

А.В. БАЧУРИН, О.В. ШУРЫГИНА, О.О. ПОПОВА,
В.В. ЖИЗНИН, А.С. ШУРЫГИНА

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАБЫСТРОЙ РАЗМОРОЗКИ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ВИТРИФИКАЦИИ (обзор литературы)

***Ключевые слова:** вспомогательные репродуктивные технологии, ооциты, эмбрионы, витрификация, ультрабыстрая разморозка, бластоцисты.*

Выживаемость ооцитов, используемых в рамках вспомогательных репродуктивных технологий, в значительной мере зависит от динамики температурных показателей, в том числе от скорости их разморозки после витрификации. Проведен анализ литературных данных о возможностях применения современных методов разморозки ооцитов после их витрификации в базах данных отечественных и международных научных библиотек. Относительно недавно были проведены пилотные исследования по применению сокращенных по длительности протоколов разморозки, продемонстрировавшие обнадеживающие эмбриологические результаты в отношении выживаемости бластоцист. Воздействие осмотического стресса на клетки во время разморозки может привести к повреждению микротрубочек, органелл, мембран и, в итоге, к лизису клеток. Представлены экспериментальные данные о том, что при ультрабыстрой разморозке выживает более 90% ооцитов. По мнению некоторых исследователей, ультрабыстрая скорость нагрева предотвращает рекристаллизацию мелких внутриклеточных кристаллов льда, образовавшихся при охлаждении. Показано, что сочетание низкого уровня внутриклеточных криопротекторов после витрификации и низких концентраций сахарозы может служить основой для применения одноступенчатых методов быстрой разморозки бластоцист. Приведены данные о влиянии методов замораживания и разморозки на ультраструктурные характеристики ооцитов. Рассмотрены результаты исследований, в которых оценивалась клиническая эффективность применения различных методов разморозки клеток. Проведенный анализ литературных данных свидетельствует, что использование методов сверхбыстрой разморозки ооцитов способствует поддержанию высокого уровня их жизнеспособности, оплодотворения и развития эмбрионов. Применение этого подхода позволяет оптимизировать и стандартизировать процедуру разморозки ооцитов.

Введение. Несмотря на широкое использование в последние годы метода витрификации ооцитов, из клинической практики известно, что после размораживания способными к оплодотворению остаются менее 80% клеток [10, 25]. Витрификация представляет собой сверхбыстрый процесс охлаждения клеток (тканей), приводящий к стеклообразному затвердеванию биологических структур без образования кристаллов. Для его реализации применяются высококонцентрированные криопротекторы (КП), обезвоживающие ооциты в процессе сверхбыстрого охлаждения клеток, что предотвращает образование межклеточных и внутриклеточных кристаллов льда [6, 21, 33].

Если первоначально метод сверхбыстрого замораживания рассматривался лишь в качестве альтернативы традиционной «медленной заморозке» ооцитов [1, 8, 9], то в дальнейшем специалисты стали придавать витрификации все большее значение как предпочтительному подходу к консервации [1, 3, 8].

В настоящее время витрификация признана «золотым стандартом» криоконсервации во всем мире, при этом используются различные коммерческие наборы реактивов для проведения этих процедур [23]. Среди разрешенных к применению сред для замораживания ооцитов в репродуктивной медицине каждый производитель крионаборов, как правило, рекомендует использовать только собственные продукты, тогда как используемые растворы характеризуются незначительными вариациями составов [32]. Безусловно, необходимо снижать межлабораторную вариабельность результатов. Это позволяет более точно оценивать клиническую эффективность и безопасность применения метода, в том числе при использовании комбинированных схем охлаждения и разморозки клеток.

Следует учитывать, что, вопреки устоявшемуся мнению, способность пережить витрификацию до -196°C и последующее размораживание в большей степени зависит от предварительного обезвоживания ооцита (как правило, осмотического) до критического уровня содержания воды, чем от типа или концентрации КП внутри клетки. При этом на выживаемость обезвоженных ооцитов также существенно влияет скорость их размораживания [14, 35].

В настоящее время отсутствуют сведения о физико-химических механизмах, определяющих взаимосвязь между содержанием внутриклеточной воды, температурой и кинетикой рекристаллизации льда при размораживании ооцитов. Недостаточно изученным представляется влияние процесса размораживания на возникновение повреждений в клетках, которые потенциально могут привести к нарушениям развития эмбриона. При этом некоторые из подобных изменений могут проявиться спустя годы или произойти у потомства и последующих поколений [8, 23].

Цель работы – анализ литературных данных о возможностях применения современных методов разморозки ооцитов после процедуры их витрификации.

