

Витрификация эмбрионов человека после манипуляций на *zona pellucida*

Т.А. Юрчук¹, М.П. Петрушко^{1,2}, В.И. Пиняев^{1,2}, Н.А. Будерацкая^{1,3}

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

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

³Медицинский центр ИГР, г. Киев

Vitrification of Human Embryos After Manipulation with *Zona Pellucida*

T.O. Yurchuk¹, M.P. Petrushko^{1,2}, V.I. Piniayev^{1,2}, N.O. Buderatska^{1,3}

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, Ukraine

³Medical Center IGR, Kyiv, Ukraine

Современные вспомогательные репродуктивные технологии (интрацитоплазматическая инъекция спермия (ICSI), доимплантационная генетическая диагностика (PGD), вспомогательный хэтчинг (AH)) включают манипуляции на *zona pellucida* (ZP), нарушающих ее целостность. Это приводит к изменению скорости проникновения растворенных в среде веществ на всех этапах криоконсервирования ооцитов и эмбрионов, о чем свидетельствует их осмотическое поведение (скорость и степень дегидратации, время регидратации).

Цель работы – сравнительная оценка выживаемости и частоты наступления беременности после переноса в полость матки пациентки витрифицированных эмбрионов человека, подверженных манипуляциям на ZP, с учетом осмотической реакции клеток на этапах криоконсервирования.

Полученные в стимулированных циклах ооциты на стадии МП после денудации оплодотворяли методом ICSI (группа 1) и культивировали *in vitro* на протяжении 5 суток в среде «Global total» («LifeGlobal», США). ZP надсекали с помощью лазера на 3–4-е сутки развития эмбрионов для проведения АН (группа 2) и биопсии бластомеров (группа 3). Бластоцисты криоконсервировали с использованием эквilibрационных и витрификационных сред на основе диметилсульфоксида, этиленгликоля и сахарозы. Эмбрионы отогревали в растворе 0,5 М сахарозы при 37°C и переносили в полость матки через 3 ч после культивирования.

Выживаемость бластоцист после криоконсервирования составила (96,0 ± 4,0); (72,2 ± 7,1) и (68,2 ± 5,7)%, частота наступления беременности – (54,2 ± 4,6); (52,4 ± 5,5) и (55,6 ± 4,9) в группах 1–3 соответственно.

На этапе насыщения криозащитными растворами было отмечено, что ре- и дегидратация эмбрионов групп 2 и 3 происходила быстрее, чем в группе 1.

При проведении криоконсервирования с учетом индивидуальных осмотических реакций эмбрионов их выживаемость составила (98,7 ± 9,1); (88,8 ± 7,5) и (88,7 ± 6,3)%, а ЧНБ увеличилась до (55,5 ± 5,8); (53,3 ± 6,2) и (62,9 ± 4,4)% для групп 1–3 соответственно.

На основании полученных данных можно заключить, что выживаемость эмбрионов после криоконсервирования снижается при увеличении степени воздействия на целостность ZP при АН или биопсии бластомеров для PGD. Индивидуализация временного регламента этапов криоконсервирования эмбрионов с манипуляцией на ZP, основанная на осмотической реакции, позволяет повысить их выживаемость.

Current assisted reproductive technologies, such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI), pre-implantation genetic diagnosis (PGD), assisted hatching (AH), include manipulations with *zona pellucida* (ZP) resulting in its damage. This leads to changes in membrane permeability of oocytes and embryos for the substances dissolved in the medium at all the stages of cryopreservation, as evidenced by their osmotic behavior (dehydration rate and rehydration time). The purpose of this work was to comparatively assess the embryo survival and pregnancy rate after transferring the vitrified human embryos with manipulated ZP into a patient's uterus, taking into account the osmotic response of cells at the stages of cryopreservation.

The retrieved oocytes at the MII stage in stimulated cycles after denudation were fertilized by ICSI (group 1) and cultured *in vitro* for 5 days in Global total medium (LifeGlobal, USA). The ZP was slightly laser-incised at days 3–4 of embryo development either for AH (group 2) or blastomere biopsy (group 3). Blastocysts were cryopreserved using equilibration and vitrification media based on DMSO, EG and sucrose. Embryos were thawed in 0.5 M sucrose solution at 37°C and transferred into the uterine cavity after 3 hrs of culturing.

Blastocyst survival rate after cryopreservation was (96.0 ± 4.0); (72.2 ± 7.1) and (68.2 ± 5.7)% in groups 1–3, respectively. The pregnancy rate in groups 1–3 was (54.2 ± 4.6); (52.4 ± 5.5) and (55.6 ± 4.9), respectively. It was noted that re- and dehydration of groups 2 and 3 embryos occurred more rapidly than in group 1 during exposure with cryoprotective solutions. In a case when cryopreservation was carried out taking into account the individual osmotic reactions of embryos, their survival rate was (98.7 ± 9.1); (88.8 ± 7.5) and (88.7 ± 6.3)% and the pregnancy rate increased up to (55.5 ± 5.8); (53.3 ± 6.2) and (62.9 ± 4.4)% for groups 1–3, respectively.

Based on our findings we can conclude that with an increase of exposure extent on ZP integrity either at AH or blastomere biopsy for PGD, the survival rate of embryos decreased after cryopreservation. Individualization of the temporal regulation of cryopreservation stages of embryos with ZP manipulation, based on the osmotic reaction allows increasing their survival rate.

