

Kryokonzervace oocytů

doc. Ing. Michal Jeřeta, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika, LF MU a FN Brno

Možnosti kryokonzervace biologického materiálu

relativně snadná kryokonzervace



velice obtížná kryokonzervace



spermie



ovarium



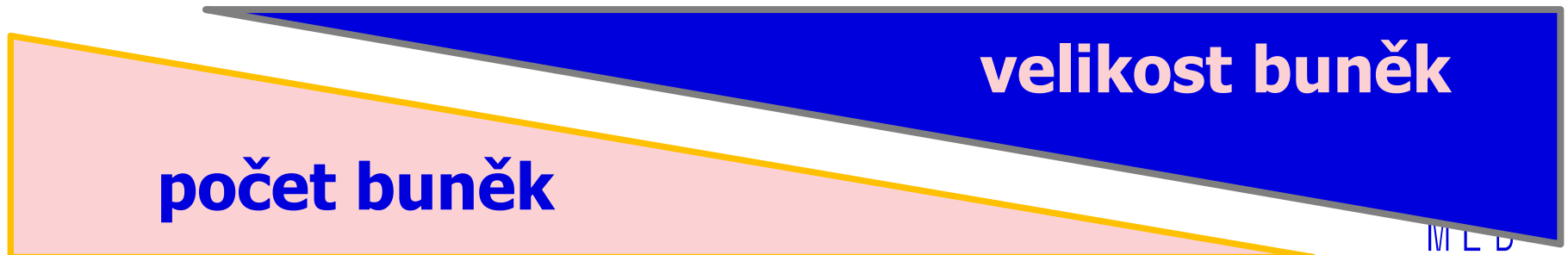
embrya



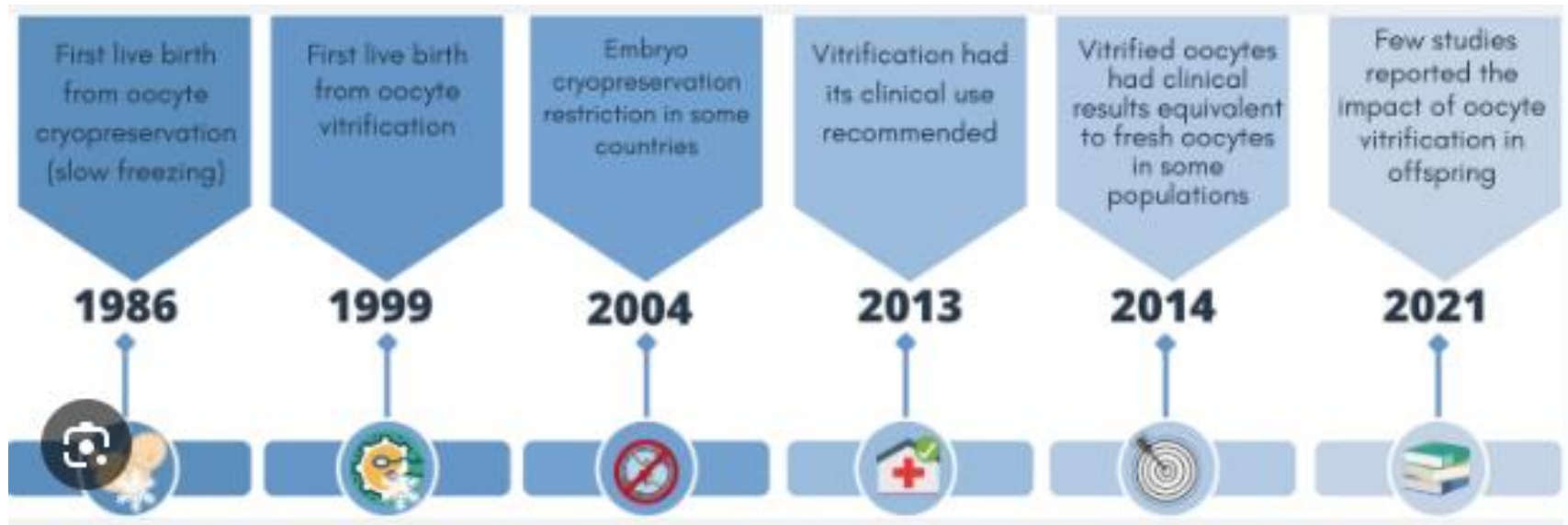
oocyt GV



oocyt MII



Vývoj vitrifikace oocytů



Etický problém kryokonzervace embryí



- v roce 1996 papež Jan Pavel II. "apeloval na svědomí světových vědeckých autorit a zejména na lékaře, aby **byla zastavena produkce lidských embryí, přičemž je třeba vzít v úvahu, že se zdá, že neexistuje žádné morálně přípustné řešení** týkající se lidského osudu tisíců a tisíců 'zmražených' embryí, která jsou a zůstanou předmětem základních práv, a proto by měla být chráněna zákonem jako lidské osoby

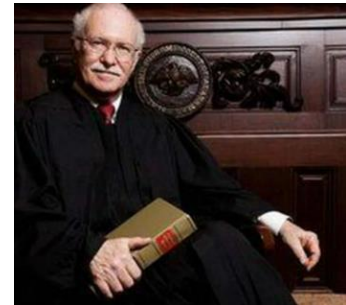


Nejvyšší soud Alabama 2024

- oocyty nejsou etický problém, ale embrya....
- žaloba párů na kliniku IVF pro neúmyslné zničení zamražených embryí v roce 2022, byla neúspěšná ale:
- nejvyšší soud v Alabamě však nyní (únor 2024) jeho rozhodnutí v poměru osm hlasů k jednomu zvrátil s tím, že se *„zákon o neúmyslném usmrcení nezletilého dítěte se vztahuje na všechny nenarozené děti bez ohledu na jejich umístění“*
- Odůvodnění: *...chceme aby bylo více dětí...*

Všichni jsme Boží stvoření. I nepoužitá embrya jsou děti, určil soud v Alabamě

- vrchní soudce Tom Parker, 02/2024
- *alabamské ústava: ...každý člověk byl stvořen k obrazu Božímu, což znamená, že každý život má nevyčíslitelnou hodnotu, kterou „nelze protiprávně zničit, aniž bychom na sebe přivolali hněv svatého Boha“.* „Článek 36.06 uznává, že to o nenarozeném lidském životě platí neméně než o všech ostatních lidských životech: „všechny lidské bytosti nesou Boží obraz ještě před narozením a jejich životy nemohou být zničeny, aniž by byla vymazána jeho sláva“



Alabama Supreme Court Cites the Bible in Terrifying Embryo Ruling

The Alabama Supreme Court's decision is all but guaranteed to gut IVF in the entire state.



**ALABAMA SUPREME COURT
RULES FROZEN EMBRYOS ARE
PEOPLE UNDER STATE LAW**

*The unprecedented ruling could
end IVF in the state.*

**ALABAMA COURT RULING:
FROZEN EMBRYOS QUALIFY
AS PEOPLE UNDER STATE LAW**

“unborn children are 'children'...”

“...without exception based on developmental stage...”

SUPREME COURT OF ALABAMA
OCTOBER TERM, 2022-2024

James LePage and Emily LePage, individually and as parents and next friends of two deceased LePage embryos, Embryo A and Embryo B, and William Trippe Fonde and Caroline Fonde, individually and as parents and next friends of two deceased Fonde embryos, Embryo C and Embryo D

NEW THIS MORNING
ALABAMA SUPREME COURT RULES FROZEN EMBRYOS ARE CHILDREN
HOW DECISION COULD IMPACT THE FUTURE OF IVF IN THE STATE

Kryokonzervace oocytů v klinické praxi

- kryokonzervace gamet byla původně zavedena za účelem udržení šance na početí v případě onkologické léčby (zachování plodnosti) a poté rozšířena na indikace, jako je Turnerův syndrom, autoimunitní onemocnění, endometrióza nebo zachování plodnosti ze společenských důvodů



- po řadu let od prvně publikované práce (1986) nebyla kryokonzervace oocytů příliš používanou metodou kvůli nízkému procentu přežívání, špatné fertilizaci a špatné kvalitě embryí
- technika vyšla z kryokonzervačních protokolů užívaných pro embrya
- bylo nutno provést řadu experimentů, které se zabývaly nejrůznějšími modifikacemi těchto laboratorních postupů, aby vedly ke spolehlivému použití pro oocyty

1983
First pregnancy from
frozen embryo

1986
First pregnancy from frozen
eggs using slow-freeze method

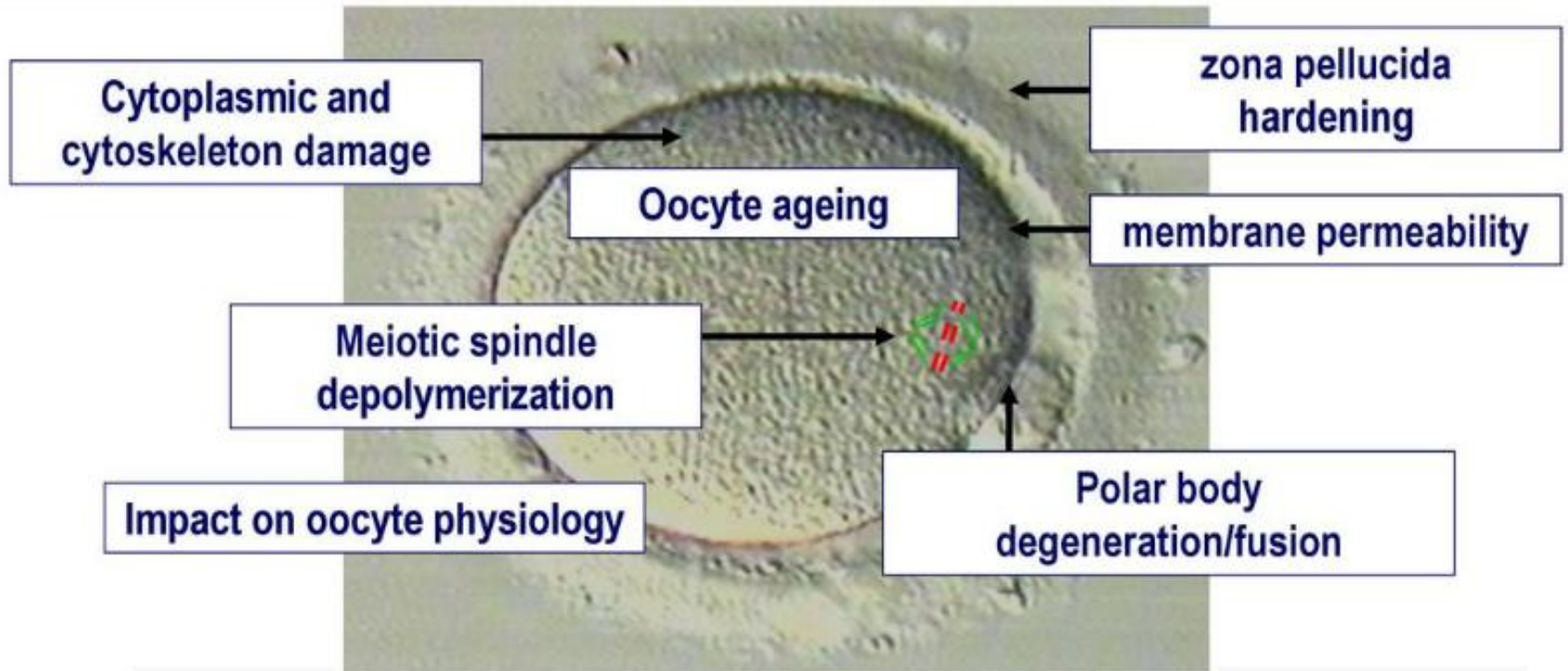
1999
First birth from frozen
eggs using vitrification

