



© В. В. Габараева<sup>1</sup>,  
А. С. Калугина<sup>2</sup>,  
Ю. К. Каменецкая<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный  
государственный медицинский университет  
имени И. И. Мечникова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>Клиника АВА-ПЕТЕР, Санкт-Петербург

## НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВИТРИФИКАЦИИ ООЦИТОВ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

УДК: 618.177-089.888.11-07

■ Витрификация ооцитов является одним из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений ВРТ. Технология витрификации яйцеклеток позволяет осуществлять криоконсервацию женских половых клеток на длительный срок с возможностью дальнейшего применения в циклах ЭКО/ИКСИ. Применение витрификации позволяет расширить возможности программ ВРТ, а высокие показатели выживаемости ооцитов после витрификации и процент их нормального оплодотворения будут способствовать еще большему повышению эффективности и совершенствования программ ЭКО в будущем.

■ **Ключевые слова:** витрификация; криоконсервация; ооциты; эмбрионы; протокол витрификации; частота наступления беременности.

Эра криоконсервации половых клеток человека насчитывает уже более 60 лет. За это время были достигнуты значительные успехи в данной области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

### Краткая история

В конце 40-х годов прошлого века А. Smith и соавт. впервые успешно криоконсервировали сперматозоиды человека при  $-80^{\circ}\text{C}$  с использованием глицерина в качестве криопротектора [49]. Впечатляющие успехи были достигнуты при криоконсервации ооцитов у животных — первые беременности у мышей были получены еще в конце 1970-х годов. Однако простой перенос методологии криоконсервирования и размораживания ооцитов животных на ооциты человека не привел к желаемому результату [24]. Тем не менее, в 1986 году в Австралии была получена первая беременность (двойня) после переноса эмбрионов из размороженных ооцитов человека [11]. Вплоть до 1994 года выживаемость зрелых ооцитов после криоконсервации была крайне низкой. В литературе описаны лишь единичные случаи наступления беременности. Альтернативным подходом и прорывом в области криоконсервации ооцитов, так же как и эмбрионов, стало начало применения метода витрификации. Первые сообщения об эффективности данного метода криоконсервации ооцитов начали появляться в 1999 году, когда родился первый ребенок после использования витрифицированных ооцитов [30, 31].

### **Описание метода витрификации**

В настоящее время для клиник вспомогательных репродуктивных технологий актуальным является задача оптимизации метода витрификации ооцитов [9, 36, 41, 47, 51]. Необходимость проведения данной процедуры обусловлена как медицинскими и социальными показаниями, так и высокой потребностью в банках донорских ооцитов [17, 18, 42, 48]. В основе метода витрификации лежит ультрабыстрая технология охлаждения, в результате которой удается избежать образования кристаллов льда, повреждающих клетку. В ходе процедуры биологический материал подвергается воздействию более высоких, по сравнению с методом медленного замораживания, концентраций криопротекторов, а затем погружается в жидкий азот. По данным разных авторов, выживаемость витрифици-

рованных эмбрионов на стадии 2 пронуклеусов колеблется в пределах 81–93% (Park et al., 2000) [2, 27, 44], достигая по некоторым данным 100% (Kuwayama et al., 2005) [32]. Технология криоконсервации эмбрионов методом витрификации уже стала рутинной, в отличие от криоконсервации ооцитов, которая долгие годы, как отмечено в литературе, представляла большие трудности. Процесс витрификации ооцитов имеет определенные особенности, которые связаны с рядом цитологических и молекулярно-биохимических особенностей ооцита. Ооцит — одна из крупнейших клеток человеческого организма и содержит большое количество воды, состоит из: зоны пеллюцида, гликопротеиновой оболочки, ооплазмы и ядра, органелл клетки (митохондрии, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи), имеет диаметр 120–150 мкм. Для криоконсервации пригодны ооциты, находящиеся на стадии метафазы II, которая характеризуется наличием активного аппарата веретена деления [10, 21, 23, 36, 45]. Веретено деления ооцита крайне чувствительно к воздействию низких температур. При снижении температуры происходит стремительная деполимеризация микротрубочек, что может привести к неправильной сборке веретена после размораживания и, как следствие, к нарушению расхождения хромосом при делении яйцеклетки после размораживания [5, 21, 23, 25, 37]. Указанные проблемы в той или иной степени были успешно разрешены в результате применения для криоконсервации ооцитов метода витрификации, который практически полностью исключает формирование кристаллов льда, так как происходит быстрый переход вещества в аморфное состояние и сводит к минимуму механическое повреждение клеток [12, 28, 53]. Первоначально разработанные протоколы витрификации ооцитов, как отмечают в литературных источниках, были с высокой концентрацией криопротекторов и длительный период обладали выраженной цитотоксичностью, вызывая значимый осмотический стресс клетки [56]. Однако новым этапом в усовершенствовании метода витрификации стало увеличение числа криопротекторов в составе сред витрификации. Примером наиболее успешного использования трехкомпонентного состава витрификационных сред (этиленгликоль, ДМСО, сахараза) стал Cryotop метод [33].

