

## РАЗДЕЛ 2 – КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ PART 2 – SHORT ARTICLES

### ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГАМЕТ И ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

<sup>1</sup>Иванова О.В., <sup>1,2</sup>Шурыгина О.В., <sup>1,2</sup>Русаков Д.Ю., <sup>2</sup>Быкова Т.В., <sup>2</sup>Петрова А.А., <sup>3</sup>Юхимец С.Н., <sup>1</sup>Кулакова О.В., <sup>4</sup>Юлдашева С.З.

<sup>1</sup>Самарский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>ЗАО Медицинская компания ИДК, <sup>3</sup>Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара, Россия; <sup>4</sup>Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Республика Узбекистан; pathologywinkie@gmail.com

### THE EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF THE CRYOPRESERVATION OF HUMAN'S GAMETES AND EMBRYOS IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAM

<sup>1</sup>Ivanova OV, <sup>1,2</sup>Shurygina OV, <sup>1,2</sup>Rusakov DYU, <sup>2</sup>Bykova TV, <sup>2</sup>Petrova AA, <sup>3</sup>Yukhimets SN, <sup>1</sup>Kulakova OV, <sup>4</sup>Yuldasheva SZ

<sup>1</sup>Samara State Medical University, <sup>2</sup>Closed Joint Stock Company «Medical Company IDK», <sup>3</sup>Medical University Reaviz, Samara, Russian Federation; <sup>4</sup>Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Republic Uzbekistan; pathologywinkie@gmail.com

#### Для цитирования:

Иванова О.В., Шурыгина О.В., Русаков Д.Ю., Быкова Т.В., Петрова А.А., Юхимец С.Н., Кулакова О.В., Юлдашева С.З. Оценка эффективности криоконсервации гамет и эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий// Морфологические ведомости.- 2019.- Том 27.- № 3.- С. 46-50. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.19\(27\).03.46-50](https://doi.org/10.20340/mv-mn.19(27).03.46-50)

#### For the citation:

Ivanova OV, Shurygina OV, Rusakov DYU, Bykova TV, Petrova AA, Yukhimets SN, Kulakova OV, Yuldasheva SZ . The evaluation of the efficiency of the cryopreservation of human's gametes and embryos in assisted reproductive technology program. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2019;27(3):46-50. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.19\(27\).03.46-50](https://doi.org/10.20340/mv-mn.19(27).03.46-50)

**Резюме:** Криоконсервация гамет и эмбрионов является одной из самых актуальных проблем современной репродуктивной медицины. В работе проведен сравнительный анализ эффективности применения нативного и замороженного материала в практике эмбриологической лаборатории. Исследовано 120 образцов спермы здоровых мужчин (доноров спермы). В 100 случаях (83%) снижение подвижности после размораживания составило от 67% до 84% от исходной. При изучении 35 нативных и 23 замороженных ооцитов выявлено незначительное снижение процента дробления с 98,4% до 84,2%. Было выполнено 1289 переносов размороженных эмбрионов с использованием носителей закрытого (n=611) и открытого (n=678) типов. Большинство показателей оказались лучше при использовании открытых носителей: выживаемость составила 84,8% для закрытого типа и 95,1% для открытого типа (p<0,0001), частота наступления беременности – 39,5% и 44,2% (p=0,001), частота родов 72,7% и 67,3% (p=0,003), потери 27,3% и 24,3% (p=0,044). Полученные данные позволяют заключить, что витрификация морфологически нормальных гамет не ухудшает эффективность криопрограмм и сохраняет их репродуктивный статус. Применение для витрификации и хранения эмбрионов носителей открытого типа демонстрирует более высокие показатели выживаемости эмбрионов после криоконсервации, частоты наступления беременности и низкий уровень потерь. Предполагается, что это происходит за счет прямого контакта биологического объекта (эмбриона) с жидким азотом и высокой скорости замораживания, что может быть решающим фактором, определяющим успех витрификации на открытых носителях.

