КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та репродуктивної медицини

Завідувач кафедри
проф. Микола ДЗЕРЖИНСЬКИЙ
Протокол №_____ засідання кафедри
від "____" _____2023 р.

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ПОВІЛЬНОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ ТА ВІТРИФІКАЦІЇ В ЦІЛЯХ ЛІКУВАННЯ БЕЗПЛІДДЯ МЕТОДОМ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 Біологія
Книженко Юліани Олегівни

Науковий керівник від кафедри
кандидат біологічних наук,
доцент
Варенюк І.М.

Робота виконана у медичному центрі «Велес»
під керівництвом лікаря акушера-гінеколога Книженко Катерини Олегівни

Оцінка захисту роботи

_____

Київ – 2023р.

АНОТАЦІЯ

У даній роботі досліджується ефективність використання двух методів кріоконцервації ембріонів – повільного заморожування і вітрифікації.

Першим етапом дослідження було порівняння частоти виживання бластоцит 45 щурів з використанням методів повільного заморожування, вітрифікації та удосконаленим методом вітрифікації. Було показано, що при використанні методу вітрифікації значно збільшується виживання ембріонів після розморожування, порівнюючи з методом повільного заморожування. При модифікації методу вітрифікації зі зниженням токсичності кріопротекторів, зменшенням часу промивки, уникненням перегрівання було встановлено зростання життєздатності кожного ембріону до 100%.

У другому етапі було розглянуто ефективність методів повільного заморожування та вітрифікації в порівнянні з природнім циклом (без заморожування) на 134 пацієнтках з використанням 327 ембріонів у програмах ЕКЗ та ПЕ. При порівнянні методів підготовки пацієнток до кріо циклів не було виявлено залежності частоти настання вагітності від методів підготовки (таких як природний цикл; а також цикли із застосуванням препаратів ФСГ; препаратів Lupron/Естроген), а середній вік жінок порівнюваних груп не мав значних відмінностей. Застосування методу вітрифікації ембріонів людини значно збільшує такі показники, як частка ембріонів, що вижили, частота настання вагітності і частота імплантації, порівняно з тими ж результатами після проведення методу повільної кріоконсервації.

Кваліфікаційна робота викладена на 62 сторінки, ілюстрована 11 таблицями. Список використаних джерел включає 72 роботи.

Ключові слова: ембріони, бластоцисти, повільне заморожування, вітривікація, кріопротектори, перенос ембріонів, екстракорпоральне запліднення.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕКЗ – екстракорпоральне запліднення

ПЕ – перенос ембріонів

ICSI – intracytoplasmic sperm injection

IVF – in vitro fertilisation

ФСГ – фолікулостимулюючий гормон

ЛГ – лютеїнізуючий гормон

СПКЯ – синдром полікістозу яєчників

ГнРГ – агоністи гонадотропін-рилізинг гормону

ДМСО – диметилсульфоксид

ПД – пропандіол

ЕГ – етиленгліколь

ПВП – полівінілпіролідон

ПЕГ – поліетиленгліколь

Ск – концентрація кріопротектора

Тк – температура кристалізації

То – температура остекління

ХГ – хоріонічний гонадотропін

ЗМІСТ

ВСТУП……6

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури……9

1.1 Огляд проблеми безпліддя……...…9

1.2 Роль екстракорпорального запліднення з метою лікування безпліддя…..11

1.3 Основи екстракорпорального запліднення…….…..14

1.4 Стійкість доімплантаційних ембріонів ссавців до різних способів кріоконсервації……..19

1.5 Метод повільного заморожування ембріонів та ооцитів……27

1.6 Метод вітрифікації ембріонів та ооцитів……..35

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень……45

2.1 Отримання ембріонів щурів……...45

2.2 Оцінка якості ембріонів щурів……...……46

2.3 Гіпотермічне зберігання та культивування ембріонів in vitro щурів…..…47

2.4 Класифікація та градація бластоцист……47

2.5 Метод повільного заморожування……48

2.6 Метод вітрифікації……..50

2.7 Групи жінок у циклах екстракорпорального запліднення……..52

2.8 Програма екстракорпорального запліднення та перенесення ембріонів людини……53

2.9 Статистичні методи обробки та аналізу отриманих результатів……56

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення……...57

3.1 Порівняння методів повільного заморожування та вітрифікації у роботі з ембріонами щурів……..57

3.2 Розробка модифікації методу вітрифікації……...59

3.3 Порівняння частоти настання вагітностей та частоти імнлантації в результаті переносу повільно кріоконсервованих та вітрифікованих бластоцист у кріо циклах……..62

ВИСНОВКИ……..67

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…….68

ВСТУП

Кріоконсервація ембріонів має кілька потенційних переваг при екстракорпоральному заплідненні людини. Метою процедури кріоконсервації у допоміжних репродуктивних технологіях людини має бути забезпечення високої виживання та життєздатності ембріонів людини після відтавання. Два важливі параметри визначають успіх будь-якого протоколу кріоконсервації: спосіб відновлення рівноваги клітин у відповідь на охолодження та швидкість заморожування (швидкість охолодження). Традиційні протоколи повільного заморожування використовувалися для заморожування всіх видів людських ембріонів, але клінічно задовільні результати не завжди співвідносяться з виживаністю матеріалу [1]. Крім того, метод повільного заморожування вимагає дорогого обладнання та займає багато часу. Вітрифікація, при якій використовуються високі швидкості охолодження у поєднанні з високою концентрацією кріопротектора, не призводить до утворення кристалів льоду при охолодженні та нагріванні. З кількох недавніх досліджень випливає, що метод вітрифікації кращий, ніж процедури повільного охолодження у допоміжних репродуктивних технологіях [2]. Незважаючи на багато потенційних проблем, таких як токсичні ефекти, викликані високою концентрацією кріопротекторів або опосередковане рідким азотом забруднення, метод вітрифікації привернув підвищений інтерес протягом останніх кількох років і досяг значних успіхів. Тому в найближчому майбутньому метод вітрифікації буде кращим за метод повільного заморожування для заморожування людських ембріонів на будь-якій стадії, а також ооцитів [3].

В зв'язку з розвитком нових методів ембріо-біотехнології та біомедицини, таких як запліднення in vitro, трансплантація, мікрохірургія, кріоконсервація, ембріональне клонування тощо, необхідно мати більш глибокі та точні знання про процеси нормального розвитку різних видів ссавців при різних умовах культивування [4].

Існує метод повільного заморожування клітин та ембріонів, який використовується понад 30 років і полягає у повільному витісненні води кріопротекторами та поступовому зниженні температури до -196°C. Однак, метод вітрифікації, який базується на швидкому впливі кріопротекторів та швидкому зниженні температури, ще не повністю розроблений та досліджений, хоча він цікавий як з погляду зниження вартості та збільшення швидкості процесу, так і з погляду результатів зберігання та розморожування ембріонів. При вітрифікації відбувається швидке витіснення води з ембріонів та миттєвий перенос їх до рідкого азоту, що запобігає кристалізації води в клітинах. Багато досліджень свідчать про значне зростання виживання ембріонів при використанні методу вітрифікації [5].

У наш час, кріоконсервація ембріонів є стандартним методом для програми штучного запліднення людини, а також широко використовується в ветеринарії [6].

Таким чином, наша дослідницька мета полягала в оцінці ефективності методу вітрифікації ембріонів щурів за допомогою порівняння з методами повільного заморожування, а також у встановленні найбільш оптимальних умов для успішної вітрифікації. Ми також модифікували стандартний протокол вітрифікації для отримання більшого виживання бластоцист. Було проведено широку статистичну обробку даних щодо ефективності використання методів.

Наступні завдання дослідження були сформульовані з метою досягнення поставленої мети:

1. Використання методів повільного заморожування та вітрифікації для бластоцист щурів 5 та 6 днів розвитку.

2. Порівняти, як вітрифікація та метод повільного заморожування впливають на частоту виживання бластоцист.

3. Поліпшення методу вітрифікації та проведення порівняльного аналізу з контрольною групою.

4. Порівняти частоту настання клінічної вагітності та частоту імплантації при переносі ембріонів після вітрифікації бластоцист та після використання методу повільного заморожування бластоцист з частотою настання клінічної вагітності та імплантації.

5. Порівняти схеми підготовки пацієнток до перенесення розморожених після повільної кріоконсервації ембріонів та після вітрифікації.

Метод вітрифікації може бути більш ефективним, оскільки процедура займає лише до 15 хвилин, тоді як повільне заморожування займає у межах 3-х годин. Таким чином, Використання методу вітрифікації дозволяє не тільки зекономити час, але й уникнути необхідності використовувати дороге морозильне обладнання, оскільки процедура проводиться відносно швидко, у порівнянні з повільним заморожуванням.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Огляд проблеми безпліддя

Безпліддя – це стан, при якому пара не може зачати дитину після року невдалих спроб без використання контрацепції. Ця проблема стає все більш поширеною в нашому суспільстві. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), у світі близько 10% пар стикаються із цією проблемою [7].

Проблема безплідності може бути викликана різними факторами, такими як [8]:

1. Гормональні проблеми: Деякі гормональні проблеми, такі як низький рівень гормональної функції щитовидної залози або високий рівень пролактину, можуть спричинити безпліддя.

2. Порушення овуляції. Овуляція є процесом, при якому яйцеклітина виходить з яєчника і готова до запліднення. Порушення овуляції можуть бути спричинені різними причинами, такими як синдром полікістозних яєчників (СПКЯ), ожиріння або низький рівень фолікулостимулюючого гормону (ФСГ).

3. Проблеми з чоловічими репродуктивними органами: Деякі чоловічі проблеми, такі як низька концентрація сперми, недостатня мотильність сперми або проблеми з еректією можуть бути причиною безпліддя.

4. Проблеми з жіночими репродуктивними органами: Проблеми з жіночими репродуктивними органами, такі як ендометріоз, фіброми матки, поліпи або проблеми з трубами можуть призвести до безпліддя.

5. Порушення імунної системи: Іноді імунна система може атакувати свої власні клітини, включаючи здорові яйцеклітини та сперматозоїди.

6. Шкідливі звички: Куріння тютюну, вживання алкоголю, наркотики та інші шкідливі звички можуть погіршити якість сперми або яйцеклітин, що призводить до безпліддя.

7. Психологічні проблеми: Депресія, тривога, стрес, а також проблеми стосунків та комунікації між партнерами можуть вплинути на здатність пари зачати дитину.

Крім того, вік може бути фактором ризику для безпліддя. У жінок з віком зменшується кількість яйцеклітин та їх якість, що може призвести до труднощів із зачаттям. У чоловіків вік також може бути пов'язаний із зниженням якості сперми [9].

Для діагностики причин безплідності, пари зазвичай звертаються до лікаря-гінеколога або уролога, який проведе низку досліджень, включаючи аналізи крові та сперми, ультразвукове дослідження, гістеросальпінгографія, лапароскопію та інші методи, щоб визначити причини безпліддя.

Лікування безплідності може бути різним залежно від причини. Деякі методи лікування включають зміни способу життя, такі як відмова від шкідливих звичок, зниження ваги, збільшення фізичної активності. У деяких випадках можуть бути прописані препарати, такі як гормони для стимуляції овуляції. Іноді може бути потрібне хірургічне втручання, наприклад, для видалення фіброми матки або лікування ендометріозу. У деяких випадках може бути потрібне використання технологій репродуктивної медицини, таких як штучна інсемінація, допоміжне запліднення або ембріональний трансфер [10].

Загалом безпліддя може бути викликано різними факторами, і лікування може бути різним залежно від причин. Важливо отримати консультацію лікаря, щоб визначити причину безпліддя та обрати найефективніший метод лікування.

У деяких випадках безплідність може бути спричинена генетичними факторами, такими як наявність хромосомних аномалій, які можуть бути успадковані від батьків. Це може призвести до порушення процесу розвитку яйцеклітин та сперматозоїдів, що ускладнює зачаття та народження здорової дитини. У таких випадках пари можуть звернутися до генетичного консультанта, який допоможе їм зрозуміти ризики та можливі методи лікування [11].

Також слід зазначити, що безпліддя може бути спричинене проблемами зі здоров'ям, такими як захворювання щитовидної залози, діабет, гіперпролактинемія, а також інфекції, такі як хламідіоз та гонорея. У таких випадках лікування основного захворювання може покращити шанси на зачаття.

Крім того, фактори навколишнього середовища, такі як забруднення повітря та води, також можуть вплинути на здатність пари зачати дитину. Тому зниження впливу цих факторів може бути корисним для підвищення шансів на зачаття [12].

В цілому, безпліддя може бути викликано безліччю факторів, і кожна пара потребує індивідуального підходу та консультації лікаря. Важливо пам'ятати, що безпліддя не є вироком, і багато пар зможуть успішно зачати дитину за допомогою сучасних методів лікування та підтримки з боку близьких та спеціалістів.

1.2 Роль екстракорпорального запліднення з метою лікування безпліддя

Екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ) є одним із методів лікування безпліддя. Він використовується, коли інші методи не допомагають або неможливі, і полягає у виведенні яйцеклітин з яєчників жінки та заплідненні їх сперматозоїдами у лабораторних умовах, а потім введенні отриманого ембріона у матку жінки.

Роль ЕКЗ полягає в тому, що він може допомогти багатьом парам, які не можуть зачати дитину природним шляхом [13]. Це може бути пов'язано з різними причинами, такими як порушення функції яєчників або матки, низька якість сперми, проблеми з імунітетом та іншими медичними причинами.

Процедура ЕКЗ складається з кількох етапів. Спочатку жінка проходить стимуляцію яєчників, щоб зробити більше яйцеклітин, ніж зазвичай. Потім, коли яйцеклітини досягають зрілості, вони витягуються з яєчників і запліднюються спермою в лабораторії. Після запліднення ембріони вирощуються протягом кількох днів, а потім уводять у матку жінки.

ЕКЗ може бути ефективним методом лікування безпліддя, але він не завжди гарантує вагітність. Успішність процедури залежить від багатьох факторів, таких як вік жінки, її здоров'я та якість сперми [7]. Крім того, процедура може бути дуже дорогою, і деякі пацієнти можуть потребувати кількох спроб, щоб досягти вагітності.

В цілому, ЕКЗ є одним із методів лікування безпліддя, який може допомогти парам, які не можуть зачати дитину природним шляхом. Він має свої переваги та недоліки, і повинен використовуватися лише за наявності медичних показань та після ретельного обговорення з лікарем.

Крім того, ЕКЗ може бути рекомендований для пар, які мають ризик передачі спадкових захворювань дитині [14]. У такому разі можна використовувати процедуру генетичного скринінгу, щоб перевірити ембріони на наявність генетичних дефектів до їхнього впровадження в матку.

Також ЕКЗ може бути рекомендований для жінок, які мають проблеми з яєчниками або які пройшли радикальну хірургічну процедуру, яка пошкодила їхні яєчники. Це може бути пов'язане з раком, ендометріозом чи іншими захворюваннями [10].

Однак, слід зазначити, що процедура ЕКЗ може мати певні ризики та ускладнення, включаючи гіперстимуляцію яєчників, інфекції, кровотечі, а

також високий ризик багатоплідної вагітності. Тому, як і будь-яка медична процедура, ЕКЗ має бути проведене лише під наглядом досвідченого та кваліфікованого медичного персоналу.