### Техника витрификации

Современная техника витрификации происходит при большой скорости замораживания >20 000 С/мин, с использованием более низких концентраций криопротекторов, чем ранее. Такая высокая скорость витрификации достигает-

ся благодаря объему витрификационного раствора <0,1 мкл. Затем образцы помещаются в специальные устройства в жидкий азот при температуре –196 °С [6, 7, 13, 30, 49].

Существует несколько различных устройств для проведения процесса витрификации, — «закрытые»: Cryotip, High Security Vitrification, «открытые»: Cryolock, S3 [33, 34, 43, 57]. В «открытых» устройствах образцы вступают в непосредственный контакт с жидким азотом в течение витрификации. «Закрытые» устройства предотвращают непосредственный контакт образцов с жидким азотом. Большой процент показателя выживаемости, по данным литературы, при использовании открытых устройств, возможно, связан с экстремально быстрой скоростью размораживания [33]. Основным недостатком открытых систем является возможность контаминации различными инфекционными заболеваниями. Однако важно указать, что не было ни одного случая контаминации при криопереносах с применением открытых систем [15]. Но это не исключает некоторых мер предосторожности при гипотетическом риске с использованием открытых систем [16, 20].

В клинической практике после размораживания витрифицированных ооцитов применяется метод оплодотворения ИКСИ (ICSI) [38].

Много научных исследований и статей посвящено сравнению двух методов криоконсервации ооцитов: медленное замораживание и витрификация. В частности, в своей научной работе «Криоконсервация ооцитов и эмбрионов» Lisbet Van Landuyt (2012), указала несколько преимуществ техники витрификации над медленным замораживанием.

1. Исключается риск образования внеклеточных или внутриклеточных кристаллов льда, которые могут повреждать клетку.
2. Во время витрификации клетки теряют воду или обезвоживаются прежде, чем будут криоконсервированы. С другой стороны, при медленном замораживании обезвоживание клетки запускается при инициации внеклеточной кристаллизации (сидинге) в результате повышения концентрации соли во внеклеточном пространстве. Такое повышение концентрации соли называется «эффектом растворения» и, как известно, является губительным для клеток. Во время витрификации такого внеклеточного повышения концентрации соли не происходит, следовательно, отсутствует риск возникновения «эффекта растворения».
3. При витрификации процесс криоконсервации происходит очень быстро и, следовательно, возможный ущерб, причиняемый замораживанием, практически исключается [8].

Успех метода витрификации зависит от большого количества факторов:

- от «достаточной» проникающей способности криопротекторов и дегидратации под воздействием непроницающих криопротекторных веществ во время витрификации. Достаточная проникающая способность и достаточная степень дегидратации непосредственно связаны со специфическими характеристиками проницаемости ооцитов для воды и криопротекторов и, следовательно, эти характеристики должны учитываться при проведении процедуры витрификации;
- чем ниже температура, тем ниже проницаемость клеточной мембраны для воды и криопротектора. Таким образом, температура в лаборатории, где проводится процедура витрификации, должна строго контролироваться и поддерживаться неизменной на протяжении всего года для того, чтобы избежать вариаций в исходе витрификации;
- известно, что проницаемость для воды и криопротекторов у ооцитов меньше, чем, например, у зигот. Таким образом, оптимальный интервал времени для уравнивания криопротекторов будет варьировать в зависимости от витрифицируемой клетки [55];
- число витрифицированных зрелых ооцитов более и равное 8, именно такое количество ооцитов в среднем позволит получить достаточное количество эмбрионов. По данным Cobo A., Garrido N., Crespo J., Jose R., Pellicer A. (2012), если число витрифицированных ооцитов более 8 — частота успешных родов возрастает с 22,6% до 46,4% [19];
- рекомендуется витрификация только ооцитов хорошего качества, так как ооциты, имеющие пограничную морфологию, хуже переносят процедуры криоконсервации [29].