**Ключевые слова:** вспомогательные репродуктивные технологии, криоконсервация, эмбрион человека

**Summary:** Cryopreservation of gametes and embryos is the essential of modern reproductive medicine. This study aimed to evaluate the efficiency of the native and frozen material in the assisted reproductive technology programs. We investigated 120 semen samples of healthy males (sperm donors). One hundred cases (83%) demonstrate mobility attenuation after defrosting from 67% to 84% versus initial value. During the investigation of 35 native and 23 frozen oocytes, we taped an insignificant decreasing of cleavage rate (from 98,4% to 84,2%, p=0,018). We performed 1289 defrosted gametes and embryos transfers and used closed (n=611, CryoTip, USA) and open (n=678, CryoTop, Japan) type carriers. The majority of indicators was better when we used open type carriers: survival (84,8% for closed type, 95,1% for open type, p <0,0001), pregnancy rate (39,5%, 44,2%, p=0,001), labors rate (72,7%, 67,3%, p=0,003), losses rate (27,3%, 24,3%, p=0,044). The obtained data allow us to conclude that the vitrification of morphologically normal gametes doesn't deteriorate the efficiency of cryo-program and keeps their reproductive status. Open type carriers for vitrification and storage of embryos demonstrates higher survival of embryos, pregnancy rate and lower losses rate after cryopreservation as compared to closed type carriers. Highly likely it occurs due to direct contact of an embryo with

liquid nitrogen and high freezing speed. It can be the crucial factor defining the success of the vitrification in open type carriers.

**Key words:** *assisted reproductive technology, human embryo, cryopreservation*

**Введение.** Развитие вспомогательных репродуктивных технологий (далее - ВРТ) требует высокого уровня клеточных технологий на эмбриологическом этапе. Криоконсервация гамет и эмбрионов является клинически значимым методом повышения кумулятивной частоты наступления беременности [1]. При проведении стандартной процедуры стимуляции овуляции и оплодотворения ооцитов *in vitro* более чем в 60% случаев после выполнения переноса остаются эмбрионы пригодные для замораживания. В результате криоконсервация создает возможность продолжения лечения в случае отсутствия беременности в стимулированном цикле. Замороженные эмбрионы могут быть оттаяны и перенесены в матку пациентки в последующих циклах, не требующих использования дорогостоящих гормональных схем стимуляции суперовуляции [2]. Другим явным преимуществом криоконсервации безусловно является возможность отмены в стимулированном цикле переноса эмбрионов в случае развития у пациентки синдрома гиперстимуляции тяжелой степени, а также при возникновении факторов риска нарушения имплантации (кровотечение, недостаточность секреторной трансформации и полипы эндометрия, а также экстремально трудный перенос эмбрионов) [3].

**Цель исследования** - сравнить эффективность применения нативных и замороженных гамет в циклах вспомогательных репродуктивных технологий и оценить влияние типа носителя для замораживания и хранения эмбрионов на результаты криопрограмм и криопротоколов.

**Материалы и методы исследования.** В работе были использованы ооциты, сперматозоиды и эмбрионы человека, исследование которых проведено с соблюдением международных этико-правовых норм обращения с эмбрионами человека [ст. 18 Конвенции Совета Европы о защите прав человека и достоинства человеческого существа при использовании достижений биологии и медицины, 1997]. Изучение гамет и эмбрионов было проведено в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения на базе эмбриологических лабораторий ЗАО «Медицинская компания ИДК». Использование в научных исследованиях половых клеток и эмбрионов человека было разрешено этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета Минздрава России. Гаметы и эмбрионы были идентифицированы под контролем стереомикроскопа (Nikon, Япония). Для инкубации в условиях 5% O<sub>2</sub> использованы инкубаторы СООК (Австралия). Для культивирования эмбрионов до 5-6-х суток эмбрионального развития были использованы среды Vitrolife (Швеция). Для витрификации ооцитов использованы среды и протоколы Kitozato (Япония) и открытые виды носителей CryoTop (Япония). Для витрификации сперматозоидов использованы среды FertiPro (Франция) и носители закрытого типа - соломины 0,25 (Франция). Для витрификации эмбрионов были использованы среды Irvine Scientific (США) и носители открытого CryoTop (Япония) и закрытого CryoTip (США) типов. Бластоцисты 5-6-х суток культивирования оценивали по международной классификации [4].