У процесі ЕКЗ використовується високотехнологічне обладнання, включаючи інкубатори для вирощування ембріонів та системи для їх моніторингу. Лікарі та медичні фахівці повинні мати відповідну кваліфікацію та досвід роботи з цим обладнанням, щоб забезпечити високу ефективність та безпеку процедури [15].

Процедура ЕКЗ може бути досить дорогою, що може стати обмеженням для багатьох пар. Крім того, процедура може вимагати кількох спроб досягти бажаного результату, що також може збільшити загальну вартість.

Нарешті, деякі пари можуть відчувати емоційний стрес та психологічну напругу під час процедури ЕКЗ, особливо у разі невдачі чи ускладнень. Тому, крім професійної медичної допомоги, може знадобитися психологічна підтримка.

Загалом, ЕКЗ є ефективним та відносно безпечним методом лікування безпліддя, який допомагає багатьом парам реалізувати свою мрію про дитину. Однак, як і будь-яка медична процедура, він має свої переваги та недоліки, і рішення про проведення цієї процедури має бути прийняте з урахуванням індивідуальних особливостей та обставин кожної пари.

Для підготовки до процедури ЕКЗ жінка зазвичай повинна проходити курс гормональної терапії, який дозволяє стимулювати її яєчники та отримати достатню кількість яйцеклітин для процедури. Після цього яйцеклітини витягуються з яєчників жінки за допомогою голки, а потім змішуються зі спермою партнера або донора в лабораторії [16].

Отримані ембріони потім вирощуються в інкубаторах протягом кількох днів, щоб перевірити їх на життєздатність та вибрати найкращий для

впровадження в матку. Зазвичай використання проводиться через шийку матки за допомогою тонкого катетера.

Після процедури ЕКЗ жінка повинна дотримуватися особливого режиму та приймати гормональні препарати, щоб підтримувати вагітність та запобігти її перериванню [17]. Зазвичай протягом 2-3 тижнів після процедури проводиться тест на вагітність, і якщо він позитивний, жінка повинна продовжувати прийом гормональних препаратів протягом перших кількох місяців вагітності.

Насамкінець, процедура екстракорпорального запліднення є ефективним методом лікування безпліддя, який допомагає багатьом парам здійснити свою мрію про дитину. Однак, як і будь-яка медична процедура, вона має свої переваги та недоліки, і її проведення має бути оцінене з урахуванням індивідуальних особливостей та обставин кожної пари. Крім того, важливо пам'ятати, що ЕКЗ є складною та дорогою процедурою, яка потребує кваліфікованого медичного обслуговування та ретельного спостереження за пацієнтом.

1.3 Основи екстракорпорального запліднення

Протокол проведення ЕКЗ може трохи відрізнятися залежно від медичного закладу, проте в цілому процес проведення ЕКЗ складається з декількох етапів.

Етап 1: Підготовка до ЕКЗ

Перед початком ЕКО жінка проходить обстеження, що включає ультразвукове дослідження матки та яєчників, аналізи крові та сечі, зіскоб на флору, аналіз на інфекції та гормональний аналіз. Якщо обстеження показало відсутність протипоказань щодо ЕКЗ, жінці прописують гормональні препарати для стимуляції овуляції [9].

Для стимуляції овуляції при екстракорпоральному запліднені можуть використовуватися різні гормональні препарати. Залежно від індивідуальних особливостей пацієнта та специфіки конкретної схеми лікування лікар може призначити один або кілька з наступних препаратів:

1. Гонадотропіни – це гормони, які стимулюють зростання фолікулів у яєчниках та викликають овуляцію. Вони можуть використовуватися у вигляді ін'єкцій, наприклад, фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) та лутеїнізуючого гормону (ЛГ) [11].

2. Антагоністи гонадотропінів – це препарати, які блокують дію гонадотропінів, тим самим затримуючи овуляцію. Вони можуть використовуватися для запобігання передчасній овуляції під час стимуляції овуляції.

3. Агоністи гонадотропін-рилізинг гормону (ГнРГ) – це препарати, які стимулюють продукцію гормонів у гіпофізі, що призводить до зростання фолікулів та овуляції [17].

4. Естрогени – це гормони, які можуть бути застосовані на початку циклу для стимуляції росту ендометрію та підготовки матки до імплантації ембріона.

5. Прогестерон - це гормон, який може бути використаний для підтримки ендометрію та забезпечення кращої реакції на імплантацію ембріона [18].

Які саме гормональні препарати будуть призначені, залежить від конкретної ситуації та медичних показань, а також від індивідуальних особливостей пацієнта.

Етап 2: Збір яйцеклітин

Протягом кількох днів пацієнтка відвідує лікаря, який за допомогою ультразвукового сканера та аналізів крові моніторить зростання фолікулів, які містять яйцеклітини. Це допомагає лікарю визначити оптимальний час для забору яйцеклітин. Коли досягнуто овуляції, жінка проходить процедуру

пункції яєчників. У день процедури пацієнтці дають седативний або знеболюючий засіб для зняття болю та розслаблення м'язів. Лікар також проводить попередню підготовку, що включає введення у піхву спеціальної пробки, яка полегшує доступ до яєчників. Лікар використовує ультразвуковий сканер для візуалізації яєчників і проводить тонку голку через піхву, щоб досягти яєчників. Потім лікар проводить забір яйцеклітин із фолікулів через голку за допомогою аспіратора. Забір яйцеклітин зазвичай займає приблизно 20-30 хвилин і може бути виконаний в операційній чи процедурній кімнаті. Після забору яйцеклітин ретельно обробляються в лабораторії, щоб видалити з них клітини гранульози та інші непотрібні матеріали [19].

Етап 3: Запліднення

Зібрані яйцеклітини поміщають у спеціальну живильну рідину і змішують із спермою партнера чи донора. Якщо жінка не може використовувати свої яйцеклітини, вона може скористатися з донорських яйцеклітин. Запліднення відбувається природним шляхом (IVF) або з використанням методу ін'єкцій сперми в яйцеклітину (ICSI) [20].

IVF (in vitro fertilization) та ICSI (intracytoplasmic sperm injection) – це два різні методи екстракорпорального запліднення (ЕКЗ), які використовуються для лікування безпліддя у пар, у яких виникають проблеми із зачаттям [21].

IVF є методом, при якому яйцеклітини жінки та сперматозоїди чоловіка змішуються в лабораторії, та запліднення відбувається самостійно. Потім ембріони вирощуються в лабораторії до достатньої стадії розвитку і потім переносяться до матки жінки для росту та розвитку.

ICSI, з іншого боку, є інтенсивнішим методом, при якому сперматозоїди чоловіка ін'єктуються всередину яйцеклітин жінки за допомогою мікроскопічної голки. Це дозволяє подолати проблеми з низькою кількістю або низькою рухливістю сперматозоїдів, які можуть спричинити безпліддя.

Таким чином, різниця між IVF та ICSI полягає у способі запліднення яйцеклітини жінки. У випадку IVF запліднення відбувається природним шляхом, а у випадку ICSI використовується ін'єкція сперматозоїда безпосередньо в яйцеклітину. Обидва методи можуть бути ефективними для лікування безпліддя, і вибір методу залежить від конкретних проблем, які можуть призвести до безпліддя.

Етап 4: Вирощування ембріона

Після запліднення яйцеклітин ембріони вирощують у спеціальних умовах протягом 3-5 днів до стадії бластули. У медичній практиці для вирощування ембріонів після запліднення використовуються спеціальні культуральні середовища, які містять необхідні поживні речовини та фактори зростання для підтримки життєздатності ембріона. Однією з найбільш поширених культуральних середовищ є Ham's F-10 (Ham's Nutrient Mixture F-10), яка містить амінокислоти, глюкозу, вітаміни, мінерали та інші важливі компоненти. Для досліджень у галузі біології та генетики також можуть використовуватися спеціалізовані культуральні середовища, які дозволяють отримувати ембріони різних стадій розвитку або навіть клітини ембріонального походження [22]. Наприклад, для вирощування ембріональних стовбурових клітин використовуються культуральні середовища, що містять високі концентрації факторів росту та поживних речовин. На 3-5 день після забору яйцеклітин лабораторний фахівець оцінює якість ембріонів, ґрунтуючись на їх кількості, розмірі та ступені розвитку.

Етап 5: Трансфер ембріонів

Перед трансфером ембріонів пацієнтці зазвичай дають ліки, які допомагають створити оптимальні умови для приживання ембріонів у порожнині матки. Часто це включає використання прогестерону, який допомагає підготувати ендометрій до ембріонів. Ембріони, які будуть трансплантовані в порожнину матки, готуються перед трансфером. Вони

мають бути в оптимальному стані для перенесення, щоб підвищити шанси успішної імплантації. У деяких випадках застосовуються методи вибору найкращих ембріонів для перенесення, наприклад, за допомогою технології PGD/PGS. Трансфер ембріонів проводиться за допомогою катетера, який вводиться через шийку матки у порожнину матки. Катетер містить ембріони, які будуть перенесені. Перед трансфером лікар проводить ультразвукове дослідження, щоб переконатися, що порожнина матки підходить для трансферу. Ембріони потім переносяться в порожнину матки за допомогою катетера. Залежно від віку жінки та її стану здоров'я може бути перенесено один або кілька ембріонів. Після процедури жінка повинна відпочивати протягом кількох годин, а потім може повернутися до звичайної діяльності. Після трансферу ембріонів лікар спостерігає за пацієнткою, щоб переконатися, що вона не має жодних ускладнень. Зазвичай пацієнтці призначають ультразвукове дослідження через кілька днів або тижнів після трансферу, щоб переконатися, що ембріони успішно прижилися у порожнині матки та почали розвиватися [23].

Етап 6: Підтримка вагітності

У разі успішного трансферу ембріонів пацієнтка може очікувати вагітність, яка триватиме як звичайна вагітність. Якщо трансфер ембріонів не спричинив вагітності, пацієнтці може бути запропоновано провести повторну процедуру ЕКЗ. Через 10-14 днів після трансферу проводиться тест на вагітність. Якщо тест показав позитивний результат, жінка має відвідати свого лікаря для підтвердження вагітності та подальшого моніторингу. Протягом перших кількох тижнів вагітності жінка повинна продовжувати приймати гормональні препарати для підтримки вагітності.

Ці етапи є основними для проведення ЕКЗ, але в залежності від конкретної ситуації може знадобитися додаткова діагностика та лікування. Важливо, що ЕКЗ може призвести до вагітності з першої спроби, і може знадобитися кілька спроб, як досягти бажаного результату.

Крім того, існує ризик виникнення ускладнень, таких як багатоплідна вагітність, викидень, передача генетичних захворювань та інших ускладнень. Важливо проводити ЕКЗ лише у спеціалізованих медичних закладах, де працюють досвідчені фахівці та дотримуються всіх необхідних стандартів та протоколів [24].

Загалом проведення ЕКЗ є довгим і трудомістким процесом, який потребує не лише фізичних, а й емоційних та фінансових витрат. Однак, завдяки сучасним технологіям, ЕКЗ може допомогти багатьом парам, які зіткнулися з проблемами безпліддя, реалізувати свою мрію народження дитини.

Для того, щоб підвищити шанси на успішну вагітність після ЕКЗ, жінка повинна дотримуватися рекомендацій лікаря, включаючи обмеження фізичних навантажень, правильне харчування, відмову від куріння та вживання алкоголю. Також важливо контролювати рівень стресу та загальний емоційний стан.

У разі невдалої спроби ЕКЗ парі може бути запропоновано провести повторну процедуру, змінити протокол лікування або розглянути інші варіанти лікування безпліддя [25].

1.4 Стійкість доімплантаційних ембріонів ссавців до різних способів кріоконсервації

Процес заморожування ембріонів включає комплекс фізико-хімічних перетворень, пов'язаних з перенесенням тепла і води між ембріоном і навколишнім середовищем [25]. Ступінь пошкодження клітин ембріона при заморожуванні зумовлена низкою зовнішніх та внутрішніх факторів. До перших належать швидкість охолодження та склад середовища, що оточує ембріон, до других - розмір клітин, їх поверхнево об'ємне відношення, проникність клітинної мембрани для води та температурний коефіцієнт

проникності. Для того щоб зрозуміти всі технологічні етапи процесу заморожування ембріонів, необхідна інформація про зміни, що відбуваються в розчині, де знаходиться ембріон, а також клітинах самого ембріона при зниженні температури.

При негативних температурах, близьких до 0°С, навколишній ембріон розчин охолоджується нижче за точку свого замерзання без утворення льоду (явище переохолодження) і знаходиться в нестабільному стані. При подальшому зниженні температури спонтанно відбувається процес нуклеації – зародження центрів кристалізації. Починається наростання фронту кристалізації, яке супроводжується стрибкоподібним підвищенням температури та виділенням прихованої теплоти плавлення [26]. При утворенні льоду під час охолодження виморожується частина води та концентрація речовин у розчині підвищується, що відновлює термодинамічний рівновагу. На ці зміни довкілля ембріон відповідає осмотичною реакцією. Осмотичні процеси, що відбуваються в ембріоні, і зрештою сприятливий результат заморожування залежить від швидкості охолодження.

При низькій швидкості охолодження спостерігається повільне утворення льоду, і ембріон довгий час знаходиться в розчині з підвищеною концентрацією речовин, що веде до його зневоднення (ефект розчинів). При надмірному зневодненні клітинні структури ембріона ушкоджуються [27].

При вищих швидкостях охолодження перенесення тепла з клітин у довкілля переважає над виходом води у тому напрямі. Тому вода не виходить із клітин із тією швидкістю, яка необхідна для підтримки осмотичної рівноваги. Клітини переохолоджуються та утворюється внутрішньоклітинний лід, який у даному випадку дозволяє зберегти осмотичну та термодинамічну рівновагу, проте може призвести і часто призводить до пошкодження внутрішньоклітинних структур, що може спричинити загибель клітин [28]. Отже, причиною загибелі ембріона є пошкодження клітинних структур, з одного боку, через надмірне зневоднення (ефект розчинів), а з іншого боку,

через внутрішньоклітинне утворення льоду. Ці можливі наслідки заморожування клітин при різних швидкостях охолодження виражають суть двофакторної гіпотези кріопошкодження клітин.

Несприятливий вплив розглянутих факторів кріопошкодження клітин ембріона можна знизити, застосовуючи кріопротектори та охолодження з оптимальною швидкістю. У численних роботах з кріозаморожування ембріонів ссавців традиційним способом було показано, що ембріони виживають при заморожуванні тільки в присутності кріопротекторів типу гліцерину або диметилсульфоксиду в концентраціях від 1 до 2 М [29]. Для цих кріопротекторів характерні висока розчинність, мала концентрація що дуже важливо для їхнього проникнення всередину клітин. Крім того, володіючи коллигативными властивостями, розчини цих речовин знижують точку замерзання кріозахисного середовища і внаслідок підвищення в'язкості при мінусових температурах і здатності до переохолодження впливають на процеси кристалобразования, затримуючи зростання кристалів, і сприяючи аморфному замерзанню (вітрифікації) навіть при повільному охлаждении.

