

**Скорость морфогенеза эмбрионов человека после
криоконсервирования**

М.П. ПЕТРУШКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Rate of Human Embryo Morphogenesis after Cryopreservation

M.P. PETRUSHKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали скорость морфогенеза нативными и криоконсервированными эмбрионами человека. Показано, что после криоконсервирования ускоряются темпы дробления, что выражается в раннем формировании бластоцисты и увеличении общего количества бластомеров. Факторы криоконсервирования оказывают влияние на способность бластоцисты к выходу из *zona pellucida*, что требует проведения вспомогательного “вылупления”.

Ключевые слова: криоконсервирование, эмбрионы человека, морфогенез.

Вивчали швидкість морфогенезу нативними і криоконсервованими ембріонами людини. Показано, що після криоконсервування відбувається прискорення темпів дроблення, що виражається в ранньому формуванні бластоцисти і збільшенні загальної кількості бластомерів. Фактори криоконсервування впливають на здатність бластоцисти до виходу з *zona pellucida*, що вимагає проведення процедури допоміжного “вилуплення”.

Ключові слова: криоконсервування, ембріони людини, морфогенез.

There was studied the morphogenesis rate by both native and cryopreserved human embryos. Cleavage rate after cryopreservation was shown to accelerate, that manifested in an early blastocyst formation and increase of total blastomere amount. Cryopreservation factors were shown to influence the blastocyst capability of leaving *zona pellucida*, that requires the procedure of assisted hatching to be performed.

Key-words: cryopreservation, human embryos, morphogenesis.

Долгосрочное хранение эмбрионов человека при низких температурах является перспективным направлением их дальнейшего использования во вспомогательных репродуктивных технологиях.

После отогрева необходима тщательная оценка морфологических параметров эмбрионов: учитывают количество бластомеров, их форму, размеры, расположение и степень фрагментации цитоплазмы. Повреждения, встречающиеся после криоконсервирования, как правило, механической или осмотической природы: деформации и разрыв *zona pellucida*, лизис бластомеров, выход фрагментов цитоплазмы в перивителлиновое пространство [14]. Объективным критерием морфофункциональной целостности деконсервированных эмбрионов является способность к возобновлению митоза с дальнейшим дроблением *in vitro* до стадии бластоцисты [3].

Первые деления эмбрионов человека имеют ряд специфических особенностей, в частности, относительно медленный темп, асинхронность, наличие компактизации, при которой между клетками эмбриона устанавливается система щелевых контактов. Этот процесс заканчивается

Long-term storage of human embryos at low temperatures is known to be a perspective trend for their further use in assisted reproduction technologies

After thawing we need a thorough evaluation of morphological parameters of embryos: we take into account the number of blastomeres, their shape, sizes, location and cytoplasm fragmentation degree. Damages occurred after cryopreservation are mostly of mechanical either osmotic origin: *zona pellucida* deformations and break, blastomere lysis, cytoplasm fragments release into perivitelline space [14]. Capability of renewing mitosis with further *in vitro* cleavage up to the stage of blastocyst is known to be an objective criterion of morphofunctional integrity of frozen-thawed embryos [3].

Primary cleavages of human embryos possess a number of specific peculiarities, in particular, a relatively slow rate, asynchronicity, compactness when among the embryo cells it is established the system of slot contacts. This process finishes with blastocyst formation (final stage of early embryonic development) capable of existing *in vitro* and possessing the primary differentiation on a distinctly manifested inner cell mass and trophoctoderm [1].

Адрес для корреспонденции: Петрушко М.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-11-19, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Petrushko M.P., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

формированием бластоцисты (последняя стадия раннего эмбрионального развития), способной существовать *in vitro* и обладающей первой дифференцировкой на четко выраженную внутреннюю клеточную массу и трофэктодерму [1].

По данным [4] частота формирования бластоцисты нативными эмбрионами составляет 30-40%. Сведения о частоте образования бластоцист деконсервированными эмбрионами человека единичны, поскольку эмбрионы, как правило, переносят либо сразу после оттаивания, либо после их краткосрочного культивирования [5]. Данные о формировании замороженно-оттаянными эмбрионами различных типов бластоцист и общем количестве бластомеров в таких эмбрионах отсутствуют.