2000
HFEA allows the use of frozen
eggs in fertility treatment in the UK

2013
'Experimental' label lifted by the
American Society for Reproductive
Medicine

2014
Facebook and Apple announce
egg freezing as a benefit for
female US employees

Obtížné mražení

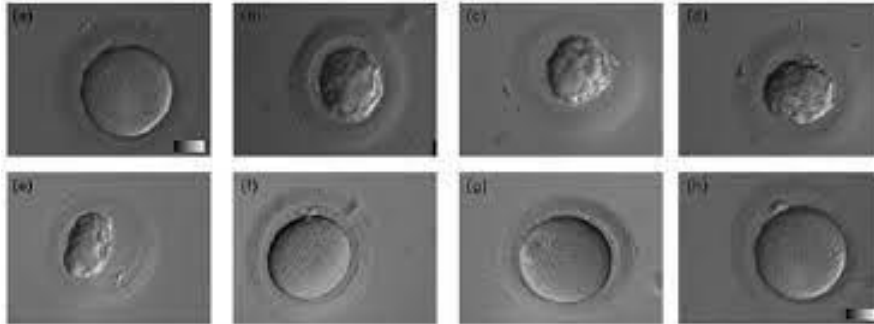


Vitrifikace oocytů

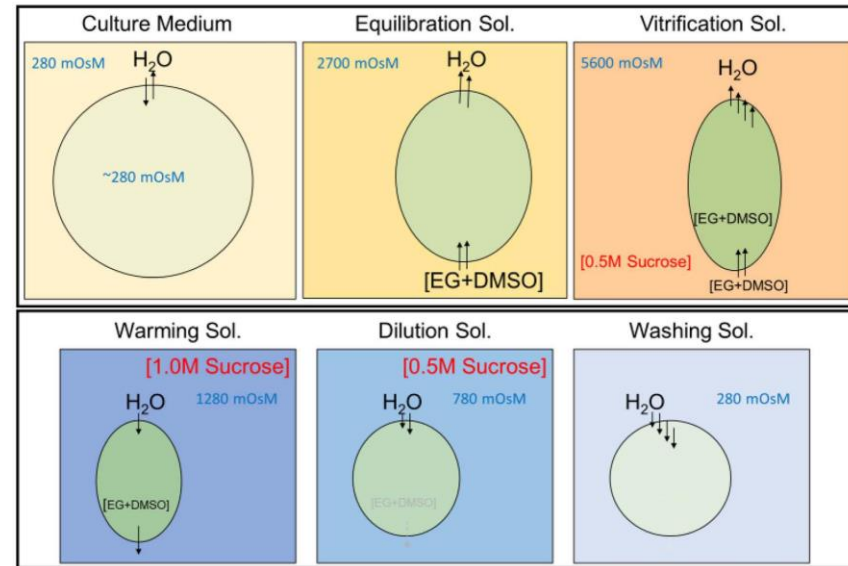
- velký objem a malý povrch – pomalé pronikání kryoprotektiva
- poškození periferních oblastí oocytů
- specifické organely – dělicí vřeténko, CGs, ZP
- vysoký obsah vody
- MII jsou citlivější než GV oocyty (poškození dělicího vřeténka) (Boiso et al., 2002) – vznik aneuploidií se zvyšuje s věkem ženy

in vitro zrání není tak efektivní jako zrání in vivo

Vitrifikace



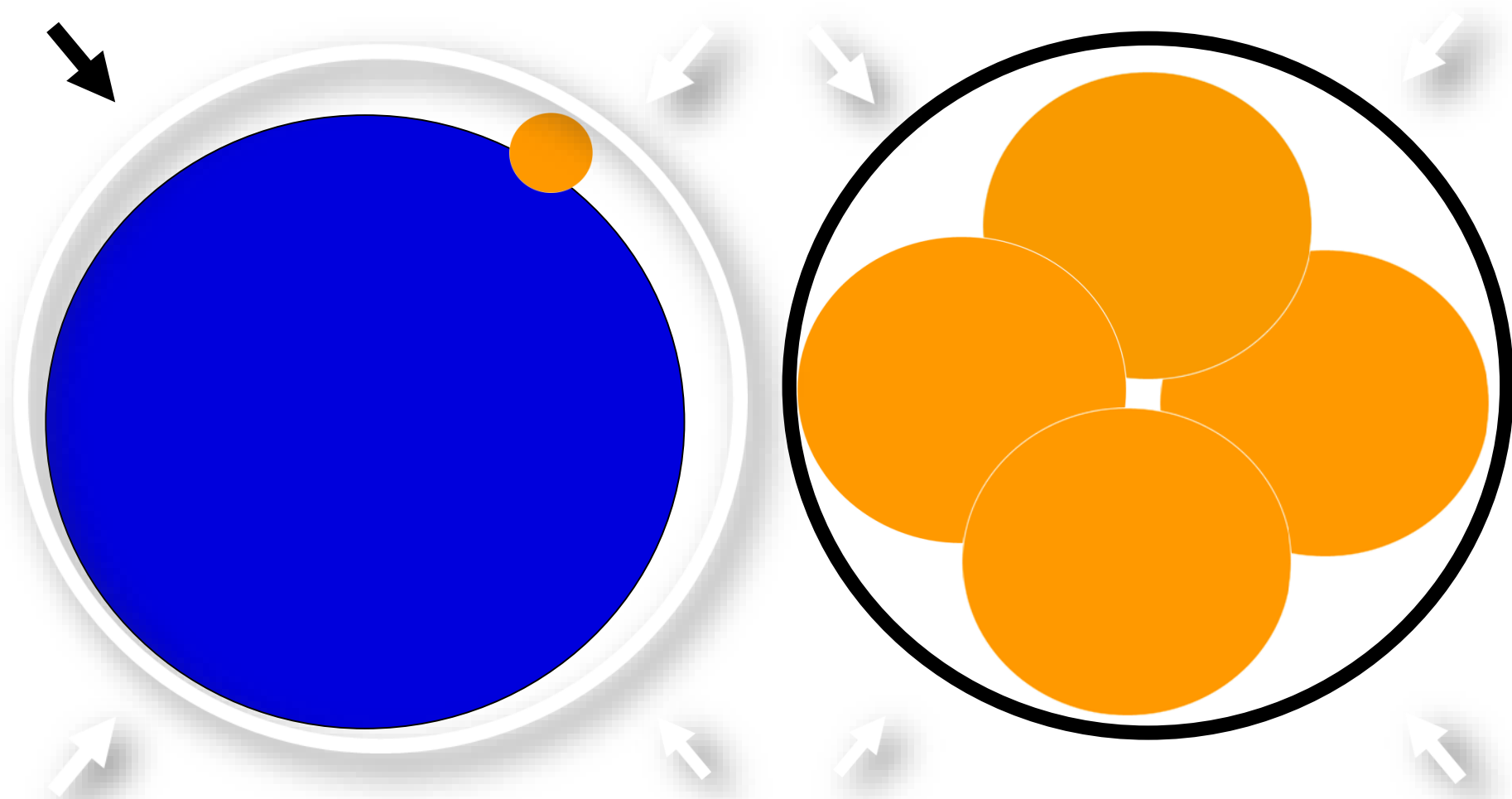
The osmolarity changes in oocyte vitrification and warming procedures



- během vitrifikace jsou buňky vystaveny velkým změnám osmolarity
- se zvyšující se osmolaritou, nastává hypertonický tlak na buňky, který způsobí jejich deformaci (5600 mOsm)
- při rozmražení je nutné buňky dát nejprve do prostředí s vyšším osmotickým tlakem a postupně tlak snižovat na izotonické prostředí