Швидкість проникнення гліцерину через клітинні мембрани ембріона у кілька разів нижча, ніж швидкість проникнення води. При попаданні ембріонів у кріозахисний розчин з гліцерином, гіпертонічний для їх клітин, вода з них за законами осмосу починає виходити у позаклітинний простір доти, доки між клітинами та позаклітинним середовищем не встановиться осмотична рівновага. Одночасно гліцерин починає повільно надходити у клітини, тобто процес врівноваження починається знову. Це відбувається до тих пір, поки концентрація гліцерину в клітинах ембріона і позаклітинному розчині не зрівняються [30]. Довгий час, загальноприйнятим прийомом, що дозволяє уникнути осмотичного шоку, було поступове насичення ембріональних клітин кріопротектором шляхом проведення ембріонів через розчини з концентраціями гліцерину, що підвищуються (від 0,25 до 1,5 М) [31]. Осмотичний стиск ембріона можна спостерігати під мікроскопом відразу при

попаданні його в розчин кріопротектора. Еквілібрація завершується коли обсяг ембріона збільшується до нормального.

Пізніше було успішно застосовано одноступінчасте насичення ембріональних клітин кріопротектором при зануренні ембріона 1,4 М або 1,5 М розчин гліцерину на 15-20 хв. При цьому спостерігалося сильне стиснення ембріона і подальше відновлення його обсягу без видимих морфологічних змін [32].

Отже, гліцерин сприяє зневодненню ембріональних клітин, заміщаючи в клітинах воду і відновлюючи цим їх ізотонічний обсяг.

Mazur із співавторами розрахували, що для ембріонів, які втрачають 90 % первинного об'єму своєї води до досягнення температурної зони нуклеації льоду, ймовірність утворення внутрішньоклітинного льоду дуже мала, тоді як ембріони, що зберегли більше 30 % початкового об'єму води при охолодженні піддаються внутрішньоклітинному [33]. Тому ембріони починають охолоджувати до мінусових температур після насичення гліцерином за кімнатної температури. Коефіцієнт проникності гліцерину та води через клітинні мембрани - величина, яка залежить від температури, тому при охолодженні швидкість проникнення гліцерину в клітини падає, а при мінусових температурах надходження гліцерину в клітини припиняється. Швидкість виходу води з клітин також знижується, і гліцерин починає діяти як непроникний кріопротектор.

При повільному охолодженні зі швидкостями порядку 0,3-0,8°С/хв процес льодоутворення відбувається з такою інтенсивністю, що концентрація розчинених речовин (у тому числі гліцерину) у міжхристальних просторах зростає повільно, і ембріональні клітини продовжують поступово зневоднюватися за рахунок ефекту розчинів. Як було встановлено емпірично, при охолодженні ембріонів до мінус 30-40 ° С можна досягти найвищої виживання ембріонів. Очевидно, це з тим, що у цьому інтервалі температур

клітини ембріона досягають оптимального ступеня зневоднення, при якій внутрішньоклітинна концентрація гліцерину така, що подальше швидке охолодження мінус 196°С призводить до вітрифікації вмісту клітин [34].

В даний час всі процедури заморожування ембріонів, що застосовуються на практиці, передбачають введення затравки тобто шматочка льоду для індукованого процесу льодоутворення в переохолодженому розчині з ембріонами. У літературі з'явився термін "сідинг" (seeding – посів або seed – затравальний кристал), який і означає "провести затравку". Причиною, яка спонукає використовувати цей прийом, є здатність гліцеринового розчину до сильного переохолодження [35]. При цьому спонтанна нуклеація (утворення центрів кристалізації в результаті агрегації молекул) виникатиме випадково та залежатиме від об'єму та температури зразка. Для переохолодженого розчину характерний у даному випадку метастабільний стан, і спонтанне кристалоутворення буде проходити безконтрольно.

Експериментально було показано, що внесення затравки при температурі -5°С або -12°С не викликає пошкодження ембріонів. Однак у першому випадку з охолоджених надалі до мінус 196 ° С ембріонів виживе більша частина, а в другому менша. Це з тим, що внесення затравки обумовлює фазовий перехід розчину з рідкого стану у тверде. Початкова концентрація гліцерину (1,5 М) різко зростає при внесенні затравки: при мінус 6°С - до 5 М, при мінус 12°С - до 10 М [26]. Ембріон у цих умовах відчуватиме сильний осмотичний вплив. У першому варіанті створюються умови для поступового зневоднення ембріональних клітин, у другому осмотичний вплив буде більш жорстким, що приведе при подальшому охолодженні до зниження життєздатності ембріонів.

Отже, мета внесення затравки - виведення переохолодженого розчину з ембріонами з метастабільного стану та утворення льоду за контрольованих умов, що сприяють оптимальному перебігу осмотичної реакції ембріонів.

Точка замерзання 1,5-2 М розчинів гліцерину знаходиться в температурному інтервалі мінус 3,5 - 4°С. Згідно з вищесказаним оптимальною температурою для введення затравки в 1,5 М розчин гліцерину буде температура мінус 7°С [27].

Найчастіше вживаним прийомом для індукування кристалізації служить дотик охолодженим в азоті пінцетом стінок контейнера, в якому заморожуються ембріони, що знаходяться в кріозахисному розчині. Від кристала льоду, що утворився всередині контейнера, фронт кристалізації починає поступово поширюватися по всьому об'єму розчину. При цьому зміна концентрації розчину в рідкій фазі проходить поступово, що створює, як зазначено вище, сприятливі умови для осмотичної реакції ембріона [36].

В даний час існує безліч варіантів пристроїв із програмним охолодженням для кріоконсервації ембріонів. Істотна їхня відмінність полягає у використанні теплоносіїв, в яких проходить охолодження ембріонів до занурення в рідкий азот [37].

У пристроях одного типу охолодження проходить у повітряному середовищі, а у пристроях іншого типу у спиртовій бані. Найменша варіабельність відзначена для спиртових пристроїв, коливання температури в камері, що охолоджує, не перевищують 0,5°С. У деяких заморожувачах з повітряною камерою охолодження температурні коливання можуть досягати 2°С [39].

Наскільки важливо точно підтримувати швидкість охолодження під час заморожування ембріонів було показано у спеціальному дослідженні. При пересадці відтаяних ембріонів великої рогатої худоби, що охолоджувалися в процесі кріоконсервації зі швидкістю 0,3°С/хв, приживлюваність становила 54%, зі швидкістю 0,5°С/хв - 55% і зі швидкістю 0,8°С/хв. 51%. Отже, коливання швидкості охолодження у зазначених межах не впливають на виживання ембріонів [40].

Для того, щоб відтанутий ембріон надалі нормально розвивався, кріопротектор повинен бути видалений з його клітин. При виведенні кріопротектора з ембріона після розморожування відбувається зворотна осмотична реакція. Ембріон поміщають у розчин кріопротектора з нижчою концентрацією, ніж усередині клітини. При цьому вода починає надходити в ембріон, а гліцерин виходить із нього. Оскільки проникність води вище, ніж гліцерину, то при високому градієнті концентрацій внутрішньо- та позаклітинних розчинів швидке надходження води в клітини може призвести до надмірного набухання ембріона та його механічних пошкоджень. Тому видалення кріопротектора з ембріональних клітин здійснюють проведенням ембріона через розчини з концентраціями, що знижуються.

Schneider та Mazur за коефіцієнтом проникності ембріонів великої рогатої худоби до гліцерину розрахували осмотичні наслідки шестиступінчастої процедури видалення кріопротектора при послідовному проведенні ембріонів через розчини з концентраціями гліцерину 1,25 М; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 і 0 М. Вчені запропонували включити в середу для відмивання відтаяних ембріонів сахарозу, яка відноситься до класу екзоцелюлярних кріопротекторів і не проникає в клітини. Наявність у середовищі сахарози обмежує надмірне набухання ембріона при видаленні гліцерину, осмотично стримуючи надходження води в ембріональні клітини. За запропонованим методом заморожені в 1,5 М розчині гліцерину ембріони після розморожування поміщали в 0,5 -1,0 М розчин сахарози на 10 хв, а потім відмивали в чистому культуральному середовищі. Після цього ембріони можна культивувати чи трансплантувати тваринним реципієнтам [33].

Після вдалого випробування цього методу ембріони великої рогатої худоби стали заморожувати в невеликих пластикових соломинках, одноступінчасто розбавляючи їх після відтавання сахарози в цих же соломинках [38]. Метод дозволяє розморожувати ембріони у виробничих

умовах і пересаджувати їх реципієнтам тим же способом, яким здійснюється штучне осіменіння великої рогатої худоби.

Загальноприйнятим способом розморожування ембріонів є занурення соломинок на кілька секунд у водяну баню при температурі 30-37°С. При цьому теоретичні передумови для застосування розглянутого способу розморожування засновані на положеннях двофакторної гіпотези і є загальними для всіх типів клітин [39].

При повільних швидкостях охолодження виживання ембріонів визначається кінцевою температурою, до якої проходило охолодження перед зануренням рідкого азоту. Максимальне виживання відмічено при температурі до -40°С та швидкому відтаванні. При повільному охолодженні до -80°З зануренні в рідкий азот максимальне виживання ембріонів спостерігалося при повільному відтаванні.

Описані умови розморожування дозволяють знизити ймовірність рекристалізованих процесів, що супроводжуються внутрішньоклітинним утворенням льоду в зоні температур вище -80°С, а також уникнути осмотичного шоку під час танення кристалів льоду [40].

Одним із найчастіших ушкоджень ембріонів, які відбуваються під час заморожування та відтавання, є розриви або сколи прозорої оболонки. У дослідженнях на незапліднених яйцеклітинах корів було показано, що прозора оболонка у 100% випадків залишається непошкодженою при відтаванні зразків повітря при температурі 20°С. При традиційному способі розморожування у водяній бані (36°С) частота пошкоджень прозорою оболонкою склала 24%. У першому випадку швидкість розморожування становила 150°С/хв, у другому - близько 2000°С/хв. Подібні результати були отримані на морулах та бластоцистах корів та морулах мишей. Збережена після процедури кріоконсервації прозора оболонка оберігає ембріон від

вірусів, бактеріальної та грибкової мікрофлори, що особливо важливо при створенні кріобанків ембріонів та їх виробничих трансплантаціях [41].

Таким чином, при короткому описі традиційний технологічний процес заморожування ембріонів складається з кількох послідовних етапів.

1. Еквілібрація ембріона з гліцерином при послідовному витримуванні в розчинах кріопротектора з концентрацією, що підвищується, або приміщення ембріона в розчин з кінцевою концентрацією гліцерину (1,5 М) на 10-20 хв.

2. Охолодження до температури внесення затравки (близько -7°С).

3. Локальне індукування утворення кристалів льоду для затравки (seeding).

4. Охолодження зразка із швидкістю 0,3-0,8°С/хв від температури затравки до -30°С - -40°С.

5. Швидке охолодження до -196° із зануренням у рідкий азот.

6. Розморожування заморожених ембріонів у водяній бані (30-37°С) або на повітрі (20°С).

7. Видалення кріопротектора шляхом проведення ембріонів через знижувальні концентрації кріопротектора або в 0,5 - 1,0 М розчині сахарози протягом 10 хв.

1.5 Метод повільного заморожування ембріонів та ооцитів

Кріоконсервація ооцитів та ембріонів - це складний процес збереження, який включає наступні етапи: захист клітин від пошкоджень за допомогою кріопротекторів, охолодження до температури -196°С, зберігання у стані замороження, розморожування, видалення кріопротекторів та повернення до фізіологічного середовища для продовження розвитку [40].

Головним принципом кріоконсервації є уникнення пошкодження клітин внаслідок внутрішньоклітинних льодових утворень. Це досягається шляхом дегідратації клітин перед та під час зниження температури. Життєздатність

ооцитів і ембріонів залежить від різних факторів, включаючи ступінь зрілості ооцита, стадію розвитку ембріона, градацію ембріона, умови культивування в vitro, тип використовуваного кріопротектора, а також метод кріоконсервації, який вибирається.

У різних видів ссавців кріоконцервація ооцитів та ембріонів може мати різні результати. У мишей, наприклад, кріоконцервація може бути успішною для зрілих та незрілих ооцитів, а також для ембріонів на будь-якому етапі розвитку, із мінімальними втратами. Однак у людей, які беруть участь у програмі екстракорпорального запліднення, частіше за все кріоконцервують ембріони, оскільки ооцити мають низькі показники виживання та шанси на вагітність після розмороження.

У 1972 році було вперше успішно заморожено та розморожено предімплантаційні ембріони ссавців, що дало змогу зберегти їх життєздатність. Для цього використовувався метод повільного зниження температури на 1°C в хвилину до -79°C, після чого ембріони переносили в рідкий азот. Ця робота відкрила основні принципи повільного заморожування, такі як важливість ефективності "сіяння" (утворення льоду) при температурі -7°C, швидкості зниження температури, ролі кріопротекторів та умов, за яких вони повинні впливати або видалятися. У 1983 році було опубліковано першу статтю про вагітність, отриману в результаті перенесення розмороженого 8-клітинного ембріона людини [42].

Роль кріопротекторів полягає в захисті клітин від пошкодження, що може виникнути в результаті утворення льоду та високих концентрацій солей при заморожуванні. В наш час, для цього використовують розчини, які містять один або кілька проникних кріопротекторів, таких як гліцерин, диметилсульфоксид (ДМСО), пропандіол (ПД) і етиленгліколь (ЕГ). Молекулярна вага цих кріопротекторів становить від 63 до 97. Вони добре розчиняються у воді і можуть змінювати структуру води, руйнуючи та утворюючи водневі зв'язки з молекулами води. Наприклад, у гліцерину і 1,2-

пропандіолі водневі зв'язки формуються між воднем ОН-групи та киснем води, тоді як кисень диметилсульфоксиду зв'язується з протонами води, що супроводжується виділенням тепла [43].

Також можна сказати, що кріоконсервація може бути забезпечена за допомогою непроникних для клітин сполук. Такі сполуки, як правило, включають великі молекули цукрів, таких як сахароза, рафіноза, трегалоза, а також білки і ліпопротеїди. Вони не проникають в клітини, але можуть захищати їх від пошкоджень під час кріоконсервації.

Коли розчин охолоджується повільно, кріопротектори незначно знижують температуру замерзання розчину, що становить близько 2-3°C. Проте, при подальшому падінні температури та формуванні льоду, концентрація кріопротекторів у порівнянні з концентрацією незамерзаючих фракцій в трубочці, де знаходяться ембріони, раптово збільшується. Це є важливим фактором, оскільки з формуванням льоду підвищується концентрація солей у незамерзаючих фракціях, що може досягти токсичного рівня. Кріопротектори знижують токсичний ефект високої концентрації солей, замінюючи молекули води в з'єднаннях та запобігаючи їх руйнуванню. Другим важливим фактором є те, що висока концентрація кріопротекторів у клітинах допомагає уникнути утворення кристалів льоду всередині клітин [40].

Зазвичай, розчини з кріопротекторами містять сироватку або макромолекули, такі як альбумін або синтетичні полімери, такі як декстран, фіколл, полівінілпіролідон (ПВП), або полівінілалкоголь. Існує багато досліджень, які показують, що додавання хоча б однієї макромолекули в середовище під час повільного заморожування може знизити фізичне пошкодження ембріонів. Це досягається шляхом зміни властивостей середовища, що зменшує концентрацію кріопротекторів.

