showed no significant differences between the studied groups (Fig. 2).

In most cases, embryos at the expanded blastocyst stage were used for cryopreservation and subsequent embryo transfer. The survival rate of embryos in group 3 was significantly lower compared to embryos in group 2 ( $p < 0.05$ ). Embryos in group 3, which did not have visible morphological abnormalities, were significantly less likely to recover their volume and form a blastocoel after thawing compared to those in group 2 ( $p < 0.001$ ), that indicates the effect of repeated cryopreservation on their viability and potential for re-expansion. Interesting results were obtained after analyzing the implantation rate among the studied groups. It turned out that this index was maximal in group 2, and in group 3 that was significantly lower compared to groups 2 and 1 ( $p < 0.001$ ) (Table 2). This suggests that repeated cryopreservation affects





**Рис. 2.** Розподіл стадій розвитку бластоцист у пацієнок досліджуваних груп: **А** — свіжоотримані ембріони (група 1); **В** — кріоконсервовані ембріони (група 2); **С** — повторно кріоконсервовані ембріони (група 3); 1 — рання бластоциста з бластоцелем менше половини об'єму ембріона; 2 — бластоциста з бластоцелем, що становить половину об'єму ембріона; 3 — повна бластоциста; 4 — розширена бластоциста з витонченою ЗР; 5 — бластоциста з початком хетчингу; 6 — повністю вилуплена бластоциста.

**Fig. 2.** Distribution of blastocyst development stages in patients of the studied groups: **A** – freshly obtained embryos (group 1); **B** – cryopreserved embryos (group 2); **C** – repeatedly cryopreserved embryos (group 3); 1 – early blastocyst with a blastocoel occupying less than half of the embryo's volume; 2 – blastocyst with a blastocoel occupying half of the embryo's volume; 3 – full blastocyst; 4 – Expanded blastocyst with a thinned zona pellucida (ZP); 5 – blastocyst with the beginning of hatching; 6 – fully hatched blastocyst;

ня після відігріву. Можливо допустити, що 2 години між відігрівом і повторним кріоконсервуванням можуть бути недостатніми для повної репарації клітинних структур, зокрема для відновлення плазматичних мембран, мітохондрій, внутрішньоклітинних органел і ДНК. Порушення в мембранних структурах, які відповідають за обмін речовин та іонів, є особливо критичними. Обмежений час для репарації може призвести до того, що ембріони не встигають відновитися до оптимального стану, а це збільшує ймовірність накопичення пошкоджень під час повторної вітрифікації. Даний факт може пояснювати зниження показників реекспандування та імплантації у повторно кріоконсервованих ембріонів. Для мінімізації вказаних ризиків доцільно розглянути можливість збільшення часу між двома раундами кріоконсервування.

Більш високий рівень імплантації, який спостерігається після одноразового кріоконсервування, ймовірно, можна пояснити двома основними чинниками: більш високою життєздатністю до імплантації та оптимізацією умов підготовленого циклу перенесення ембріонів порівняно з умовами стимульованого циклу.

Результати дослідження, які були проведені на лабораторних тваринах, показали, що ембріони миші виживають після трьох циклів заморожування-розморожування і залишаються здатними до розвитку *in vitro* [14]. Одержані дані на ембріонах людини є обмеженими через етичні міркування. Клінічна необхідність використання циклів з повторно кріоконсервованими ембріонами дозволила виявити деякі закономірності. Так було показано, що частота імплантації при трансфері ембріонів, заморожених один раз чи двічі, значущо не відрізнялася [3, 6]. Слід вка-

not only the survival rate and re-expansion efficiency, but also the ability of the embryo to implant.

The presented results indicate that repeated cryopreservation leads to a number of disorders of both the structural and functional integrity of preimplantation embryos. Physicochemical factors of cryopreservation are known to cause cellular damage; in particular, a large volume of fluid in the blastocoel cavity increases the likelihood of ice crystal formation [5]. It has been shown that from 1 to 5% of vitrified blastocysts may not survive after thawing [1]. According to the results of the study by X. Zheng *et al.* [17], repeated cryopreservation negatively affects the development of human embryos and their implantation, that indicates a cumulative effect of cell damage during multiple cycles of cryopreservation.