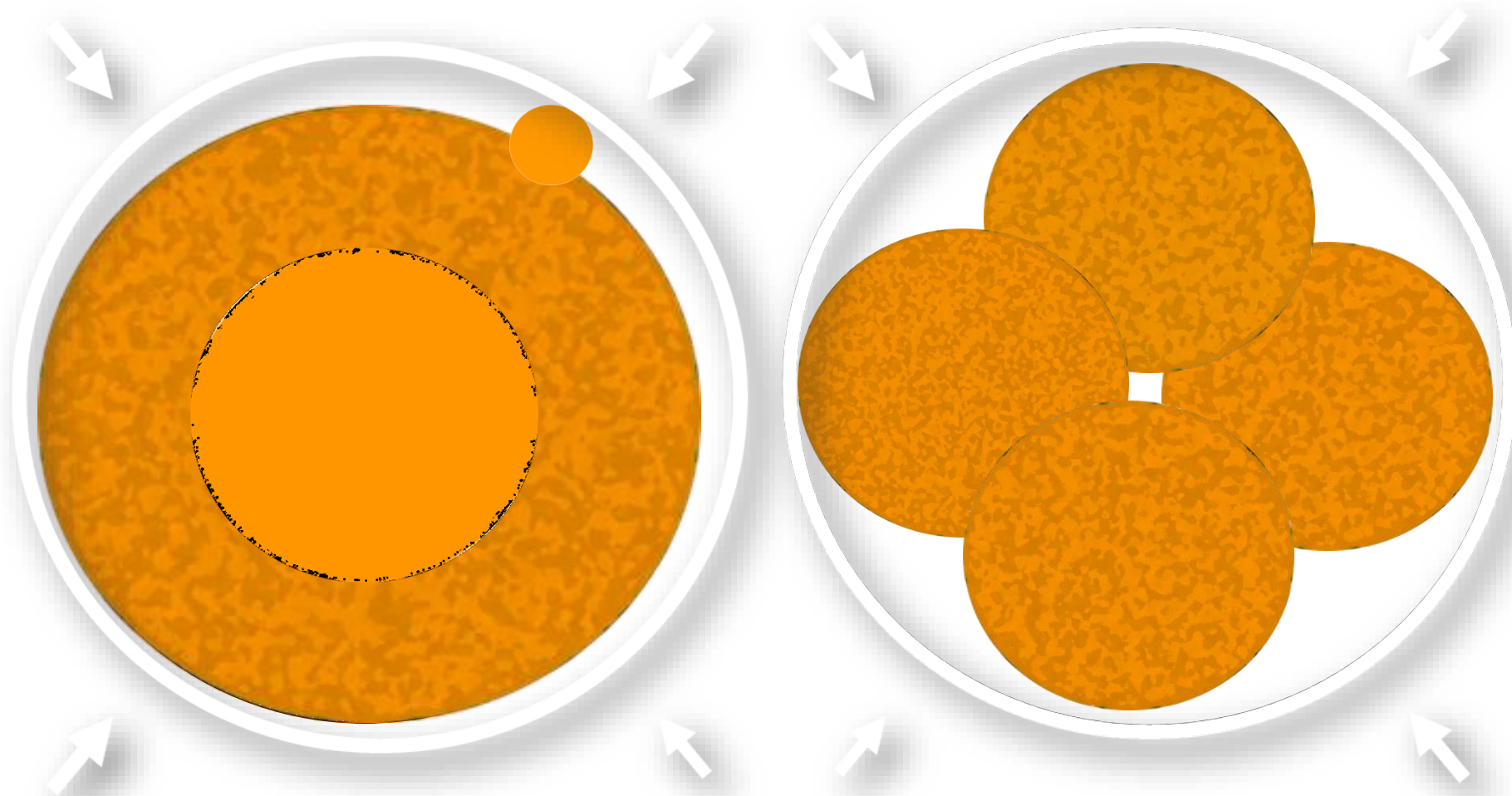
Mrazení oocytů vs embryí

MUNI
MED



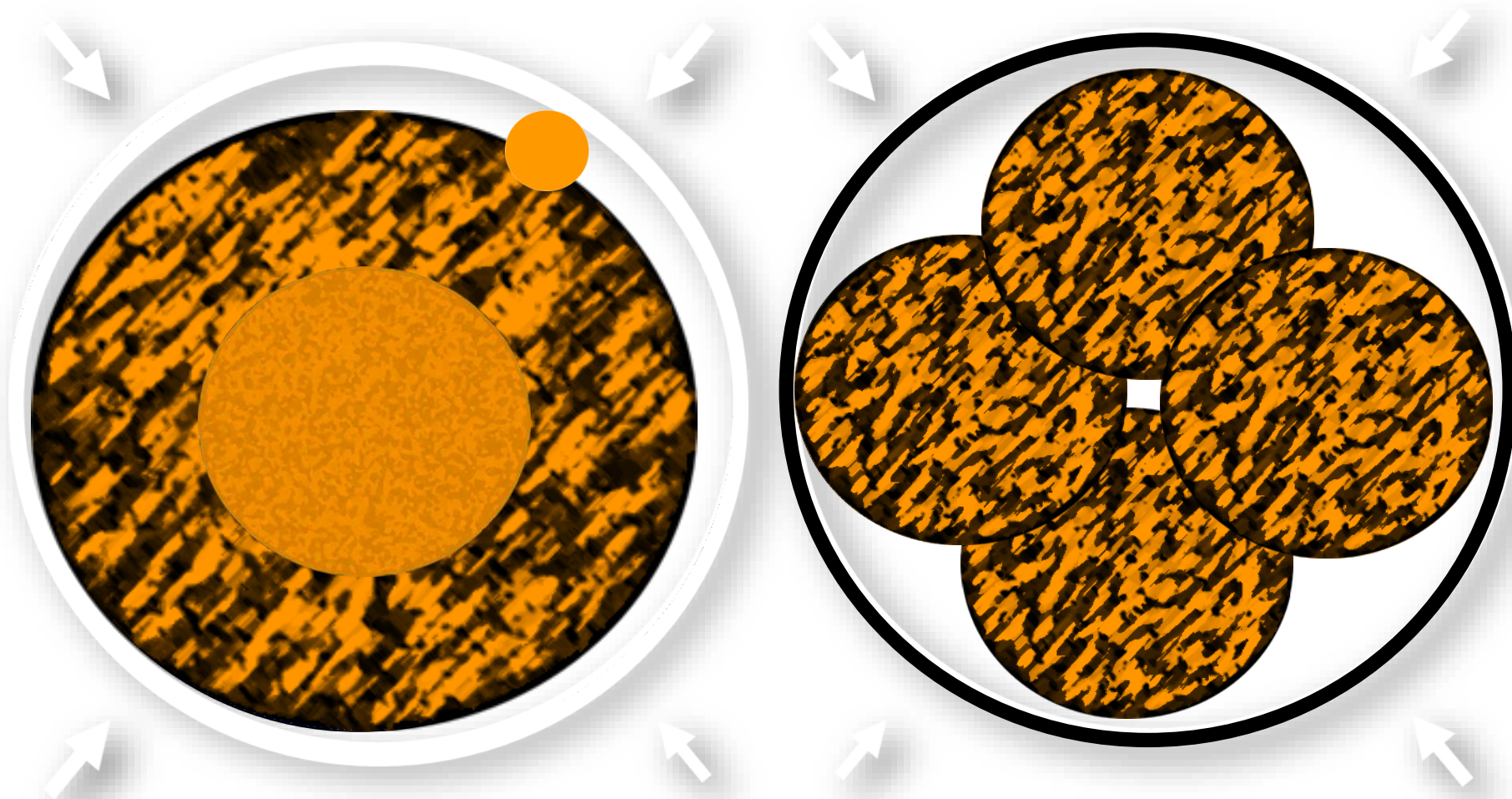
Mrazení oocytů vs embryí

optimální čas pro embrya



Mrazení oocytů vs embryí

optimální čas pro oocyty



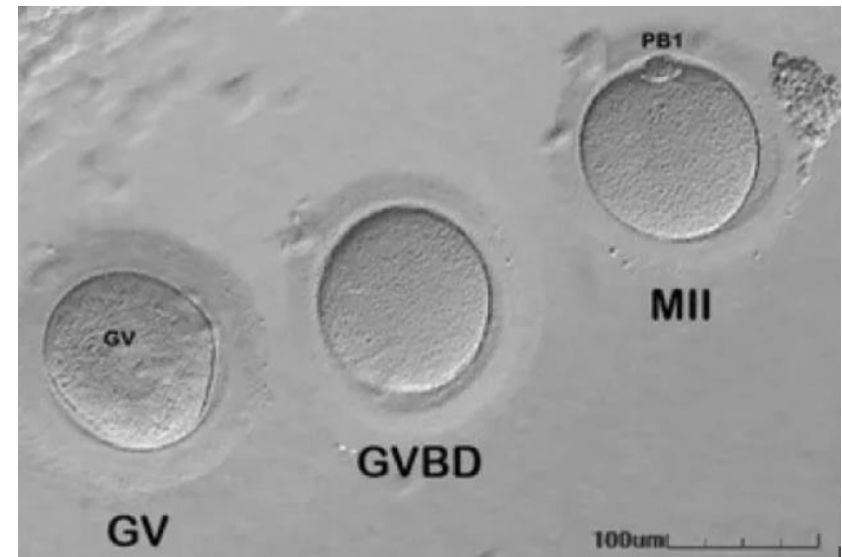
Mražení oocytů

- pravděpodobné **příčiny nízké úspěšnosti** se nacházely na více úrovních
- zmrazování/rozmrazování indukuje změny *zony pellucidy*, které poškodí mechanismus napojení spermií a/nebo jejich penetraci
- narušení funkce kortikálních granul může vést k polyspermii
- oocyt v metafázi II je extrémně citlivý vzhledem k jeho velikosti, obsahu vody a uspořádání chromozomů
- poškození cytoskeletu vede k následné chaotické organizaci organel

Mrazení oocytů

- poškození mikrotubulů dělicího vřeténka v metafázi II vlivem tvorby ledu může vést k chromozomální aneuploidii
- dalším abnormalitám karyotypu a zástavě vývoje embryí
- oocyty ve stádiu GV jsou méně diferencované než v MII (neorganizované dělicí vřeténko a dekondenzovaný chromatin) čímž jsou méně náchylné k poškození
- po kryokonzervaci a rozmrazení je ovšem úskalí v *in vitro* maturaci těchto oocytů

IVM člověk 36-38h

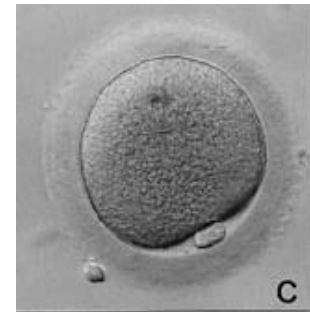


Fertilizace po mrazení oocytů

- oocyty by měly být mrazeny nejdříve **5 hodin po odběru**. V tomto období se odstraní hyaluronidázou kumulární buňky.
- **odstranění buněk** by mělo usnadnit průnik kryoprotektiva. V současné době se upřednostňuje mrazení bez kumulárních buněk.