Перед початком зниження температури, ембріони послідовно переносять у кілька середовищ, що містять кріопротектори, і залишають там

на кілька хвилин. Цей процес може відрізнятись в залежності від стадії розвитку ембріона та застосовуваного методу кріоконсервації. Після цього ембріони переносять у спеціальні трубочки та поміщають у програмований на зниження температури морозильник. У деяких центрах екстракорпорального запліднення кріоконсервують по 3-4 ембріони у трубочці, але багато лабораторій проводять кріоконсервацію шкірного ембріона окремо. Цей підхід дозволяє зберегти інформацію про градацію ембріона до заморожування, можливість розморожування певної кількості ембріонів для запобігання багатоплідної вагітності та оцінку виживання ембріона після розморожування. Градація ембріона у кожній трубочці дозволяє вибрати ембріони для перенесення, ґрунтуючись на статистичних показниках окремих лабораторій та на результатах попереднього циклу [44].

Перед початком зниження температури ембріонів, їх середовище повинно бути охолоджене до -5°C - -7°C, щоб ініціювати утворення льоду, за допомогою дотику до трубочки, що містить середовище, металевими щипцями, які попередньо охолоджені в рідкому азоті. Головна мета цих дій полягає в локалізації утворення льоду максимально далеко від місця знаходження ембріонів в трубочці, щоб уникнути сильного переохолодження середовища та розпочати процес дегідратації. Ці заходи необхідні для того, щоб уникнути формування кристалів всередині клітин ембріонів. Якщо "сіяння" утворення льоду не відбудеться, лід буде формуватися по всій трубочці і може переохолодити ембріони, що робить процес дегідратації неможливим.

При поступовому зниженні температури та наступному створенні кристалів льоду, склад некрижаної фракції зазнає змін. Спочатку, кристали льоду утворюються тільки за рахунок молекул води, тому кількість води в фракції зменшується. У цьому процесі, солі та інші речовини не беруть участі в створенні початкових кристалів льоду, що в результаті призводить до збільшення осмотичного тиску. Коли кількість води у фракції зменшується,

ембріони знаходяться в осмотичній рівновазі з зовнішнім середовищем, що в свою чергу призводить до дегідратації клітин ембріонів. За допомогою регулювання швидкості та тривалості втрати води, можна контролювати кількість втраченої води клітинами [41]. Це необхідно для зниження кількості внутрішньоклітинної води з метою забезпечення необхідного рівня води для успішного виживання ембріонів після зберігання в рідкому азоті.

Існують математичні моделі, які можуть передбачити найоптимальніші умови для зниження температури різних видів клітин. Вибір цих умов базується на різних факторах, таких як склад та проникність мембран клітин, обсяг поверхні клітин, чутливість до температури та осмотичний тиск мембран. При дегідратації та регідратації клітин дуже важливо враховувати ці фактори [45].

У процесі кріоконсервації ембріонів, зниження температури зазвичай проводять зі швидкістю 0.3-0.5°C в хвилину, доки не досягнуть температури в діапазоні -30°C -40°C. Після цього, температуру знижують значно швидше, і трубочки з ембріонами переносять в рідкий азот для зберігання. Весь процес повільного заморожування займає близько 2-3 годин. Таким чином, оптимальні умови зниження температури залежать від типу клітин і різних факторів, які слід враховувати для забезпечення успішної кріоконсервації.

Ембріони, які були заморожені повільним методом, потребують спеціального підходу до розморожування. Швидке розморожування використовується з метою уникнення рекристалізації. Ембріони виймають з рідкого азоту і поміщають у водяну баню або залишають на повітрі при кімнатній температурі для повного розморожування. Далі, середовище з ембріонами переносять з трубочок в чашки Петрі та знижують концентрацію кріопротекторів, перед тим, як повністю їх вимити. Після цього, ембріони переміщують в фізіологічне середовище для їх подальшого розвитку. Після кріоконсервації, оцінюють ступінь виживання ембріонів, вважаючи життєздатним ембріон, у якого вижило більше 50% клітин [44].

Для підвищення виживаності ембріонів використовуються різні модифікації методу повільної кріоконсервації. Одна з таких модифікацій - додавання антиоксидантів до середовища. Для повільної кріоконсервації ембріонів людини розроблені комбінації кріопротекторів, наприклад, для стадії пронуклеуса ефективним вважається використання 1.5м пропандіола і 0.1м сахарози. Для заморожування ембріонів на початкових стадіях розвитку використовують пропандіол або диметилсульфоксид. Використання диметилсульфоксида збільшує частоту вагітностей. Кріопротектор етиленгліколь швидко проникає в ембріон і усуває ризик осмотичного шоку. Бластоцисти заморожують в середовищі на основі гліцерину. Також проводилися спроби змінити швидкість зниження температури для підвищення відсотка виживаності бластоцист [46].

Середня вірогідність успішної вагітності після застосування методу повільної кріоконсервації становить 20-30%. Важливо зазначити, що ці цифри можуть бути розглянуті як задовільний результат, оскільки всі ембріони, які були заморожені, належать до категорії менш якісних, так як були відібрані після кращих ембріонів для перенесення в попередньому циклі переносу ембріонів [47].

Хоча кріоконцервація ембріонів людини вже є звичайним методом, який використовується в програмі ЕКЗ, кріоконсервація ооцитів залишається невирішеною проблемою сучасної ембріології. Очищені від клітин cumulus ооцити піддаються кріоконцервації з використанням різних модифікацій цього методу. Після розморожування ооцити запліднюють методом ICSI. У таблиці 1.1 наведені результати кріоконцервації незрілих ооцитів, а у таблиці 1.2 - зрілих ооцитів на основі опублікованих даних різних лабораторій.

Таблиця 1.1

Результати кріоконсервації незрілих (MI) ооцитів у 1.5 М пропандіолі та 0.2 М сахарозі [42]

Повільне охолодження	Швидкість відтаяння	Виживання, %	Дозрівання in vitro, %	Нормальна фертилізація, %
-80°C	8°C в хвилину	15,5%	9%	0%
-30°C	37°C, водяна баня	43,2%	11,9%	0%

Таблиця 1.2

Результати кріокенцервації зрілих ооцитів (МІІ) [42]

	К-сть ооцитів у МІІ	Виживання, %	Нормальна фертилізація, %	Дроблення, %	Формування бластоцистів, %
2М пропандіол та 0,25М сахароза					
З клітинами cumulus	33	54,5%	24%	18,1%	9%
Без клітин cumulus	30	26,6%	6,6%	3,3%	0%
1,5М пропандіол та 0,1М сахароза					
З клітинами cumulus	131	69%	-	-	-
Без клітин cumulus	48	48%	-	-	-

Без клітин cumulus	134	41%	25%	-	-
Без клітин cumulus	16	62,5%	-	-	-
1,5 диметилсульфоксид					
Без клітин cumulus	15	73,3%	33,3%	6,6%	0%
Без клітин cumulus	48	41,6%	14,5%	-	-
Без клітин cumulus	38	36,8%	18,4%	-	-
Без клітин cumulus	13	61,5%	23%	0%	0%
Без клітин cumulus	20	65%	45%	0%	0%

У ембріології було проведено дослідження ефективності методу повільної кріоконсервації ооцитів людини, про що з'явилося декілька публікацій. Перші результати виявлені в 1987 та 1988 роках, коли трьох вагітностей були досягнуті в двох центрах ЕКЗ. У 1996 році була опублікована стаття про розмороження 334 ооцитів, які були заморожені методом повільної кріоконсервації з використанням 1,2-пропандіолу; в результаті, 70 ооцитів

вижили (21%) і з них 25 були перенесені в порожнину матки, що привело до народження трьох дітей, що становить близько 1% успішності враховуючи початкову кількість ооцитів [48]. У 1997 році ще один Центр ЕКЗ повідомив про народження 7 дітей (6 пологів) із запліднених кріоконсервованих ооцитів, що були заморожені з використанням 1,2-пропандіолу з початковою кількістю 753 ооцитів, що дає менше 1% успішності. У 1998 році була опублікована стаття про вагітність трійнею в результаті кріоконсервування ооцитів. Зараз багато центрів ЕКЗ використовують різні модифікації методу повільної кріоконсервації ооцитів для покращення їхньої ефективності [49].

1.6 Метод вітрифікації ембріонів та ооцитів

З метою вдосконалення техніки кріоконсервації було проведено ряд досліджень. У 1985 році було опубліковано першу роботу про спробу вітрифікації ембріонів миші [49]. В 1988 році була продемонстрована ефективність методу вітрифікації на ембріонах миші на стадії 8 бластомерів. Після цього метод вітрифікації було досліджено та застосовано для кріоконсервації ембріонів різних видів ссавців. Далі в 1996 році було показано, що ембріони корови, після їх вітрифікації та розморожування, здатні досягти стадії бластоцисти[50]. У 1997 році була опублікована стаття про успішну вітрифікацію ембріонів корови на ранніх стадіях розвитку. Також слід зазначити, що вітрифікація ембріонів є одним із способів збереження генетичного матеріалу в ембріології та репродуктивній медицині [48].

Ідея збереження біологічних матеріалів шляхом вітрифікації з'явилася ще у 1937 році і належить Лайету [51]. Нині відомо, що деякі рослини, що ростуть в арктичних регіонах, використовують цей метод, як природну форму захисту від низьких температур. Основна ідея вітрифікації полягає у швидкому заморожуванні біологічного матеріалу за допомогою кріопротекторів. Висока концентрація кріопротекторів дозволяє знизити

температуру без утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду. Для створення буферного середовища використовують або сольовий фосфатний буфер, або Hepes-буфер. Протоколи вітрифікації дуже прості і дозволяють переносити ембріони спочатку в середовища з кріопротекторами, а потім безпосередньо в рідкий азот, без використання програмованого морозильного обладнання [38].

Термін "вітрифікація" походить від слова "vitreous", що означає "подібний до скла". Це метод зберігання ембріонів в рідкому азоті, який містить кріопротектори. Він запобігає утворенню кристалів льоду в середовищі ембріонів, як внутрішньоклітинному, так і позаклітинному. Одна з переваг вітрифікації полягає у забезпеченні більшої стабільності середовища. Фізичне визначення вітрифікації - це затвердіння (остекління) середовища з ембріонами, яке відбувається при моментальному замерзанні, що призводить до утворення склоподібної структури за рахунок швидкого підвищення в'язкості. Для досягнення вітрифікації води всередині клітин, необхідне прискорене зниження температури і підвищення концентрації кріопротекторів [43]. Проте використання цього методу може бути важким, оскільки навіть мінімальна концентрація деяких кріопротекторів може бути токсичною для ембріонів і ооцитів.

Найпоширенішими проникаючими кріопротекторами є гліцерин, етиленгліколь, пропіленгліколь і диметилсульфоксид, які мають низькомолекулярну масу. Ці кріопротектори запобігають утворенню кристалів льоду в ембріонах і забезпечують їх збереження при моментальному замерзанні. Фізичне визначення вітрифікації - це затвердіння (остекління) середовища з ембріонами, що відбувається за рахунок швидкого підвищення в'язкості при моментальному замерзанні [38]. Однією з переваг вітрифікації є створення більш стабільного середовища, але використання цього методу може бути складним, оскільки навіть мінімальна концентрація деяких кріопротекторів може бути токсичною для ембріонів і ооцитів.

Непроникаючі кріопротектори, такі як моносахариди і дисахариди, відіграють важливу роль у контролюванні регідратації клітин при розморожуванні та зменшенні потенційно шкідливого впливу "осмотичного шоку". Серед непроникаючих кріопротекторів, найпоширенішим є сахароза. Проте, для досягнення максимальної ефективності заморожування, часто використовують як проникаючі, так і непроникаючі кріопротектори в поєднанні.

Для запобігання токсичності кріопротекторів для ембріонів і ооцитів існують такі способи [41]:

1. Можна замінити гідроксильну групу спирту на аміногрупу, що підвищує його вітрифікабельність. Зокрема, 2-аміно-2-метил-1-пропанол є найбільш підходящим з аміноспіртів для формування склоподібної структури.

2. Збільшення гідростатичного тиску середовища. Цей метод також підвищує температуру остекління, що дозволяє знизити концентрацію кріопротекторів. Наприклад, Тк в 35% -ому розчині ДМСО повинна досягати -80°С, але з підвищенням гідростатичного тиску до 1300 атм це середовище вітріфікується. Проте, підвищення гідростатичного тиску може мати негативний вплив на біологічні системи, такі як ушкодження печінки кролика при знаходженні протягом 20 хвилин в 500 атм. Тому підвищений тиск необхідний лише для вітрифікації, а для зберігання ембріонів і ооцитів в рідкому азоті достатньо атмосферного тиску. Більш ефективним способом зниження концентрації кріопротекторів є використання непроникаючих кріопротекторів, таких як сахароза.

3. Зниження концентрації кріопротекторів. Для цього до розчину кріопротекторів додають полімери, які не можуть проникнути в клітини, але розташовуються в позаклітинному просторі, що допомагає знизити Ск та зменшити токсичний вплив на клітини.

Отже, швидкість зниження температури та ефективність середовища є двома найважливішими параметрами вітрифікації, які взаємодіють один з одним. Необхідний суворий баланс між цими параметрами. Оптимальною швидкістю зниження температури вважається та, при якій майже вся вода виходить з клітин і замерзає позаклітинно. Важливо також знати, що швидке зниження температури може призвести до утворення льоду всередині клітин, що може завдати їм шкоди. Для зменшення цього ризику зазвичай використовують низькі концентрації кріопротекторів, що дозволяють повільніше знижувати температуру.

Таким чином, головною метою процесу вітрифікації є швидкий і безпечний перехід клітини через температурний інтервал від 15°C до -5°C, щоб уникнути можливих пошкоджень клітини.

Під час зберігання ембріонів в рідкому азоті, останній нагрівається та перетворюється у газ, утворюючи парову оболонку навколо клітин ембріонів. Щоб забезпечити наявність рідкого азоту біля ембріонів, використовують мінімальні об'єми крапель, у яких знаходяться ембріони (1-2 мікролітри). Для цього були розроблені різноманітні пристосування, такі як відкриті трубочки Open Pulled Straw (OPS), мікроскопічні мідні решітки, половинки трубочок, нейлонові спіралі та осередки, мікроскопічні петлі, а також соломини з плівкою на кінці Cryotop. Краплю, яка містить ембріони, переносять на обране пристосування та відразу ж опускають у рідкий азот. Використання розроблених пристосувань дозволило успішно застосувати метод вітрифікації на різних стадіях розвитку ембріонів тварин, таких як корови та миші, а також на людських ембріонах на стадії бластоцисти та триденних ембріонах [52]. Результати досліджень свідчать про настання вагітностей після вітрифікації ембріонів. У одному з досліджень зиготи людини з одним та трьома пронуклеусами були піддані вітрифікації та наступному розморожуванню. Виживаність вітріфікованих зигот склала 87.5%, а після розморожування на день 2 частка дроблення склала 77%, порівняно з 85% у контрольній групі [53].