Цель исследования – определение выживаемости эмбрионов человека после криоконсервирования, изучение скорости морфогенеза и сопоставление количества бластомеров в эквивалентных стадиях формирования бластоцисты нативными и деконсервированными эмбрионами.

Материалы и методы

Эмбрионы были получены в циклах лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) инсеминацией *in vitro* аспирированных ооцитов пациентки спермиями мужа.

Индукцию суперовуляции, аспирацию ооцитов, подготовку спермиев к оплодотворению, культивирование гамет и эмбрионов проводили по стандартной технологии ЭКО [2].

Эмбрионы, которые культивировали *in vitro* в течение 120 ч, были разделены на две группы: 1 – контрольная, 2 – исследуемая. Показатель формирования бластоцист рассчитывали как отношение эмбрионов, сформировавших бластоцисты, к общему количеству эмбрионов, полученных в данной группе.

Замораживание-оттаивание проводили по методу Lassalle с модификацией [8]. Эмбрионы охлаждали со скоростью 2°C/мин от 22 до 5,5°C. После “сидинга” охлаждение вели со скоростью 0,3°C/мин до –35°C. Затем соломинки погружали в жидкий азот.

Оттаивание эмбрионов происходило быстро инкубированием соломинок при комнатной температуре в течение 30с. После отогрева эмбрионы переносили в среды с убывающей концентрацией растворов криопротекторов.

Морфологическую оценку эмбрионов проводили через час после деконсервирования и через 120 ч культивирования в среде IVF-medium (Medi-Cult, Дания) микроскопированием (Olympus IX-60, ×400).

According to the data [4] the rate of blastocyst formation by native embryos makes 30-40%. The data on the rate of blastocyst formation by frozen-thawed human embryos are not numerous, for the embryos are transferred as a rule either immediately after thawing or following their short-term culturing [5]. No data are available on forming various blastocyst types by frozen-thawed embryos, and neither on the total blastomere number in such embryos.

Present study was aimed to determining the human embryo viability following the cryopreservation, studying the rate of morphogenesis and comparing the blastomeres number in equivalent blastocyst formation steps by native and frozen-thawed embryos.

Materials and methods

Embryos were obtained during treatment cycles using of infertility IVF by *in vitro* insemination of the patient's aspirated oocytes by husband's sperm.

Superovulation induction, oocytes aspiration, sperm preparing for fertilization and gametes and embryo culturing were done according to the standard IVF protocol [2].

Embryos which were *in vitro* cultured for 120 hours were divided into 2 groups: control group 1, group under study 2. Blastocyst formation index was calculated on the number of embryos obtained in this group.

Freeze-thawing was accomplished according to the modified Lassalle method [8]. Embryos were cooled from 22 to 5.5°C with the rate of 2°C/min. Following seeding the cooling was performed with the rate of 0.3°C/min down to –35°C, followed by immersing the straws into liquid nitrogen.

Embryo thawing was done in a quick mode by a 30-sec straws incubation at room temperature. After thawing the embryos were transferred into media with the decreasing concentration of cryoprotectant solutions.

Embryos were morphologically estimated with microscope (Olympus IX-60, ×400), in 1 hour after thawing and in 120 hours of culturing in IVF medium (Medi-Cult, Denmark).

Blastocysts were classified according to Gardner [10]: early compacted embryo with the start of cavitation; cavitated blastocoele occupies less than a half of embryo size; expanded blastocoele occupies more than a half of embryo size with clearly seen trophoctoderm and inner cell mass; blastocyst in the stage of hatching: thinning and break of *zona pellucida*, while trophoctoderm leaves the membrane.

Fixed blastocysts were prepared according to Tarkovsky method [13]. Blastomere number was calculated while there was counted the level of nuclei basophily, presence of nucleoli and amount of pyknotic cells.

Бластоцисты классифицировали по Gardner [10]: ранняя – компактизированный эмбрион с началом кавитации; кавитированная – бластоцель занимает менее половины объема эмбриона; экспандированная – бластоцель занимает более половины объема эмбриона с хорошо выраженной трофо-эктодермой и внутренней клеточной массой; бластоциста в стадии “вылупления” – истончение и разрыв *zona pellucida*, при которых трофо-эктодерма выходит из оболочки.