Проведен обзор публикаций о современных методах разморозки ооцитов в рамках процедур их витрификации в англо- и русскоязычных базах данных отечественных и международных научных библиотек: eLIBRARY, PubMed, Scopus. Проанализировано 170 литературных источников, из которых был отобран 41 процитированный в публикации источник. Критерием отбора являлось наличие сведений о технических аспектах и результатах экспериментальных и клинических исследований по применению методов разморозки ооцитов. Поиск осуществлялся по ключевым словам: ооциты, бластоциты, выживаемость, витрификация, криопротекторы, ультрабыстрая разморозка. Использован комплекс исследовательских методов, сочетающий общенаучные (анализ и синтез литературных данных, метод сравнительной аналогии, извлечение информации из научных источников) и специальные методы (системный и сравнительный анализ).

Общие сведения об этапе разморозки витрифицированных ооцитов.

С момента первой беременности после переноса размороженного эмбриона в 1983 г. протоколы криоконсервации значительно усовершенствовались, и в течение последних лет витрификация практически полностью вытеснила медленное замораживание [7, 25, 33].

Витрификация основана на использовании высоких концентраций КП и сверхбыстрых скоростей охлаждения или разморозки, что приводит к переходу клеток в стеклообразное состояние без образования кристаллов льда. Эта технология произвела революцию в криоконсервации при использовании вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), обеспечив значительное

более высокую выживаемость ооцитов и эмбрионов и, в конечном счете, лучшие показатели их способности к оплодотворению по сравнению с медленным охлаждением.

Этапы витрификации и размораживания ооцитов занимают значительное время, требуя последовательного выполнения нескольких строго регламентированных по длительности этапов. На фоне стремительного роста количества выполняемых процедур витрификации в условиях высокой нагрузки на эмбриологические лаборатории закономерно встал вопрос об оптимизации длительности выполнения этих процедур. Большинство протоколов витрификации или разморозки занимают 15–20 мин [26, 28]. В последние годы появились полуавтоматические системы витрификации, использование которых способствует стандартизации и ускорению процесса. Относительно недавно были проведены пилотные исследования по применению методов с сокращенной длительностью разморозки, продемонстрировавшие обнадеживающие показатели выживаемости бластоцист [20, 22, 37].

Этап разморозки клеток исторически считался менее критичным, чем охлаждение, в связи с чем данному этапу было посвящено относительно небольшое количество исследований. Как правило, применяли последовательную схему, обратную процессу витрификации: постепенное удаление КП и регидратацию клеток за счет их последовательного переноса в среды с уменьшающейся концентрацией сахарозы. Эта концепция многоэтапного восстановления основана на результатах относительно ранних исследований криоконсервации ооцитов, в которых не использовалась сахароза, а применялось лишь постепенное снижение концентрации КП. Таким образом, происходила поэтапная разморозка клеток [34]. Однако при отсутствии контроля процесса воздействие осмотического стресса на клетки во время разморозки может привести к повреждению микротрубочек, органелл, мембран и, в итоге, к лизису клеток [41].

Скорость разморозки ооцитов как значимый фактор выживания ооцитов при витрификации. В ряде исследований оценивалась скорость размораживания, при этом была показана критическая важность максимальной скорости нагрева. Некоторые авторы предполагают, что скорость размораживания играет более значимую роль для выживаемости клеток, чем скорость охлаждения [14, 35, 40]. Тем не менее в литературе практически отсутствуют данные о продолжительности экспозиции клеток в растворах с понижающимися концентрациями КП.

В экспериментах на мышинных ооцитах было показано, что более 90% ооцитов и эмбрионов выживают после их относительно медленного охлаждения даже в растворах, содержащих треть стандартной концентрации КП при условии сверхбыстрого размораживания – со скоростью 117 000° С/мин за счет использования энергии лазерного импульса [13].

Исследования на ооцитах мышей также продемонстрировали, что защитный механизм действия КП обусловлен их способностью обеспечивать осмотическое выведение значительной части внутриклеточной воды перед охлаждением. Установлено, что при помещении ооцитов или эмбрионов в раствор сахарозы с концентрацией 1 моль/кг (непроникающий КП) происходит потеря клетками до 85% внутриклеточной воды менее чем за 2 мин. Если затем клетки быстро охладить до –196°С, то почти 90% из них остаются жизнеспособными после размораживания при условии осуществления ультрабыстрой разморозки [13]. В. Jin, Р. Mazur (2015) выдвинули гипотезу, что выживаемость клеток

при витрификации и размораживании в большей степени зависит от доли внутриклеточной воды, удаленной перед началом охлаждения, чем от количества КП, проникшего внутрь клетки [14].

В. Jin et al. (2014) использовали среду для витрификации EAFS1, которая содержит смесь проникающих (этиленгликоль (ЭГ) и ацетамид) и непроникающих КП (фиколл, сахароза и соли). При трехкратном разведении этой среды авторы продемонстрировали выживаемость ооцитов мыши более 90% при условии последующей ультрабыстрой разморозки витрифицированных образцов [13].