Důležitý je **způsob oplozování** oocytů po rozmrazení:

- změny v *zona pellucida*, poškození funkce kortikálních granul a částečná disrupce membrán, která způsobila blok splynutí a penetrace spermií vedly k nízkému procentu oplození při klasickém IVF - tyto překážky se podařilo úspěšně obejít použitím ICSI



Indikace k mrazení oocytů

V současné době je kryokonzervace oocytů využívána v následujících případech:

1. Možnost uchování oocytů pro pacientky s **rizikem předčasného ovariálního selhání** (endometrióza – iatrogenní oškození, operace, autoimunitní – tyreotitida)
2. Skladování zmrazených darovaných oocytů v **programu dárcovství** (odbourává nutnost synchronizace cyklů dárkyně a příjemkyně)
3. Řešení v případě neočekávané **absence partnerových spermií** v den odběru oocytů (překážka zdravotní, dopravní, pracovní, momentální psychické rozpoložení).

Indikace k mrazení oocytů

4. Pomoc pro **ženy s onkologickým onemocněním** u kterých nemohou být zamrazena embrya - nemají vhodného partnera a odmítají dárcovské sperma.
5. Možnosti **skladování oocytů** se nově jeví jako příležitost pro ženy, které neplánují bezprostředně těhotenství a chtěly by si uschovat „mladé oocyty“ pro vlastní použití v budoucnu – **social freezing**.
6. Kryokonzervace oocytů minimalizuje **etické a právní komplikace** spojené se skladováním embryí (v některých zemích bylo mrazení embryí omezeno)
7. Autologní zmrazení vajíček s poolingem lze provést i u pacientů se špatnou odpovědí na léčbu s **neobstrukční azoospermií**. U těchto pacientek může být provedeno několik cyklů odběru oocytů následovaných zmrazením oocytů. To může být následováno chirurgickým odběrem spermií varlat později, když je k dispozici dostatečný počet (~10–12) zralých oocytů pro inseminaci. To může zabránit vícenásobným operacím varlat u mužského partnera.

Vitrolife vitrification

1. Fill the SmartBox with liquid nitrogen up to 1 cm from the box's rim and place the lid on top of the box.

2. Place 1 ml of each of the following solutions into separate wells of a 5-well plate and warm to

37°C

Vitri 1™ Oocyte
Vitri 2™ Oocyte
Vitri 3™ Oocyte



The recommended volumes should not be changed. Failure to use the correct volume of media may result in osmolality changes, which could cause suboptimal oocyte survival



3. Label the exact number of RapidStraws needed with the patient's identification. Place the label below the top, black mark of the straw.



4. Transfer the oocytes into Vitri 1 Oocyte. The oocytes should remain in the solution for



Vitri 1 Oocyte 5-20 min

Vitrolife vitrification

5. Move an appropriate number of oocytes into Vitri 2 Oocyte. The oocytes remain in this solution for



Vitri 2 Oocyte 2-5 min

The oocytes should have re-expanded to their original volume within five minutes.

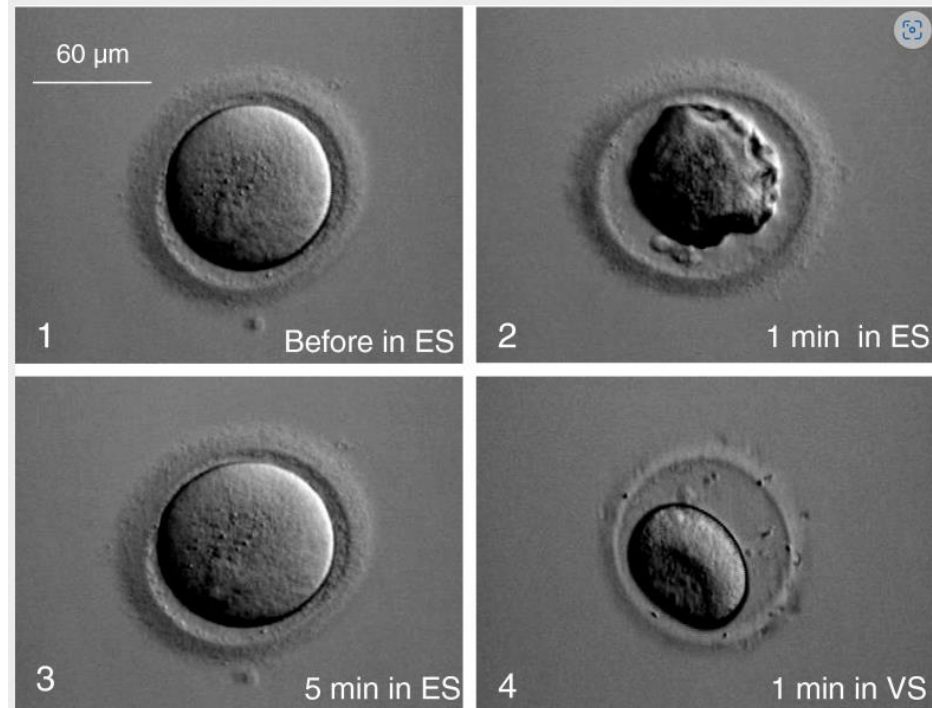
6. Place the RapidStraw in liquid nitrogen. Make sure that the RapidStraw is securely attached to the magnet in the SmartBox.



7. When the oocytes have fully re-expanded, make a droplet of Vitri 3 Oocyte on a non-toxic surface, preferably a 40 mm culture dish.



The 20 μ l droplet can only be used once



Vitrolife vitrification

8. Transfer the oocytes into the 20 μ l droplet of Vitri 3 Oocyte and let them remain in this solution for

25-35 sec, including the time it takes to load the Rapid-i and vitrify.

Remove the stainless steel rod from the RapidStraw after 15 seconds have elapsed and discard.

Vitri 3 Oocyte 25-35 sec



9. Place Rapid-i on the microscope stage with the flat side down. Locate the correct plane of focus so that the hole of Rapid-i is in view, for easy loading.

10. Collect the oocytes with a Vitrolife micro-pipette. Keep the oocytes close together at the end of the pipette.



Avoid overfilling the hole or else the oocytes may float out

11. Slide the hole of Rapid-i into view, in the microscope. Move the tip of the pipette close to

the wall of the hole in Rapid-i and expel the oocytes into the hole.



12. Quickly place Rapid-i vertically into the pre-cooled straw sitting in the Smartbox. Cover the hole immediately after insertion for a few seconds to prevent that Rapid-i accidentally pops out.



Vitrolife warming

1. Place the Smartbox on the lab bench close to the microscope and fill it with liquid nitrogen up to 1 cm from the box's rim and place the lid on top of the box.

2. Place 1 ml of each of the following media into separate wells of a 5-well plate and warm to

37°C

Warm 1™ Oocyte

Warm 2™ Oocyte

Warm 3™ Oocyte

Warm 4™ Oocyte



SmartBox™



Rapid-i™ forceps



Rapid-i™ cutter



RapidWarm™ Oocyte kit

4. Without leaving the liquid nitrogen, remove one RapidStraw from the goblet and place it in a slit of the lid.

5. Warm the RapidStraw with your fingers around the black mark to get a better view of the black tab on Rapid-i. Hold the RapidStraw well above the black mark and use the Rapid-i cutter to cut the RapidStraw 3 mm above the back end of Rapid-i. Do not lift the RapidStraw from the lid and make sure it stays up-right in the liquid nitrogen.



Vitrolife

6. Lift Rapid-i (using the Rapid-i forceps) out of the RapidStraw just enough to enable you to grasp the end with your finger tips. Then quickly (preferably less than 2 seconds), but carefully, remove Rapid-i from the RapidStraw and plunge the tip and hole of Rapid-i into the Warm1 Oocyte solution.



7. Allow the oocytes to fall from the device and sink to the bottom. Leave for



Warm 1 Oocyte 1 min

8. Transfer the oocytes into Warm 2 Oocyte and let the oocytes remain in the solution for



Warm 2 Oocyte 3 min



Vitrolife

9. Transfer the oocytes into Warm 3 Oocyte and let the oocytes remain in the solution for



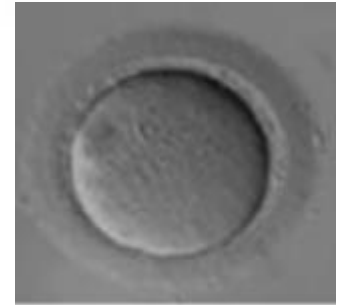
Warm 3 Oocyte 5 min

10. Transfer the oocytes to Warm 4 Oocyte and remain in the solution for



Warm 4 Oocyte 5-10 min

11. Rinse the oocytes in culture media several times and continue culture according to laboratory practice.



If more than one Rapid-i is to be warmed in the same dish, make sure that the temperature reaches 37°C after each warming procedure

Kitazato



ALUMINUM
BLOCK CL



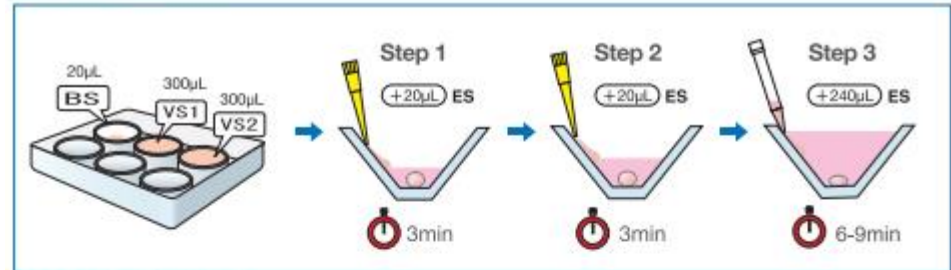
STRAW
CUTTER



HEAT
SEALER



Oocyte Equilibration



Oocyte Equilibration 1

Write **BS**, **VS1** and **VS2** on the lid of Repro Plate. Drop 20µL for **BS** and 300µL each for **VS1** and **VS2** on the plate with micro pipette (See Figure 3-1). Immediately put the lid on the Repro Plate.

Oocyte Equilibration 2

Aspirate the Oocyte at the tip of the pasteur pipette. Transfer the Oocyte with minimal volume of medium from the culture dish to the **BOTTOM** of **BS** (20µL).

Oocyte Equilibration 3 - For 3 minutes

Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps. Add **ES** 20µL gently to the **TOP** of **BS** with the Oocyte moving micro pipette along the well and leave it for 3 minutes (See Figure 3-2).

Oocyte Equilibration 4 - For 3 minutes

Add another **ES** 20µL gently to the **TOP** of **BS** as well and leave it for 3 minutes (See Figure 3-2).