Фиксированные препараты бластоцист готовили по методу Тарковского [13]. Подсчитывали количество бластомеров, при этом учитывали степень базофильности ядер, наличие ядрышек и количество пикнотических клеток.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Excel из пакета программ Microsoft Office 2000. Достоверность различий определяли с помощью критериев Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Всего было аспирировано 334 ооцита в контрольной группе и 342 ооцита в исследуемой группе, что составило $11,5 \pm 0,8$ и $12,7 \pm 0,8$ ооцитов на пациентку соответственно. Оплодотворилось 272 (81,4%) и 292 (85,4%) ооцита. Из 156 эмбрионов контрольной группы 78 (50,0%) достигли стадии бластоцисты.

После деконсервирования 163 эмбрионов исследуемой группы 16 (9,8%) лизировали полностью, в 21 (12,9%) сохранилось менее 50%, в остальных эмбрионах (77,3%) были интактными более 50% бластомеров. После культивирования стадии бластоцисты достигли 24 (16,3%), что достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Причем при 100%-й сохранности бластомеров выход бластоцист был наибольшим (53,3%), что сопоставимо с количеством бластоцист, сформированных нативными эмбрионами.

Количество бластомеров в эквивалентных стадиях развития нативных и криоконсервированных эмбрионов через 120 ч культивирования представлено в таблице.

Как видно из таблицы, частота достижения стадии вышедшей из оболочки бластоцисты для нативных эмбрионов достоверно выше, чем для криоконсервированных. В то же время эквивалентные стадии развития характеризуются разным количеством бластомеров (рисунок). Деконсервированные эмбрионы демонстрируют ускоренные темпы дробления по сравнению с нативными.

Изучаемый нами показатель созревания бластоцист в культуре часто используют как прогностический при исходе лечебного цикла ЭКО [5].

Statistical results were processed using Excel software (Microsoft Office 2000) Statistical significance of the differences was determined by Student's criterion.

Results and discussion

The total number of 334 oocytes was aspirated in the control group and 342 ones in the group under study, that made 11.5 ± 0.8 and 12.7 ± 0.8 oocytes per patient, respectively. The number of fertilized oocytes made 272 (81.4%) and 292 (85.4%). Blastocyst stage was reached by 78 (50%) of 156 control group embryos.

After thawing the 163 embryos of the studied group 16 (9.8) of them completely lyzed, 21 (12.9%) embryos retained less than 50%, in the rest ones (77.3%) more than 50% blastomeres were intact.

Following culturing the blastocyst stages reached 24 (16.3%), that was significantly lower than in the control group ($p < 0.01$), while at 100% blastomeres integrity the number of blastocysts was the highest (53.3%), which is comparable with the number of blastocysts formed by native embryos.

The table presents blastocysts number in equivalent development stages of native and cryopreserved embryos in 120 hours of culturing.

As the table demonstrates, frequency of reaching the stage of blastocyst leaving the membrane is significantly higher than for cryopreserved ones, whilst diverse blastomere number is peculiar for equivalent development stages (Figure).

Frozen-thawed embryos demonstrate the accelerated cleavage rates comparing to native ones.

Studied index for blastocyst maturation in culture is often used as prognostic one at the end of IFV treatment cycle [5].

To analyze the blastocyst cleavage rate by native and frozen-thawed embryos *in vitro* up to blastocyst stage there has been carried out a considerable profound research.

The data are contradictory however. Some authors consider the number of embryos capable of developing up to the blastocyst stage following freeze-thawing decreases twice if compared with native control [6]. Other researchers noticed that cryopreservation showed no effect on blastocyst rate formation [16]. This index is to depends rather on culturing conditions: nutritive media composition and presence of coculturing systems [9].

Rate of blastocyst formation is influenced by blastomere integrity following freeze-thawing. Thus at 100% blastomere integrity the rate of blastocyst formation makes more than 40%, while the damage of 50% of cells causes the value reduction down to 20%.

The question of fragmentation influence on blastocyst formation is presently under active discussion. The

Для анализа частоты дробления нативными и деконсервированными эмбрионами *in vitro* до стадии бластоцисты проведено много исследований. Однако сообщения носят противоречивый характер. Одни авторы считают, что количество эмбрионов, способных развиваться до стадии бластоцисты после деконсервирования, снижается в два раза по сравнению с нативным контролем [6]. Другие отмечают, что криоконсервирование не влияет на частоту формирования бластоцист [16]. Этот показатель зависит, скорее всего, от условий культивирования: состава питательных сред и наличия систем сокультивирования [9]. На частоту образования бластоцист оказывает влияние сохранность blastomeres после деконсервирования. Так, при 100%-й сохранности blastomeres частота формирования бластоцист составляет более 40%, при повреждении 50% клеток этот показатель снижается до 20%.