Опубліковані дослідження демонструють успішність вітрифікації різних типів ембріонів та зигот, що ставить цей метод високо в списку кріоконсерваційних технік. В результаті цього дослідження можна зробити висновок, що метод вітрифікації є ефективним для кріоконсервації зигот людини з одним і трьома пронуклеусами. Виживаність вітріфікованих зигот була висока, що може пояснюватися затвердінням мембрани зиготи в результаті мембранних змін, що відбуваються під час і після запліднення. Однак, частка дроблення цих зигот після розморожування на день 2 була нижчою порівняно з контролем, що може вказувати на те, що кріоконсервація може впливати на дальший розвиток ембріонів.

Цей метод вітрифікації також успішно застосовувався на ембріонах корови, миші та людини на різних стадіях розвитку. Розроблені різні пристосування для вітрифікації, такі як відкриті трубочки, мікроскопічні мідні решітки, половинки трубочок, нейлонові спіралі і осередки, мікроскопічні петлі, а також соломини з плівкою на кінці, що дозволяють зберігати ембріони в мінімальні обсяги крапель рідкого азоту, що забезпечує належні умови для їх збереження [54].

Ці дослідження відкривають широкі можливості для збереження та використання генетичного матеріалу людини та тварин у майбутньому.

Під час розморожування ембріонів, які були збережені в рідкому азоті, було встановлено, що їх здатність до виживання залежить від швидкості перенесення ембріонів в середовище, яке має температуру 37°C. Швидкість підвищення температури була зафіксована на рівні 233°C за 3 секунди, що дозволило досягти необхідної температури від -196°C до 37°C [28].

Досить часто для вітрифікації ембріонів використовують етиленгліколь як кріопротектор. Останнім часом велика увага приділяється розробці середовищ, які містять етиленгліколь. Наукові дослідження показали, що токсичність етиленгліколю слабко впливає на ембріони та бластоцисти миші,

а також, що етиленгліколь швидко проникає через блискучу оболонку і клітинну мембрану. Використання вітрифікації ембріонів, які були піддані процедурі з еквімолярним поєднанням етиленгліколю і диметилсульфоксиду, дозволило розвивати нормальні вагітності у тварин [55]. Зараз такі середовища з еквімолярним поєднанням етиленгліколю і диметилсульфоксиду є основними при використанні вітрифікації ембріонів.

Для досягнення оптимальних результатів при вітрифікації ембріонів важливо обирати правильний склад середовища, який можна оптимізувати шляхом додавання різних цукрів, таких як сахароза, глюкоза, фруктоза, сорбіт, трегалоза або рафіноза. Однак, необхідно звернути увагу на те, що додавання цукрів може впливати на властивості середовища, тому їх необхідно підбирати оптимальним чином [56]. Сахароза та трегалоза, які мають велику молекулярну вагу, не проникають через клітинну мембрану, але здатні знижувати концентрацію кріопротекторів, тому їх присутність в середовищі може зменшити токсичність кріопротекторів. Крім того, цукри забезпечують витіснення води з клітин, що знижує час проведення вітрифікації, а отже зберігає ембріони від можливих токсинів. Сахароза також може служити як осмотичний буфер під час розморожування вітрифікованих ембріонів, що зменшує вплив осмотичного шоку під час розведення кріопротекторів [57].

В клітинах міститься значна кількість білків, що допомагає в процесі вітрифікації. Але для позаклітинної вітрифікації необхідно підвищити концентрацію кріопротекторів. Для зниження цієї концентрації до рівня, який є достатнім як для внутрішньо-, так і для позаклітинної вітрифікації, використовують полімери з великою молекулярною масою, такі як полівінілпіролідон, поліетиленгліколь або фікол. Дослідження показали, що за певних умов полімер може знизити концентрацію кріопротекторів (Ск) в середньому на 7%, а іноді й на 24% в комбінації з підвищеним гідростатичним тиском.

Для проведення вітрифікації в середовище можна додавати макромолекули, що можуть зменшити механічний стрес та запобігти пошкодженню ембріонів. Ці полімери можуть створювати в'язку матрицю, що утворює капсулу навколо ембріонів та запобігає їх кристалізації. У деяких дослідженнях виявлено, що додавання поліетиленгліколю в середовище вітрифікації підвищує виживаність ембріонів [58]. У інших дослідженнях досліджували вплив полівінілпіролідону, фікола та декстрану на середовище вітрифікації, основане на етиленгліколі [59]; в результаті виявлено, що фікол та декстран майже не впливають на процес остекління середовища, в той час як присутність полівінілпіролідону призводить до зростання температури остекління.

Щоб уникнути токсичності кріопротекторів, можна скористатись комбінацією двох кріопротекторів в середовищі, яке зберігається при кімнатній температурі замість 37°C, оскільки підвищення температури підвищує їх токсичність.

Останнім часом було розроблено нове обладнання, яке називається Вітмастер (Vitmaster), яке може знижувати температуру рідкого азоту з -196°C до -205°C або -208°C. Це обладнання дозволяє прискорити процес заморожування, і вже було успішно використано для вітрифікації ооцитів у корів, вівці та людини [60].

В методі вітрифікації, який був описаний у середині 1990-х років, використовується поляризація та видалення цитоплазматичних ліпідів. Дослідження на ембріонах свині показали, що видалення цих ліпідів знижує чутливість ембріонів до зниження температури і пошкоджень [61]. Дослідження на рослинах, ціанобактеріях та сперматозоїдах показали, що склад ліпідів у мембрані впливає на сприйнятливість до охолодження. Дослідження з використанням ооцитів свині на стадії зародкового пухирця показали, що деліпідування допомагає запобігти негативному ефекту охолоджених внутрішньоклітинних ліпідів, і не має негативного впливу на

розвиток ооцитів та ембріонів [62]. Однак, внутрішньоклітинні ліпіди є джерелом енергії та матеріалом для клітинних мембран майбутніх ембріонів, тому успішна вітрифікація після деліпідування піднімає питання про зміни фізико-хімічних властивостей ліпідів цитоплазматичних мембран при низьких температурах та можливе порушення зв'язку "ендоплазматична мережа-глобули ліпідів - мітохондрія" в процесі кріоконсервації.

Показники виживаності ооцитів і частота настання вагітностей значно нижчі при кріоконсервації ембріонів, що може пояснюватися декількома факторами [63]. По-перше, мембрани ооцитів володіють зниженою прохідністю, що ускладнює процес проникнення кріопротекторів. По-друге, ооцити чутливі до осмотичного розбухання, яке відбувається при видаленні кріопротекторів. Дослідження показали, що прискорення зниження температури може підвищити успішність вітрифікації ооцитів. Крім того, найбільш високий ступінь виживаності мають незрілі ооцити на стадії статевого бульбашки (Germinal Vesicle, GV), які містять ядро. Однак у такому випадку важливо завершити дозрівання ооцитів in vitro для досягнення успішного виконання ICSI. Нова необхідна інформація полягає в тому, що прискорення зниження температури може підвищити успішність вітрифікації ооцитів.

Існує проблема контамінації бактеріями або вірусами в процесі вітрифікації ембріонів, оскільки при цьому використовується рідкий азот, який знаходиться в прямому контакті з ембріонами[64]. Щоб уникнути такої контамінації, рекомендується використовувати пристрої вітрифікації з ковпачками, такі як соломки з плівкою на кінці або cryotop. Також необхідно попередньо перевіряти пацієнтів на всі можливі інфекційні захворювання і завжди використовувати чистий рідкий азот.

В результаті досліджень, які були проведені на ооцитах і ембріонах миші, виявлено, що кріоконсервація ооцитів може спричинити порушення мейотичного веретена поділу, що може збільшити ризик виникнення

анеуплодії [65]. Більшість досліджень по охолодженню ооцитів ссавців показали негативний вплив кріоконсервації на елементи цитоскелету, зокрема на деполімеризацію білка структур цитоскелету, таких як мікрофіламенти і мікротрубочки.

Дослідники припускають, що охолодження ооцитів миші може спричинити деполімеризацію мікротрубочок веретена поділу, що призведе до аномальної структури клітинного скелету [66]. На жаль, після охолодження до 4°C через 20 хвилин веретено поділу ооцитів миші повністю дезінтегрувалося. Проте деполімеризація мікротрубочок веретена поділу є оборотним процесом, тому після зігрівання ооцитів миші до 37°C через 60 хвилин веретено поділу в ооцитах знову набуло впорядкованої структури.

Дослідження показали, що близько 50% ооцитів людини, які були охолоджені до кімнатної температури і залишені в ній на 10 хвилин, мали нормальну морфологію після 4-х годин інкубації при + 37 ° C [65]. Негативний ефект охолодження може бути пов'язаний з деполімеризацією мікротрубочок і мікрофіламентів ооцитів. На основі проведених досліджень встановлено, що ооцити (зародкові клітини) корови демонструють чутливість до зниження температури. Конкретно, з'ясовано, що при зниженні температури до +25°C структура веретена поділу у 56% ооцитів корови була аномальною, а при зниженні температури до +4°C через 1 хвилину - у 90%. Дані результати свідчать про те, що зниження температури може негативно вплинути на розвиток зародка корови.

Отже, кріоконсервація ооцитів вимагає контролю швидкості зниження температури, щоб запобігти утворенню кристалів льоду та забезпечити необхідну концентрацію кріопротекторів. Кріопротектори повинні бути також недостатньо токсичними. Кріоконсервація також має на меті запобігання зміни фізико-хімічних властивостей охолоджених ліпідів та пошкодженню

глобул ліпідів мембран. Важливо зберігати зв'язок ендоплазматичної сітки з ліпідами при охолодженні, а також забезпечити збереження або можливість реполімерізації мікротрубочок веретена поділу [67].

У 1999 та 2000 роках в Центрах екстракорпорального запліднення народилися діти, які були запліднені розмороженими верифікованими ооцитами[68]. З тих пір проводяться численні дослідження з метою оптимізації методу вітрифікації, оскільки цей метод має велике значення для розвитку репродуктивної медицини, тваринництва та біомедичних технологій. Використання методу вітрифікації ооцитів та ембріонів дозволяє знизити вартість кріоконсервації, оскільки не потрібно використовувати дороге морозильне обладнання. Крім того, при вітрифікації збільшується кількість життєздатних ембріонів, зменшується кількість використаного рідкого азоту, а швидкість проведення процесу вітрифікації ооцитів та ембріонів значно вища, ніж при повільній кріоконсервації. Це робить метод вітрифікації особливо корисним для лабораторій ембріології, які займаються дослідженнями та застосуванням різних методів кріоконсервації.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Отримання ембріонів щурів

У всіх проведених роботах використовували культуральні середовища: фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко ("Eurobio", Франція), середовища DME M і DMEM/Hepes ("Flow",Англія) та середовище Ham F-10 ("Sigma ", США). Як білкові добавки використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA, "Gibco", США), фітальну коров'ю сироватку (FCS, "Flow", Англія).

У роботі використовували щури аутбредних лінії "Wistar", Sprague-Dawley, та спонтанно-гіпертензивні щури SHR. Самок підсажували з самцями протягом ночі, а потім перевіряли їх наявність копуляційних пробок вранці. День виявлення пробки вважали першим днем вагітності. Ембріони різних стадій розвитку вилучали шляхом промивання яйцеводів або матки фосфатно-сольовим буфером Дюльбекко з додаванням 20% FCS.

Фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко - це буферна система, яка часто використовується в біологічних дослідженнях для підтримки клітинних культур в умовах in vitro [69]. Цей буфер містить різні солі, в тому числі натрій-фосфат, калій-фосфат та натрій-хлорид, і має стандартний рівень pH у діапазоні 7,2-7,6. Фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко є ізотонічним сольовим розчином, що допомагає зберегти фізіологічну та структурну цілісність клітин in vitro. Крім того, цей буфер може використовуватися для миття клітин та тканин. Важливо зазначити, що Фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко є стабільним і нешкідливим для клітин, тому він є популярним вибором для багатьох дослідників в галузі клітинної біології та молекулярної біології. Цей буфер є важливим інструментом для дослідження клітинних процесів та розвитку лікарських препаратів.

2.2 Оцінка якості ембріонів щурів

Для оцінки якості ембріонів мишей, було використано п'ятибальну шкалу та наступні критерії. "Відмінний" ембріон - це сферичний ембріон з клітинами однакового розміру, кольору і щільності. "Хороший" ембріон - це практично сферичний ембріон з незначною вакуолізацією та наявністю одного або декількох виштовхнутих бластомерів. "Задовільний" ембріон - це дещо порушена сферичність, наявність однієї або кількох дегенерованих клітин та часткова вакуолізація. "Поганий" ембріон має деформовану зону пелюціда, багато виштовхнутих бластомерів, дегенерованих клітин та велику вакуолізацію. "Дуже поганий" ембріон - це яйцеклітини або повністю деградовані ембріони. У даній роботі були використані тільки ембріони, оцінені як "відмінні", "хороші" або "задовільні". Для проведення оцінки якості ембріонів щурів використовувався мікроскоп Nikon / Fryer Co.

В ході нашого дослідження ми складали три групи ембріонів з різними методами заморожування та розморожування. Перша група містила ембріони, які були заморожені методом повільної кріоконсервації та були досліджені на 5 та 6 день розвитку. Друга група містила ембріони, які були заморожені на 5 та 6 день методом вітрифікації, а дані цієї групи використовувались для порівняння з модифікованим методом вітрифікації.

Також ми проводили дослідження на ембріонах, які не були заморожені, але мали живі клітини на 6 день розвитку. Ці ембріони використовувалися для дослідження оптимального протікання методу вітрифікації.

Третя група містила ембріони, які були вітрифіковані та розморожені з використанням модифікованих методів, запропонованих у нашій лабораторії.

За день до отримання ембріонів, було приготовано всі необхідні середовища для досягнення їх необхідної еквілібрації в інкубаторах за наявності 5.5% CO2 в повітрі при температурі 37°C та вологості 91-93% [59].

Крім того, всі середовища, що використовуються для ембріонів, були покриті еквіліброваним мінеральним маслом від фірми Sage.

2.3 Гіпотермічне зберігання та культивування ембріонів in vitro щурів

Ембріони зберігали та культивували у скляних капілярах. Для зберігання використовували різні культуральні середовища та газові суміші. В один капіляр поміщали по 5-8 зародків. Закритий пеніциліновий флакон із капілярами під шаром парафінової олії опускали в посудину з дистильованою водою. Для гіпотермічного зберігання посудину поміщали у побутовий холодильник при температурі 4°C на 24 години. Вимірювали швидкість зниження температури до 4°C у флаконі (0,1°C/хв) з водою та без води (1°C/хв). Після цього ембріони культивували термостаті при 37°C. Розвиненими вважали тільки ембріони, що досягли пізньої стадії.

2.4 Класифікація та градація бластоцист

В ході роботи у лабораторії була використана класифікація бластоцистів на 5-му дні, яка містить наступні три класи:

Клас А: включає бластоцисти зі збільшеним обсягом (200-230 мкм) в порівнянні з об'ємом ембріона на стадії морули, в яких ембріобласт складається з 30% всіх клітин бластоциста (від загального кількості клітин 80-160), а інші клітини формують трофобласт.

Клас В: включає бластоцисти зі збільшеним повним обсягом в порівнянні з початковою стадією формування порожнини в морулі; або морула з гладкою структурою (менше 5% фрагментації).

