



## Показатели выживаемости и клинической эффективности витрифицированных бластоцист человека в практике эмбриологических лабораторий

О. В. Иванова\*, О. В. Шурыгина<sup>1, 2</sup>, А. А. Петрова<sup>2</sup>, С. Н. Юхимец<sup>3</sup>,  
О. В. Кулакова<sup>1</sup>, Д. Ю. Русаков<sup>1, 2</sup>, Н. Н. Демидова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия

<sup>2</sup>ЗАО «Медицинская компания ИДК», Самара, Россия

<sup>3</sup>ЧУОО ВО «Медицинский университет Реавиз», Самара, Россия

**Цель** – провести сравнительный анализ выживаемости эмбрионов и частоты наступления беременности после витрификации эмбрионов человека на разных стадиях преимплантационного развития.

**Материал и методы.** Было проанализировано 1311 эмбрионов. Для витрификации эмбрионов были использованы среды Irvine Scientific (США), носители открытого типа CryoTop (Япония). Витрификация и размораживание эмбрионов осуществлялись в соответствии с рекомендациями производителя. Статистическую обработку результатов выполняли на компьютере в среде статистических вычислений R (R v.3.5.3, RStudio v.1.1.463), первичный ввод данных проводили с помощью электронных таблиц MS Excel. В работе использовали методы описательной статистики, тесты для сравнения пропорций, в том числе точный биномиальный для малых выборок и одновыборочный тест пропорций с коррекцией непрерывности для больших выборок.

**Результаты.** Диапазон выживаемости эмбрионов достаточно широкий и составляет от 75 до 100%. При проведении детального анализа зависимости частоты наступления беременности от стадии заморозенной бластоцисты, мы выявили прямую связь клинических показателей и структуры эмбрионов 5–6-х суток преимплантационного развития. Бластоцисты с наиболее высокой степенью сформированности внутренней клеточной массы и трофобласта в сочетании с высокой степенью экспансии дают наиболее высокие результаты частоты наступления клинической беременности.

**Выводы.** При проведении витрификации стадия развития бластоцисты влияет на их выживаемость и показатели частоты наступления беременности. Явление хетчинга у эмбрионов 5–6-х суток преимплантационного развития следует расценивать как фактор, понижающий успех витрификации.

**Ключевые слова:** криоконсервация, бластоциста, трофобласт, витрификация, частота наступления беременности, человек.

### Survival Rates and Clinical Effectiveness of Vitriified Human Blastocysts in the Practice of Embryological Laboratories

© V. Ivanova\*, O. V. Shurygina<sup>1, 2</sup>, A. A. Petrova<sup>2</sup>, S. N. Yukhimets<sup>3</sup>, O. V. Kulakova<sup>1</sup>, D. Y. Rusakov<sup>1, 2</sup>, N. N. Demidova<sup>2</sup>, 2020

<sup>1</sup>Samara State Medical University, Samara, Russia

<sup>2</sup>Medical company IDK, Samara, Russia

<sup>3</sup>Medical University Reaviz, Samara, Russia

**Objective** – to carry out comparative analysis of embryo survival and pregnancy rate after the vitrification of human embryos at different stages of the preimplantation development.

**Material and methods.** A total of 1311 embryos were analyzed. For vitrification of embryos, the Irvine Scientific media (USA) and the CryoTop open-type carriers (Japan) were used. The vitrification and the defrosting of embryos were carried out according to the manufacturer's recommendations. The statistical processing of the results was performed on a computer in the statistical computing environment R (R V. 3. 5. 3, RStudio V. 1. 1. 463), the primary data entry was performed using MS Excel spreadsheets. We used methods of descriptive statistics, tests for comparing proportions, including an accurate binomial test for small samples and a single-sample test of proportions with continuity correction for large samples.

**Results.** The range of the embryo survival is quite wide and ranges from 75% to 100%. When conducting a detailed analysis of the dependence of the pregnancy rate on the stage of cryopreserved blastocysts, we found a direct link between the clinical indicators and the structure of the embryos of 5–6 days of the preimplantation development. The blastocysts with the highest degree of the internal cell mass and the trophoblast formation in combination with a high degree of the expansion (4) give the best results of the clinical pregnancy rate.

**Conclusions.** When performing vitrification we found out that the stage of the blastocyst development influences their survival and pregnancy rates. The phenomenon of hatching in the embryos of 5–6-day preimplantation development should be regarded as a factor that reduces the success of vitrification.