Активно дискутируется вопрос влияния фрагментации на формирование бластоцисты. Одни авторы считают, что фрагментация существенно затрудняет формирование бластоцисты [17], другие полагают, что клеточная фрагментация не приводит к нарушению их развития [15]. Если фрагментация не затрагивает ту часть blastomeres, в которой локализованы наиболее существенные для развития компоненты сигнальных путей (рецепторы факторов роста, регуляторные домены апоптоз-специфических белков), она не является летальной для эмбриона. Соответственно эмбрионы с различными типами пространственной фрагментации имеют разный потенциал развития и последующей имплантации.

Кроме того, предполагают, что в процессе фрагментации blastomeres теряют важную составляющую часть цитоплазмы, а вместе с ней клеточные органеллы, мРНК и белки [4].

Важным показателем скорости морфогенеза предимплантационных эмбрионов человека является четкая корреляция между временем их культивирования *in vitro* и количеством blastomeres. Показано, что в результате повреждения отдельных blastomeres количество клеток в ранней бластоцисте снижается с $58 \pm 3,4$ для нативных эмбрионов до $45 \pm 3,7$ для декон-

Частота формирования различных типов бластоцист и общее количество blastomeres в нативных и деконсервированных эмбрионах человека
Rate of various types of blastocyst formation and total number of blastomeres in native and frozen-thawed human embryos

Типы бластоцист Blastocyst types	Количество эмбрионов абс. (%) Number of embryos, abs. number (%)		Количество blastomeres в эмбрионах $M \pm m$ Number of blastomeres in embryos $M \pm m$	
	Нативных Native	Заморожено – оттаянных Frozen – thawed	Нативных Native	Заморожено – оттаянных Frozen – thawed
Ранняя Early	15 (19,2)	8 (33,3)	$54 \pm 2,5^*$	$63,1 \pm 2,1$
Кавитированная Cavitated	6 (7,7)	6 (25)	$65,4 \pm 2,1^*$	$82,2 \pm 3,6$
Экспандированная Expanded	12 (15,4)	8 (33,3)	$76 \pm 3,8^*$	$96,6 \pm 1,7$
В стадии "вылупления" Stage of "hatching"	$45 (57,7)^*$	2 (8,3)	$87 \pm 2,6^*$	$125,5 \pm 4,5$

Примечание: * – $p < 0,1$ – по сравнению со второй группой.

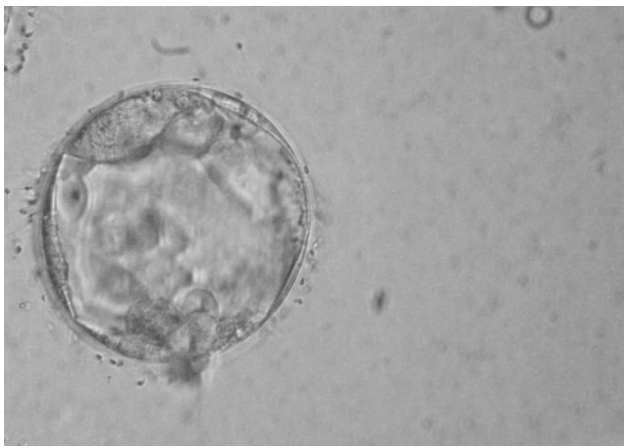
Notes: * – $p < 0.1$ comparing to group 2.

idea of some authors is that the fragmentation is greatly impeding the blastocyst formation [17], another theory supposes the cell fragmentation not to trouble their development [15]. It would not be lethal for an embryo if the fragmentation does not affect the part of blastomeres where the most important for development signal pathways components are localized (growth factor receptors, regulatory domains of apoptosis-specific proteins). Respectively, the embryos with different types of spatial fragmentation have various development potential and the one for further implantation.