Клас С: включає морули з фрагментацією більше 5% або ембріони, які все ще знаходяться на стадії 6-12 клітин.

Для аналізу розвитку бластоцистів на 6-му дні використовували класифікацію, яка містить такі класи:

Клас B: охоплює бластоцисти зі збільшеним обсягом (200-230 мкм) в порівнянні з об'ємом ембріона на стадії морули, у яких ембріобласт складається з 30% всіх клітин бластоциста (від загального кількості клітин 80-160), а інші клітини формують трофобласт.

Клас C: охоплює бластоцисти зі збільшеним повним обсягом в порівнянні з початковою стадією формування порожнини в морулі; або морула з гладкою структурою (менше 5% фрагментації).

Із заморожених бластоцист була проведена градація залежно від дня заморожування та частки виживання, що представлена такою класифікацією:

Клас A: бластоцист, що була заморожена на 5-ий день і мала більш ніж 90% виживання.

Клас B: бластоцист, що була заморожена на 5-ий день і мала виживання на рівні 70-90%; або бластоцист, заморожена на 6-ий день і мала більш ніж 90% виживання.

Клас C: бластоцист, що була заморожена на 5-ий день і мала виживання на рівні 50-70%; або бластоцист, що була заморожена на 6-ий день і мала виживання на рівні 70-90%.

2.5 Метод повільного заморожування

Дотримуючись стандартних протоколів [60], було використано метод повільної кріоконсервації бластоцист. Для заморожування бластоцистів на день 5 та день 6 були використані середовища на основі HTF-Hepes-буферу, який є важливим для забезпечення необхідних умов для виживання ембріонів та імітації середовища маткових труб. У таблиці 2.1 наведені склади середовищ заморожування 1, 2, 3 та середовищ розморожування 4, 5.

Таблиця 2.1

Склад середовищ, що використовувався для повільної кріоконцервації та розморожування бластоцист

Середовища	Вміст гліцерину	Вміст сахарози
1	0%	0
2	5%	0
3	9%	0,2М
4	0%	0,5М
5	0%	0,2М

Усі середовища було застосовано при температурі 37°С, які були попередньо підігріті на підігрівному столику. Для заморожування бластоцистів їх переносили мікропіпетками з діаметром кінчика 250 мкм по черзі в середовища 1, 2, 3, і залишали на 10 хвилин у кожному на чашці X-plates Falcon 1009 (Фірми Mid Atlantic Diagnostics) при кімнатній температурі. Ембріони з середовища 3 набирали у трубочки для заморожування об'ємом 1/4 мл (фірми TS Scientific) і поміщали в програмований морозильник Planner Cryo (фірми TS Scientific), де температура знижувалася до -7°С зі швидкістю 2°С в хвилину. Після досягнення -7°С, проводили "сіяння", і температура залишалася -7°С протягом 3 хвилин. Температура далі знижувалася до -30°С зі швидкістю 0.3°С в хвилину, після чого швидкість зниження температури збільшувалася до 50°С в хвилину, і трубочки з ембріонами (1-2 ембріона в кожній трубочці) переносили в рідкий азот для зберігання. При перенесенні в середовища як при заморожуванні, так і при розморожуванні ембріони піддавались ретельному відмиванню від попереднього середовища.

Під час процесу розморожування ембріонів, їх трубочки були зняті з рідкого азоту та поміщені горизонтально при кімнатній температурі на 1-2 хвилини до повного розморожування. Ембріони були перенесені з трубочок до

чашок X-plates Falcon 1009, і послідовно поміщені під мікроскопом в середовища 4 та 5, на періоди по 10 хвилин кожне при кімнатній температурі. Після етапу середовища 5, бластоцисти були переміщені в середовище для росту, і їх виживаність була оцінена під мікроскопом Nikon/Fryer Co. В якості вижившх ембріонів рахували ті, у яких збереглось більше 50% клітин.

2.6 Метод вітрифікації

HTF-Hepes-буфер використовували для створення середовищ вітрифікації. Для заморожування використовувалися 2 різні середовища: середовище врівноваження (1) і середовище вітрифікації (2). Для розморожування використовували 3-тє середовище, а для розведення - 4-тє середовище. 5-тє середовище використовували для промивання на всіх етапах розвитку ембріона (від дня 1 до дня 6), ці дані можна знайти в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Склад середовищ вітрифікації

	Вміст ЕГ	Вміст ДМСО	Вміст сахарози
1 середовище еквілібрації	7,5%	7,5%	0
2 середовище вітрифікації	15%	15%	0,5М
3 середовище розморожування	0%	0%	1М
4 середовище розведення	0%	0%	0,5М
5 середовище промивання	0%	0%	0

Для виконання процедури вітрифікації ембріони спочатку були очищені від мінерального масла в середовищі зростання. Потім їх переносили в чашки Falcon 3002, де відбувалося підвищення концентрації кріопротекторів шляхом додавання рівної кількості середовища 1. Реакція ембріонів спостерігалася протягом 1-2 хвилин, під час якої відбувалося їх стиснення та наступне збільшення обсягу. Після збільшення обсягу ембріонів знову додавали таку ж кількість середовища 1 та продовжували спостереження за реакцією. Наступним кроком було перенесення ембріонів в чисту краплю середовища 1, де вони залишалися оточеними попереднім середовищем і очікували завершення реакції стиснення ембріонів та збільшення їх обсягу (3-5 хвилин). Після цього ембріони були ретельно промиті піпеткою середовищем 2 і перенесені в це саме середовище, де відбулося миттєве стиснення. Після 1-хвилинного промивання в середовищі 2, ембріони були перенесені на кінець плівки соломини cryotop (фірми Kitazato) і одразу ж занурені в рідкий азот. Ковпачок був надітий на плівку з ембріонами, не виймаючи трубочку з рідкого азоту.

Для розмороження вітріфікованих ембріонів, перед початком процедури, середовище 3 поміщали в щільно закриту пробірку та ставили в інкубатор на 1-2 години. При кімнатній температурі використовували середовища 3, 4, та 5. Далі, із інкубатора брали середовище 3 (при 37°C), та поміщали в чашку Falcon 3037 на предметний столик мікроскопа. Під рідким азотом знімали ковпачок з трубочки та швидко опускали кінець плівки з ембріоном в середовище 3 при 37°C. Далі, ембріони переносили в середовище 3 при кімнатній температурі в чашці Falcon 3002 та знижували концентрацію кріопротекторів шляхом додавання рівної кількості середовища 4. Відбувалася реакція збільшення обсягу ембріонів з подальшим їх стисненням. При стиску знову додавали таку ж кількість середовища 4. Після цього ембріони переносили в чисте середовище 4 та чекали тієї ж реакції, потім знову знижували концентрації кріопротекторів з додаванням рівної кількості

середовища 5 та чекали завершення реакції, тобто відновлення початкового об'єму ембріонів. Далі, ембріони 2 рази промивали в середовищі 5, переносили в середовище зростання та оцінювали їхню здатність до виживання аналогічним способом, як при методі повільної кріоконсервації.

2.7 Групи жінок у циклах екстракорпорального запліднення

За виконання цього дослідження було обстежено 134 пацієнтки, 327 ембріонів у програмі ЕКО та ПЕ. У цих пацієнток були такі порушення як ендометріоз, СПКЯ, непрохідність фалопієвих труб, гормональні та імунні порушення, вікові фактори. Крім того, у частини жінок причиною безпліддя було порушення чоловічої репродуктивної функції у партнерів у шлюбі, що пояснювало наявність показань для виконання ІКСІ, наприклад, оліго-, астено-, терато-, або азооспермії у чоловіків пацієнток. У деяких пацієнток виявлено порушення в блискучій оболонці ооцитів, що дозволяють пропускати більше одного сперматозоїда в ооцит (тобто не запобігають поліспермію за допомогою кортикальної реакції) при природному заплідненні. Було проведено низку клінічних досліджень, і всі пацієнтки були поділені на 3 групи.

Перша група складена з 51 пацієнтки із середнім віком 35.5 років, з кількістю обстежених ембріонів 147. Вони пройшли програму ЕКЗ і ПЕ з повільною кріоконсервацією бластоцист, що залишилися після ПЕ на день 5 і день 6, з розморожуванням їх для ПЕ на день 5 у циклі.

У 2-гу групу увійшли 35 пацієнток із середнім віком 35.6 років, кількістю ембріонів 77. Ці пацієнтки пройшли програму ЕКЗ і ПЕ з заморожуванням залишилися після ПЕ бластоцист на день 5 і на день 6 методом вітрифікації з їх розморожуванням і перенесенням у порожнину матки циклі.

3-я група (контрольна) представлена 48 пацієнтками програми ЕКЗ та ПЕ із середнім віком 35.9 років та з перенесенням бластоцист та морул (тобто тільки ембріонів класу А та В) на день 5 розвитку. Оцінено 103 ембріони.

2.8 Програма екстракорпорального запліднення та перенесення ембріонів людини

При гормональній стимуляції суперовуляції пацієнток у програмі ЕКЗ та ПЕ використовували різні комбінації препаратів. Для пацієнток з віком 33 років та молодших після овуляції застосовували Lupron (фірми Esurge) 225 одиниць один раз на день (або 300 одиниць, залежно від перебігу стимуляції). Для пацієнток старше 33 років стимуляцію суперовуляції проводили двома способами: або з використанням Lupron після овуляції 225 одиниць двічі на день протягом 10 днів; або із застосуванням таблеток препаратів естрогену (фірми Freedom Drug) протягом 4-х тижнів та 225 одиниць мікро-Lupron або Antigon (фірми Organon) після овуляції 225 одиниць двічі на день протягом 10 днів. У процесі стимуляції суперовуляції проводили гормональний та УЗ-моніторинг пацієнток.

При розмірі фолікулів 17-20 млм та (або) при показнику Е2=1600-1800 пг/мл, вводили хоріонічний гонадотропін (ХГ) Profaci (фірми Serono), і через 36 годин проводили трансвагінальну пункцію яєчників (ТВП) за допомогою голок Asch Needle (фірми Cook, Obgyn). Приготування всіх середовищ проводили за день до ТВП для досягнення необхідної еквілібрації в інкубаторах в присутності 5.5% CO2 в повітрі при температурі 37°С і вологості 91-93%. Під час аспірації фолікулів використовували середовище з гепарином nTF-Hepes-буфер (фірми Sage). При низькій кількості фолікулів промивали кожен фолікул 2-3 рази для збирання всіх ооцитів без втрат. Ооцити ідентифікували під мікроскопом фірми Nikon/Fryer Co., відмивали їх серед аспірації Asp media (фірми Vitrolife) у чашках Falcon 3002 (фірми Mid Atlantic

Diagnostics). За допомогою пастерівських піпеток (фірми Fisher) ооцити переносили до чашок Falcon 3037 (фірми Mid Atlantic Diagnostics), що містять середовище для запліднення G-Fert (фірми Vitrolife). Усі середовища, що використовуються для ооцитів та ембріонів, покривали шаром еквіліброваної мінеральної олії (фірми Sage).

Аналіз еякуляту проводили за стандартною методикою ВООЗ[70]. Еякулят центрифугували в градієнті Перколла з використанням 45% і 90% Перколла (фірми Conception Technologies), або застосовували метод swim up, або просто промивали середовищем G-Fert при низьких показниках еякуляту. У тих випадках, коли еякулят мав нормальні параметри, такі як концентрація сперматозоїдів: 20 і більше млн/мл, рухливість: 40% і більше, частота проникнення сперматозоїдів до ооциту становила 25% і більше, а також частка нормальної морфології сперматозоїдів: 15% норм , і більше, проводили просте запліднення. Еякулят додавали в чашки, що містять ооцити в середовищі G-Fert, для 50-100 тис. на 1 мл середовища. Запліднення ооцитів проводили через 4-6 годин після ТВП.

За наявності медичних показань для проведення ІКСІ з метою видалення клітин cumulus oophorus використовували фермент гіалуронідазу та полімер ПВП (фірми Medicult) для відбору сперматозоїдів. ІКСІ проводили за стандартною застосовуваною методикою за допомогою інвертованого мікроскопа фірми Nikon/Fryer[71]. з оптикою Намарського, що має стійки для мікроманіпуляторів і столик, що підігрівається. Для виконання ІКСІ використовували 2 ін'єктори: присоска зліва, holding pipet, (фірми Humagen), контрольована подачею мінерального масла Sage, необхідна для утримання ооциту в потрібному положенні (полярне тільце в положенні 7 або 11 годин), і мікроголка, ICSI pipet, Humagen), контрольована газом NO2. У центрі чашки ІКСІ Falcon 1009 (фірми Mid Atlantic Diagnostics) поміщали краплю ПВП зі сперматозоїдами, а навколо неї пронумеровані краплі з ооцитом в кожній з них в середовищі для мікроманіпуляції G-Mops (фірми Vitrolife). Сперматозоїд

знерухомлювали за допомогою мікроголки засмоктували в мікроголку з боку хвоста і здійснювали активацію цитоплазми ооциту та ін'єкцію сперматозоїда в ооцит.

Через 16-18 годин після запліднення оцінювали результати. При звичайному заплідненні очищення від клітин cumulus oophorus проводили за допомогою мікропіпеток діаметром кінчика 150 мкм (фірми Mid Atlantic Diagnostics). Ембріони, що містять 2 пронуклеуси, відмивали від сперматозоїдів і переносили в чашки Falcon 3037 з середовищем для росту G1 (фірми Vitrolife). Для встановлення результатів ІКСІ ембріони з 2 пронуклеусами, вже позбавлені клітин cumulus oophorus, також переносили в середу G1. При малій кількості ембріонів у пацієнтки (від 1-го до 4-х) ПЕ зазвичай проводили на 2-й або 3-й дні. В основному, якщо було отримано велику кількість ембріонів, на третій день ембріони, що містять 6 і більше клітин, переносили в середовище росту G2 (фірми Vitrolife) за допомогою мікропіпеток з діаметром кінчика 200 мкм (фірми Mid Atlantic Diagnostics). ПЕ здійснювали на день 5 (група 3) з вибором кращих 2-3 бластоцистів (клас А) або морул (клас В).

Перед ПЕ проводили мікроманіпуляційний хетчінг (assisted hatching) для пацієнток з ІКСІ, пацієнток з віковим фактором, пацієнток, які мали 3 і більше невдалих спроб ЕКЗ та ПЕ, а також за низьких морфологічних показників ембріонів. З цією метою вибрані для ПЕ ембріони поміщали в краплю середовища G-Mops, покриту мінеральною олією в чашці Falcon 1009. а за допомогою голки, PZD pipet, (фірми numagen) проколювали zona pellucida в положенні від 2 до 10 годин; звільняли ембріон від присоски і робили розріз проколотого ділянки ембріона за рахунок його тертя про гострий кут присоски.

Для проведення ПЕ використовували середовище SSS (фірми Irvine Scientific), в яке ембріони переносили безпосередньо перед ПЕ, набирали їх катетером Wallace (фірми Irvine Scientific) за стандартною методикою і

поміщали в порожнину матки через цервікальний канал. Потім катетер промивали середовищем для зростання, щоб переконатися, що всі ембріони були перенесені. Бластоцисти, що залишилися на день 5 і на день 6, піддавали кріоконсервації методом повільного заморожування (група 1), а також методом вітрифікації (група 2) для використання їх пацієнтами в наступних кріо циклах.

