

Эффективность криоконсервирования экспандированных бластоцист человека методом витрификации с использованием коллапсирования

Т.А. Юрчук¹, М.П. Петрушко^{1,2}, В.И. Пиняев^{1,2}

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Медицинский центр «ВРТ-клиника репродуктивной медицины», г. Харьков

Efficiency of Human Expanded Blastocyst Cryopreservation using Vitrification and Collapsing

T.A. Yurchuk¹, M.P. Petrushko^{1,2}, V.I. Pinyaev^{1,2}

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Medical Center ART Clinic of Reproductive Medicine, Kharkiv

Витрификация эмбрионов человека является наиболее перспективным методом криоконсервирования. Однако существующие протоколы не учитывают особенности стадий развития. Доимплантационные эмбрионы на стадии экспандированной бластоцисты представляют собой многоклеточную структуру с наличием blastocoeli, заполненной большим количеством жидкости. В связи с этим целесообразно применение процедур, позволяющих уменьшить полость blastocoeli, перед витрификацией.

Цель данного исследования – оценка эффективности применения коллапсирования перед криоконсервированием эмбрионов человека на стадии экспандированной бластоцисты методом витрификации.

Витрификацию бластоцист проводили с использованием среды на основе этиленгликоля, диметилсульфоксида и сахарозы на носителях («CryoTech», Япония). Коллапсирование бластоцист осуществляли химическим, механическим и лазерным методами. Выживаемость бластоцист после отогрева оценивали по морфологическим критериям [Gardner D. *et al.*, 1999], восстановлению их объема и развитию *in vitro*. Эффективность криоконсервирования определяли по частоте наступления беременности. Бластоцисты были разделены на две группы: 1 – без коллапсирования (контроль), 2 – с коллапсированием полости бластоцисты. Клинические показатели пациенток в исследуемых группах (возраст, продолжительность бесплодного брака, количество аспирированных ооцитов) частота оплодотворения, морфологические характеристики эмбрионов и скорость их морфогенеза не имели статистически значимых отличий во всех исследуемых группах.

Выживаемость бластоцист после витрификации и отогрева группы 1 составила $(88,2 \pm 11,1)\%$, а группы 2 – $(92,1 \pm 10,3)\%$. Через 2 ч культивирования *in vitro* $(92,3 \pm 5,8)\%$ бластоцист группы 1 и $(53,8 \pm 9,1)\%$ бластоцист группы 2 восстанавливали клеточный объем. Через 3 ч культивирования этот показатель в группе 2 увеличился до $(97,3 \pm 3,5)\%$. Количество бластоцист, перенесенных в полость матки, составило $1,9 \pm 0,2$ и $2,2 \pm 0,4$ для групп 1 и 2 соответственно. Частота наступления беременности в группе с коллапсированием (64%) была статистически значимо выше, чем в группе контроля (58%).

Коллапсирование экспандированных бластоцист перед витрификацией приводит к повышению показателя выживаемости эмбрионов, морфологических характеристик и частоты наступления беременности. Увеличение времени культивирования коллапсированных экспандированных бластоцист перед эмбриопереносом является одним из условий их восстановления после витрификации-отогрева.

Vitrification of human embryos is the most promising method of cryopreservation. However, current protocols do not address the specificity of developmental stages. Preimplantation embryos at the expanded blastocyst stage represent multicellular structure with the presence of blastocoel filled with plenty of fluids. In this connection, it is advisable to use the procedures reducing the blastocoel cavity prior to vitrification.

The purpose of this study was to assess the effectiveness of collapsing prior to cryopreservation of human embryos at the stage of expanded blastocyst by means of vitrification method. Blastocysts were vitrified on the carriers (CryoTech, Japan) using the media based on ethylene-glycol, sucrose and dimethyl sulfoxide. Collapsing of blastocysts was carried out by chemical, mechanical or laser methods. Survival of blastocysts after thawing was examined by morphological criteria [Gardner D. *et al.*, 1999], recovery of their volume and *in vitro* development. Cryopreservation efficiency was determined by the frequency of pregnancy onset.

Blastocysts were divided into two groups: 1 – with no collapsing (control), 2 – with collapsing of the blastocyst cavity. Clinical scores of patients in the studied groups (age, duration of infertility, number of aspirated oocytes) fertilization rate, morphological characteristics of embryo and the rate of their morphogenesis had no statistically significant differences.

The survival of blastocysts after vitrification and warming for group 1 made $(88.2 \pm 11.1)\%$ and $(92.1 \pm 10.3)\%$ for group 2. After 2 hours of *in vitro* culturing (92.3 ± 5.8) and $(53.8 \pm 9.1)\%$ blastocysts of group 1 of group 2, respectively, recovered the cell volume. After 3 hours of culturing, this value in group 2 blastocysts increased up to $(97.3 \pm 3.5)\%$. Number of blastocysts transferred into the uterine cavity was 1.9 ± 0.2 and 2.2 ± 0.4 for group 1 and 2, respectively. Pregnancy rate in the group with collapsing (64%) was significantly higher than in the control group (58%).

Thus, collapsing of the expanded blastocysts before vitrification increased the survival rate of embryos, their morphological characteristics and pregnancy rate. Extending the cultivation period of collapsed expanded blastocysts prior to the embryo transfer is one of the conditions for their recovery after vitrification-warming.