S. Seki, P. Mazur (2012) оценивали выживаемость ооцитов двумя методами: морфологическую определяли по целостности мембраны, осмотической реактивности и нормальной морфологии клеток, а функциональную – по их способности к оплодотворению *in vitro* и развитию до стадии двухбластомерных эмбрионов и экспандированных (увеличенных в размере) бластоцист в культуре. Авторы обратили внимание на то, что, во-первых, при ультрабыстром размораживании с использованием лазера выживало почти 90% клеток, даже при использовании среды с относительно высоким содержанием воды – 0,53 г воды/г общей массы клетки. Для разбавленных растворов EAFS оптимальное отношение массы воды составляло около 0,35 г/г. Во-вторых, независимо от содержания воды все ооциты погибали при размораживании в 100 раз медленнее, без использования лазерного импульса [35].

Характеристики криопротекторов при использовании различных протоколов разморозки ооцитов. Были предложены различные концентрации КП и сроки экспозиции, однако до настоящего времени доказательная база преимуществ применения различных веществ в отношении влияния на результат разморозки ооцитов остается недостаточной. Можно предположить, что основная часть КП удаляется уже на первом этапе размораживания, что ставит под сомнение целесообразность использования нескольких последовательных резервуаров с понижающейся концентрацией КП. Сведения об их более низкой внутриклеточной концентрации после витрификации по сравнению с медленным замораживанием подтверждают эту гипотезу. Кроме того, предполагают, что опасения, связанные с использованием высоких уровней сахарозы и осмотическим стрессом, существенно не влияют на результаты разморозки ооцитов и бластоцист [39].

В ряде работ было показано, что разморозку клеток можно эффективно проводить при низкой концентрации сахарозы (0,25 М вместо 1 М) [16, 19]. Таким образом, именно сочетание более низкого уровня внутриклеточных КП после витрификации с опытом применения низких концентраций сахарозы может служить обоснованием для применения одноэтапных методов быстрой разморозки бластоцист.

Так, J. Manns et al. (2022) провели проспективное рандомизированное исследование с использованием 71 бластоцисты, в котором проводилось сравнение применения одноэтапного ультрабыстрого и стандартного методов разморозки. При этом различий по показателям выживаемости клеток выявлено не было [20].

В работе J. Guns, A. Ahlstrom (2022) приведено сравнение использования различных концентраций сахарозы при выполнении протокола ультрабыстрой разморозки клеток. Авторами было установлено, что как низкая, так и высокая

концентрации сахарозы обеспечивают достаточно высокие показатели выживаемости, сопоставимые с таковыми при использовании стандартного метода разморозки [12].

Известно, что поскольку и витрифицированные, и медленно замороженные ооциты имеют сходные характеристики цитоплазмы, некоторые авторы считают возможным использовать один и тот же протокол нагревания. Более того, при любой заданной концентрации КП скорость нагревания значительно превышает критическую скорость охлаждения, следовательно, минимальная концентрация КП, предотвращающая кристаллизацию при нагревании, должна быть выше, чем при охлаждении [38]. При реализации большинства методов витрификации с использованием коммерческих наборов концентрация КП в первом нагревающем растворе составляет приблизительно 1 моль/л, таким образом, ее уровень выше, чем в замораживающем растворе [2, 3].

Следует отметить, что витрификация ооцитов все чаще применяется в мировой практике, однако к настоящему времени в криобанках клиник экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) хранится большое количество медленно замороженных ооцитов/эмбрионов. Более того, центры ЭКО, полностью перешедшие с медленного замораживания на витрификацию, могут по-прежнему получать медленно замороженные ооциты/эмбрионы из других центров, криоконсервированные с использованием различных протоколов. Целью исследования L. Parmegiani et al. (2014) явилась оценка методов нагревания и разморозки человеческих ооцитов. Проведено проспективное исследование 216 родственных ооцитов, рандомизированных в группы, в которых были применены стандартный метод быстрого нагревания и быстрой разморозки с использованием витрифицирующего раствора [27].

В качестве первичной конечной точки была использована морфологическая оценка выживаемости через два часа. Выжившие ооциты были разделены на две подгруппы: партеногенетически активированные и фиксированные, при этом авторы оценивали конфигурацию веретена/хромосом. Было установлено, что выживаемость ооцитов при использовании стандартного метода быстрого нагревания была выше (92/102, 90,2%), чем при быстрой разморозке с использованием витрифицирующего раствора (85/114, 74,6%; $p = 0,005$). Через 3 дня культивирования в быстро разогретых клетках по стандартному методу было отмечено больше бластомеров по сравнению с быстро размороженными ооцитами в витрифицирующих растворах ($p = 0,042$). Авторы отмечают, что мейотическое веретено деления и конфигурация хромосом не подверглись существенным изменениям при быстром нагревании или разморозке. По мнению авторов, полученные результаты свидетельствуют, что метод быстрого нагревания, предложенный в данном исследовании, потенциально применим также к медленно замороженным эмбрионам на любой стадии дробления [27].