Підготовку пацієнток до кріо циклів проводили декількома методами. Для молодих пацієнток із нормальним проходженням овуляції використовували природний цикл із щоденною перевіркою рівня ЛГ; при зростанні ЛГ у 2 рази вводили Profaci і день через 36 годин вважали днем овуляції. Для молодих пацієнток з аномальним проходженням овуляції у циклі підготовки використовували 150 одиниць ФСГ щодня. Для пацієнток з віковим фактором, а також з аномальним перебігом овуляції проводили так званий цикл заміни гормону (hormone replacement cycle) з використанням таблеток препаратів естрогену та Lupron після овуляції (225 одиниць на день протягом 10 днів). Порівнювали частоту настання вагітностей залежно від способу підготовки пацієнток до кріоциклів.

2.9 Статистичні методи обробки та аналізу отриманих результатів

У даній роботі було проведено статистичну обробку, використовуючи метод оцінки різниці генеральних часток, виражених у відсотках. Для оцінки різниці часток було використано фактичний t-критерій Стьюдента та порівняно його значення з критичним значенням для окремої вибірки.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Порівняння методів повільного заморожування та вітрифікації у роботі з ембріонами щурів

Метод кріоконсервації дозволяє зберігати ембріони в рідкому азоті при температурі -196°C з метою їх подальшого використання. Однак, використання цього методу може спричинити пошкодження клітин та зменшення їх виживання при наступних кріоциклах, оскільки ембріони з кращою морфологією зазвичай використовуються у попередніх циклах, а ембріони другого сорту піддаються заморожуванню.

У даній науковій роботі було проведено порівняння двох різних методів кріоконсервації - методу повільного заморожування (група 1) і методу вітрифікації (група 2). Група 2 була використана як контрольна для порівняння з групою 3 під час удосконалення методу вітрифікації.

У групі 1, частота виживання бластоцист при повільній кріоконсервації становила 86,4%, тоді як у групі 2, всі бластоцисти вижили (100%) при застосуванні вітрифікації.

Таблиця 3.1

Градація ембріонів в групах 1, 2

	Група 1		**Група 2**	
	До повільного заморожування	Після повільного заморожування	До вітрифікації	Після вітрифікації
Кількість ембріонів класу А	40% (6/15)	33,3%* (5/15)	53,3% (8/15)	46,7% (7/15)

Кількість ембріонів класу B	60% (9/15)	60%* (9/15)	46,7% (7/15)	53,3% (8/15)
Кількість ембріонів класу C		6,7% (1/15)		

*$p \leq 0,05$ – різниця достовірна у порівнянні з контрольною групою

Після аналізу таблиці 3.1, було відзначено, що всі бластоцисти груп 1 і 2 були класифіковані як клас A і B відповідно під час заморожування. Причину, яка пояснює перенесення деяких бластоцистів групи 1 у клас C можливо пов'язати з низькою частотою виживання. Крім того, після розморожування, спостерігалося зменшення градації з класу A на клас B в групі 1 на 20% (3/15), що є значно вищим, ніж в групі 2, де цей показник склав лише 6,6% (1/15). Таке зниження градації можна пояснити тим, що ембріони під час кріоконсервації стикаються з додатковим стресом від кріопротекторів і змін температури, що може впливати на їх життєздатність.

Завдяки високій частоті виживання (100%) вітрифікованих бластоцистів, можна використовувати лише необхідну кількість заморожених ембріонів для розморожування в даний момент часу. Планування наступних кріоциклів залежатиме від кількості доступних заморожених ембріонів і базуватиметься на результатах попередніх циклів та на градації вітрифікованих ембріонів.

Таким чином, застосування лише методу вітрифікації для кріоконсервації ооцитів та ембріонів, може призвести до підвищення виживаності ембріонів та збереження їх градації на високому рівні.

3.2 Розробка модифікації методу вітрифікації

У ході нашого дослідження, після оцінки частоти виживання ембріонів щурів, ми встановили необхідність внесення деяких змін у метод вітрифікації. Визначення частоти виживання ембріонів передбачає, що ембріон вважається вижившим, якщо більше половини його клітин збереглися після розморожування [73], оскільки кількість клітин є важливою характеристикою ранніх зародків і використовується для оцінки їх стану при проведенні ембріотехнологічних робіт, таких як кріоконсервація, культивування та мікроманіпуляції. Зменшення кількості клітин в ембріоні через їх втрату при кріоконсервації може призвести до зниження життєздатності зародків. Тому, кількість клітин після розморожування може служити критерієм ефективності кріозбереження. В рамках нашої роботи ми провели метод вітрифікації в Групі 2, після чого всі бластоцисти вижили. Але, при розморожуванні кожного ембріона ми оцінювали виживання окремо, результати яких представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Виживаність клітин бластоцист у 2 групі (вітрифікації)

Відсоток вижившихбластомерів бластоцисти	Кількість бластоцист
100%	6
95%	5
90%	4

Для розробки модифікації методу вітрифікації було проведено дослідження на 15 ембріонах, що мали від 8 до 10 клітин на день 6. Клітини ембріонів не дегенерували, тому їх можна використовувати для оцінки ефективності методу вітрифікації. Основна увага була приділена зменшенню

токсичності кріопротекторів. Всі середовища для вітрифікації готувалися в лабораторії з точністю дотримання концентрацій додаваних кріопротекторів.

Ми розробили певні етапи технології вітрифікації та надали наступні рекомендації для їх виконання:

1. Середовища, що використовуються для вітрифікації та розморожування з високим вмістом кріопротекторів, можуть випаровуватися при кімнатній температурі, а також можуть збільшувати токсичність при перегріванні мікроскопа. Тому для успішного процесу вітрифікації необхідно дочекатися охолодження мікроскопа перед початком процедури, а також охолоджувати кожух лампи мікроскопа, застосовуючи лід у пластикових пакетиках, щоб уникнути перегріву мікроскопа та досліджуваного зразка;

2. Під час вітрифікації та розморожування ембріона, необхідно постійно контролювати його реакцію в середовищах еквілібрації та розведення відповідно. Це допоможе не пропустити момент переходу до наступного етапу. Якщо ембріон перестає реагувати на зміну концентрації кріопротекторів, слід негайно переходити до наступного етапу, щоб прискорити процес та захистити ембріон від зайвого контакту з кріопротекторами;

3. Рекомендується дотримуватися часу від 40 секунд до 1 хвилини для промивання ембріона в середовищі вітрифікації, оскільки з емпіричних спостережень було виявлено, що зневоднення ембріона починається лише після 40 секунд. Іншим ефектом зміни часу промивання є підвищений ризик кристалізації ембріона. Таким чином, важливо дотримуватися чіткої тривалості часу маніпуляції від 40 секунд до 1 хвилини.

4. Щоб прискорити процес замерзання краплі з ембріоном при перенесенні в рідкий азот, рекомендується нанести на соломинку лише мінімальну кількість середовища з ембріоном;

5. Рекомендується заморожувати лише один ембріон на соломинці замість двох, оскільки кожен ембріон може реагувати різним чином на зміну концентрації кріопротекторів;

6. Оскільки обсяг краплі, що містить ембріон, складає близько 1 мкл, рекомендується переносити соломинку з ембріоном в рідкий азот негайно, без затримки;

7. Для перенесення ембріона з рідкого азоту в середу розморожування, коли ембріон повністю зневоднений, необхідно використовувати мікропіпетки з великим діаметром кінчика, щоб уникнути пошкодження ембріона.

Групу 3 порівнювали з результатами групи 2, яка виступала контрольною групою, оскільки в ній проводилась вітрифікація без внесення будь-яких змін до умов експерименту, що дає можливість взяти її за контрольну групу.

Таблиця 3.3

Порівняння виживання ембріонів при модифікації метода вітрифікації з контрольною групою

Кількість вижившихклітин	**Група 2 (контрольна група, вітрифікація)**	**Група 3 (удосконалена вітрифікація)**
100%	40% (6/15)	66,6% (10/15)*
95%	33,3% (5/15)	26,7% (4/15)*
90%	26.7% (4/15)	6,7% (1/15)*

*$p \leq 0,05$ – різниця достовірна у порівнянні з контрольною групою

Якщо виживання клітин становило 95%, то різниця у результатів між групами 2 і 3 була незначною. Однак, коли виживання складало 100% або 90%, було виявлено значну розбіжність у показниках між групами. Загалом, результати свідчать про те, що ембріони в групі 3 мали більше життєздатних бластомерів. Ці дані дозволяють припустити, що успішність цього методу

може залежати від підтримання правильної концентрації кріопротекторів, контролю токсичності цих речовин, а також швидкості вітрифікації та розморожування.

Метод вітрифікації є ефективним завдяки тому, що ембріони прямо контактують з рідким азотом, що забезпечує їх миттєве замороження без утворення кристалів льоду. Крім того, метод забезпечує швидке зниження і підвищення температури, що мінімізує осмотичні пошкодження.

Застосування методу вітрифікації при кріоконсервації ембріонів щурів показало значне покращення таких показників, як виживаність ембріонів та стабільність градації бластоцист. При порівнянні з результатами повільної кріоконсервації, які також були вивчені в даній роботі, метод вітрифікації давав більш високі результати. Важливо зазначити, що ці показники не залежали від причин безпліддя, а отже, метод може бути ефективним при різних репродуктивних порушеннях.

Нові умови, розроблені нами для проведення вітрифікації, ґрунтуються на зменшенні концентрації кріопротекторів, що забезпечує покращення життєздатності ембріонів.

Розробка даної модифікації методу вітрифікації ембріонів впливає на економіку тваринництва та має значний народногосподарський ефект у біотехнологічній роботі з сільськогосподарськими та лабораторними тваринами.

3.3 Порівняння частоти настання вагітностей та частоти імнлантації в результаті переносу повільно кріоконсервованих та вітрифікованих бластоцист у кріо циклах

У цій роботі при використанні двох різних методів кріоконсервації: методу повільного заморожування (група 1) та методу вітрифікації (група 2)

порівнюються результати кріо циклів з результатами звичайних циклів ЕКЗ з перенесенням ембріонів на той же день (5 день) (контрольна група 3). Оскільки з ембріонів, заморожених у групах 1 та 2, сформовані бластоцисти як на день 5 (клас А), так і на день 6 (клас В), у контрольній групі 3 для порівняння результатів використовували цикли ЕКЗ з перенесенням ембріонів класів А та В, тобто бластоцист та морул на день 5.

Перед тим як перейти до порівняння груп 1, 2 та 3, необхідно описати показання до проведення програми ЕКЗ та ПЕ, а також цикли стимуляції пацієнток цих груп. У таблиці 5 наведено показання пацієнток до програми ЕКЗ та ПЕ.

Таблиця 3.4

Показання пацієнток груп 1, 2 та 3 до програми ЕКЗ

Показання до ЕКЗ	**Група 1 (повільне заморожування)**	**Група 2 (вітрифікація)**	**Група 3 (природній цикл)**
ІКСІ	49% (25/51)	40%(14/35)	41.7%(20/48)
Ендометріоз	15.7% (8/51)	22.9%(8/35)	16.7% (8/48)
СПКЯ	11.8% (6/51)	11.4% (4/35)	12.5% (6/48)
Непрохідність фалопієвих труб	9.8% (5/51)	14.3% (5/35)	10.4% (5/48)
Віковий фактор	3.9% (2/51)	8.6% (3/35)	6.3% (3/48)
Порушення овуляції	9.8% (5/51)	2.9% (1/35)	12.5% (6/48)

Порівняно з практично ідентичною схемою стимуляції суперовуляції пацієнток групи 3 (Lupron або Antigon після овуляції 225 одиниць на день протягом 10-ти днів), у 1-ій та 2-ій груннах існували 3 різних методи підготовки націєнток до кріо циклів, зазначені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Методи підготовки пацієнток груп 1 та 2 до кріо циклів

	Група 1 (повільне заморожування)	**Група 2 (вітрифікація)**
Природній цикл	47% (24/51)	51.4% (18/35)
ФСГ	31.4% (16/51)	34.3% (12/35)
Lupron/ Естроген	21.6% (11/51)	14.3% (5/35)

Було показано, що не існувало значних відмінностей між показаннями до програми ЕКЗ для націєнток 1-ої, 2-ої та 3-ї груп, а також між методами підготовки пацієнток 1-ої та 2-ї грунп кріо циклів.

При аналізі результатів кріоконсервації бластоцист було приділено велику увагу методам підготовки пацієнток 1-ої та 2-ої групи до кріоциклів, які наведені у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Частота настання вагітностей у жінок у групах 1 та 2 залежно від методу підготовки пацієнток до кріо циклів

Метод підготовки	**Кількість настання вагітностей у групі 1 (повільне заморожування)**	**Кількість настання вагітностей у групі 2 (вітрифікація)**
Природній цикл	4 (44.4%)	6 (40%)
ФСГ	3 (33.3%)	4 (26.7%)
Lupron / Естроген	2 (22.2%)	5 (33.3%)

З отриманих нами даних некоректно робити будь-які обґрунтовані висновки, оскільки наведено не високу кількість випадків, і частота настання вагітностей залежно від методу підготовки пацієнток до кріо циклів практично не відрізняється між групами.

Усі ембріони порівнюваних груп були перенесені на 5-й день після овуляції з результатами, наведеними в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Результати, отримані в групах 1, 2 і 3 при переносі ембріонів

	Група 1 (повільне заморожування)	**Група 2 (вітрифікація)**	**Група 3 (природній цикл)**
Кількість пацієнток	51	35	48
Середній вік	35.5	35.6	35.9
Виживаність ембріонів	86.4% (127/147)	100% (77/77)	-
Середня кількість ембріонів / ПЕ	2.5 (127/51)	2.2 (77/35)	2.1 (103/48)
Частота настання вагітності	17.6% (9/51)* 7 пологів, 1 спонтанний аборт 1 прогресуюча вагітність	42.9% (15/35)* 13 пологів, 2 прогресуючі вагітності	50% (24/48) 20 пологів, 2 спонтанних аборта, 2 прогресуючі вагітності
Частота імплантації	7% (9/127)*	29.9% (23/77)*	37.9% (39/103)

*$p \leq 0,05$ – різниця достовірна у порівнянні з контрольною групою 3

Як видно з таблиці 3.7, середній вік пацієнток у групах 1, 2 та 3 практично не відрізнявся. Частота виживання бластоцист при повільній кріоконсервації у групі 1 склала 86.4%, у той час як при вітрифікації бластоцист у групі 2 вижили всі бластоцисти (100%). При оцінці кількості перенесених ембріонів у групах 1, 2 та 3 було виявлено, що найбільшу кількість бластоцистів у розрахунку на 1 пацієнтку було перенесено у групі 1 (2.5) порівняно з групою 2 (2.2) та групою 3 (2.1).

Як видно з таблиці 3.7, при перенесенні розморожених вітрифікований бластоцист достатньо переносити в порожнину матки в середньому 2.2 ембріона з такими результатами, як частота наступу вагітностей, що становить 42.9% (n=35); частота імплантації – 29.9% (n=77). У такий спосіб запобігається ризик багатоплідної вагітності. Ці високі показники дозволять підвищити ефективність циклів ЕКЗ пацієнток із СПКЯ та СГЯ, а цей підхід до програми ЕКЗ, тобто перенесення не більше 2-3 ембріонів з урахуванням індивідуальних особливостей жінки, рекомендується відповідними міжнародними інститутами.