Статистическую обработку результатов выполняли на компьютере в среде статистических вычислений R (R v.3.5.3, RStudio v.1.1.463), первичный ввод данных производили с помощью электронных таблиц MS Excel. Использовались методы описательной статистики, тесты для сравнения пропорций, в том числе точный биномиальный для малых выборок и одновыборочный тест пропорций с коррекцией непрерывности для больших выборок.

**Результаты исследования и обсуждение.** Одной из основных характеристик, определяющих качество сперматозоидов и их криотолерантность, является кинетическая характеристика. Оценивалась подвижность сперматозоидов до и после процедур замораживания и размораживания. Проанализировано 120 образцов спермы здоровых мужчин (доноров спермы). В 100 случаях (83%) снижение подвижности после

размораживания составляло от 67% до 84% от исходных значений показателя. Исследование показало, что в 25% случаев имела место низкая криотолерантность сперматозоидов. В дальнейшем отобранные образцы спермы были использованы для оплодотворения в программах ВРТ. Частота наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку с использованием криоконсервированных донорских сперматозоидов составила 42%. Для оценки влияния витрификации мы сравнили эффективность использования нативных и замороженных ооцитов (таблица 1).

**Таблица 1**

**Основные показатели качества программ ВРТ при использовании нативных (свежих) и витрифицированных (замороженных) ооцитов**

Показатели	Нативные (свежие) ооциты	Витрифицированные (замороженные) ооциты	P
Количество случаев	35	23	-
Средний возраст пациентов, лет	38,9	38,8	-
Среднее количество ооцитов, переданных пациенту	9,6	9,3	-
% размораживания	не оценивалось	90	-
% оплодотворения	86,5	73,1	0,061
% дробления	98,4	84,2	0,018*
% дорастания до бластоцисты	61,9	53,4	0,170
Среднее количество эмбрионов на перенос	1,2	1,2	-
Положительный тест на хорионический гонадотропин, %	48,6	56,5	0,219
Частота наступления беременности, %	45,7	47,8	0,470
Частота имплантаций, %	44,1	39,3	0,394

Из приведенных данных следует, что показатели группы витрифицированных ооцитов по сравнению с группой нативных ооцитов были несколько ниже. Это может быть следствием нарушением восстановления веретена деления, неполного восстановления органелл ооцита после размораживания. Однако, показатели частоты наступления беременности при использовании свежих и замороженных ооцитов статистически не различаются, что позволяет использовать технологию криоконсервации ооцитов на эмбриологическом этапе программ ВРТ без снижения шансов на получение беременности.

Важным элементом процесса замораживания является носитель, в котором находится образец в процессе криоконсервации и последующего хранения [5]. Носители для криоконсервации ооцитов и эмбрионов должны обеспечивать надежную сохранность эмбрионов во время охлаждения, хранения и нагревания. Носители делятся на две группы – открытые и закрытые. В случае, когда носитель открытого типа – капля криопротекторного раствора с эмбрионом непосредственно контактирует с жидким азотом (например, CryoTop, Япония). В носителе закрытого типа (например, CryoTip, США) криопротекторный раствор не контактирует с жидким азотом и охлаждение происходит через стенку защитного чехла. Как у открытого, так и у закрытого носителя имеется защитный чехол, который предотвращает механическое повреждение замороженного эмбриона.

Для оценки эффективности разных носителей рассчитывали следующие показатели: выживаемость, средний балл эмбриона(ов) на перенос, среднее количество эмбрионов на перенос, частота наступления беременности, частота родов и потери (таблица 2).