Был предложен универсальный метод разморозки, основанный на поэтапном использовании экстрацеллюлярного КП (ЕССР) в концентрациях 1 М и 0,5 М, независимо от первоначального метода замораживания [29]. Подобная стратегия, предусматривающая комбинацию различных VIT/WARM-решений, продемонстрировала эффективность как при работе с клетками, подвергавшимися медленно замораживанию, так и с витрифицированными ооцитами. Метод успешно применялся в клинических условиях при сочетании различных наборов в работе с ооцитами человека [30, 31], эмбрионами на стадии дробления и бластоцистами [36].

В целом показана возможность гибкого применения универсального протокола размораживания независимо от бренда, типа КП и состава базовой среды. Таким образом, накопление клинических данных по использованию различных сочетаний крионаборов должно стимулировать эмбриологов к обмену опытом и тестированию новых комбинаций с целью создания прочной доказательной базы для внедрения универсального протокола разморозки, особенно в случаях юридических споров.

Влияние методов замораживания и разморозки на ультраструктурные характеристики ооцитов. Известно, что ультраструктурные повреждения ооцитов связаны с токсическим действием КП, образованием кристаллов льда и осмотическим стрессом [5, 24]. Следует отметить, что в ооцитах, криоконсервированных методом медленного замораживания, веретено деления защищается благодаря применению проникающих КП. Тем не менее изменения веретена деления и его дезорганизация были обнаружены в таких ооцитах при использовании процедуры быстрой разморозки [11]. В исследованиях с применением поляризационной микроскопии изменения веретена деления ооцитов, выявленные сразу после разморозки клеток, исчезали при последующем удалении КП и появлялись вновь через 3–5 ч культивирования [11]. Напротив, при витрификации мейотическое веретено деления и выравнивание хромосом сохранялись на протяжении всего процесса витрификации, нагревания и в последующем периоде пост-нагревания [6].

Исследование, проведенное на 359 медленно замороженных зиготах (эмбрионах первых суток развития) в Японии, подтвердило положительное влияние метода быстрого нагревания на развитие эмбрионов: скорость образования бластоцисты значительно увеличивалась, когда эмбрионы нагревались с помощью специальной среды, но не с помощью метода быстрой разморозки [15].

Клиническая эффективность применения различных протоколов разморозки клеток. В работе S. Canosa et al. (2022) оценивалась клиническая эффективность применения комбинации различных коммерческих наборов для разморозки витрифицированных бластоцист человека. Авторы провели когортное проспективное исследование, в рамках которого проанализировали 255 циклов размораживания бластоцист. Витрификация эмбрионов выполнялась с использованием набора Kitazato. Разморозка осуществлялась с применением трех наиболее распространенных коммерческих наборов: Kitazato, Sage и Irvine с предварительной стратификацией пациенток по источнику ооцитов. Первичной конечной точкой служил показатель выживаемости эмбрионов после разморозки бластоцист, вторичными – частота клинической беременности, живорождения и самопроизвольных выкидышей [4]. Авторы показали, что частота выживаемости эмбрионов была сопоставима во всех группах: 100% (47/47) в группе Kitazato, 97,6% (49/50) в Sage, 97,6% (41/42) в Irvine. Частота клинической беременности также статистически значимо не различалась и составила в этих группах соответственно 38,3% (18/47), 49% (24/49) и 47,4% (18/38) [4].

В работе I. Kuznyetsova et al. (2024) в четырех циклах разморозки ооцитов-близнецов MII, витрифицированных по стандартному протоколу в нулевой день (Vit Kit-Freeze NX, Irvine), клетки размораживались по стандартному ($n = 44$, Vit Kit-Warm NX, Irvine) или ультрабыстрому ($n = 30$) протоколу. Ооциты MII первого дня ($n = 7$) были витрифицированы с использованием стандартной процедуры, затем подверглись быстрой разморозке. Ультрабыстрая разморозка

представляла собой нагревание клеток в течение 1 мин в размораживающем растворе (TS, Vit Kit-Warm NX, Irvine) с последующим переносом ооцитов в питательную среду Global HP. В течение 2,5 ч после оттаивания ооцитов производилась интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида. По результатам ЭКО 98,0% (50/51) ооцитов выжили после применения метода сверхбыстрой разморозки, при этом 88,2% ооцитов восстановили структуру в течение 1 ч.

В целом проведенное исследование показало, что сверхбыстрая разморозка ооцитов на стадии метафазы II не снижает их выживаемость и потенциал развития по сравнению со стандартным протоколом нагревания [17].