Oocyte Equilibration 5 - For 6 - 9 minutes

Add another **ES** 240µL gently to the **TOP** of **BS** and leave it for 6 - 9 minutes (See Figure3-2).

For Equilibration, the volume of Oocyte is required to be recovered completely. Oocyte Equilibration is complete when the width of perivitelline space becomes equal to the width before immersing to ES.

Figure 3-1



Figure 3-2



[Cryotop Oocyte Vitrification Animation - YouTube](#)

[Kitazato Vitrification Method - Kitazato IVF \(kitazato-ivf.com\)](http://kitazato-ivf.com)

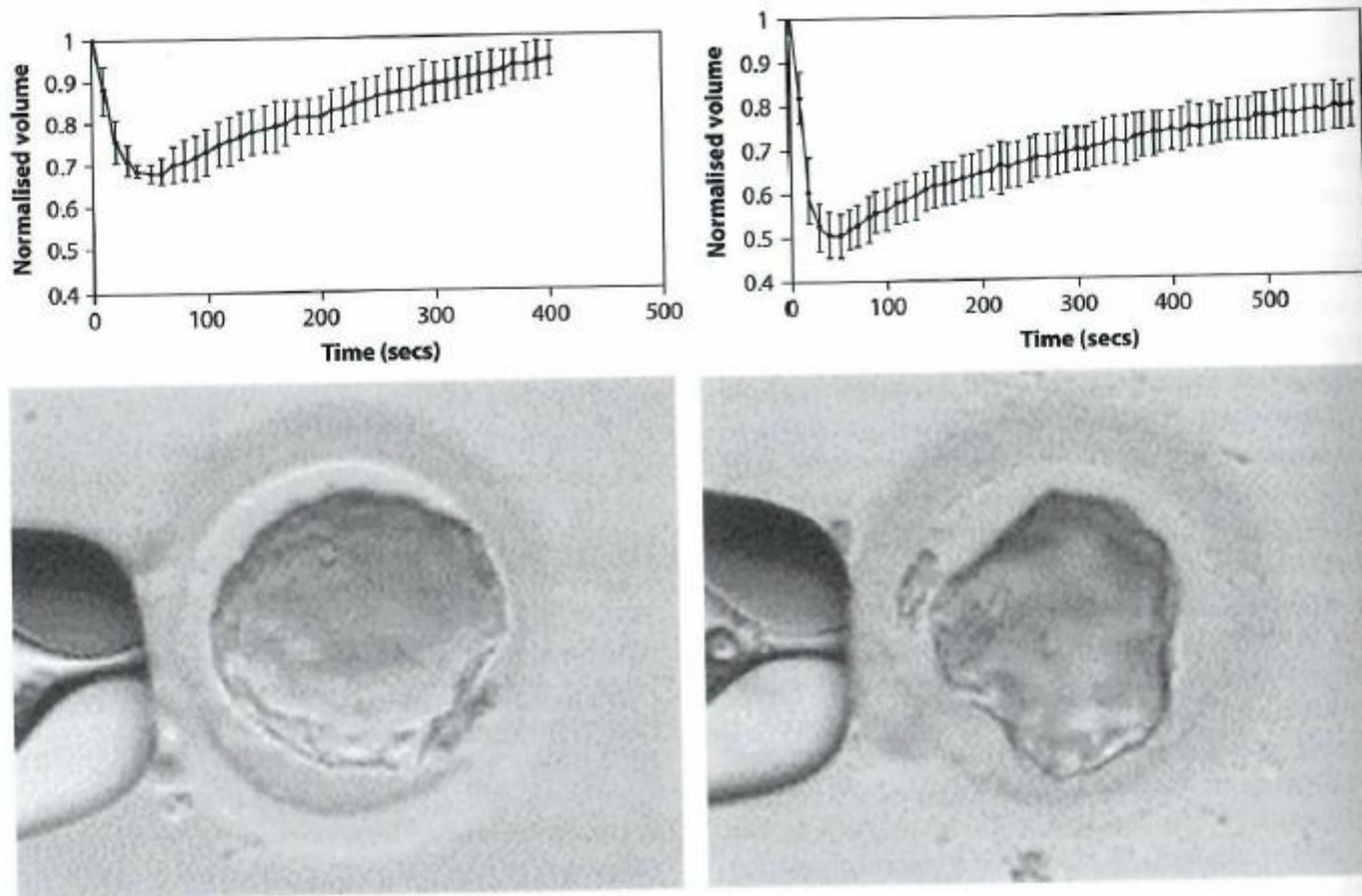


Figure 20.1 Mean \pm SD normalized volumes of human oocytes during exposure to 1.5 mol/L 1,2-propanediol (27) (left) or ethylene glycol (28) (right) at 25°C. The magnitude and kinetics of volume changes are dictated by the relative oolemma permeability to water and cryoprotective agent (CPA). Low permeability to CPA and, consequently, more pronounced volume reduction may cause major transient perturbations of the original spherical shape (right).

Minimum Volume – Open System Approach

**Concentration of cryoprotectant in
VS 30% (EG and DMSO)**

Volume of 0.1 μ L

**Cooling rate of approximately
23,000°C/min**

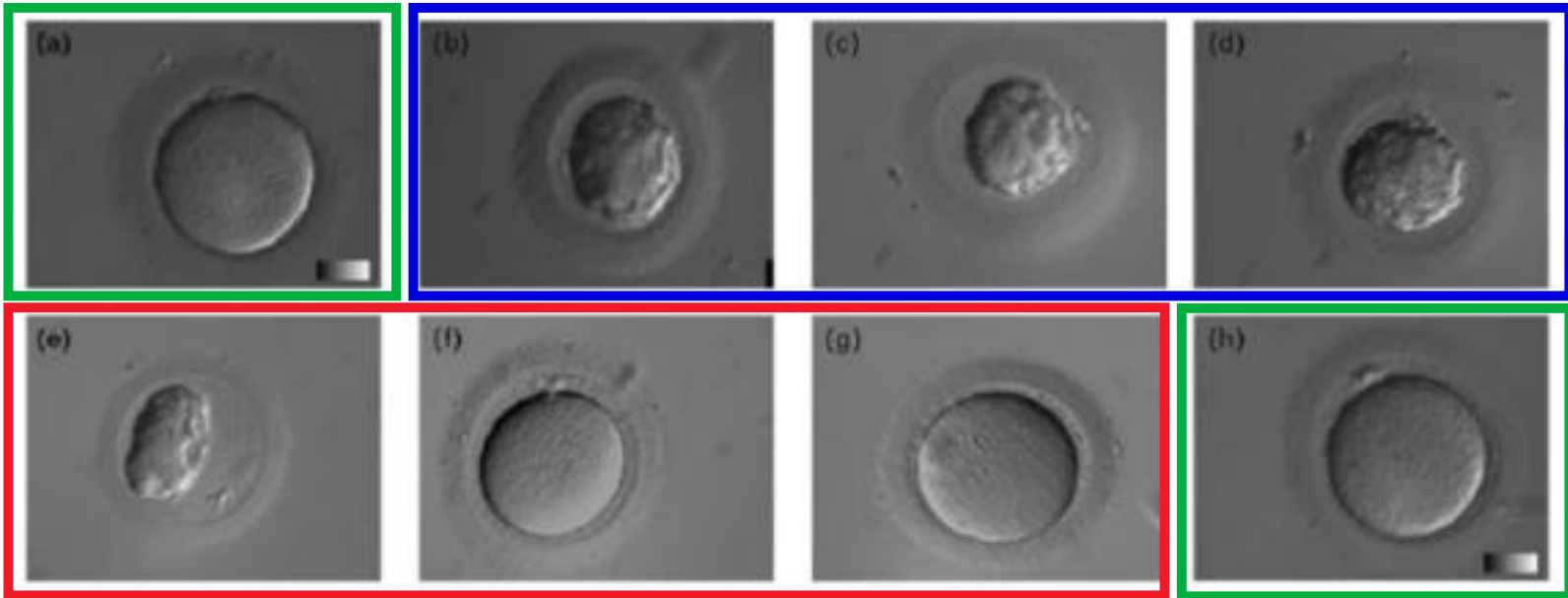
**Osmolarity of VS \approx 8.000 to 4.000
mOsm/L**