**Таблица 2**

**Основные критерии эффективности криопрограмм при использовании эмбрионов, витрифицированных в закрытых и открытых типах носителей**

Показатели	Закрытый носитель (CryoTip)	Открытый носитель (CryoTop)	P
Средний возраст пациента, лет	34,1	33,5	-
Количество размороженных эмбрионов	611	678	-
Выживаемость, %	84,8	95,1	<0,0001*
Средний балл эмбрионов/перенос	3,9	4,1	-
Среднее количество эмбрионов/перенос	1,2	1,3	-
Частота наступления беременности, в % на перенос	39,5	44,2	0,001*
Частота родов, в % на клинически верифицированную беременность	72,7	67,3	0,003*
Потери, в % на клинически верифицированную беременность	27,3	24,3	0,044*

За 2015-2016 годы на рассматриваемых видах носителей было разморожено 1289 эмбрионов. Выживаемость эмбрионов на закрытых носителях составила 84,8%, на открытых - 95,1%, и эта разница статистически значима ( $p < 0,0001$ ). Средний балл эмбрионов на перенос в I группе составил 3,9, во II группе – 4,1. Среднее количество эмбрионов на перенос 1,2 и 1,3, соответственно. Частота наступления беременности статистически значимо отличалась ( $p < 0,0001$ ) и составила 39,5% (I группа) и 44,2% (II группа). Частота родов на клиническую беременность с учетом известных исходов составила в I группе 72,7%, во II группе 67,3%, потери составили 27,3% и 24,3%, соответственно. Показатели частоты родов и потерь статистически значимо различались. В целом, результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о более высоком уровне выживаемости эмбрионов при использовании открытых носителей при криоконсервации.

**Заключение.** Таким образом, витрификация гамет и эмбрионов позволяет сохранить качество и нормальный морфологический и физиологический статус клеток и дает возможность их использования в будущем. Это позволяет применять данную технологию наравне с нативным материалом без снижения качества и эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий. При этом открытые носители для замораживания и хранения эмбрионов демонстрируют более высокие показатели эффективности криопрограмм по сравнению с закрытыми. Клинические показатели

(показатели частоты наступления клинической беременности, родов и потерь беременности), которые напрямую зависят от уровня выживаемости, также демонстрируют статистически значимую разницу в пользу использования открытых носителей в эмбриологической практике.

**Авторы сообщают об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.**

## ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Roque M. Freeze-all policy: is it time for that? *J. Assist Reprod Genet.* 2015;32:171-176. DOI: 10.1007/s10815-014-0391-0.
2. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in high responders. *Fertil Steril.* 2011;96:516-518. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.02.059.
3. Wong KM, van Wely M, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane database Syst rev.* 2017;3:1-63. DOI:10.1002/14651858.CD011184.pub2.
4. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. *Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond.* 1999;11:378-388.
5. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *J Reproduction.* 2011;141(1):1-19. DOI: 10.1530/REP-10-0236.

## Авторская справка

**Иванова Ольга Викторовна**, аспирант кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; e-mail: pathologywinkie@gmail.com

**Шурыгина Оксана Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией вспомогательных репродуктивных технологий, ЗАО «Медицинская компания ИДК»; профессор кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; e-mail: oks-shurygina@yandex.ru

**Русаков Дмитрий Юрьевич**, врач-уролог, ЗАО «Медицинская компания ИДК»; старший преподаватель кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; e-mail: pathologywinkie@gmail.com

**Быкова Татьяна Васильевна**, эмбриолог, ЗАО «Медицинская компания ИДК», Самара, Россия; e-mail: pathologywinkie@gmail.com

**Петрова Альбина Анатольевна**, эмбриолог, ЗАО «Медицинская компания ИДК», Самара, Россия; e-mail: pathologywinkie@gmail.com

**Юхимец Сергей Николаевич**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры морфологии и патологии, Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара, Россия; e-mail: y\_s\_n@reaviz.ru

**Кулакова Олеся Викторовна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; e-mail: pathologywinkie@gmail.com

**Юлдашева Сурая Зарифовна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии, Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Республика Узбекистан; e-mail: pathologywinkie@gmail.com