Відповідно до літературних даних, 40-50% ембріонів від загальної отриманої кількості ембріонів здатні формувати бластоцисти до днів 5 і 6; а приблизно 40-50% від цих сформованих бластоцистів успішно імплантуються і дають початок розвитку плода. Отже, можна припустити, що одного циклу ЕКЗ, тобто однієї трансвагінальної пункції яєчників, буде достатнім для настання 2-х - 3-х вагітностей. При високій частоті виживання ембріонів пацієнтки матимуть більше шансів на успіх у кріо циклах, а також можливість планувати сім'ю. Можна припустити, що застосування вітрифікації як єдиного методу кріоконсервації ооцитів та ембріонів у програмі ЕКЗ та ПЕ дозволить підвищити частоту настання вагітностей та частоту імплантації майже до традиційних рівнів у циклах ЕКЗ.

Таким чином, при застосуванні методу вітрифікації ембріонів людини значно зростають такі показники, як частка ембріонів, що вижили, частота

настання вагітності і частота імплантації, порівняно з тими ж результатами після проведення методу повільної кріоконсервації. Як було виявлено в даній роботі, ці результати не залежали від причин безпліддя та методу підготовки пацієнток до циклів овуляції, а середній вік жінок порівнюваних груп не мав значних відмінностей.

ВИСНОВКИ

1. При вітрифікації ембріонів спостерігається збільшення частоти виживання на 1.2 рази порівняно з частотою виживання при повільній кріоконсервації.

2. Новий спосіб вітрифікації, який ми модифікували, заснований на зменшенні токсичності кріопротекторів шляхом зміни концентрації та тривалості їх впливу. Використання цього способу покращує умови зберігання і збільшує частоту виживання бластомерів ембріона щурів порівняно з традиційним методом вітрифікації.

3. При порівнянні методів підготовки пацієнток до кріо циклів не було виявлено залежності частоти настання вагітності від методів підготовки (таких як природний цикл; а також цикли із застосуванням препаратів ФСГ; препаратів Lupron/Естроген), а середній вік жінок порівнюваних груп не мав значних відмінностей.

4. Застосуванні методу вітрифікації ембріонів людини значно збільшує такі показники, як частка ембріонів, що вижили, частота настання вагітності і частота імплантації, порівняно з тими ж результатами після проведення методу повільної кріоконсервації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пушкарь, Н., Білоус, А. (1975). *Введення в кріобіологію*. Київ: Наукова думка.

2. Wong, J., Wong, A. (2011). Phasing-in of vitrification into routine practice: why, how, and what. *J. Hong Kong Med*, 17, pp. 119-126.

3. Шурыгина, О., Тугушев, М., Байзарова, А., Сараева, Н. (2016) Витрификация гамет и эмбрионов - эффективный инструмент повышения результативности программ ВРТ. *Современные проблемы науки и образования*, [онлайн]. 4. Доступно на: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24955 [Доступно з 14 лип. 2016]

4. Cobo, A., de los Santos, M., Castello, D., Gamiz, P., Campos, P. (2012). Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blasto-cyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil. Steril.*, 98(5), pp. 1138-1146.5. Chen, C. (2017). Cryopreservation of human oocytes and embryos. *CRC Press*.

6. Kılıç, S., & İlkılıç, A. (2021). Human Embryology and Developmental Biology. In Basic Science for Obstetrics and Gynaecology. *Elsevier*, pp. 1-22.

7. Gandolfi, F., & Brevini, T. A. (2019). *Handbook of mammalian embryology*. Wiley-Blackwell.

8. Karaki, R. Z., & Aboulghar, M. A. (2021). Advances in embryo cryopreservation: state of the art. *Fertility and Sterility*, 115(2), pp. 268-276.

9. Al-Azawi, T., Tavukcuoglu, S., Khaki, A. (2013). Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos and blastocysts: A comparison study between slow freezing and ultra rapid (vitrification) methods. *J. Middle East Fertil. Soc*, 18(4), pp. 223-232.

10. Liu, L., Sansing, S., Morse, I, Pritchett-Corning, K. (2011). Mouse Sperm Cryopreservation and Recovery using the I·Cryo Kit. *JoVe Journal*, [online]. Available at: https://doi.org/10.3791/3713 [Accessed 12 Dec. 2011].

11. Whittingham, D. (1974). The viability of frozen-thawed mouse blastocysts, *J. Reprod. Fertil.,* 37, pp. 159–162.

12. Trounson, A., Mohr, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature publishing group,* [online]. 305(5936), pp. 707-709. Available at: https://doi.org/ 10.1038/305707a0 [Accessed 20-26 Oct. 1983].

13. Пушкарь, Н., Шраго, М., Білоус, А. (1978). *Кріопротектори*. Київ: Наукова думка.

14. Singh, V., & Agarwal, S. (2021). Human embryology and its clinical significance. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 10(2), pp. 391-397.

15. De Munck, N., Tournaye, H., & Van de Velde, H. (2020). Update on cryopreservation of ovarian tissue and follicles. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 67, pp. 113-126.

16. Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2019). The developing human: clinically oriented embryology. *Elsevier*.

17. Чернобай, Н., Гурина, Т., Пахомов, А. (2011). Криозащитная эффективность ряда криопротекторов в зависимости от скорости охлаждения. *Проблемы криобиологии*, 21(3), сс. 273-279.

18. Сведенцов, Е. (2010). *Криоконсерванты для живых клеток*. Сыктывкар: Коми науч. центр УрО РАН.

19. Nardid, O. (2014). Effect of low temperatures on protein systems. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 24(2), pp. 83-101.

20. Spindler, R., Rosenhahn, B., Hofmann, N., Glasmacher, B. (2012). Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology*, 64(3), pp. 250-260.

21. Phillips, R. (2015). *Handbook Of Cryobiology*. New York: Callisto Reference.

22. Chian, R. C. (2018). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 28(9), pp. 275-280.

23. Sadler, T. W. (2019). *Langman's medical embryology*. Wolters Kluwer.

24. Kilani, Z., Dakour, S., & Jabara, S. (2020). The role of cryopreservation in assisted reproductive technology. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 32(3), pp. 184-189.

25. Marques, C., Santos-Silva, C., Rodrigues, C. (2018). Bovine oocyte membrane permeability and cryosurvival: Effects of different cryoprotectants and calcium in the vitrification media. *J. Cryobiology*, 81, pp. 4-11.

26. Вейсман, А. (2010). Перенос криоэмбрионов. *Проблемы репродукции*, 16(2), сс. 34–40.

27. Zhu, D., Zhang, J., Cao, S., Zhang, J., Heng, B., Huang, M., Ling, X., Duan, T., Tong, G. (2011). Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles — time for a new embryo transfer strategy?. *Fertil. Steril.*, 95(5), pp. 1691-1695.

28. Orellana, M., De Santis, G., Abraham, J. (2015). Efficient recovery of undifferentiated human embryonic stem cell cryopreserved with hydroxyethyl starch, dimethyl sulphoxide and serum replacement. *Cryobiology*, 71 pp. 151–160.

29. Xu, X., Liu, Y., Cui, Z., Wei, Y., Zhang, L. (2012). Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation. *Journal of Biotechnology,* 162(2–3), pp. 224–231.

30. Qingqing H., Xishi L., Hilary C., Zhongpeng F., Sun-Wei G. (2022). How does the extent of fibrosis in adenomyosis lesions contribute to heavy menstrual bleeding? *Reprod Med Biol.* [online]. 21 (1), pp. 172. Available at: https://doi.org/10.1002/rmb2.12442 [Accessed 7 Feb. 2022].

31. Farhi, J., Ben-Haroush, A., & Sapir, O. (2021). Fertility preservation in women: a comprehensive update. *Obstetrics & Gynecology Science*, 64(3), pp. 211-222.

32. Youssef, M. A. (2018). Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in women. *Fertility and Sterility*, 110(4), pp. 587-594.

33. Sadler, T. W. (2019). *Langman's medical embryology*. Wolters Kluwer.

34. Ahmadi, S., Bashiri, R., & Ghaffari, S. R. (2021). The role of embryo cryopreservation in assisted reproductive technology. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(7), pp. 581-588.

35. Katkov I. (2012). Current Frontiers in Cryobiology. Rijeka: InTech.

36. Hiraoka, K., Horiuchi, T., Kusuda, T., Okano, S., Kinutani, M., Kinutani, K. (2009) Case report: successful delivery following the transfer of a human re-vitrified day-7 spontaneously hatched blastocyst developed from vitrified cleaved embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 26(7), pp. 405–409.

37. Громенко, Ю., Исхаков, И. (2012). Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в рамках экстракорпорального оплодотворения. *Мед. вестн. Башкортостана*, 2, сс. 27–30.

38. Корсак, В., (2019). *Руководство по клинической эмбриологии*. Москва: СИМК.

39. Rail, W., Fahy, G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313, pp. 573-575.

40. Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2019). *Reproduction and breeding in mammals*. Academic Press.

41. Boitrelle, F., & Clavequin, M. C. (2020). Current status of oocyte cryopreservation in human. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 49(10), pp. 10-18.

42. Cobo, A., García-Velasco, J. A., & Domingo, J. (2019). Elective and Onco-fertility Preservation in Female Patients. *Springer*, pp. 57-61.

43. Gilchrist, R. B., & Ritter, L. J. (2019). Cryopreservation and vitrification of oocytes and embryos. In Reproductive Sciences in Animal Conservation. *Springer*, pp. 143-157.

44. Liu, L., Sansing, S., Morse, I, Pritchett-Corning, K. (2011). Mouse Sperm Cryopreservation and Recovery using the I Cryo Kit. *JoVe Journal*, [online]. Available at: https://doi.org/10.3791/3713 [Accessed 12 Dec. 2011].

45. Robinson R., Mann G.,Lamming G., Wathes D. (1999). The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *J Endocrinol*, 160, pp. 21-33

46. Wood, M. (2012) Vitrification of oocytes. *Obstetrician Gynecologist*, 14(1) pp. 45-49.

47. Saragusty, J., Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification . *J. Reproduction*, 141(1), pp. 1-19.

48. Piotrowska-Tomala K., Jonczyk A., Skarzynski D., Szóstek-Mioduchowska A. (2020). Luteinizing hormone and ovarian steroids affect in vitro prostaglandin production in the equine myometrium and endometrium. *Theriogenology* [online]. 153, pp. 1-8. Available at: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.039 [Accessed 1 Sep. 2020].

49. Gook, D., Osbom, S., Johnston, W. (1993). Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum. Reprod.,* 8 pp. 1101-1110.

50. Van, U., Siebzehuruble, E., Schuh, B. (1987). Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet.* 1, pp. 752-753.

51. Chen, C. (1988). Pregnancies after human oocyte cryopreservation. *Ann. NY Acad. Sci.* 541, pp. 541-549.

52. Tucker, M., Wright, G., Morton, P. (1996). Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2-propanediol and sucrose. *Hum. Reprod,* 11, pp. 1513-1515.

53. Porcu, E., Fabbri, R., Seracchioli, R. (1997). Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil. Steril.* 68, pp. 724-726.

54. Young, E., Kenny, A., Puigdomenech, E. (1998). Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreservad embryos: case report. *Fertil. Steril.*, 70, pp. 360-361.

55. Костяев, А., Мартусевич, А., Андреев, А. (2016) Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья). *Научное обозрение. Медицинские науки,* [онлайн]. 6, сс. 54-74. Доступно на: https://science-medicine.ru/ru/article/view?id=944 [Доступно з 28 лип. 2016].

56. Osuga Y., Hirota Y., Yoshino O., Hirata T., Koga K., Taketani Y. (2012). Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis. Front *Biosci (Schol Ed)* [online]. 4 (4), pp. 1201-1212. Available at: https://doi.org/10.2741/S326 [Accessed 1 Jun. 2012].

57. Laganà A., Garzon S., Götte M., Viganò P., Franchi M., Ghezzi F., Martin D. (2019). The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *Int J Mol Sci* [online]. 20 (22), pp. 5615. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20225615 [Accessed 7 Nov. 2019].

58. Pathare A., Hinduja I., Mahadik R. (2022). Basic aspects of endometrial receptivity in PCOS patients. *Mol Biol Rep*. [online]. 49 (2), pp. 1519-1528. Available at: https://doi.org/10.1007/s11033-021-06976-9 [Accessed 16 Jan. 2022].

59. Hu C, Pang B, Ma Z, Yi H (2020) Immunophenotypic profiles in polycystic ovary syndrome. *Mediators Inflamm.* [online]. Available at: https://doi.org/10.1155/2020/5894768 [Accessed 9 Mar. 2020].

60. Nakagawa K. and K. Kishi. (2012). Development of human oocytes cryopreservation by vitrification. *Nihon Rinsho Men'eki Gakkai Kaishi*, 35(6), pp. 480-485.

61. Громенко, Ю., Исхаков, И. (2012). Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в рамках экстракорпорального оплодотворения. *Мед. вестн. Башкортостана*, 2, сс. 27–30.

62. Kitazawa J., Kimura F., Nakamura A., Morimune A., Takahashi A. (2020). Endometrial Immunity for Embryo Implantation and Pregnancy Establishment. *Tohoku J Exp Med* [online]. 250 (1), pp. 49-60. Available at: https://doi.org/10.1620/tjem.250.49 [Accessed 18 Jan. 2020].

63. Ishakab G., Bashira S., Gastala M., Gastal E. (2017). Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science* [online]. 187, pp. 1-12. Available at: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.09.003 [Accessed 6 Dec. 2017].

64. Hiraoka K., et al. (2021). Vitrification of oocytes and embryos: advances and controversies. *Fertility and Sterility*, 116(4), pp. 764-781.

65. J.C. Ousey (2011). Endocrinology of pregnancy. *Equine Reproduction (second ed.)* , pp. 2222-2233

66. Kader, A., Choi, A., Orief Y., Agarwal, A. (2009). Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *J. Reproductive Biology and Endocrinology*, [online]. Available at: http://www.rbej.com/content/7/1/99 [Accessed 16 Sept. 2009].

67. Оуен Ф., Томсон Е., (2021) Клінічне акушерство та гінекологія. *Elsevier.*

68. Carlson, B. M. (2019). *Human embryology and developmental biology*. Elsevier.

69. Гайдуков, С., Боярский, К., Фолькерт, И ., Баласанян, В. (2014). Критерии, определяющие клиническую эффективность витрификации. *Фундаментальные исследования*, [онлайн]. Доступно на: http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35991 [Доступно з 25 лис. 2014].

70. Корсак, В., (2019). *Руководство по клинической эмбриологии*. Москва: СИМК.

71. Краснопольская К., Сесина Н., Бадалян Г.В. (2015). Медленное замораживание и витрификация эмбрионов. Сравнение эффективности. *Проблемы репродукции*, [онлайн]. 1 сс. 48-53. Доступно на: https://doi.org/10.17116/repro20152148-53 [Доступно з 21 лис. 2015]

72. Park S., et al. (2017). Comparison of pregnancy outcomes between fresh and frozen-thawed blastocyst transfer. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 44(4), pp. 209-215.