### Показания для применения метода витрификации

Несмотря на то что витрификация — новый метод криоконсервации биологического материала, который постоянно совершенствуется, показания к применению данного метода криоконсервации с течением времени расширяются:

- сохранение фертильности при различных онкологических заболеваниях. Достаточно обширен перечень онкологических заболеваний, которые успешно излечиваются с помощью лучевой терапии и химиотерапии: например, хронический миелолейкоз, лимфома Ходжкина, миелофиброз, саркома Эдвина и т. д. Проводимое лечение губительно влияет на фолликулярный аппарат яичников, вызывая

их преждевременное истощение и аменорею. В ряде случаев существует возможность провести контролируемую овариальную стимуляцию яичников и получить здоровые яйцеклетки до начала лечения [4];

- витрификация ооцитов в программах ЭКО/ИКСИ [33, 59];
- программа «донорства ооцитов», для ее реализации необходимо создание банка ооцитов [3, 46]. Важным аспектом витрификации ооцитов в донорских программах является отсутствие необходимости синхронизации менструального цикла донора и реципиента. Более того, усовершенствование программ криоконсервации ооцитов в последние годы привело к созданию во многих странах банков ооцитов;
- возможность «накопления ооцитов» (oocyte collection) — «банкинг» при «бедном» ответе на программу контролируемой овариальной стимуляции. Применение программы «банкинг» актуально в данном случае, как указывают ученые N. Prados, M. Cruz, A. Requena et al., на Конгрессе ASRM 2013 г. целесообразно накопление ооцитов у женщин старшего репродуктивного возраста (>40). При накоплении минимум 6 ооцитов вероятность наступления беременности у этой группы пациентов составляет 31,6%, в отличие от стандартных программ ВРТ — 28,3% [39]. Возможно также проведение «банкинга» в натуральном цикле у данной категории пациенток;
- программа «отсроченного материнства», когда здоровая женщина желает сохранить фертильность путем витрификации ооцитов;
- применение витрификации ооцитов по религиозным причинам.

В последнее время многие авторы отмечают, что витрификация является перспективным и высокоэффективным методом криоконсервации ооцитов. По данным различных исследователей, выживаемость ооцитов колеблется от 85 до 90% [25, 35]. В 2009 году Nagy и соавт. сообщили о результатах исследования с использованием ооцитов от 10 доноров и 20 реципиентов, — выживаемость ооцитов составила примерно 90%, а ЧНБ достигла 75% [41]. В 2005 году Kuwayama и соавт. сообщили о 90% выживаемости ооцитов и 40% частоте наступления беременности с использованием системы «Cryotop», эти результаты были получены в проспективном рандомизированном исследовании с ооцитами, полученными от инфертильных пациенток (в возрасте до 35,5 лет), с использованием 124 ооцитов от 40 пациенток [33]. Наиболее масштабное проспективное рандомизированное контролируемое исследование

по оценке банка гамет проведено в 2010 году учеными Cobo A., Meseguer M., Remohi J., Pellicer A.: эффективность донорских ооцитов с 600 реципиентами (более 3000 ооцитов) показали эквивалентные результаты при витрификации в сравнении с использованием нативных ооцитов [18]. В публикации А. Собо [14] указала следующие результаты: выживаемость ооцитов после витрификации более 90% (95,1%), процент оплодотворения витрифицированных ооцитов по сравнению с нативными 73,1% против 74,8%, а частота наступления беременности 51,4% против 52,6% соответственно ( $p < 0,05$ ). Cobo A, Diaz C. в своем метаанализе в 2011 г., как и ученые А.Е. Jones, J. W. Miller на Конгрессе ASRM в 2013 г., указали на то, что по результатам их научного исследования по сравнению результативности применения витрифицированных и нативных ооцитов донора оплодотворение, развитие бластоцисты и частота наступления беременности не имеют достоверных различий [22].