**Key words:** cryopreservation, blastocyst, trophoblast, vitrification, pregnancy rate, human.

**\*Автор для переписки:**

Иванова Ольга Викторовна  
Самарский государственный медицинский университет,  
ул. Чапаевская, 89, Самара, 443099, Российская  
Федерация

**\*Corresponding author:**

Ol'ga Ivanova  
Samara State Medical University, ul. Chapaevskaya, 89,  
Samara, 443099, Russian Federation  
E-mail: pathologywinkie@gmail.com

**Введение**

В настоящее время сохранение репродуктивного потенциала эмбрионов человека с помощью современных криотехнологий – задача абсолютно реальная и решаемая [1, 2, 7, 9]. Криоконсервация клеток, тканей и органов человека позволяет временно приостановить биологические процессы с последующим восстановлением структуры и функции после оттаивания. Именно эта свойство – сохранение жизнеспособности – используется в репродуктивной медицине, главная задача которой – сохранение репродуктивной функции гамет и эмбрионов, определяющая возможность дальнейшего развития зародыша и плода [3, 4]. Однако, данное направление нельзя считать исчерпанным, поскольку наличие широкого круга вопросов еще требует дополнительных исследований [6]. Определение оптимальной для криоконсервации стадии развития эмбриона *in vitro*, эффективности применения различных способов весьма актуальны не только для фундаментальной науки, но и для практической медицины [10]. Витрификация эмбрионов («быстрое» замораживание с помощью растворов, содержащих высокие концентрации криопротекторов), как основной способ сохранения их жизнеспособности, имеет в настоящее время наиболее широкое распространение в практике эмбриологических лабораторий [5, 11]. Данная технология не вызывает образования кристаллов льда и развития осмотического шока, которые приводят к гибели клеток [9]. Получение первых беременностей после успешной витрификации ооцитов и эмбрионов человека позволило включить ее в рутинную практику большинства эмбриологических лабораторий.

Цель работы – сравнительный анализ выживаемости эмбрионов и частоты наступления беременности при витрификации эмбрионов человека на разных стадиях преимплантационного развития.

**Материал и методы**

Исследование проведено в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения на базе эмбриологических лабораторий ЗАО «Медицинская компания ИДК». Разрешение на проведение клинического исследования получено от комитета по биоэтике при Самарском государственном медицинском

университете (выписка из протокола №116 от 3.10.2018 г.). Всего было проанализировано 1311 эмбрионов. Для морфологической оценки перед витрификацией эмбрионы 5–6-х суток преимплантационного развития были идентифицированы под контролем стереомикроскопа Olympus IX-73 (Япония). Оценку структуры бластоцист проводили в соответствии с международной классификацией, согласно которой стадия развития бластоцисты определяется ее степенью экспансии, степенью сформированности внутренней клеточной массы (эмбриобласта) и трофобласта (D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft, 1999) [8].

Для инкубации эмбрионов до 5–6-х суток в условиях 5% O<sub>2</sub> использованы инкубаторы COOK (Австралия) и среды Vitrolife (Швеция). Для витрификации эмбрионов были использованы среды VIT-KIT® FREEZE SOLUTIONS ONLY Irvine Scientific (США), носители открытого типа CryoTop (Япония). Среда для витрификации раствор ES (Equilibration Solution) содержит: 7.5% DMSO, 7.5% ethylene glycol, 20% DSS, Gentamicin, in a M-199 HEPES Buffered Medium. Раствор VS (Vitrification Solution) содержит: 15% DMSO, 15% ethylene glycol, 20% DSS, 0.5 M sucrose, Gentamicin, in a M-199 HEPES Buffered Medium.

Витрификация и размораживание эмбрионов осуществлялись в соответствии с рекомендациями завода-производителя.

Для анализа эффективности переносов размороженных эмбрионов использовали показатель частоты наступления беременности (ЧНБ). Его рассчитывали как отношение количества подтвержденных УЗИ беременностей (УЗИ+) к общему количеству переносов, умноженное на 100%.

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

**Результаты и их обсуждение**

Всего было проанализировано 1311 эмбрионов 5–6-х суток культивирования на разных стадиях развития. Данные приведены в табл. 1. Проанализированы показатели выживаемости и ЧНБ в зависимости от стадии развития бластоцисты, выраженности внутренней клеточной массы и трофобласта.