When cryopreservation of biological objects, an important factor is the time allotted for their recovery after thawing. It is possible to assume that 2 hours between thawing and repeated cryopreservation may be insufficient for complete repair of cellular structures, in particular for the restoration of plasma membranes, mitochondria, intracellular organelles and DNA. Disturbances in membrane structures responsible for metabolism of substances and ions are particularly critical. Limited time for repair may lead to the fact that embryos do not have time to recover to an optimal state, which increases the likelihood of accumulation of damage during repeated vitrification. This fact may explain the decrease in re-expansion and implantation rates in repeatedly cryopreserved embryos. To minimize these risks, it is advisable to consider increasing the time between two rounds of cryopreservation.

зати, що в цих дослідженнях було проаналізовано обмежену кількість циклів лікування безпліддя. Проте при розширеному аналізі були виявлені негативні перинатальні наслідки у випадках трансферу двічі кріоконсервованих ембріонів [8]. Важливо враховувати той факт, що у проведених дослідженнях використовували різні методи кріоконсервування: повільне заморожування та вітрифікацію або тільки вітрифікацію. Можливим поясненням розбіжностей між отриманими результатами може бути вплив саме цього чинника.

Відомо, що на частоту імплантації впливає багато чинників, серед яких важливу роль відіграє генетичний статус ембріона [2]. У нещодавній роботі Q. Zhang та співавт. [16] були проаналізовані кріоцикли після передімплантаційного тестування 97 еуплоїдних бластоцист з біопсією та однократною вітрифікацією та 117 еуплоїдних бластоцист, біопсією яких проводили один раз, але двічі вітрифікували. Автори встановили, що додаткове кріоконсервування бластоцист призвело до зниження частоти їхнього виживання, проте рівень імплантації бластоцист значущо не знижувався. Неонатальні результати (співвідношення статей, гестаційний вік, частота передчасних пологів і низька маса дитини після народження) не відрізнялися між групами [16]. Проте залишається дискусійним питання, який саме чинник негативно вплинув на життєздатність ембріонів: повторне кріоконсервування чи клітинні мікрomanipуляції, необхідні для виконання генетичного тестування?

Існує побоювання, що повторне кріоконсервування може викликати генетичні та епігенетичні зміни в клітинах ембріона на стадії бластоцисти, оскільки саме ця стадія характеризується первинним диференціюванням і початком експресії багатьох генів [12]. J. Li та співавт. [7] провели дослідження на лабораторних тваринах і виявили підвищену частоту викиднів під час вагітності ембріонами, які були заморожені та розморожені кілька разів, порівняно з тими, що пройшли один цикл кріоконсервування. Автори встановили значно вищі рівні експресії генів BAX та Caspase3 у групі повторно кріоконсервованих ембріонів, що може свідчити про знижений потенціал розвитку цих ембріонів.

Слід зазначити, що проведена нами робота мала певні обмеження. По-перше, це було ретроспективне дослідження, по-друге, було використано тільки один спосіб кріоконсервування — вітрифікацію. Ембріони, які ми досліджували, не діагностували на еуплоїдність. З одного боку, це дозволило уникнути додаткового

The higher implantation rate observed after single cryopreservation is likely to be explained by two main factors: First, embryos that survived single cryopreservation were likely to have higher viability, which increased their ability to implant. Second, it may indicate that cryo embryo transfer cycle had optimized hormonal condition control to the stimulated cycle, which could also contribute to the implantation rate increasing.

The results of a study conducted in laboratory animals have shown that mouse embryos survive three freeze-thaw cycles and remain capable to in vitro development [14]. The data obtained in human embryos are limited due to ethical considerations. The clinical need for cycles with re-cryopreserved embryos has revealed some patterns. It has been shown that the implantation rate in the transfer of embryos frozen once or twice did not differ significantly [3, 6]. It should be noted that these studies analyzed a limited number of infertility treatment cycles. However, an extended analysis revealed negative perinatal outcomes in cases of transfer of twice cryopreserved embryos [8]. It is important to consider the fact that the studies used different cryopreservation methods: slow freezing and vitrification or vitrification alone. A possible explanation for the discrepancies between the results obtained may be the influence of this factor.