В исследованиях Noyes N., Porcu E., Borini A. указано, что к 2009 г. родилось более 532 детей по всему миру с использованием витрифицированных ооцитов [41]. Несмотря на то что проводится большое количество исследований исходов беременности в программах ВРТ с применением метода витрификации, мы не можем точно утверждать, будут ли долгосрочные последствия от применения данного метода криоконсервации ооцитов. Обнадешивает то, что, по данным Noyes N., Porcu E., Borini A. (2009) [41], из 392 детей, рожденных с применением витрифицированных ооцитов, только 6 были с определенными хромосомными и генетическими аномалиями, — данная цифра не отличается от процента детей, зачатых естественным путем.

Широкое рандомизированное контролируемое исследование Smith G. D., Serafini P., Fioravanti J., Yadid I. и соавт. (2010) указывает на то, что витрификация ооцитов повышает выживаемость, оплодотворение, получение качественных эмбрионов, а также увеличивает частоту наступления беременности и позволяет длительно хранить биологический материал [49]. Thomas J. Kim, Seung Wook Hong и соавт. в 2010 г. опубликовали информацию о рождении здорового мальчика при использовании витрифицированных ооцитов, хранившихся в течение 5 лет [54].

Таким образом, витрификация расширяет возможности вспомогательных репродуктивных технологий и имеет большие перспективы развития, так как применяется в данный момент практически для всех видов биологических материалов [1, 2, 55, 58, 59] и открывает «двери» для многих тысяч женщин, которые подвергаются

рisku потери репродуктивной функции вследствие различных причин. Высокие показатели выживаемости и оплодотворения витрифицированных ооцитов будут способствовать повышению эффективности и совершенствованию программ ЭКО.

## Литература

1. Джамбор В.В. Усовершенствование программы экстракорпорального оплодотворения человека с помощью применения метода витрификации. Автореф. дис... канд. биол. наук. М.; 2005.
2. Калугина А.С., Кравчук Я.Н., Шлыкова С.А. и др. Влияние качества полученных эмбрионов на исходы программ криоконсервации при сравнении методов медленного замораживания и витрификации в циклах ВРТ. Журнал акушерства и женских болезней. 2012; LXI (4): 48–53.
3. Носкова Ю.О., Кривохарченко И.С., Захарова Е.Е., Залетова В.В. Мультипротекторная витрификация ооцитов. Создание и использование криобанка ооцитов доноров: опыт Клиники МАМА. Проблемы репродукции. 2011; № 6: 46–50.
4. Смирнова А.А., Тур-Каспа И. Криоконсервация ооцитов человека: клинические исходы. Проблемы репродукции 2005; № 1: 14–8.
5. Alikani M., Cohen J. Human oocyte and embryo cryopreservation. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 1990; 5 (2): 714–7.
6. Almodin C.G., Minguetti-Camara V.C., Paixao C.L., Pereira P.C. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. Hum. Reprod. 2010; 25: 1192–8
7. Antinori M., Licata E., Dani G., Cerusico F., Versaci C., Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. Reprod Biomed Online. 2007; 14: 72–9.
8. Balaban B. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolish and blastocyst formation. Hum. Reprod. 2008; 23 (9): 1976–82.
9. Bernard A., Fuller B. J. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. Hum. Reprod. Update. 1996; 3 (2): 193–207.
10. Boiso I., Marti M., Santalo J. et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. Hum. Reprod. 2002; 17: 1885–91.
11. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet. 1986; 1: 884–6.
12. Chen C., Li W. Diffusion controlled ice growth with soft impingement inside biological cells during freezing. Cryo Letters 2008; 5 (29): 371–81.
13. Chian R-C., Huang J.Y.J., Gilbert L., Son W-Y., Holzer H., Cui S.J. et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. Fertil. Steril. 2009; 91: 2391–8.
14. Cobo A. Oocyte vitrification: a useful perspective in assisted. Unit at IVI. Valencia; 2011.