Диапазон частоты выживаемости эмбрионов достаточно широкий и составлял от 75 до 100%. Самый низкий уровень частоты

Таблица 1

**Уровни выживаемости и частоты наступления беременности (УЗИ+) в зависимости от стадии развития бластоцист, выраженности внутренней клеточной массы и трофобласта**

Стадия развития бластоцисты	Степени развития ВКМ	Степени развития ТБ	n	Выживаемость, %	Кол-во УЗИ+, n	Доля УЗИ+, %
3	A	A	41	100.00	22	54.0
	A	B	109	95.51	54	50.0
	A	C	3	100.00	1	33.0
	B	A	8	100.00	5	62.0
	B	B	141	89.33	55	39.0
	B	C	27	92.16	9	33.0
	C	C	2	100.00	1	50.0
	NA	NA	1	NA	NA	NA
4	A	A	193	96.96	119	62.0
	A	B	168	97.90	73	43.0
	A	C	1	100.00	NA	NA
	A	NA	1	100.00	NA	NA
	B	A	21	100.00	11	52.0
	B	B	107	97.21	44	41.0
	B	C	13	100.00	2	15.0
	C	B	1	100.00	1	100.0
	C	C	1	100.00	NA	NA
	NA	NA	1	100.00	1	100.0
5	A	A	43	96.43	18	42.0
	A	B	15	100.00	4	27.0
	B	A	7	100.00	4	57.0
	B	B	8	81.82	1	12.0
6	A	A	5	100.00	3	60.0
	A	B	4	75.00	3	75.0
	B	B	3	100.00	2	67.0
NA	NA	NA	133	37.68	1	1.0

Примечание: ВКМ – внутренняя клеточная масса, ТБ – трофобласт.

Таблица 2

**Зависимость показателей частоты наступления беременности (УЗИ+) от стадии развития бластоцисты**

Стадия развития бластоцисты	Кол-во УЗИ+, n	Кол-во УЗИ-, n	Всего, n	Частота УЗИ+, %
3	147	182	329	44.7
4	251	255	506	49.6
5	27	45	72	37.5
6	8	4	12	66.7
Итого	433	486	919	47.1

Примечание: различия частот значимы,  $p < 0.001$ .

выживаемости демонстрировали вылупившиеся бластоцисты (степень экспансии – 6). Возможно, это связано с отсутствием оболочки оплодотворения и цитотоксическим влиянием криопротекторов на клетки трофобласта. Количество эмбрионов в этой группе крайне мало ( $n=12$ ), чтобы сделать однозначные выводы.

При проведении дальнейшего анализа зависимости ЧНБ от стадии замороженной бластоцисты, обнаружена прямая связь клинических показателей и структуры эмбрионов 5–6-х суток преимплантационного развития (табл. 2).

По признаку «степень экспансии» показатели ЧНБ возрастают с увеличением степени экспансии от стадии начала кавитации бластоцисты до увеличенной бластоцисты (степень экспансии – 4), достигая максимума

у вылупленных эмбрионов, лишенных оболочки оплодотворения. Подобная тенденция является вполне закономерной: эмбрион с более высоким уровнем организации и клеточной дифференцировкой дает более высокие показатели ЧНБ. Однако, обращает на себя внимание снижение величины показателей в группе бластоцист со степенью экспансии – 5. Это эмбрионы, которые находились во время криоконсервации в состоянии хетчинга (вылупления). По всей вероятности, эмбрионы данной стадии развития являются наиболее уязвимыми к воздействию процедуры витрификации.

Проводя сравнительный анализ по признаку «степень сформированности эмбриобласта» (табл. 3), мы получили ожидаемые результаты: чем выше степень компактизации клеток внутренней клеточной массы, тем

Таблица 3

**Зависимость показателей частоты наступления беременности (УЗИ+) от степени развития внутренней клеточной массы**

Степень развития внутренней клеточной массы	УЗИ+, n	УЗИ-, n	Всего, n	Частота УЗИ+, %
A	298	283	581	51.3
B	133	201	334	39.8
C	2	2	4	50.0
Итого	433	486	919	47.1

Примечание: различия частот значимы,  $p=0.004$ .

