

УДК 576.37:57.086.13:611.013.1

Л.Д. Валкова\*, П.М. Андреева, Т.В. Милачич, Б.Р. Бандрева, П.В. Пенкова,  
І.М. Бочев, Б.Д. Петкова, Т.Н. Тимева, А.Д. Щерев

## Оцінка кількості вітрифікованих аутологічних або донорських ооцитів людини для народження однієї дитини

UDC 576.37:57.086.13:611.013.1

L.D. Valkova\*, P.M. Andreeva, T.V. Milachich, B.R. Bandreva,  
P.V. Penkova, I. M. Bochev, B.D. Petkova, T.N. Timeva, A.D. Shterev

## Determination of Optimal Number of Vitrified Human Autologous or Donor Oocytes Needed for One Live Birth

**Ключові слова:** кріоконсервування, вітрифікація, аутологічні ооцити, донорські ооцити.

**Key words:** cryopreservation, vitrification, autologous oocytes, donor oocytes.

Кріоконсервування гамет та ембріонів – важливий технологічний етап у лікуванні безпліддя з використанням допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [8]. Різні дослідження продемонстрували високі показники запліднення, настання вагітності та пологів після кріоконсервування ооцитів (КО), які збігаються з таким після використання свіжовиділених ооцитів [4]. Деякі автори вважають, що селективне заморожування ооцитів потребує більш детального вивчення, оскільки на сьогодні відсутні чіткі докази щодо його безпеки, ефективності та економічної доцільності [2]. Слід зазначити, що на результат КО впливають численні фактори: вік та стан здоров'я жінки, якість ооцитів, режими їх вітрифікації, відігріву, відповідні умови зберігання та техніка виконання інтрацитоплазматичного введення сперматозоїдів (ICSI) в ооплазму ооцита [7]. Відомо, що здатність жінки народити дитину знижується з віком. Цей спад починається у 32 роки і стає критичним після 37 років [6]. Результати мета-аналізу показали зниження частоти настання вагітності у жінок старших за 36 років після використання вітрифікованих ооцитів [3]. Пацієнтки, які бажають кріоконсервувати аутологічні ооцити для планування відстроченої вагітності, повинні бути проінформовані про реальний шанс народити дитину з урахуванням віку та оваріального резерву. У разі використання вітрифікованих донорських ооцитів важливо знати необхідну кількість для одного реципієнта з метою виключення редукції зайвих ембріонів.

Cryopreservation of gametes and embryos has become an important biotechnological component of infertility treatment by means of assisted reproductive technologies (ART) [8]. Different studies show good fertilization, pregnancy and delivery rates after oocyte cryopreservation (OC) similar to the rates from fresh oocytes [4]. Some authors think that selective oocyte freezing remains controversial because there are no clear evidence-based guidelines regarding its safety, efficacy and cost-effectiveness [2]. Most important parameters affecting the OC success are age and health conditions of a woman, quality of the oocytes, reliable vitrification and warming regimens, appropriate storage conditions and precise intracytoplasmic sperm injection (ICSI) after warming [7]. It is well known that the ability of a woman to have her own child decreases with the age. This decline usually starts at age of 32 years and becomes very significant after 37 years' age [6]. One meta-analysis showed a decrease in the pregnancy rate in women after the age of 36 after using vitrified oocytes [3]. The women who cryopreserve autologous oocytes for delayed pregnancy have to be informed about the real chance to give birth of a baby depending on their age and number of vitrified oocytes. Concerning the vitrified donor oocytes, it is important to have data about the number of oocytes needed for one recipient to get enough embryos, and at the same time without exceeding some limit because of ethical aspects due to the probable elimination of not necessary embryos.

Лікарня «Д-р Щерев», відділення ЕКЗ, Софія, Болгарія

Dr Shterev Hospital, IVF Unit, Sofia, Bulgaria

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Христо Благоев, 25–31, м. Софія, Болгарія 1330;  
тел.: 003 592 920 9001, факс: 003 592 920 1827  
електронна пошта: petkoval@yahoo.com

\*To whom correspondence should be addressed:

25–31, Hristo Blagoev str., Sofia, Bulgaria 1330;  
tel.: 003 592 920 9001, fax: 003 592 920 1827  
e-mail: petkoval@yahoo.com

Надійшла 18.10.2019

Прийнята до друку 09.11.2020

Received October, 18, 2019

Accepted November, 09, 2020

© 2020 L.D. Valkova, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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.