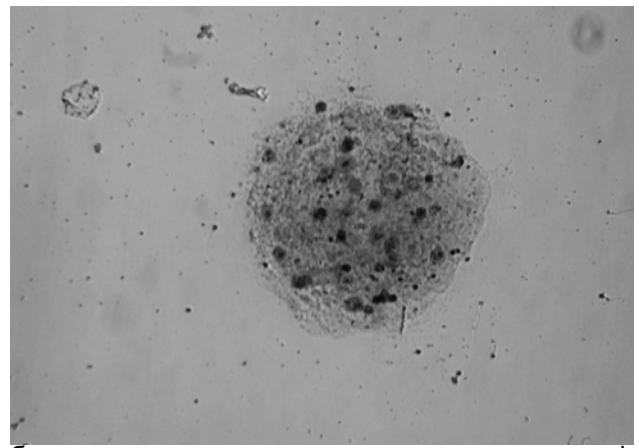
Also, there is a supposition that during fragmentation the blastomeres lose a very important cytoplasm component, and along with it the cellular organoids, as well as mRNA and proteins [4].

Clear correlation of their *in vitro* culturing time and blastomere amount is an important index of morphogenesis rate of pre-implantation human embryos. As a result of certain blastomeres damaging the cells amount in early blastocyst was shown to decrease from 58 ± 3.4 for native embryos down to 45 ± 3.7 for frozen-thawed ones. Thus the work [11] is of interest where the 4-cell embryo blastomere was removed and there was found a correlation of a statistically significant decrease of cells number in blastocyst in native and control embryos.

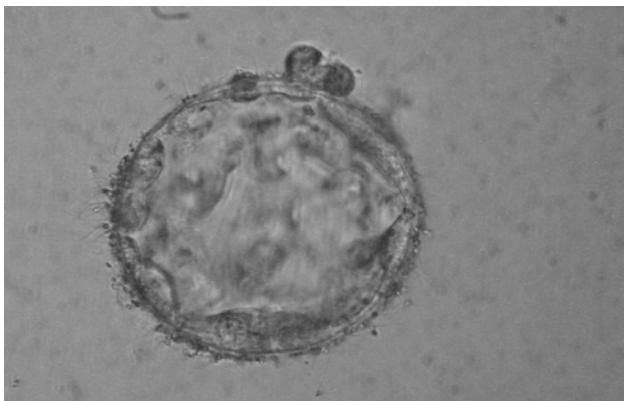
Number of blastocysts is the major criterion for a vital embryo estimation following freeze-thawing [7]. However cleavage rates and blastocyst formation rate in 120 hours of culturing are the more reliable viability criterion.



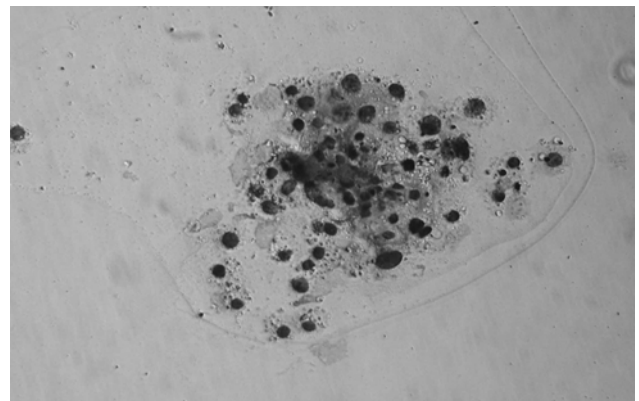
a a



b b



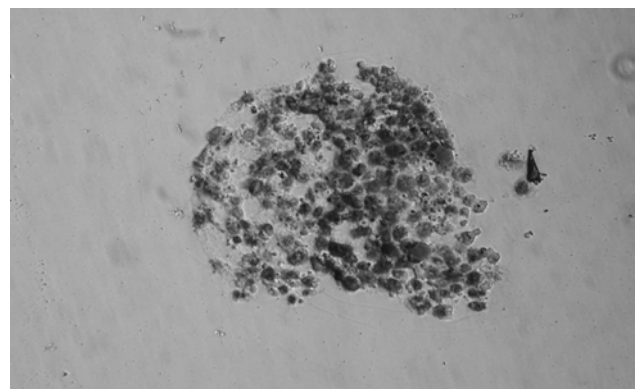
в c



г d



д e



е f

Различные степени зрелости бластоцист человека и соответствующее им количество бластомеров: а – ранняя, нативный препарат, ув.400; б – общее количество бластомеров (32), фиксированный препарат, ув.600; в – экспандированная, нативный препарат, ув.400; г – общее количество бластомеров (63), фиксированный препарат, ув.600; д – в стадии “вылупления”, нативный препарат, ув.400; е – общее количество бластомеров (132), фиксированный препарат, ув. 600.