Kuwayama et al., 2005, 2007
Ana Cobo, 2008

Změny tvaru oocyty

před vitrifikací

během mražení



během rozmražení

po rozmražení

Warming: vit média

– DMSO je příliš toxické na to aby bylo použito při 37C

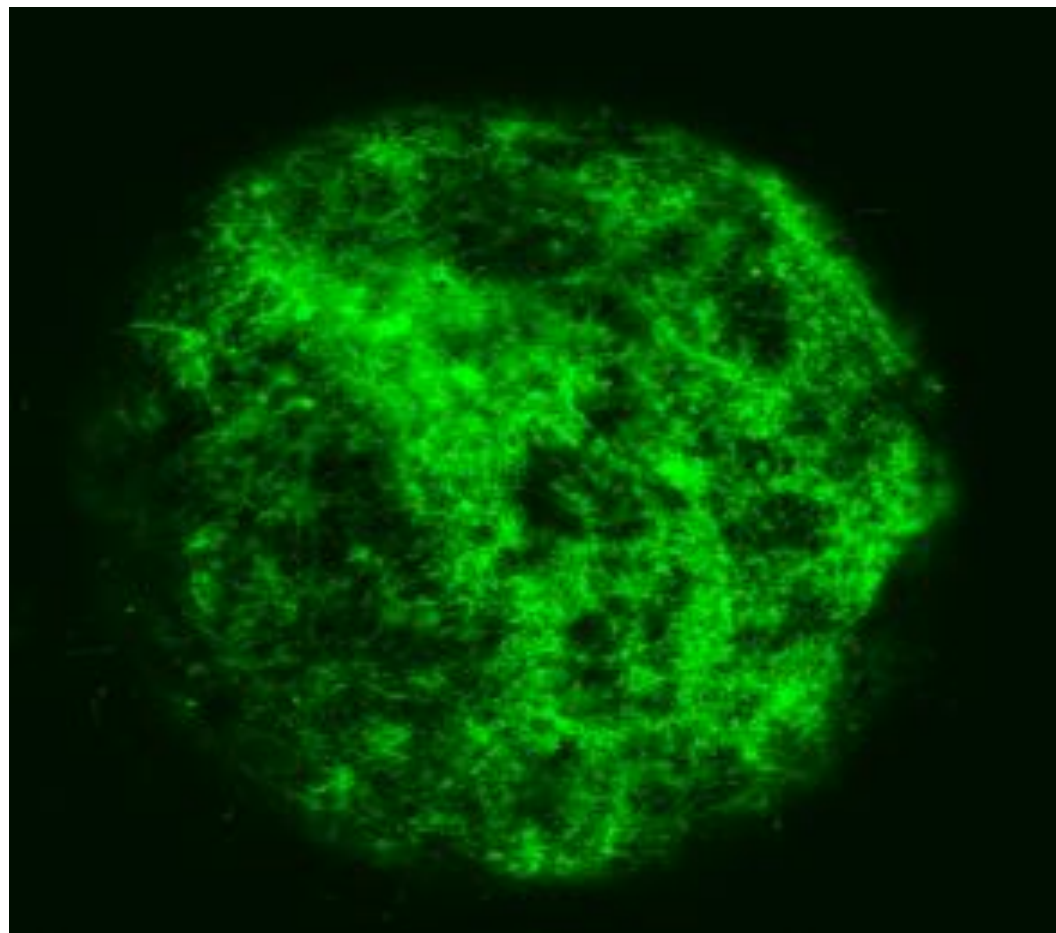
Složení vitrifikačních / warming kitů

Vitrifikace	RapidVit Oocyte	SAGE Vitrification Solutions	Kitazato
Kryoprotektanty	Propandiol, Ethylen glycol, (37°C)	DMSO, Ethylene glycol, Sucrose (RT)	DMSO, Ethylene glycol, Trehalose (RT)
Ostatní látky	MOPS, Gentamicin, HSA, ficoll, minimal release Ca ²⁺ composition	MOPS buffered HTF, amino acids, Gentamicin, HSA	HEPES, Hydroxypropyl cellulose, Gentamicin

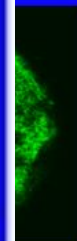
Warming	RapidWarm Oocyte	SAGE Vitrification Solutions	Kitazato
Kryoprotektanty	Sacharóza (37°C)	Sacharóza (RT) / 1M -> 0.5M	Trehalose (RT)
Ostatní látky	MOPS, Gentamicin, HSA	MOPS buffered HTF, amino acids, Gentamicin, HSA	HEPES, Hydroxypropyl cellulose, Gentamicin

Poškození oocytů během mrazení

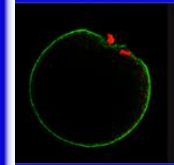
mikrofilamenta



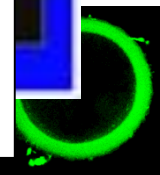
lamenta



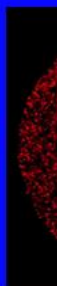
granula



icida



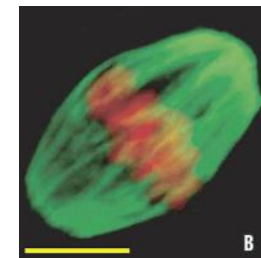
mi



de



Fyziologické aspekty vitrifikace oocytů

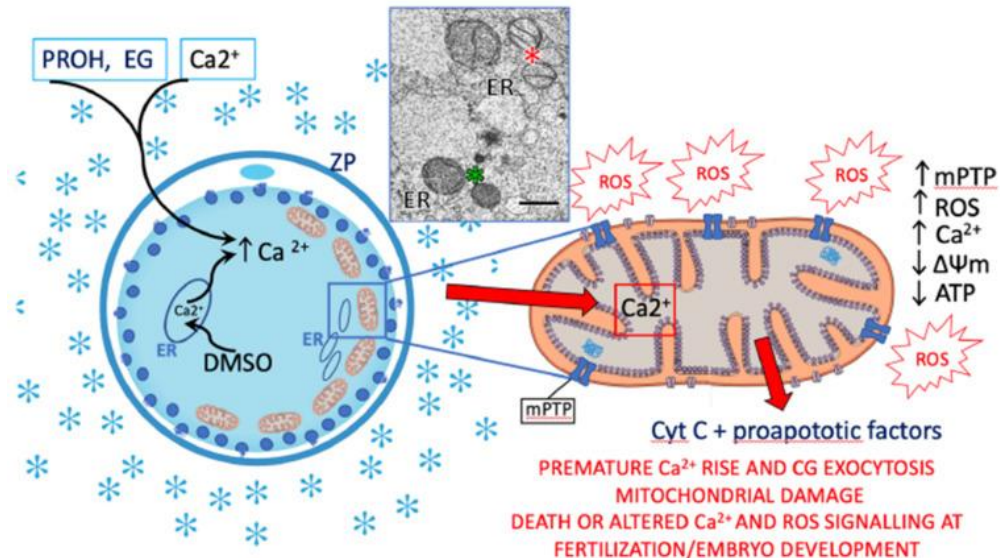


Dělicí vřeténko

- citlivé na změny teploty, bylo zjištěno, že zmizí během rozmražení po slow freezingu a později během **3 h znovu vzniká**
- regenerace vřeténka nastává během několika minut při 37°C, už od 33 °C se začíná vřeténko rozpadat
- MII myších oocytů: spindle se rozpadá krátce po rozmražení a následně znovu vzniká během 1 h po rozmražení
- přestože se během vitrifikace naruší integrita dělicího vřeténka, tak po rozmražení **po obnově buněčné homeostázy se změny opraví**
- stavbu dělicího vřeténka poškozují i kryoprotektiva
- platí že **nebyly zjištěny** chromozomální misegregace po vitrifikaci, vývojové malformace či defekty

Poškození organel oocytů – mitochondrie

- kryokonzervace způsobuje **mitochondriální disfunkci**
- rapidní průnik kryoprotektiv do oocytu může způsobit nevratné změny organel včetně mitochondrií
- kryoprotektiva (především s DMSO) spouští **uvolňování Ca** z endoplazmatického retikula a způsobuje abnormálně zvýšené hladiny mitochondriální Ca
- míra poškození mitochondrií určuje zda oocyt zemře nebo přežije
- poškození mitochondrií může vést ke změně Ca a signalizace ROS při oplodnění a ohrožení vývoje



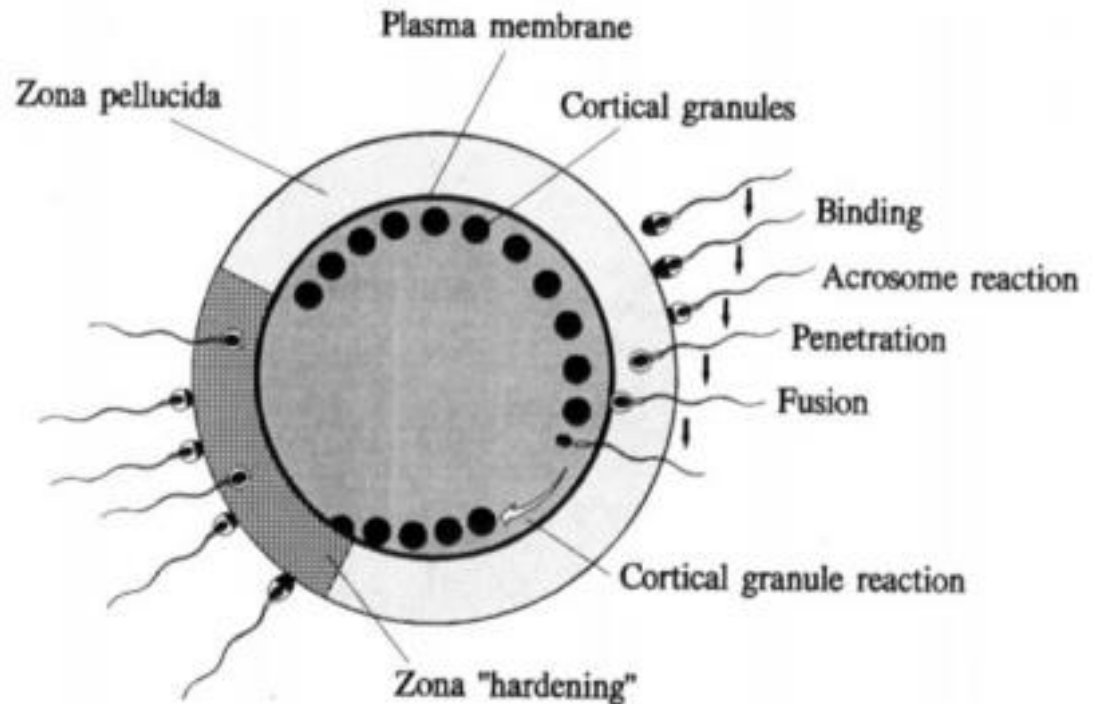
Fyziologické aspekty vitrifikace oocytů

Vápníková kaskáda a zona hardening

- oscilace vápníků jsou jiné u nemražených a mražených oocytů
- uvolňování Ca z ER
- vitrifikovaných i slow-freeze jsou nižší frekvence a delší doba trvání
- bylo zjištěno že nastává předčasný *zona hardening* (způsoben pravděpodobně kryoprotektivy)
- DMSO samotný u myši způsobuje *zona hardening*
- vitrifikované oocyty mají odolnější ZP vůči chymotrypsinu
- u potkanů bylo zjištěno že DMSO nebo EG způsobuje vylití kortikálních granulí

Poškození organel oocytů – zona pellucida

- trilaminární vrstva glykoproteinů
- kryokonzervace někdy způsobí ZP hardening způsobený předčasným vylitím kortikálních granul do perivitelinního prostoru
- **přidání proteinů** do kryokonzervačních médií snižuje efekt *zona hardening*



Fyziologické aspekty vitrifikace oocytů

Genová exprese

- koncentrace kryoprotektiv a jejich složení ovlivňuje genovou expresi oocytů
- byly zjištěny i rozdíly mezi typy kryoprezervace (slow freezing snižuje geny chromozomové struktury a **regulace buněčného cyklu**, vitrifikace snížila expresi regulátorů **ubikvitinace**)
- epigenetické změny nalezené v rozmražených oocytech by mohly být vysvětlením downregulace exprese genů (u zvířat i lidí)
- ovlivnění epigenetických mechanismů regulace buněčného cyklu a zásah do regulace apoptózy, u lidí byly nalezeny v procesu **ubikvitinace**
- **narušení regulace ubikvitinace** může ovlivnit obsah proteinů v oocytech a potenciálně vývojové schopnosti oocytů