Мета дослідження – визначення оптимальної кількості вітрифікованих аутологічних та донорських ооцитів, необхідних для досягнення одноплідної вагітності; аналіз частоти їх виживання, запліднення після інтрацитоплазматичного введення сперматозоїда, настання вагітності та народження дітей після перенесення ембріонів, отриманих із криоконсервованих ооцитів.

У роботі досліджували 315 вітрифікованих ооцитів, отриманих від 46 жінок, яких розподілили на дві групи: 1 – 9 пацієток, від яких було отримано 68 ооцитів; 2 – 31 реципієнтка, для яких одержано 247 донорських ооцитів від 37 пацієток. Жінки були включені до програми донації ооцитів через пізній вік або функціональну передчасну недостатність яєчників.

Для отримання ооцитів проводили контрольовану гіперстимуляцію яєчників за допомогою рекомбінантного фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) або отримання високоочищеного людського ФСГ. Для ініціювання овуляції використовували рекомбінантний або високоочищений хоріонічний гонадотропін людини (ХГЛ). Ооцити забирали аспіраційною голкою «Echo Tip» («Cook», США) через 34–36 годин після введення тригера овуляції. Ооцит-кумулюсні комплекси промивали в середовищі «G-Mops» («Vitrolife», Швеція), збирали в середовище «G-IVF Plus» («Vitrolife»).

Денудацію ооцитів виконували через 2 години після аспірації за допомогою піпеток із внутрішнім діаметром 0,140–0,150 мкм («Synga», Чехія). Відразу після цього криоконсервували лише зрілі (MII) ооцити у середовищі «VT801» у «Cryotop»-носії («Kitazato Biopharma Co. Ltd», Японія) відповідно до інструкції виробника зі швидкістю охолодження 23 000 град/хв. Ооцити зберігали у рідкому азоті протягом 1–24 місяців.

Сперматозоїди отримували з нативних або криоконсервованих еякулятів у день відігріву ооцитів перед ICSI. Для криоконсервування еякулятів використовували криопробірки («Greiner Bio-One GmbH», Німеччина) та середовище «Sperm Freeze» («Ferti Pro», Бельгія). У роботі використовували зразки еякульованої сперми чоловіків із нормозооспермією, астенозооспермією, олігозооспермією та олігоастенозооспермією із загальною концентрацією сперматозоїдів не менше 5 млн/мл. Випадки важких порушень чоловічої репродуктивної функції були виключені з дослідження.

Відігрів ооцитів проводили у середовищі «VT802» («Kitazato Biopharma Co. Ltd»), яке містило забуферене розчином HEPES основне культуральне середовище з трегалозою та гідроксипропілцелюлозою, відповідно до інструкції виробника. Швид-

The aim of this study was to assess the number of vitrified autologous and donor oocytes necessary for having the live birth of one baby; to analyze the survival rate of oocytes after warming, fertilization rate after applying ICSI to the survived oocytes and following pregnancy and live birth rates after embryo transfer of the resulted embryos.

The current study included 315 vitrified oocytes from 46 women, which were divided in two groups; the Group I included 9 patients, from which 68 oocytes were collected; the Group II consisted of 31 recipients, where we used 247 donor oocytes, collected from 37 women. The recipients were included in donor-recipient program because of the advanced maternal age or premature ovarian failure.

To obtain oocytes, the controlled ovarian hyperstimulation with recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) or highly purified hFSH was performed. For triggering the ovulation, the recombinant or highly purified human chorionic gonadotropin (hCG) was used. The oocytes were collected by aspiration needle Echo Tip (Cook, USA) 34–36 hours after ovulation triggering. The cumulus-oocyte complexes were washed in G-Mops (Vitrolife, Sweden), collected in G-IVF Plus (Vitrolife).