15. Cobo A., Bellver J., de los Santos M.J., Remohi J. Vireal screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 2012; 97: 74–8.
16. Cobo A., Castello D., Weiss B., Vivier C., de la Macorra A., Kramp F. Highest liquid nitrogen quality for vitrification process: micro bacteriological filtration of LN2. In book: 16th World Congress on In vitro fertilization; 6th World Congress on In Vitro Maturation. Tokyo; 2011: 286.
17. Cobo A., Domingo J., Perez S., Crespo J., Remohi J., Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin. Transl. Oncol.* 2008; 10: 268–73.
18. Cobo A., Meseguer M., Remohi J., Pellicer A. Use of cryobanked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum. Reprod.* 2010; 25: 2239–46.
19. Cobo A., Remohi J., Chang C.C., Nagy Z.P. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *Reprod. Biomed. Online.* 2011; 23: 341–6.
20. Cobo A., Romero J.L., Perz S., de los Santos M.J., Meseguer M., Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 1903–7.
21. Cobo A., Rubio C., Gerli S. et al. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil. Steril.* 2001; 75: 354–60.
22. Cobo A., Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011;96:277–85.
23. Coticchio G., Bromfield J.J., Sciajno R. et al. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase I spindle of human mature oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* 2009; 19 (Suppl. 3): 29–34.
24. Gook D., Osborn S., Johnston W. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of meiotic spindle. *Hum. Reprod.* 1993; 8: 1101–9.
25. Isachenko E.F., Nayudu P.L. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. *Hum. Reprod.* 1999; 2 (14): 400–8.
26. Jain J. et al. Oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 2005; 86 (4): 1037–46.
27. Jelinkova L. Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos. *Fertil. Steril.* 2002; 77: 412–4.
28. Karlsson J.O. A theoretical model of intracellular devitrification. *Cryobiology.* 2001; 42: 154–69.
29. Keskkintepe L., Agca Y., Sher G., Keskkintepe M., Maasarani G. High survival rate of metaphase 2 human oocytes after first polar body biopsy and vitrification: determining the effect of previtrification conditions. *Fertil. Steril.* 2009; 92: 1706–15.
30. Kim T.J., Hong S.W. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. *Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28: 73–76.
31. Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A., Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 3077–9.
32. Kuleshova L.L., MacFlare D.R., Trounson A.O., Shaw J.M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryo cryopreservation. *Cryobiology.* 1999; 38: 119–30.
33. Kuwayama M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Hum. Reprod.* 2011; 4 (1): 23–8.
34. Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* 2005; 3 (11): 300–8.
35. Liebermann J., Nawroth F., Isachenko E., Rahimi G., Tucker M.J. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1671–80.
36. Lucena E., Bernal D.P., Lucena C., Rojas A., Moran A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil. Steril.* 2006; 85: 108–11.
37. Mandelbaum J., Anastasiou O., Levy R. et al. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004; 113 (Suppl.): S17–S23.
38. Mandelbaum J., Junca A.M., Plachot M. et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum. Reprod.* 1988; 1 (3): 117–9.
39. Maureen J. Wood. Vitrification of oocytes. *Obstetrician Gynaecologist.* 2012; 14: 45–9.
40. Nagy Z.P., Chang C.C., Shapiro D.B., Bernal D.P., Elsner C.W., Mitchell-Leef D. et al. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryobanking. *Fertil. Steril* 2009; 92: 520–6.
41. Noyes N., Labella P.A., Grifo J., Knopman J. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors. *MJ. Ass. Reprod. Genet.* 2010; 8 (27): 495–9.
42. Noyes N., Porcu E., Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod. Biomed. Online.* 2009; 6 (18): 769–76.
43. Papis K., Shimizu M., Izaika Y. Factors affecting the survival of bovine oocytes vitrified in droplets. *The rriogenology* 2000; 54: 651–8.
44. Park S.P. et al. Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1787–90.
45. Pickering S.J., Johnson M.H. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.* 1987; 3 (2): 207–16.
46. Polak de Fried E., Notrica J., Rubinstein M., Marazzi A., Gómez Gonzalez M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil. Steril.* 1998; 69 (3): 555–7.
47. Porcu E. Freezing of oocytes. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 1999; 11: 297–300.
48. Scaravelli G., Vigiliano V., Mayorga J.M. et al. Analysis of oocyte cryopreservation in assisted reproduction: the Italian