Exprese genů oocyty

- oocyty podrobené buď vitrifikaci nebo pomalému zmrazení, vykazují transkriptomické změny, protože obě metody generují modifikace v profilu genové exprese lidských oocytů MII (downregulaci několika genů souvisejících s vývojem embrya, energetickými drahami, integritou DNA a buněčným cyklem), tyto změny jsou výraznější u pomalého zmrazení
- vitrifikace může ovlivnit imprinting esenciálních genů, jako jsou **GTL2 a PEG3 a snižuje expresi PTEN** v oocytu
- sekvenování jednobuněčné RNA ukázalo, že postup vitrifikace lidských oocytů **snížil genovou expresi** ve srovnání s čerstvými oocyty

Epigenetika oocyty

- pomalé zmrazování **zvyšuje** trimethylaci histonu H3 na lysinu 27 (H3K27me3) a **snižuje** trimethylaci histonu H3 na lysinu 4 (H3K4me3), což by mohlo narušit vývoj myšího embrya
- myší oocyty podrobené vitrifikaci vykazují zvýšené hladiny demethylace histonu H3 v lysinu 9 (H3K9me2) a zvýšení acetylace histonu 3 na lysinu 5 (H3K5ac)
- bovinní blastocysty z vitrifikovaných oocytů vykazují sníženou úroveň **methylace genomu**
- prasečí oocyty podrobené vitrifikaci vykazují hyperacetylaci histonu 4 dvě hodiny po rozmrazení, zvýšení methylace histonu 3

- většina epigenetických změn byla pozorována u vitrifikace nezralých oocytů (stadium GV) následované krokem zrání *in vitro*, o kterém je známo, že snižuje následný vývoj embryí

Vápník

- vitrifikované/zahřáté oocyty vykazující změny amplitud a frekvencí Ca ve srovnání s čerstvými oocyty
- podporují aktivační kompetenci těchto oocytů, přičemž míra oplodnění je srovnatelná
- kryokonzervace spermií má také vliv na obsah PLCz

Fyziologické aspekty vitrifikace oocytů

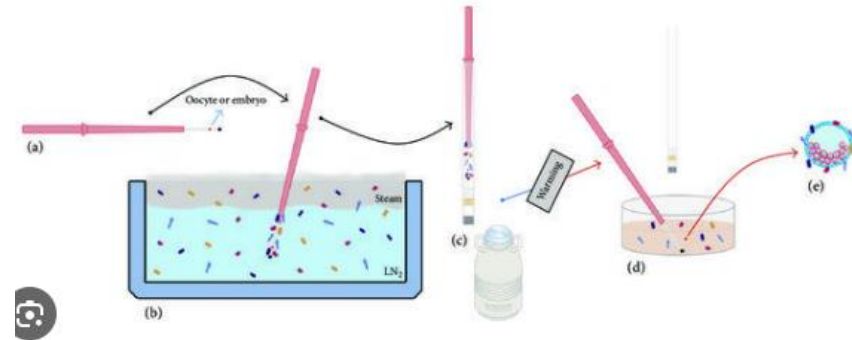
Metabolismus

- u bovinních embryí zjištěn výrazně **pomalejší metabolismus** po kryo
- slow freezing má výrazně horší dopad na metabolismus než vitrifikace, což je pravděpodobně dáno poškozením mitochondrií
- během vitrifikace dochází k poškození plazmatické membrány – kvantifikace laktát dehydrogenázy (**LDH** - mákrk neporušenosti plazmatické membrány)
- bylo zjištěno, že po slow freezingu byl staticky zvýšený obsah LDH na rozdíl od vitrifikace
- embrya po vitrifikaci lze znova mrazit u myší takto embrya přežila 4 cykly a vyvíjela se na 31,5 % (nemražená se vyvíjela na 51,7 %) na rozdíl od slow freezingu, kdy embrya nepřežila 3 cykly

Poškození oocytů vliv CPA

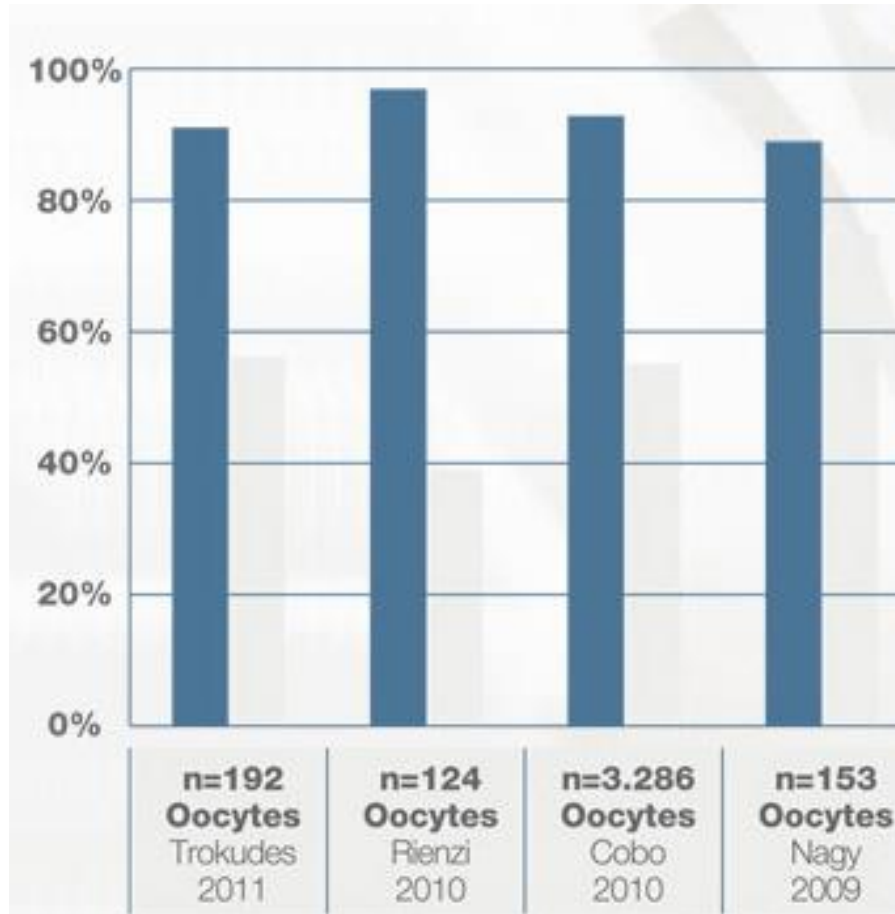
- použití **1,2-propandiolu** v pomalém zmrazování vyvolává změny v profilu exprese proteinů oocytů
- expozice oocytů hlodavců tomuto činidlu zvyšuje intracelulární kalcium, ROS, *zona pellucida* a snižuje přežití oocytů
- mražení způsobuje pokles kortikálních granulí, zvýšenou vakuolizaci, změny mitochondrií
- pomalé zmrazování může vyvolat vyšší a trvalejší intracelulární elevaci Ca^{2+} ve srovnání s kontrolními a vitrifikovanými lidskými oocyty, což naznačuje poškození Ca^{2+} kaskády

Open vs closed system



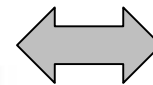
- obavy z otevřené vitrifikace kvůli riziku křížové kontaminace a přenosu chorob kapalným dusíkem
- uzavřený systém může mít za následek méně účinné zmrazení oocytů kvůli snížené rychlosti chlazení (23 000 C/min vs 1000 C/min)
- **lepší zachování ultrastruktury oocytů v otevřeném systému**
- prospektivní studie oocytů sourozeneckých dárcyň zmrazených oběma technikami - kromě míry přežití (82,9 % vs. 91,0 %) nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v míře klinického těhotenství a počtu živě narozených dětí mezi closed a open
- roce 2018 byla provedena metaanalýza a zjistila srovnatelné kryopřežití, klinické těhotenství a míru živě narozených dětí

Prezivani oocytu po vitrifikaci



KITAZATO

Dibimed



Vitrolife 

MED

Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method

Ana Cobo, Ph.D.,^a Masashigue Kuwayama, Ph.D.,^b Sonia Pérez, Ph.D.,^a Amparo Ruiz, M.D.,^a Antonio Pellicer, M.D.,^a and José Remohí, M.D.^a

^aIVI Universidad de Valencia, Valencia, Spain; and ^bKato Ladies Clinic, Nushishinjuku, Shinjuku, Tokyo, Japan

Embryo quality.

	Vitrified	Fresh	P value
Cleavage rate day 2 embryos (%)	161/171 (94.2)	176/180 (97.8)	.083
No. of cell day 2 embryos (mean ± SD)	3.8 ± 1.1	3.9 ± 1.5	.567
Good quality day 2 embryos (%)	136/161 (84.4)	126/176 (71.5)	.005
Cleavage rate day 3 embryos (%)	125/161 (77.6)	149/176 (84.6)	.098
No. of cell day 3 embryos (mean ± SD)	6.9 ± 2.3	6.9 ± 2.7	.558
Good quality day 3 embryos (%)	101/125 (80.8)	120/149 (80.5)	.956
No. of embryo undergoing extended culture	78	143	
Blastocyst rate No. (%)	38/78 (48.7)	68/143 (47.5)	.869
Good quality blastocysts No. (%)	24/32 (81.1)	42/60 (70)	.612

Klinické těhotenství po vitrifikaci

Author	Study design	Mean age at freezing	Target population	Method	Number of patients	Number of oocytes	Mean embryos	Day transfer	SR (%)	FR (%)	IR (%)	CP/T (%)	LB/T (%)
Cobo <i>et al.</i> Spain [15]	Randomization appropriate for comparing clinical outcome	26.7 ± 3.9	Oocyte donors	VF	295	3286	1.7	3	92.5	74.2	39.9	55.4	49.1
		26.6 ± 3.8		Fresh	289	3185	1.7		NA	73.3	40.9	55.6	48.3

Perinatologická data – FET vs KET



Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes

Ana Cobo, Ph.D., Vicente Serra, M.D., Nicolás Garrido, Ph.D., Inés Olmo, M.D., Antonio Pellicer, M.D., and José Remohí, M.D.

Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

Obstetric and perinatal outcomes.

	Fresh oocytes (N = 996)	Vitrified oocytes (N = 804) ^a	P value
Pregnancy outcome			
1 st trimester bleeding	287 (28.8)	267 (33.2)	.045
Invasive procedures ^b	94 (9.4)	124 (15.4)	< .001
Anemia (Hb <11 g/dL)	61 (6.1)	52 (6.5)	NS
Gestational cholestasis	18 (1.8)	19 (2.4)	NS
Diabetes	94 (9.4)	75 (9.3)	NS
2 nd & 3 rd trimester bleeding	62 (6.2)	69 (8.6)	NS
PROM <37 wk	64 (6.4)	44 (5.5)	NS
Pregnancy-induced hypertension	122 (12.2)	103 (12.8)	NS
Urinary tract infection	77 (7.7)	38 (4.7)	< .03
Delivery outcome			
Weeks at delivery	38.2 (38.0–38.4)	38.2 (38.0–38.4)	NS
Preterm births (<37 wk)	226 (22.7)	175 (21.8)	NS
Very preterm births (<34 wk)	61 (6.1)	37 (4.6)	NS
Cesarean section	608 (61.0)	546 (67.9)	< .001
Puerperal problems	69 (6.9)	51 (6.4)	NS

Recentní pokrok v kryo oocytů

ASSISTED
REPRODUCTIVE
TECHNOLOGY
& ARTIFICIAL
INTELLIGENCE



1. nová technologie **využívá AI** pro predikci oplodnění a počtu živě narozených dětí ze zmrazených oocytů - třídění oocytů se provádí ze snímků zralých oocytů porovnaných databází dříve kryokonzervovaných vajíček dávajících blastocystu
2. **AI selekce** může zlepšit predikci potenciálu vývoje embryí a výsledku těhotenství cyklů ICSI pomocí zmrazených a rozmražených oocytů
3. **automatizovaná vitrifikace** by mohla zlepšit výsledky mražení oocytů
4. hodnocení kvality oocytů před kryokonzervací lze provést vizualizací vřetének v oocytech metafáze II nebo měřením velikosti vřeténka pomocí polarizačního mikroskopu (**poliskopu**)
5. **biopsie polárních tělísek** před kryokonzervací oocytů může být také použita pro predikci euploidních embryí a budoucích výsledků těhotenství. Oocyty s euploidním prvním polárním tělískem mají větší šanci na vznik blastocysty



Onkologické pacientky a vitrifikace oocytů

- cca 10 % žen reprodukčního věku má malignity
- s rozvojem terapie malignit se zvýšila poptávka po efektivní kryokonzervaci oocytů
- většina chemoterapií je gonadotoxická, radioterapie také poškozuje ovária
- konvenční ovariální stimulace předsatvuje zpoždění o 2-3 týdny
- proto vhodné udělat *random start* ovarian stimulaci a využít folikulární vlny
- ovariální stimulace může být zahájena náhodně v kterýkoli den menstruačního cyklu, aniž by došlo ke snížení výtěžnosti oocytů a aniž by byla ohrožena naléhavost a bezpečnost léčby rakoviny.

Onkologické pacientky a vitrifikace oocytů

- další možností je duální stimulace
- možnost je i odběr nezralých oocytů (špatná efektivita IVM)
- ženám s genovou mutací rakoviny prsu (BRCA1/2), které plánují **profylaktickou ooforektomii** k prevenci rakoviny vaječníků, může být nabídnuta kryokonzervace oocytů
- ženy s rizikem ovarialní insuficience v důsledku genetických stavů, jako je premutace fragilního X, Turnerův syndrom a delece chromozomu X, jsou vhodnými kandidátkami na zmrazení vajíček před následným selháním vaječníků



Social freezing



- Zaměstnanecký benefit velkých korporací (Apple, Facebook)

hrazení nákladů do 20 000 USD (10 000 mražení + 1000 USD/rok skladování)

významný především věk ženy – průměr 30 let, optimální do 26 let (u žen nad 40 nemá smysl)

2nd International Symposium on Social Egg Freezing Barcelona 2015

Izrael : ženám mezi 30 - 41 lety, pokud se bojí poklesu plodnosti, umožněno podstoupit čtyři odběrové cykly, nebo odběr dvaceti oocytů. Takto vzniklá embrya pak mohou být transferována ženě až do věku 54 let

Social freezing

- veřejný průzkum prezentovaný na ESHRE 2014,
- Lallemant et al.2013, Complete Fertility Centre of Princess Anne Hospital, Southampton,
- 973 žen průměrný věk 31 let
- září 2012-září 2013

- 89,1% žen souhlasí s mražením ze sociálních důvodů
- pouze 19 % vážně uvažuje o zmražení vlastních oocytů
- osobní kariéra nebyla tak významný faktor jako věk a absence partnera u žen do 35 let

Ve Velké Británii v roce 2012 vzniklo asi 580 embryí z vitrifikovaných oocytů. Tyto embrya byla transferována ve 160 cyklech – do konce roku 2012 se narodilo 20 dětí.

Počet zamražených oocytů

- zásadním faktorem ovlivňujícím úspěšnost social freezingu je počet zralých (metafáze 2) zmražených oocytů
- zmrazení příliš malého počtu oocytů je málo efektivní
- zmrazení příliš velkého množství - zbytečné výdaje, nepříznivé účinky na zdraví, nároky na skladovací prostory a plýtvání oocyty (pokud jsou nevyužity)
- více než **8 oocytů** by mělo být zmrazeno, aby se zlepšila budoucí míra těhotenství (Rienzi et al. 2012)
- Doyle a kol. (2016) doporučuje kryokonzervovat **15–20 zralých** oocytů u žen ve věku <38 let (70–80% šance na alespoň jedno živě narozené dítě) a 25–30 zralých oocytů ve věku nad 38 let (65–75% šance na alespoň jedno živě narozené dítě).
- pacientky by měly mít přibližně **20 zralých oocytů** pro reálnou šanci na porod živého dítěte (ESHRE)

Ideální věk pro mražení vajíček

- nejkritičtějším faktorem je věk při zmrazení
- zmrazení vajíček v mladším věku může maximalizovat množství a kvalitu oocytů ale je méně pravděpodobné, že je pacientka v budoucnu využije
- mrazení v pokročilém věku vyžaduje **větší počet cyklů** odběru oocytů, čímž se zvyšuje fyzická, psychická i finanční zátěž pacientky, často vede ke zmrazení zvýšeného počtu méně kvalitních oocytů
- měla by existovat **rovnováha** mezi požadovanými přínosy a nákladovou efektivitou (?)
- míra živě narozených dětí ve věku <35 let byla významně vyšší než ve 35 letech (23,8 % vs. 12,0 %) u žen podstupující plánovanou OC
- 30-35 let je rozumnou věkovou skupinou pro mražení oocytů (mladší - u žen se sníženou ovariální rezervou nebo s předčasnou ovariální insuficiencí) ?
- nejčastější věk žen používajících rozmražená darovaná vajíčka je 43-45 let (UK)
- IVF zmrazených darovaných vajíček mají významně vyšší úspěšnost než u pacientek používajících vlastní vajíčka, a LBR je 30 % na léčebný cyklus, u vlastních vajíček pacientky je to 18 %

Freezing eggs

A woman is the most fertile between the ages of 20 and 30. After 35 years of age, the egg quality and fertility fall sharply. At the age of 40, only about 20% of women become pregnant without difficulty. In order for a woman to have a baby at an older age, we recommend freezing the eggs ideally by 30 years old and at a maximum of 35 years old. Of course, a woman can always try to conceive naturally, and she may never use the frozen eggs.

Pro koho je zmrazení vajíček vhodné?

- Pro ženy ve věku 25 – 35 let, které v budoucnu plánují rodinu, ale aktuální okolnosti jim to neumožňují (zmrazení je možné i po 35. roce, platí ale, že čím dříve, tím lépe).
- Pro ženy, které čeká invazivní léčba (např. chemoterapie) negativně ovlivňující kvalitu vajíček.
- Pro ženy, které musí podstoupit odebrání vaječníků, nebo je trápí jiné onemocnění zasahující reprodukční soustavu.

Zamražení vajíček

Žena je nejplodnější mezi 20. a 30. rokem života. Po 35. roce kvalita vajíček a plodnost výrazně klesá. Aby mohla mít vlastní dítě i ve vyšším věku, je možné, aby si ideálně do svých 30 let nechala zamrazit vajíčka. V případě, že je žena zdravá tak samozřejmě může otěhotnět i přirozenou cestou a zamražená vajíčka nemusí nikdy použít.

Obsah stránky

Pro koho je
kryokonzervace vajíček
vhodná?

Jak probíhá
kryokonzervace?

Pro koho je kryokonzervace vajíček vhodná?

pro ženy do 30 let věku

Zmrazení vajíček v mladém věku zaručuje nejvyšší kvalitu buněk. Je to skvělá prevence pro případ, že by ve vašem životě později nastal jakýkoliv zdravotní problém. Kryokonzervaci lze samozřejmě provést i ve vyšším věku, vajíčka však již nemusí být v nejlepší možné kvalitě.

Banka vajíček

- v programech dárcovských oocytů pro ženy s nízkou ovariální rezervou neúspěšným oplodněním IVF a ženy po menopauze
- **zjednodušuje logistiku** cyklu ART díky minimální koordinaci, protože není nutná synchronizace mezi menstruačním cyklem příjemkyně a dárkyně
- **karanténa oocytů** - čas pro screening infekčních onemocnění
- **snižuje náklady na cyklus** darování oocytů díky efektivnímu přidělování oocytů mnoha příjemkyním ze skupiny dárkyň a zkracuje dobu do otěhotnění
- dárcovské oocyty lze **snadno přepravovat** z jednoho centra do druhého, což zjednodušuje postup IVF léčby

- prospektivní studii, která byla provedena za účelem porovnání výsledků cyklů čerstvých a vitrifikovaných dárcovských oocytů, nebyl nalezen signifikantní rozdíl v míře oplodnění (80,7 % vs. 78,2 %) a míře klinického těhotenství (40,8 % vs. 33,3 %) mezi fresh a cryo oocyty

MUNI
MED

Děkuji Vám za pozornost !