Таблица 4

**Зависимость показателей частоты наступления беременности (УЗИ+) от степени развития трофобласта**

Степень развития трофобласта	УЗИ+, n	УЗИ-, n	Всего, n	Частота УЗИ+, %
A	183	135	318	57.5
B	237	316	553	42.9
C	13	34	47	27.7
Итого	433	485	918	47.2

Примечание: различия частот значимы,  $p<0.001$ .

более высокие показатели ЧНБ. У blastocист с максимально сформированным эмбриобластом степени A (581 эмбрион) показатель ЧНБ составил 51.3%, с эмбриобластом степени B (334 эмбриона) – 39.8%, ( $p=0.004$ ). Следует обратить внимание, что в группе blastocист с развитием внутренней клеточной массы степени C (клеток крайне мало или она отсутствует), получено 50% ЧНБ. Этот показатель вряд ли можно признать объективным вследствие крайне малочисленной группы (4 эмбриона), поскольку эмбрионы с подобной структурой, как правило, не подлежат замораживанию.

Степень сформированности трофобласта, развитие которого является наиболее значимым в процессе имплантации, напрямую коррелирует с данными ЧНБ (табл. 4). При анализе 918 эмбрионов мы выявили, что blastocисты с уровнем развития трофобласта класса A (318) дают наиболее высокие показатели – 57.5% ЧНБ, класса B (553) – 42.9% ЧНБ, класса C (47) – 27.7% ЧНБ ( $p<0.001$ ).

Проводя сравнительный статистический анализ, было выявлено влияние всех компонентов, используемых для оценки структуры blastocист 5–6-х суток преимплантационного развития: степени экспансии эмбриона, сформированности эмбриобласта и трофобласта на уровень выживаемости и показатель ЧНБ. Эмбрионы с наиболее высокой степенью сформированности внутренней клеточной массы A и трофобласта A в сочетании с максимальной степенью экспансии (4) дают лучшие результаты. Эти результаты коррелируют с данными других исследователей [4, 9]. Неожиданно высокие результаты по ЧНБ в группе эмбрионов с развитием эмбриобласта степени C (50%) вряд ли можно считать закономерными ввиду малого количества случаев (4). Степень экспансии blastocист также по-

казывает прямую связь с ЧНБ, исключением являются blastocисты с хетчингом. По всей вероятности, этот энергетически активный процесс для эмбриона (когда он экспандирует через определенные промежутки времени) крайне важен. Эмбрион пытается найти наиболее благоприятное место для разрыва оболочки оплодотворения и выхода из нее. По сути, эта стадия развития является своеобразным критическим периодом. Соответственно, в этот момент, он представляется наиболее уязвимым для воздействия внутренних и внешних факторов [6]. Далеко не всем blastocистам удается осуществить хетчинг. По некоторым данным, полученным *in vitro*, до 75% всех морфологически нормальных blastocист человека оказываются неспособными к самостоятельному выходу из блестящей оболочки [13]. Неспособность к хетчингу может являться одной из важных причин привычной неудачи имплантации у человека [6, 12]. Витрификация определенным образом является тем самым внешним фактором, который, возможно, и определяет более низкие показатели ЧНБ у эмбрионов данной стадии развития [7, 9].

### Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования показана прямая зависимость между структурой blastocист и степенью выживаемости эмбрионов, показателями частоты наступления беременности. Явление хетчинга у эмбрионов 5–6-х суток преимплантационного развития следует расценивать как фактор, снижающий успех витрификации. В рамках практической работы эмбриологических лабораторий целесообразно проводить криоконсервацию эмбрионов до момента вылупления blastocист.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Список литературы / References**