- National Register data from 2005 to 2007. *Reprod. Biomed. Online*. 2010; 4 (21): 496–500.
49. Smith A. Biological effects of freezing and supercooling. № 20. London: Edward Arnold; 1961.
  50. Smith G.D., Serafini P., Fioravanti J., Yadid I., Coslovsky M., Hassun P. et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 2088–95.
  51. Stehlik E.J. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed* 2005; 11: 53–7.
  52. Tao T., Zhang W., Del Valle A. Human oocyte cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2009; 3 (21): 247–52.
  53. Trounson A., Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nature*. 1983; 305: 707–9.
  54. Thomas J. Kim, Seung Wook Hong. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. *Assist. Reprod. Genet.* 2011; Vol.28: 73–76.
  55. Vajta G., Kuwayama M., Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006; 65: 236–44.
  56. Van den Abbeel E., Schneider U., Liu J., Agca Y., Critser J.K., Van Steirtherghem A. Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics, of human in vitro matured MII oocytes. *Human Reproduction*. 2007; 22: 1959–72.
  57. Vanderzwalmen P., Ectors F., Grobet L., Prapas Y., Panagiotidis Y., Vanderzwalmen S. et al. Septic vitrification of blastocyst from infertile patients, egg donors and after IVF. *Reprod. Biomed. Online*. 2009; 19: 700–7.
  58. Wikland M. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocyst. *Hum. Reprod.* 2010; 25 (7): 1699–1707.
  59. Winslow K., Yang D., Blohm P. et al. Oocyte cryopreservation a three year follow up of sixteen births. *Fertil. Steril.* 2001; 76 (3): 120–1.

Статья представлена И.Ю. Коганом,  
ФГБУ «НИИАГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург

#### NEW APPLICATIONS OF OOCYTE VITRIFICATION IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Gabarayeva V. V., Kalugina A. S., Kamenetskaya Yu. K.

■ **Summary:** Vitrification of oocytes is one of the most promising and rapidly developing areas of embryology and ART. Oocyte vitrification technology allows for cryopreservation of female gametes for the long term with the possibility of further use in IVF/ICSI cycles. The use of vitrification to extend the capabilities of ART programs, and high survival rates of oocytes after vitrification and the percentage of normal fertilization will contribute to further increase efficiency and improve IVF programs in the future.

■ **Key words:** vitrification; cryopreservation; oocytes; embryos; vitrification protocol; the pregnancy rate.

#### References

1. Dzhambor V.V. Usovershenstvovanie programmy ekstrakorporal'nogo oplodotvoreniya cheloveka s pomoshch'yu primeneniya metoda vitrifikatsii. [Improvement of human in vitro fertilization program by applying the method of vitrification.] Dis. kand. biol. nauk. 03.00.30 Moskva, 2005god, 104 s. RGB OD, 61: 06–3462. (in Russian).
2. Kalugina A. S., Kravchuk Ya. N., Shlykova S. A. soavt. Vliyaniye kachestva poluchennykh embrionov na iskhody programm kriokonservatsii pri sravnenii metodov medlennogo zamorazhivaniya i vitrifikatsii v tsiklakh VRT. [Influence of the quality of embryos for cryopreservation program outcomes when comparing the methods of slow freezing and vitrification ART cycles.] *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney Sankt-Peterburg*. 2012; tom (LXI). N 4: 48–53. (in Russian).
3. Noskova Yu. O., Krivokharchenko I. S., k. b.n. Zakharova E. E., gl. vrach Zaletova V. V. Multiprotekornaya vitrifikatsiya ootsitov. Sozdaniye i ispol'zovaniye kriobanka ootsitov donorov: opyt Kliniki MAMA. [Multiprotective vitrification of oocytes. Creating and using donor oocytes Cryobank: MAMA Clinic experience.] *Problemy reproduksii*. 2011; N 6: 46–50. (in Russian).
4. Smirnova A. A., Tur-Kaspa I. Kriokonservatsiya ootsitov cheloveka: klinicheskie iskhody (obzor literatury). [Cryopreservation of human oocytes: outcomes (review)]. *Problemy reproduksii*. 2005; N 1:14–8. (in Russian).
5. Alikani M., Cohen J. Human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 1990; 5 (2): 714–717.
6. Almodin C. G., Minguetti-Camara V. C., Paixao C. L., Pereira P. C. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum. Reprod.* 2010; 25: 1192–1198.
7. Antinori M., Licata E., Dani G., Cerusico F., Versaci C., Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 72–79.
8. Balaban B. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolish and blastocyst formation. *Hum. Reprod.* 2008; 23 (9): 1976–82
9. Bernard A., Fuller B. J. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum. Reprod. Update*. 1996; 3 (2): 193–207
10. Boiso I., Marti M., Santalo J. et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 1885–91.
11. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986; 1: 884–886.
12. Chen C., Li W. Diffusion controlled ice growth with soft impingement inside biological cells during freezing. *Cryo Letters* 2008; 5 (29): 371–81.
13. Chian R-C., Huang J.Y.J., Gilbert L., Son W-Y., Holzer H., Cui S.J., et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. *Fertil. Steril.* 2009; 91: 2391–98.
14. Cobo A. Oocyte vitrification: a useful perspective in assisted. Unit at IVI, Valencia. Spain. 2011.