В работе J. Lammers et al. (2025) оценивались результаты применения ультрабыстрого метода разморозки бластоцист. На первом этапе авторами была проведена оценка экспрессии основных маркеров клеток в подгруппе бластоцист после их разморозки по такому протоколу. Далее было выполнено проспективное пилотное исследование, в котором сравнивались частота выживаемости, реэкспансии (повторного расширения) и частоты живорождений между стандартным (3 этапа, 15 мин) и ультрабыстрым алгоритмом разморозки (1 этап, 2 мин).

Были оценены показатели выживаемости, реэкспансии, частоты живорождений для ооцитов, размороженных по ультрабыстрому протоколу, которые сравнивали с аналогичными показателями при использовании стандартного алгоритма. Иммунофлуоресцентное исследование показало, что окраска и пространственная организация маркеров клеточной дифференцировки сохранялись при применении ультрабыстрого протокола. По результатам пилотного исследования показатели выживаемости, реэкспансии ооцитов и частоты живорождений были полностью сопоставимы в группах стандартного ($n = 47$ циклов) и ультрабыстрого ($n = 39$ циклов) протоколов разморозки: 100% против 100%, 80% против 76% и 29,8% против 30,7% соответственно [18].

В течение последующих 3 месяцев использования метода ультрабыстрой разморозки (321 цикл, 336 эмбрионов) показатели выживаемости, повторного увеличения бластоцист в размерах и живорождений были сопоставимы с данными, полученными в стандартном протоколе в течение предшествующих 6 месяцев (547 циклов переноса размороженных бластоцист, 578 эмбрионов): 97,6% и 29,6% против 97,8% и 28,3% соответственно ($p > 0,05$ для обоих сравнений). Авторы заключили, что применение ультрабыстрого протокола разморозки бластоцист обеспечивает аналогичные эмбриологические и клинические результаты по сравнению со стандартным протоколом, но значительно сокращает длительность технической процедуры [18].

Обсуждение. В настоящее время общепризнанно, что выживаемость после витрификации ооцитов, используемых в рамках программ ВРТ, в значительной мере зависит от динамики температурных показателей, в том числе от скорости их последующей разморозки.

На фоне стремительного роста количества выполняемых процедур витрификации в условиях высокой нагрузки на эмбриологические лаборатории закономерно встал вопрос об оптимизации длительности выполнения этих процедур. В течение нескольких десятилетий использовалась преимущественно ступенчатая схема разморозки ооцитов, обратная процессу витрификации: постепенное удаление КП и регидратация клеток за счет их последовательного переноса в среды с уменьшающейся концентрацией сахарозы. В последние годы исследователи все больше внимания уделяют такому аспекту, как скорость нагрева

при разморозке, поскольку считают, что этот процесс может в значительной степени повлиять на качество ооцитов. При этом важную роль играют защитные свойства используемых КП. Предполагается, что ультрабыстрая скорость нагрева клеток предотвращает рекристаллизацию мелких внутриклеточных кристаллов льда, образовавшихся при охлаждении. Продемонстрировано, что относительно низкие уровни внутриклеточных КП после витрификации могут быть эффективны при использовании протоколов быстрой разморозки ооцитов. В частности, установлено, что выживаемость клеток при быстром нагревании составляет 74,6–90,2%, при этом не было выявлено повреждений мейотического веретена деления и конфигурации хромосом.

Имеются сведения о разработке и внедрении в клиническую практику универсальных протоколов разморозки, которые могут быть использованы независимо от первоначального метода замораживания ооцитов, подвергавшихся как медленному замораживанию, так и витрификации.

Появляются сообщения о клинической эффективности применения комбинации различных коммерческих наборов для разморозки витрифицированных blastocист человека, при этом установлены сходные уровни выживаемости эмбрионов и частоты клинической беременности. В частности, по результатам ЭКО показано, что 98,0% blastocист выживают после сверхбыстрой разморозки, а также продемонстрировано, что данный метод не снижает выживаемость ооцитов на стадии метафазы II и потенциал развития по сравнению со стандартным протоколом нагревания.

Выводы. Проведенный анализ литературных данных свидетельствует, что использование метода сверхбыстрой разморозки ооцитов способствует поддержанию высокого уровня жизнеспособности, оплодотворения и развития эмбрионов. Применение такого подхода оптимизирует и стандартизирует процедуру разморозки ооцитов, обеспечивая высокую вероятность успеха и снижая вариабельность клеточных характеристик, обычно наблюдаемую при различных методах витрификации и разморозки.

Безусловно, при внедрении новых методов разморозки ооцитов необходимо учитывать не только морфологические характеристики, но и молекулярные аспекты их развития. В этом контексте целесообразно оценивать экспрессию различных маркеров и состояние клеток на стадии blastocисты для анализа общей архитектуры и распределения клеточных линий, которые должны сохраняться независимо от выбранного метода разморозки. Несмотря на то, что витрификация ооцитов широко применяется в рамках программ ВРТ, очевидна необходимость дальнейшего совершенствования различных аспектов этой технологии для повышения ее эффективности и безопасности.