Different maturation degree of human blastocysts and the corresponding number of blastomeres: a – early, native preparation, $\times 400$; b – total number of blastomeres (32), fixed preparation, $\times 600$; c – expanded, native preparation, $\times 400$; d – total number of blastomeres (63), fixed preparation, $\times 600$; e – stage of “hatching”, native preparation, $\times 400$; f – total number of blastomeres (132), fixed preparation, $\times 600$.

сервированных. В связи с этим представляет интерес работа [11] по удалению бластомера 4-клеточного эмбриона и обнаружению корреляции в достоверном снижении количества клеток в бластоцисте в нативных и контрольных эмбрионах.

Количество бластомеров является основным критерием для прижизненной оценки эмбрионов

Blastocyst’s capability of leaving *zona pellucida* is another vital index for blastocyst integrity.

Transparent membrane during fertilization process has a protective function and promotes blastomeres compactization. During pre-implantation development of embryo we observed a thinning of *zona pellucida*. It is thrown off prior to or during the implantation due

после замораживания-оттаивания. Однако темпы дробления и частота формирования бластоцист через 120 ч культивирования являются более надежным критерием жизнеспособности [7]. Другой важный показатель полноценности бластоцисты – ее способность к высвобождению из *zona pellucida*.

Прозрачная оболочка в процессах оплодотворения выполняет защитную функцию, способствует компактизации blastomeres. Во время предимплантационного развития эмбриона наблюдается истончение *zona pellucida*. Она либо сбрасывается до или во время имплантации благодаря действию самого зародыша, либо растворяется под действием маточного секрета и ферментов зародыша. Однако до 70% бластоцист не высвобождаются из *zona pellucida* из-за происходящих в ней молекулярных изменений. Считают, что модификация гликопротеинов приводит к неспособности *zona pellucida* расщепляться под действием литических ферментов. Кроме того, культивирование *in vitro* из-за отсутствия литических ферментов в среде индуцирует затвердевание этой оболочки.

В работе [12] показано, что 100% криоконсервированных двухдневных эмбрионов выходят из оболочки только после вспомогательного “вылупления”. В нашей работе отмечено, что нативные эмбрионы достигают этой стадии в 57,7, а после криоконсервирования в 8,3% случаев.

Выводы

Нативные и замороженно-оттаянные эмбрионы человека характеризуются разной скоростью морфогенеза. После криоконсервирования эмбрионы демонстрируют ускоренные темпы дробления, что выражается в раннем формировании бластоцисты и увеличении общего количества blastomeres.

Факторы криоконсервирования оказывают влияние на способность бластоцисты к выходу из *zona pellucida*, что требует проведения вспомогательного “вылупления”.

Литература

1. Дыбан А.П., Баранов В.С. Цитогенетика развития млекопитающих. – М.:Наука, 1978. – 216 с.
2. Элдер К. Лабораторные процедуры. Bourn-Hallam group, 1990. – 23 с.
3. Burns W., Gaudet T., Martin M. et al. Survival of cryopreservation and thawing with all blastomeres intact identifies multicell embryos with superior frozen embryo transfer outcome // Fert.Ster.–1999.– Vol. 72.–P. 527-532.
4. Devreker F., Hardy K., Van der Bergh et al. Amino acids promote human blastocyst development in vitro // Hum. Reprod.– 2001.– Vol. 16.– P. 749-756.

to the effect of fetus itself, either is it is dissolved under the effect of uterus secrete and fetus enzymes. However up to 70% of blastocysts is not released out of *zona pellucida* because of occurred molecular alterations. Glycoprotein modification is thought to result in incapability of *zona pellucida* to dissolve while influenced by lytic enzymes. Also, an in vitro culturing induces this membrane solidification because of the absence of lytic enzymes in the medium.