15. Cobo A., Bellver J., de los Santos M.J., Remohi J. Vireal screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 2012; 97: 74–8.
16. Cobo A., Castello D., Weiss B., Vivier C., de la Macorra A., Kramp F. Highest liquid nitrogen quality for vitrification process: micro bacteriological filtration of LN2. 16th World Congress on In vitro fertilization; 6th World Congress on In Vitro Maturation; Tokyo, Japan. 2011: 286.
17. Cobo A., Domingo J., Perez S., Crespo J., Remohi J., Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin. Transl. Oncol.* 2008; 10: 268–73.
18. Cobo A., Meseguer M., Remohi J., Pellicer A. Use of cryobanked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum. Reprod.* 2010; 25: 2239–46.
19. Cobo A., Remohi J., Chang C.C., Nagy Z.P. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *Reprod. Biomed. Online.* 2011; 23: 341–6.
20. Cobo A., Romero J.L., Perz S., de los Santos M.J., Meseguer M., Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 1903–7.
21. Cobo A., Rubio C., Gerli S. et al. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil. Steril.* 2001; 75: 354–60.
22. Cobo A., Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011; 96: 277–85.
23. Coticchio G., Bromfield J.J., Sciajno R. et al. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase I spindle of human mature oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* 2009; 19 (Suppl. 3): 29–34.
24. Gook D., Osborn S., Johnston W., Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of meiotic spindle. *Hum. Reprod.* 1993; 8: 1101–9.
25. Isachenko E.F., Nayudu P.L. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. *Hum. Reprod.* 1999; 2 (14): 400–8.
26. Jain J. et al. Oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 2005; 86 (4): 1037–46.
27. Jelinkova L. Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos. *Fertil. Steril.* 2002; 77: 412–4.
28. Karlsson J.O. A theoretical model of intracellular devitrification. *Cryobiology.* 2001; 42: 154–69.
29. Keskinetepe L., Agca Y., Sher G., Keskinetepe M., Maasarani G. High survival rate of metaphase 2 human oocytes after first polar body biopsy and vitrification: determining the effect of previtrification conditions. *Fertil. Steril.* 2009; 92: 1706–15.
30. Kim T.J., Hong S.W. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. *Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28: 73–6.
31. Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A., Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 3077–9.
32. Kuleshova L.L., MacFlare D.R., Trounson A.O., Shaw J.M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryo cryopreservation. *Cryobiology.* 1999; 38: 119–30.
33. Kuwayama M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Hum. Reprod.* 2011; 4 (1): 23–8.
34. Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* 2005; 3 (11): 300–8.
35. Liebermann J., Nawroth F., Isachenko E., Rahimi G., Tucker M.J. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1671–80.
36. Lucena E., Bernal D.P., Lucena C., Rojas A., Moran A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil. Steril.* 2006; 85: 108–11.
37. Mandelbaum J., Anastasiou O., Levy R. et al. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004; 113 (Suppl.): S17–S23.
38. Mandelbaum J., Junca A.M., Plachot M. et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum. Reprod.* 1988; 1 (3): 117–9.
39. Maureen J. Wood. Vitrification of oocytes. *Obstetrician Gynaecologist.* 2012; 14: 45–9.
40. Nagy Z.P., Chang C.C., Shapiro D.B., Bernal D.P., Elsner C.W., Mitchell-Leef D. et al. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryobanking. *Fertil. Steril* 2009; 92: 520–6.
41. Noyes N., Labella P.A., Grifo J., Knopman J. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors. *MJ. Ass. Reprod. Genet.* 2010; 8 (27): 495–9.
42. Noyes N., Porcu E., Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod. Biomed. Online.* 2009; 6 (18): 769–76.
43. Papis K., Shimizu M., Izaiki Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *The rriogenology* 2000; 54: 651–8.
44. Park S.P. et al. Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1787–90.
45. Pickering S.J., Johnson M.H. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.* 1987; 3 (2): 207–16.
46. Polak de Fried E., Notrica J., Rubinstein M., Marazzi A., Gómez Gonzalez M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil. Steril.* 1998; 69 (3): 555–7.
47. Porcu E. Freezing of oocytes. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 1999; 11: 297–300.
48. Scaravelli G., Vigiliano V., Mayorga J.M. et al. Analysis of oocyte cryopreservation in assisted reproduction: the Italian National Register data from 2005 to 2007. *Reprod. Biomed. Online.* 2010; 4 (21): 496–500.