Литература / References

1. Bai F., Liu C., Zhang Y.X. et al. Progress on the oocyte cryopreservation technology assessment. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 2020, vol. 54(5), pp. 577–580. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20190723.
2. Bianchi V., Macchiarelli G., Borini A. et al. Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis. *Reprod Biol Endocrinol.*, 2014, vol. 12, p. 110. DOI: 10.1186/1477-7827-12-110.
3. Bianchi V., Lappi M., Bonu M.A., Borini A. Oocyte slow freezing using a 0.2–0.3 M sucrose concentration protocol: is it really the time to trash the cryopreservation machine? *Fertil. Steril.*, 2012, vol. 97, pp. 1101–1107. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.01.127.
4. Canosa S., Parmegiani L., Charrier L. et al. Are commercial warming kits interchangeable for vitrified human blastocysts? Further evidence for the adoption of a Universal Warming protocol. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2022, vol. 9(1), pp. 67–73. DOI: 10.1007/s10815-021-02364-1.

5. Casillas F., Ducolomb Y., López A., Betancourt M. Effect of porcine immature oocyte vitrification on oocyte-cumulus cell gap junctional intercellular communication. *Porcine Health Manag.*, 2020, vol. 6(1), 37. DOI: 10.1186/s40813-020-00175-x.
6. Chang C.C., Lin C.J., Sung L.Y. et al. Impact of phase transition on the mouse oocyte spindle during vitrification. *Reprod. Biomed. Online*, 2011, vol. 22, pp. 184–191. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.07.548.
7. Chang C.C., Elliott T.A., Wright G. et al. Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertil. Steril.*, 2013, vol. 99, pp. 1891–1897. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.02.008.
8. Chaput L., Dollet S., Eymard-Pierre E. et al. Analysis of maturation dynamics and oocyte nuclear quality after rescue-IVM and semi-automated vitrification. *Hum. Reprod.*, 2025, vol. 40(7), pp. 1344–1356. DOI: 10.1093/humrep/deaf078.
9. Cobo A., Giles J., Paolelli S. et al. Oocyte vitrification for fertility preservation in women with endometriosis: an observational study. *Fertil. Steril.*, 2020, vol. 113, pp. 836–844. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.11.017.
10. Costa-Borges N., Matia-Algué Q., Coello A. et al. Preclinical validation of fast oocyte vitrification and warming protocols with comparable efficiencies to a standard method. *Hum. Reprod.*, 2025, vol. 40(6), pp. 1066–1076. DOI: 10.1093/humrep/deaf069.
11. Cotichchio G., Pennetta F., Rizzo R. et al. Embryo morphokinetic score is associated with biomarkers of developmental competence and implantation. *J Assist Reprod Genet.* 2021, vol. 38(7), pp. 1737–1743. DOI: 10.1007/s10815-021-02162-9.
12. Guns J., Ahlstrom A. Multicenter preclinical validation of warming procedures for human blastocysts involving a short exposure to a single sucrose solution shows promising survival, re-expansion and continued development. 48th ed. BSRM Abstract Book, 2022.
13. Jin B., Kleinhans F.W., Mazur P. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology*, 2014, vol. 68, pp. 419–430. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.005.
14. Jin B., Mazur P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser. *Sci Rep.*, 2015, vol. 19(5), 9271. DOI: 10.1038/srep09271.
15. Kojima E., Fukunaga N., Nagai R. et al. The vitrification method is significantly better for thawing of slow-freezing embryos. *Fertil. Steril.*, 2012, vol. 98, 124. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.458.
16. Kometas M., Christman G.M., Kramer J., Rhoton-Vlasak A. Methods of Ovarian Tissue Cryopreservation: Is Vitrification Superior to Slow Freezing?—Ovarian Tissue Freezing Methods. *Reprod Sci.*, 2021, vol. 28(12), pp. 3291–3302. DOI: 10.1007/s43032-021-00591-6.
17. Kuznyetsova I., Ibarrientos Z., Motamedi G., Zaman A. Ultrafast warming of conventionally vitrified human metaphase II oocytes: A pilot study. *Fertil. Steril.*, 2024, vol. 198 (45), e205.
18. Lammers J., Reignier A., Loubersac S. et al. Ultra-Fast Warming Procedure of Vitrified Blastocysts Results in Maintained Embryology and Clinical Outcomes. *Reprod. Sci.*, 2025, vol. 32(2), pp. 495–501. DOI: 10.1007/s43032-024-01762-x.
19. Li D., Gao Y., Li R. Chinese Association of Reproductive Medicine. Expert consensus on the vitrification of human oocytes and embryos. *Chin Med J (Engl)*, 2023, vol. 136(23), pp. 2773–2775. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002895.
20. Manns J., Patrick J.L., Katz I. et al. Clinical validation of a new, ultrafast warming protocol, resulting in equivalent implantation rates and significant time savings versus routine warming protocol, a prospective randomized control. *Fertil. Steril.*, 2022, vol. 118, e7. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2022.09.227.
21. Mukaida T., Oka C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2012, vol. 26, pp. 789–803. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2012.07.001.
22. Naert M.N., Jiang V.S., Dimitriadis I. et al. External validation study of the ultrafast blastocyst warming technique –optimizing efficiency without compromising outcomes. *Fertil. Steril.*, 2022, vol. 118, e128. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2022.08.379.
23. Nagy Z.P., Shapiro D., Chang C.C. Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment. *Fertil. Steril.*, 2020, vol. 113(2), pp. 241–247. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.12.009.
24. Nottola S.A., Albani E., Cotichchio G. et al. Freeze/thaw stress induces organelle remodeling and membrane recycling in cryopreserved human mature oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2016, vol. 33, pp. 1559–1570. DOI: 10.1007/s10815-016-0798-x.
25. Papis K., Hardej K., Stachowiak E. et al. Equivalent outcomes of human oocytes after vitrification or slow freezing with a modified rehydration protocol. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2025, vol. 23(1), 58. DOI: 10.1186/s12958-025-01383-2.
26. Parmegiani L., Bernardi S., Garelo C. et al. Testing the efficiency of the “universal warming protocol”. Multicenter randomised controlled study on human slow frozen oocytes. *Fertil. Steril.*, 2014, vol. 102(3), 122. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.419.
27. Parmegiani L., Garelo C., Revelli A. et al. Efficacy and efficiency of the “universal warming protocol”: multicenter randomized controlled study on human slow frozen oocytes. *Fertil. Steril.*, 2014, vol. 102, e122.