Two hours after collection, the oocytes were denuded using pipettes with inner diameter 0.140–0.150  $\mu\text{m}$  (Synga, Czech Republic). Right after denudation only mature (MII) oocytes were cryopreserved in VT801 medium using Cryotop device (Kitazato Biopharma Co. Ltd, Japan) according to the manufacturer instructions with 23,000 deg/min cooling rate. Oocytes were stored in liquid nitrogen for 1–24 months.

Semen samples were collected on the day of warming of oocytes before ICSI or were frozen preliminarily in cryovials (Greiner Bio-One GmbH, Germany) using Sperm Freeze medium (Ferti Pro, Belgium). Only ejaculated sperm with normozoospermia, asthenozoospermia, oligozoospermia and oligoasthenozoospermia with total sperm concentration at least 5 million/mL were included. Cases with severe male disorders were excluded from the study.

The oocytes were warmed in VT802 medium (Kitazato Biopharma Co. Ltd, Japan), containing HEPES buffered basic culture media with trehalose and hydroxypropyl cellulose, according to the manufacturer instructions. The warming rate was estimated as 42,000 deg/min. Then the cells were kept in media G-IVF Plus (Vitrolife) in incubator with 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 37°C. ICSI was done two hours after warming in media G-Mops (Vitrolife) using holding and ICSI micropipettes (MicroTech, Czech Republic). The oocytes were cultured in drops of G-TL (Vitrolife) under mineral oil OVOIL (Vitrolife). Fer-



кість відігріву становила 42 000 град/хв. Жіночі статеві клітини зберігали в середовищі «G-IVF Plus» («Vitrolife») в інкубаторі при 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> та 37°C. Процедуру ICSI проводили через 2 години після відігріву ооцитів у середовищі «G-Mops» («Vitrolife») за допомогою мікропіпеток («MicroTech», Чехія). Ооцити культивували у краплях середовища «G-TL» («Vitrolife») під мінеральною олією «Ovoil» («Vitrolife»). Запліднення ооцитів оцінювали через 18–20 годин після проведення ICSI. Зиготи з двома пронуклеусами переносили в краплі середовища «G-TL» («Vitrolife»). Ембріони культивували *in vitro* протягом 2 або 3 діб. Середня кількість ембріонів, перенесених у порожнину матки пацієнтки, становила 2–4. Ембріони переносили за допомогою гнучкого катетера («Labotech», Німеччина) під контролем ультразвукової діагностики.

Кількість ооцитів, необхідних для народження однієї дитини, визначали шляхом ділення кількості криоконсервованих та життєздатних ооцитів на число народжених дітей для кожної досліджуваної групи окремо (з аутологічними та донорськими ооцитами).

Маніпуляції виконували відповідно до Стандартної оперативної процедури (SOP), затвердженої Болгарським агентством із трансплантації, Болгарським регуляторним органом із питань допоміжної репродукції. Усі пацієнти дали інформовану згоду на проведення процедур, які були затвержені Етичним комітетом лікарні «Д-р Щерев» (Болгарія).

Для статистичної обробки результатів використовували програму «Statistica 6,0» («StatSoft», США). Для порівняння двох вибірок застосовували U-критерій Манна-Уїтні при  $p = 0,05$ .

Частота виживання ооцитів після відігріву у пацієнток груп 1 та 2 була однаковою, проте частота запліднення ооцитів у пацієнток групи 1 була значущо вищою порівняно з відповідним показником групи 2. Середня кількість ембріонів, отриманих після запліднення вітрифікованих ооцитів, для перенесення в порожнину матки у жінок групи 1 була значущо нижчою, ніж групи 2.

У пацієнток групи 1 показник частоти настання вагітності та народження дітей склав 55,6% (таблиця). У жінок даної групи випадків викиднів зафіксовано не було. Кількість вітрифікованих та життєздатних ооцитів, необхідних для народження однієї дитини у разі використання аутологічних ооцитів, становила 9,1 та 7,6 відповідно. Всього народилося 7 немовлят.