The paper [12] demonstrates that 100% of cryopreserved two-day embryos leave the membrane only following the auxiliary “hatching”. This work noted native embryos reached this state in 57.7% of cases and after cryopreservation in 8.3%.

Conclusions

Native and frozen-thawed human embryos are known to have different morphogenesis rates. Having survived cryopreservation the embryos demonstrate accelerated cleavage rates, manifested in an early blastocyst formation and increase of total blastomere number.

Cryopreservation factors affect the blastocyst capability of leaving *zona pellucida*, that requires the necessity of assisted “hatching”.

References

1. Dyban A.P., Baranov V.S. Cytogenetics of mammals development.– Moscow: Nauka, 1978.– 216 p.
2. Elder K. Laboratory procedures. Bourn-Hallam group, 1990.– 23 p.
3. Burns W., Gaudet T., Martin M. et al. Survival of cryopreservation and thawing with all blastomeres intact identifies multicell embryos with superior frozen embryo transfer outcome // Fert.Ster.–1999.– Vol. 72.–P. 527-532.
4. Devreker F., Hardy K., Van der Bergh et al. Amino acids promote human blastocyst development in vitro // Hum. Reprod.– 2001.– Vol. 16.– P. 749-756.
5. Edgar D., Bourne H., Speirs S. et al. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos // Hum. Reprod.– 2000.– Vol. 15.– P. 175-179.
6. Elst V.D., Abbeel E.V., Vitrier S. et al. Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates //Hum. Reprod.– 1997.– Vol. 12.– P. 1513-1521.
7. Guerif F., Bidault R., Cadoret V et al. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal // Hum. Reprod.– 2002.– Vol. 17.– P. 1321-1326.
8. Lassale B., Testard J., Renard J. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol // Fertil. Steril.– 1985.– Vol. 44.– P. 645-651.
9. Rienzi L., Ubaldi F., Iacobelli M. et al. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer // Hum. Reprod.– 2002.– Vol. 17.– P. 1852-1855
10. Schoolcraft W., Gardner D., Lane M et al. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parametrs affecting outcome in two IVF programs // Fertil. Steril.– 1999.– Vol. 72.– P. 604-609.

5. *Edgar D., Bourne H., Speirs S. et al.* A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos // *Hum. Reprod.*— 2000.— Vol. 15.— P. 175-179.
6. *Elst V.D., Abbeel E.V., Vitrier S. et al.* Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates // *Hum. Reprod.*— 1997.— Vol. 12.— P. 1513-1521.
7. *Guerif F., Bidault R., Cadoret V et al.* Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal // *Hum. Reprod.*— 2002.— Vol. 17.— P. 1321-1326.
8. *Lassale B., Testard J., Renard J.* Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol // *Fertil. Steril.*— 1985.— Vol. 44.— P. 645-651.
9. *Rienzi L., Ubaldi F., Iacobelli M. et al.* Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer // *Hum Reprod.*— 2002.— Vol. 17.— P. 1852-1855.
10. *Schoolcraft W., Gardner D., Lane M et al.* Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parametrs affecting outcome in two IVF programs // *Fertil. Steril.*— 1999.— Vol. 72.— P. 604-609.
11. *Somers G., Trounson A., Wilton L.* Allocation of cells to the inner cell mass and trophoctoderm of 3/4 mouse embryos // *Reprod. Fertil.*— 1990.— Vol. 2.— P. 51-59.
12. *Stein A.* Assisted hatching by partial zona dissection in human preembryos in patients with reccurent implantation failure after in vitro fertilization // *Fertil. Steril.*— 1995.— Vol. 63.— P. 838-841.
13. *Tarkowsky A.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetics.*— 1966.— Vol. 5.— P. 394-400.
14. *Van den Abbel E., Camus M., Van Waesberghe L.* Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation // *Hum. Reprod.*— 1997.— Vol. 12.— P. 2006-2010.
15. *Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D. et al.* Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer // *Hum. Reprod.*— 1999.— Vol. 14.— P. 2345-2349.
16. *Zeibe S., Lundin K., Loft A. et al.* FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18,21,22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology // *Hum. Reprod.*— 2003.— P. 2575-2581.
17. *Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S.* Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization // *Hum Reprod.*—1997.— Vol. 12.—P. 1545-1549.

Accepted in 11.05.2004

Послупила 11.05.2004