28. Parmegiani L., Tatone C., Cognigni G.E. et al. Rapid warming increases survival of slow-frozen sibling oocytes: a step towards a single warming procedure irrespective of the freezing protocol? *Reprod. BioMed. Online*, 2014, vol. 28, pp. 614–623. DOI: 10.1016/j.rbmo.2014.01.015.
29. Parmegiani L., Maccarini A.M., Rastellini A. et al. Oocyte vitrification/storage/ handling/ transportation/warming, effect on survival and clinical results in donation programmes. *Curr. Trends Clin. Embryol.*, 2017, vol. 4, pp. 34–40. DOI:10.11138/ccel/2017.4.2.034.
30. Parmegiani L., Amone A., Cognigni G. et al. Universal warming protocol for a transnational egg donation program with vitrified oocytes. *Fertil. Steril.*, 2018, vol. 110, e230. DOI: 10.1007/s10815-020-01798-3.
31. Parmegiani L., Beilby K.H., Arnone A. et al. Testing the efficacy and efficiency of a single “universal warming protocol” for vitrified human embryos: prospective randomized controlled trial and retrospective longitudinal cohort study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2018, vol. 35(10), pp. 1887–1895. DOI: 10.1007/s10815-018-1276-4.
32. Parmegiani L., Minasi M.G., Arnone A. et al. “Universal Warming” protocol for vitrified oocytes to streamline cell exchange for transnational donation programs: a multi-center study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2020, vol. 37, pp. 1379–1385. DOI: 10.1007/s10815-020-01798-3.
33. Rienzi L., Gracia C., Maggiulli R. et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum. Reprod. Update*, 2017, vol. 23(2), pp. 139–155. DOI: 10.1093/hupd/dmw038.
34. Segers I., Mateizel I., Wouters K. et al. Ovarian Tissue Oocyte-In Vitro Maturation for Fertility Preservation. *J Vis Exp.*, 2024, vol. 207. DOI: 10.3791/65255.
35. Seki S., Mazur P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, e36058. DOI: 10.1371/journal.pone.0036058.
36. Serdarogullari M., Coban O., Boynukalin F.K. et al. Successful application of a single warming protocol for embryos cryopreserved by either slow freezing or vitrification techniques. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 2019, vol. 65 (1), pp. 12–19. DOI: 10.1080/19396368.2018.1487477.
37. Taylor T.H., Manns J.N., Katz I. et al. Ultrafast warming protocol demonstrates similar outcomes and significantly decreases embryology workload compared to standard warming protocols, a randomized control trial with euploid blastocysts. *Fertil. Steril.*, 2022, vol. 118, e150. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2022.08.437.
38. Vanderzwalmen P., Zech N.H., Ectors F. et al. Blastocyst transfer after aseptic vitrification of zygotes: an approach to overcome an impaired uterine environment. *Reprod. Biomed. Online*, 2012, vol. 25, pp. 591–599. DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.09.004.
39. Vanderzwalmen P., Connan D., Grobet L. et al. Lower intracellular concentration of cryoprotectants after vitrification than after slow freezing despite exposure to higher concentration of cryoprotectant solutions. *Hum. Reprod.*, 2013, vol. 28, pp. 2101–2110. DOI: 10.1093/humrep/det107.
40. Zhang H., Liu K.K. Review: optical tweezers for single cells. *J. R. Soc. Interface*, 2008, vol. 5, pp. 671–90. DOI: 10.1098/rsif.2008.0052.
41. Zhao G., Fu J. Microfluidics for cryopreservation. *Biotechnol. Adv.*, 2017, vol. 35(2), pp. 323–336. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.01.006.