49. Smith A. Biological effects of freezing and supercooling. N 20. London: Edward Arnold; 1961.
50. Smith G. D., Serafini P., Fioravanti J., Yadid I., Coslovsky M., Hassun P. et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 2088–95.
51. Stehlik E. J. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed* 2005; 11: 53–7.
52. Tao T., Zhang W., Del Valle A. Human oocyte cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2009; 3 (21): 247–52.
53. Trounson A., Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nature.* 1983; 305: 707–9.
54. Thomas J. Kim, Seung Wook Hong. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. *Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28: 73–76.
55. Vajta G., Kuwayama M., Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 2006; 65: 236–44.
56. Van den Abbeel E., Schneider U., Liu J., Agca Y., Critser J. K., Van Steirtherghem A. Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics, of human in vitro matured MII oocytes. *Human Reproduction.* 2007; 22: 1959–72.
57. Vanderzwalmen P., Ectors F., Grobet L., Prapas Y., Panagiotidis Y., Vanderzwalmen S. et al. Septic vitrification of blastocyst from infertile patients, egg donors and after IVF. *Reprod. Biomed. Online.* 2009; 19: 700–7.
58. Wikland M. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocyst. *Hum. Reprod.* 2010; 25 (7): 1699–1707.
59. Winslow K., Yang D., Blohm P. et al. Oocyte cryopreservation a three year follow up of sixteen births. *Fertil. Steril.* 2001; 76 (3): 120–1.

#### ■ Адреса авторов для переписки

*Габараева Виктория Владиславовна* — аспирант. Кафедра репродуктивного здоровья женщин. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ. 192014, Россия, Санкт-Петербург, ул. Маяковского, д. 5. **E-mail:** [reprodyktolog87@mail.ru](mailto:reprodyktolog87@mail.ru).

*Gabarayeva Viktoriya Vladislavovna* — postgraduate, Department of women's reproductive health. I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Public Health of Russian Federation. 192014, Saint-Petersburg, Mayakovskogo St., 5, Russia. **E-mail:** [reprodyktolog87@mail.ru](mailto:reprodyktolog87@mail.ru).

*Калугина Алла Станиславовна* — д. м. н., ассистент кафедры репродуктивного здоровья женщин. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ. Заместитель главного врача по репродуктивной медицине. Клиника репродуктивной медицины ООО «АВА-ПЕТЕР». 191186, Россия, Санкт-Петербург, Невский проспект, 22–24, лит. А., пом. 50-Н. **E-mail:** [Kalugina-AS@avaclinic.ru](mailto:Kalugina-AS@avaclinic.ru).

*Kalugina Alla Stanislavovna* — M.D., Lecture at the Department of women's reproductive health. I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Public Health of Russian Federation. Deputy head doctor for reproductive medicine, AVA-PETER clinic 191186, Saint-Petersburg, Nevskiy prospect, 22–24, office 50-H, Russia. **E-mail:** [Kalugina-AS@avaclinic.ru](mailto:Kalugina-AS@avaclinic.ru).

*Каменецкая Юлия Казимировна* — биолог отделения эмбриологии клиники. Клиника репродуктивной медицины ООО «АВА-ПЕТЕР». 191186, Россия, Санкт-Петербург, Невский проспект, 22–24, лит. А., пом. 50-Н. **E-mail:** [Kamenetskaya-YK@avaclinic.ru](mailto:Kamenetskaya-YK@avaclinic.ru).

*Kamenetskaya Yuliya Kazimirovna* — biologist of embryology department reproductive medicine. AVA-PETER clinic 191186, Saint-Petersburg, Nevskiy prospect, 22–24, office 50-H, Russia. **E-mail:** [Kamenetskaya-YK@avaclinic.ru](mailto:Kamenetskaya-YK@avaclinic.ru).