It is known that many factors influence the implantation rate, among which the genetic status of the embryo plays an important role [2]. In a recent study by Q. Zhang *et al.* [16], cryocycles after preimplantation testing (97 euploid blastocysts with biopsy and single vitrification and 117 euploid blastocysts with single biopsy but double vitrification) were analyzed. The authors found that additional cryopreservation of blastocysts resulted in a decrease in their survival rate, but the blastocyst implantation rate was not significantly reduced. Neonatal outcomes (sex ratio, gestational age, rate of preterm birth and low birth weight) did not differ between groups [16]. However, it remains a debatable question which factor negatively affected the viability of the embryos: repeated cryopreservation or the cellular micromanipulations required to perform genetic testing?

There is concern that repeated cryopreservation may induce genetic and epigenetic changes in blastocyst-stage embryo cells, as this stage is characterized by primary differentiation and the onset of expression of many genes [12]. J. Li *et al.* [7] performed a study in laboratory animals and found an increased incidence of miscarriages during



втручання на бластоцисти, а з іншого — ми не можемо виключити вплив генетичного статусу ембріонів на їх імплантацію. З урахуванням вищевикладеного для оцінки безпеки повторного кріоконсервування ембріонів методом вітрифікації необхідні подальші довгострокові дослідження.

### Висновки

Частота виживання та реекспандування двічі кріоконсервованих ембріонів є значущо нижчою порівняно з такою для ембріонів, що були кріоконсервовані один раз. Перенесення в порожнину матки двічі кріоконсервованих ембріонів значущо знижує частоту їх імплантації порівняно як з нативними, так і з тими, що були кріоконсервовані один раз. Одержані результати повинні ретельно враховуватися як клініцистами, так і пацієнтами під час планування лікування безпліддя з використанням повторно кріоконсервованих ембріонів.

### Література

1. Allen M, Hale L, Lantsberg D, et al. Post-warming embryo morphology is associated with live birth: a cohort study of single vitrified-warmed blastocyst transfer cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2022;39(2):417–25.
2. 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.* 2023;21(6):576–82.
3. Check JH, Brittingham D, Swenson K, et al. Transfer of refrozen twice-thawed embryos do not decrease the implantation rate. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2001;28(1):14–6.
4. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs; De los Santos MJ, Apter S, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod.* 2016; 31(4): 685–6.
5. Kovačić B, Taborin M, Vlasisavljević V, et al. To collapse or not to collapse blastocysts before vitrification? A matched case-control study on single vitrified-warmed blastocyst transfers. *Reprod Biomed Online.* 2022; 45(4):669–78.
6. Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, et al. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril.* 2009; 91(2):383–6.
7. Li J, Xiong S, Zhao Y, et al. Effect of the re-vitrification of embryos at different stages on embryonic developmental potential [Internet]. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021[cited 2024 Aug 25];12:653310. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2021.653310/full>
8. Pan Y, Wu R, Wang Z, et al. The effect of freezing twice during assisted reproductive technology on perinatal and neonatal

pregnancy in embryos that had been frozen and thawed several times compared with those that had undergone a single cryopreservation cycle. The authors found significantly higher levels of BAX and Caspase3 gene expression in the group of repeatedly cryopreserved embryos, that may indicate a reduced developmental potential of these embryos. It should be noted that our investigations had certain limitations. First, it was a retrospective study, and second, only one cryopreservation method was used, vitrification. The embryos we studied were not diagnosed for euploidy. On the one hand, this avoided additional intervention on blastocysts, and on the other hand, we cannot exclude the influence of the genetic status of the embryos on their implantation. Taking into account the above mentioned, further long-term studies are needed to assess the safety of repeated cryopreservation of embryos by vitrification.

### Conclusions

The survival and re-expansion rates of cryopreserved twice embryos are significantly lower than those have been cryopreserved once. Transfer of cryopreserved twice embryos into the uterine cavity significantly reduces their implantation rate compared to both native and once-cryopreserved embryos. The results obtained should be carefully considered by both clinicians and patients when planning infertility treatment using repeatedly cryopreserved embryos.