У пацієнток групи 2 показники частоти настання вагітності та народження живих дітей становили 41,9 та 38,7% відповідно (таблиця). У да-

tilization of the oocytes was evaluated 18–20 hours post ICSI. Two-pronuclear zygotes (2PN) were transferred to new drops of G-TL medium (Vitrolife). Embryos were cultured 2 or 3 days. Average number of transferred embryos was 2–4. Embryo transfer was performed using flexible guide catheter (Labotech, Germany) under ultrasound control.

Number of oocytes necessary for birth of one child was found by dividing the number of used oocytes to the one of babies born, separately for each of the investigated groups (with autologous and donor oocytes).

All procedures were performed according to the Standard Operating Procedure (SOP) approved by the Bulgarian Agency for Transplantation, the Bulgarian Regulatory Authority for Assisted Reproduction. All the patients gave informed consent for the procedures that were approved by the Ethical Committee of the Dr Shterev Hospital.

The findings were statistically processed with Statistica 6.0 software (StatSoft, USA). The two samples were compared using Mann-Whitney U test at  $p = 0.05$ .

The survival rate of oocytes after warming in the patients of Groups 1 and 2 was the same, but the frequency of oocyte fertilization in Group 1 was significantly higher *vs.* this index in Group 2. The average number of embryos, obtained after fertilization of vitrified oocytes, to be transferred into the uterine cavity was significantly lower in Group 1 if compared with Group 2.

In Group I, the pregnancy and following live birth rates were 55.6% (Table). No miscarriages were recorded in this group of patients. The number of vitrified-warmed and survived oocytes necessary for one baby in case of use of autologous oocytes was 9.1 and 7.6, respectively. There were 7 babies born.

In patients of Group II, the pregnancy and live birth rates were 41.9% and 38.7%, respectively (Table). Here, the number of vitrified – warmed oocytes necessary for one baby was 11.5 oocytes in average, and the number of survived ones was 9.1 in average. Seventeen babies were born.

No difference was found between fresh or frozen-thawed sperm based on previous studies confirming the absence of significant differences in terms of fertilization rate, embryo quality, implantation and pregnancy rates [1].

Most of previous investigations of the OC were done in vitrified donor oocytes and included a large number of cycles, and proved the safety and success rate of this method for infertility treatment with ART [5]. Our findings for the group of patients with vitrified donor oocytes (Group II) were also



ній групі у середньому кількість вітрифікованих ооцитів, необхідних для народження однієї дитини, становила 11,5 ооцитів, а кількість збережених після відігріву – 9,1. Усього народилося 17 дітей.

Попередні дослідження підтвердили відсутність суттєвих відмінностей щодо частоти запліднення, якості ембріонів, показників імплантації та частоти настання вагітності між свіжовиділеною та криоконсервованою спермою [1].

Більшість попередніх досліджень КО було проведено на вітрифікованих донорських ооцитах та включали велику кількість проаналізованих циклів лікування і довели безпеку та ефективність цього методу при лікуванні безпліддя з використанням ДРТ [5]. Одержані нами результати у групі пацієнток із використанням вітрифікованих донорських ооцитів (група 2) співставні з літературними даними. Слід зазначити, що показник багатоплідної (лише двоплідної) вагітності виявився вищим, ніж очікуваний. Для аутологічних та донорських ооцитів він становив 40,0 та 38,5% відповідно, що, можливо, обумовлено різною середньою кількістю перенесених ембріонів на пацієнтку. Важливо враховувати той факт, що криоконсервування способом вітрифікації не впливає на ефективність імплантації та частоту живонародження.

Таким чином, для народження однієї дитини у середньому необхідно вітрифікувати 9,1 та 11,5 та отримати життєздатними 7,6 та 9,1 аутологічних і донорських ооцитів відповідно.