БАЧУРИН АЛЕКСЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ – соискатель ученой степени кандидата медицинских наук кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Россия, Самара (bachurin.a.v@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3768-7657>).

ШУРЫГИНА ОКСАНА ВИКТОРОВНА – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии и эмбриологии, профессор кафедры репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики, Самарский государственный медицинский университет; заведующая эмбриологической лабораторией, Клинический госпиталь ИДК «Мать и дитя», Россия, Самара (oks-shurygina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3903-4350>).

ПОПОВА ОЛЬГА ОЛЕГОВНА – соискатель ученой степени кандидата медицинских наук кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Россия, Самара (popovaoo@outlook.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8681-8844>).

ЖИЗНИН ВАСИЛИЙ ВИКТОРОВИЧ – аспирант кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Россия, Самара; заведующий эмбриологической лабораторией, АО «Центр семейной медицины», Россия, Магнитогорск (4uter2@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0604-881X>).

ШУРЫГИНА АЛИНА СЕРГЕЕВНА – специалист экспериментальной эмбриологии и генетического моделирования Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий, Самарский государственный медицинский университет, Россия, Самара (Al.shurygina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8923-6446>).

Alexey V. BACHURIN, Oksana V. SHURYGINA, Olga O. POPOVA,
Vasily V. ZHIZNIN, Alina S. SHURYGINA

**OPPORTUNITIES OF USING ULTRA-FAST DEFROST
OF HUMAN OOCYTES AFTER VITRIFICATION
(literature review)**

Key words: assisted reproductive technologies, oocytes, embryos, vitrification, ultrafast defrosting, blastocysts.

The survival rate of oocytes used in assisted reproductive technologies largely depends on the dynamics of temperature parameters, including the rate of their defrosting after vitrification. The analysis of literature data on the opportunities of using modern methods of defrosting oocytes after their vitrification in the databases of national and international scientific libraries is carried out. Relatively recently, pilot studies have been conducted on the use of time-shortened defrosting protocols, which have demonstrated encouraging embryological results in blastocyst survival. The effect of osmotic stress on cells during defrosting can lead to damage to microtubules, organelles, membranes and, as a result, to cell lysis. Experimental data are presented on the survival of more than 90% of oocytes during ultrafast defrosting. According to some researchers, ultra-fast heating rate prevents recrystallization of small intracellular ice crystals formed during cooling. It has been shown that combination of low levels of intracellular cryoprotectants following vitrification and low sucrose concentrations may provide a basis for the use of single-step methods for the rapid defrosting of blastocysts. Data on the effect of freezing and defrosting methods on the ultrastructural characteristics of oocytes are presented. The results of studies evaluating the clinical efficacy of various cell defrosting methods are reviewed. The analysis of the literature data shows that the use of ultrafast defrosting of oocytes contributes to maintaining a high level of their viability, fertilization and embryo development. The use of this approach makes it possible to optimize and standardize the procedure for defrosting oocytes with a high probability of success.

ALEXEY V. BACHURIN – a Competitor of Scientific Degree of Medical Sciences Candidate, Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University, Russia, Samara (bachurin.a.v@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3768-7657>).

OKSANA V. SHURYGINA – Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Histology and Embryology, Department of Reproductive Medicine, Clinical Embryology and Genetics, Samara State Medical University; Head of the Embryology Laboratory, IDK «Mother and Child» Clinical Hospital, Russia, Samara (oks-shurygina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3903-4350>).

OLGA O. POPOVA – a Competitor of Scientific Degree of Medical Sciences Candidate, Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University, Russia, Samara (popovao@outlook.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8681-8844>).

VASILY V. ZHIZNIN – Post-Graduate Student, Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University, Russia, Samara; Head of the Embryology Laboratory, «Family Medicine Center» JSC, Russia, Magnitogorsk (4uter2@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0604-881X>).

ALINA S. SHURYGINA – Specialist in experimental embryology and genomic modeling at the Scientific and Educational Professional Center for Genetic and Laboratory Technologies, Samara State Medical University, Russia, Samara (Al.shurygina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8923-6446>).

Формат цитирования: Возможности применения ультрабыстрой разморозки ооцитов человека после витрификации (обзор литературы) [Электронный ресурс] / А.В. Бачурин, О.В. Шурьгина, О.О. Попова и др. // Acta medica Eurasica. 2026. № 1. С. 56–66. URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2026/1/6>. DOI: 10.47026/2413-4864-2026-1-56-66.