### References

1. Allen M, Hale L, Lantsberg D, et al. Post-warming embryo morphology is associated with live birth: a cohort study of single vitrified-warmed blastocyst transfer cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2022;39(2):417–25.
2. 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.* 2023;21(6):576–82.
3. Check JH, Brittingham D, Swenson K, et al. Transfer of refrozen twice-thawed embryos do not decrease the implantation rate. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2001;28(1):14–6.
4. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs; De los Santos MJ, Apter S, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod.* 2016; 31(4): 685–6.
5. Kovačić B, Taborin M, Vlasisavljević V, et al. To collapse or not to collapse blastocysts before vitrification? A matched case-control study on single vitrified-warmed blastocyst transfers. *Reprod Biomed Online.* 2022; 45(4):669–78.





- outcomes [Internet]. *Biomed Res Int*. 2022 [cited 2024 Aug 25]; 2022: 5623462. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2022/5623462>
9. Petrushko M, Yurchuk T, Piniayev V, et al. Cryopreservation of incomplete compacted morulae and preliminary biopsy of excluded fragments. *Zygote*. 2019; 27(6): 386–91.
  10. Pierson HE, Invik J, Meriano J, et al. A novel system for rapid conversion of Gardner embryo grades to linear scale numeric variables. *Reprod Biomed Online*. 2023; 46(5):808–18.
  11. Pomeroy KO, Comizzoli P, Rushing JS, et al. The ART of cryopreservation and its changing landscape. *Fertil Steril*. 2022;117(3):469–76.
  12. Telugu BP, Pence L. Development of pre-implantation mammalian blastocyst. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2021; 234:21–40.
  13. Tsai S, Johal J, Malmsten J, et al. Embryo ploidy in vitrified versus fresh oocytes: Is there a difference? *J Assist Reprod Genet*. 2023; 40(10):24192–5.
  14. Vitale NJ, Myers MW, Denniston RS, et al. In-vitro development of refrozen mouse embryos. *Hum Reprod*. 1997; 12(2):310–6.
  15. 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.
  16. Zhang Q, Yu W, Jin C, et al. Impact of multiple vitrification-warming procedures and insemination methods on pregnancy and neonatal outcomes in preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Reprod sci*. 2023; 30(7):2302–12.
  17. Zheng X, Chen Y, Yan J, et al. Effect of repeated cryopreservation on human embryo developmental potential. *Reprod BioMed Online*. 2017; 35(6):627–32.
  6. Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, et al. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril*. 2009; 91(2):383–6.
  7. Li J, Xiong S, Zhao Y, et al. Effect of the re-vitrification of embryos at different stages on embryonic developmental potential [Internet]. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 [cited 2024 Aug 25]; 12:653310. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2021.653310/full>
  8. Pan Y, Wu R, Wang Z, et al. The effect of freezing twice during assisted reproductive technology on perinatal and neonatal outcomes [Internet]. *Biomed Res Int*. 2022 [cited 2024 Aug 25]; 2022: 5623462. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2022/5623462>
  9. Petrushko M, Yurchuk T, Piniayev V, et al. Cryopreservation of incomplete compacted morulae and preliminary biopsy of excluded fragments. *Zygote*. 2019; 27(6): 386–91.
  10. Pierson HE, Invik J, Meriano J, et al. A novel system for rapid conversion of Gardner embryo grades to linear scale numeric variables. *Reprod Biomed Online*. 2023; 46(5):808–18.
  11. Pomeroy KO, Comizzoli P, Rushing JS, et al. The ART of cryopreservation and its changing landscape. *Fertil Steril*. 2022;117(3):469–76.
  12. Telugu BP, Pence L. Development of pre-implantation mammalian blastocyst. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2021; 234:21–40.
  13. Tsai S, Johal J, Malmsten J, et al. Embryo ploidy in vitrified versus fresh oocytes: Is there a difference? *J Assist Reprod Genet*. 2023; 40(10):24192–5.
  14. Vitale NJ, Myers MW, Denniston RS, et al. In-vitro development of refrozen mouse embryos. *Hum Reprod*. 1997; 12(2):310–6.
  15. 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.
  16. Zhang Q, Yu W, Jin C, et al. Impact of multiple vitrification-warming procedures and insemination methods on pregnancy and neonatal outcomes in preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Reprod sci*. 2023; 30(7):2302–12.
  17. Zheng X, Chen Y, Yan J, et al. Effect of repeated cryopreservation on human embryo developmental potential. *Reprod BioMed Online*. 2017; 35(6):627–32.