1. Иванова О.В., Шурыгина О.В., Русаков Д.Ю., Быкова Т.В., Петрова А.А., Юхимец С.Н., Кулакова О.В., Юлдашева С.З. Оценка эффективности криоконсервации гамет и эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Морфологические ведомости. 2019;7(3):46–50 [Ivanova OV, Shurygina OV, Rusakov DY, Bykova TV, et al. The evaluation of the efficiency of the cryopreservation of human's gametes and embryos in assisted reproductive technology program. Morphological Newsletter. 2019;7(3):46–50] (in Russian).
2. Краснопольская К.В., Бекетова А.Н., Сесина Н.И., Чинченко Н.К., Конеева В.О., Боcharова Т.В. Сравнение результативности переносов эмбрионов на 5-е и 6-е сутки развития в свежих циклах или криопереносах ЭКО. Проблемы репродукции. 2019;25(5):86–91 [Krasnopolskaya KV, Beketova AN, Sesina NI, Chinchchenko NK, Koneeva TO, Bocharova TV. A comparison of the effectiveness of fresh or frozen embryo transfer on day 5 or day 6. Problemy reproduktiv. 2019;25(5):86–91] (in Russian). doi: 10.17116/repro20192505186
3. Кравчук Я.Н., Калугина А.С., Быстрова О.В., Шлыкова С.А. Эффективность и исходы программ с криоконсервацией эмбрионов в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий. Журнал акушерства и женских болезней. 2014;63(4):39–46 [Kravchuk YN, Kalugina AS, Bystrova OV, Shlykova SA. Effectiveness and outcomes of embryo cryopreservation programs in assisted reproductive technologies. Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2014;63(4):39–46] (in Russian).
4. Протопопова Н.В., Дружинина Е.Б., Мильникова Ю.В., Болдонова Н.А., Дворянов Я.А., Крылова К.В., и др. Эффективность криопереносов в зависимости от различных факторов. Гинекология. 2018;20(5):59–62 [Protopopova NV, Druzhinina EB, Mylnikova UV, Boldonova NA, Dvoryanov JA, Krylova KV, et al. Efficiency of cryoperenosis depending on various factors. Gynecology. 2018;20(5):59–62] (in Russian). doi: 10.26442/2079-5696\_2018.5.59-62
5. Шурыгина О.В., Тугушев М.Т., Байзарова А.А., Сараева Н.В. Витрификация гамет и эмбрионов – эффективный инструмент повышения результативности программ вспомогательных репродуктивных технологий (BPT). Современные проблемы науки и образования. 2016;4:54 [Shurygina OV, Tugushev MT, Bayzarova AA, Saraeva NV. The vitrification of gametes and embryos is an effective instrument of increasing the results of the assisted reproductive technologies (ART) programs. Modern problems of science and education. 2016;4:54] (in Russian).
6. Кириенко К.В., Апрышко В.П., Яковенко С.А. Вспомогательный хетчинг (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2019;25(4):89–101 [Kirienko KV, Apryshko VP, Yakovenko SA. Assisted hatching (literature review). Problemy reproduktiv. 2019;25(4):89–101] (in Russian). doi: 10.17116/repro20192504189
7. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. Theriogenology. 2014 Jan;81(1):96–102. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.011
8. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. Towards reproductive certainty?: fertility and genetics beyond 1999?: the plenary proceedings of the 11th World Congress in In Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics. New York: Parthenon Pub. Group; 1999.
9. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. Theriogenology. 2007 Jan;67(1):73–80. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.014
10. Racowsky C, Vernon M, Mayer J, Ball GD, Behr B, Pomeroy KO, et al. Standardization of grading embryo morphology. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2010 Jun 9;27(8):437–9. doi: 10.1007/s10815-010-9443-2
11. Sciorio R, Thong KJ, Pickering SJ. Single blastocyst transfer (SET) and pregnancy outcome of day 5 and day 6 human blastocysts vitrified using a closed device. Cryobiology. 2018 Oct;84:40–5. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.08.004
12. Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G, Rao RP. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. Journal of Reproductive Immunology. 2009 Dec;83(1–2):79–84. doi: 10.1016/j.jri.2009.06.264
13. Thurin A, Hardarson T, Hausken J, Jablonowska B, Lundin K, Pinborg A, et al. Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients. Human Reproduction. 2005 Mar 17;20(7):1876–80. doi: 10.1093/humrep/deh872

Поступила в редакцию 3.03.2020

Принята в печать 10.06.2020

Received 3.03.2020

Accepted 10.06.2020

Для цитирования: Иваова О.В., Шурыгина О.В., Петрова А.А., Юхимец С.Н., Кулакова О.В., Русаков Д.Ю., Демидова Н.Н. Показатели выживаемости и клинической эффективности витрифицированных бластоцист человека в практике эмбриологических лабораторий. Журнал анатомии и гистопатологии. 2020; 9(2): 35–39. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-2-35-39

For citation: Ivaova O.V., Shurygina O.V., Petrova A.A., Yukhimets S.N., Kulakova O.V., Rusakov D.Yu., Demidova N.N. Survival rates and clinical effectiveness of vitrified human blastocysts in the practice of embryological laboratories. Journal of Anatomy and Histopathology. 2020; 9(2): 35–39. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-2-35-39