Клінічні та ембріологічні характеристики ооцитів у циклах криоконсервування  
Clinical and embryological characteristics of the oocytes cryopreservation IVF cycle

Параметри Parameters	Група 1 (аутологічні ооцити) Group I Autologous oocytes	Група 2 (донорські ооцити) Group II Donor oocytes
Вік, роки Age, years	35,4 ± 6,3 (27–44)	Донори 27,8 ± 3,3 (22–34) Реципієнти 43,8 ± 3,5(35–50) Donors 27,8 ± 3,3 (22–34) Recipients 43,8 ± 3,5 (35–50)
Пацієнтки Patients	9	37
Кількість перенесених ембріонів (ПЕ) Number of embryo transfers (ET)	9	31
Кількість криоконсервованих ооцитів Number of vitrified-warmed oocytes	68	247
Частота виживання, % (кількість) Survival Rate, % (number)	83,8 (57)	83,8 (207)
Частота запліднення, % (кількість) Fertilization rate, % (number)	77,2 (44)	81,6 (169)
ПЕ на 2-у добу, кількість Середня кількість ембріонів на ПЕ ET on day 2, number Mean number embryos per ET	Не виконувалося Not performed	6 2,8 (2–4)
ПЕ на 3-ю добу, кількість Середня кількість ембріонів на ПЕ ET on day 3, number Mean number embryos per ET	9 2,2 (1–3)	25 2,5 (2–3)
Частота настання вагітності, % Pregnancy rate, %	55,6 (5)	41,9 (13)
Частота живонародження, % Live birth rate %	55,6 (5)	38,7 (12)
Кількість народжених немовлят Number of babies born	7	17
Частота викиднів, % Number of miscarriage rate, %	0 (0)	7,7 (1)
Частота двоплідної вагітності, % Twin pregnancy rate, %	40,0 (2)	38,5 (5)
Середня кількість криоконсервованих ооцитів, необхідних для народження однієї дитини Mean number of vitrified-warmed oocytes needed for a baby	9,1	11,5
Середня кількість збережених ооцитів, необхідних для народження однієї дитини Mean number of survived oocytes needed for a baby	7,6	9,1

comparable to the reported data. It should be noted, that the multiple pregnancy rate (only twin pregnancies) appeared to be higher than expected. For autologous and donor oocytes, it was 40.0% and 38.5%, respectively, possibly due to the different average number of transferred embryos per woman. It is important to take into account the fact that the cryopreservation by vitrification causes no negative impact on implantation efficiency and live birth rate.



## Література

1. Borges E, Rossi LM, Locambo de Freitas CV, et al. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertil Steril.* 2007;( 87):316–20.
2. Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, et al. Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? *Cryobiology.* 2020;93:33–6.
3. Cil AP, Bang H, Oktay K. Age-specific probability of live birth with oocyte cryopreservation: an individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013;100(2):492–9 e3.
4. Cobo A, Coello A, Remohi J, et al. Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertil Steril.* 2017;108(3):491–7 e3.
5. Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohi J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertil Steril.* 2015;104(6):1426–34 e1-8.
6. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992;7(10):1342–6.
7. Petrushko MP, Yurchuk TO, Buderatska NO, Piniayev VI. Oolemma invagination of fresh and cryopreserved human oocytes during in vitro fertilization by ICSI. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2018; 28(3):258–65.
8. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – embryos and oocytes as exemplars. *Early Hum Devel.* 2018;(126): 6–9.

Thus, for one child birth 9.1 and 11.5 autologous and donor oocytes in average, respectively, should be vitrified, and 7.6 and 9.1 ones to obtain viable.

## References

1. Borges E, Rossi LM, Locambo de Freitas CV, et al. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertil Steril.* 2007;( 87):316–20.
2. Buderatska N, Gontar J, Ilyin I, et al. Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? *Cryobiology.* 2020;93:33–6.
3. Cil AP, Bang H, Oktay K. Age-specific probability of live birth with oocyte cryopreservation: an individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013;100(2):492–9 e3.
4. Cobo A, Coello A, Remohi J, et al. Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertil Steril.* 2017;108(3):491–7 e3.
5. Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohi J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertil Steril.* 2015;104(6):1426–34 e1-8.
6. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992;7(10):1342–6.
7. Petrushko MP, Yurchuk TO, Buderatska NO, Piniayev VI. Oolemma invagination of fresh and cryopreserved human oocytes during in vitro fertilization by ICSI. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2018; 28(3):258–65.
8. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – embryos and oocytes as exemplars. *Early Hum Devel.* 2018;(126): 6–9.

