

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

ZECH N, STECHER A, VANDERZWALMEN P, ZECH H
Vitrifikation von der Eizelle bis zur Blastozyste

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (4) (Ausgabe
für Schweiz), 9-13*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (4) (Ausgabe
für Österreich), 13-18*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

VITRIFIKATION VON DER EIZELLE BIS ZUR BLASTOZYZE

Summary

The technique of vitrification was modified and optimized. The development of a "hemistraw" system helped to overcome the problem of the inhomogen freezing in a conventional straw. This "hemistraw" can be deposited in a conventional cryo-vial. So the hemistraw is a closed system and can be stored in the nitrogen tanks without the risk of contamination. We could reach good results with vitrification of metaphase II oocytes and of blastocysts using the "hemistraw" system.

The mechanical damage of the spindle in Metaphase II oocytes – occurring through the formation of ice crystals – can be avoided using the vitrification technique which is shown in our results. We could reach 28.5 % implantation rate / blastocyst after vitrification (after opening the blastocoel). We consider that the vitrification will get a standard procedure in cryopreservation because of the good results and the easy handling.

KURZFASSUNG

Die Methode der Vitrifikation wurde modifiziert und optimiert. Durch die Entwicklung des sogenannten „Hemistraws“ konnte das Problem der ungleichen Kälteverteilung im Straw umgangen werden. Da der „Hemistraw“ in konventionellen Kryobehältern eingebracht werden kann, müssen die „Hemistraws“ nicht als offenes System im Lagertank vorliegen und sind so keiner Kontaminationsgefahr ausgesetzt. Es sind zufriedenstellende Resultate bezüglich der Vitrifikation von MII-Eizellen und Blastozysten mit dem „Hemistraw-System“ erzielt worden. Da bei der Vitrifikation keine Eiskristallbildung auftritt, kann die mechanische Schädigung des Spindelapparates von Metaphase II-Eizellen durch Eiskristalle ausgeschaltet werden. Die Ergebnisse stützen sich auf die Überlebensrate sowohl von Eizellen, als auch auf ihre weitere Entwicklung zu Embryonen. Die Expansionsrate von vitrifizierten und wiederaufgetauten Blastozysten (nach Eröffnen des Blastozoels vor der Vitrifikation), und das weitere Entwicklungspotential in vivo (28,5 % Implantationsrate/ Blastozyste) lassen den Schluß zu, daß diese Technik, auch durch das einfache Handling, Einzug in die

konventionellen Gefriertechniken der Reproduktionsmedizin halten wird.

EINLEITUNG

Mit den heutigen Techniken in der Reproduktionsmedizin ist es möglich, verschiedenste Zell- und Gewebearten wie Spermien, Oozyten, Vorkernstadien (2 PN), Embryonen (Tag 2 bis Tag 4), Blastozysten (Tag 5 und Tag 6), ovarielles und testikuläres Gewebe tiefzufrieren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt wieder einsetzen zu können.

Damit so wenig Schaden wie möglich an der Zelle/dem Gewebe entsteht, müssen die verschiedenen potentiell schädigenden Effekte des Abkühlens ins Kalkül gezogen werden, um die richtige Einfrieremethode zell- bzw. gewebsspezifisch einsetzen zu können [1–8].

Durch eine Regulierung der Abkühlrate unter Berücksichtigung des verwendeten Kryoprotektivums und dessen Konzentration kann eine Optimierung erzielt werden. So können metabolische Störungen, irreversible Schädigungen an Lipidprotein komplexen, erhöhte Löslichkeit für Gase sowie ein erhöhter osmotischer Druck

in Folge von Dehydratation und Eisbildung verhindert oder weitestgehend vermieden werden [9–13].

Kryoprotektiva schützen Zellen durch direkte Interaktion mit der Zellmembran. Sie setzen den Gefrierpunkt der Lösung herab. Der „Dehydrierungseffekt“ von nicht-permeablen Kryoprotektiva mit der osmotischen Wirkung im externen „Milieu“ trägt dazu bei, daß der Zelle Wasser entzogen wird, und so eine intrazelluläre Eisbildung weitestgehend vermieden wird. Beim Auftauprozess wird der Wassereinstrom in die Zelle durch die Kryoprotektiva verringert. Damit bleibt der Embryo vor exzessiver und zu schneller Rehydrierung geschützt. Zudem spielt die Kristallisation mit ihrer mechanisch schädigenden Wirkung eine wesentliche Rolle in bezug auf das Zellüberleben nach dem Auftauen.

Das Auftauen der verschiedenen Zellarten hat je nach der verwendeten Technik des Einfrierens zu geschehen [14].

Die zwei wichtigsten Kryokonservierungsverfahren sind:

1. „Slow cooling“ (langsames Einfrieren) [15, 16]
Für diese Art des Einfrierens sind computergesteuerte Apparate nötig, um eine Abkühlrate von z. B. $-0,3^{\circ}\text{C}$ pro Minute zu gewährleisten. Die Konzentration an zugesetzten Kryoprotektiva ist niedrig (10%), wodurch die chemische Schädigung an den Zellen gering gehalten wird. Während des Einfrierens tritt eine Kristallisation auf. Dadurch werden mechanische Schäden an der Zelle verursacht (Abb. 1).

2. Vitrifikation [17–20]
Dabei wird durch das direkte Einbringen („Plunging“) in flüssigen Stickstoff eine Abkühlrate von -2.000 bis -20.000°C pro Minute erreicht. Da die Zellen direkt in einen amorphen Zustand (Verglasung) übergehen – bedingt auch durch die hohen Kon-

VITRIFIKATION VON DER EIZELLE BIS ZUR BLASTOZYTE

zentrationen an Kryoprotektiva (40 bis 60 %) – sind die mechanischen Schäden an der Zelle gering, die chemischen Schäden aber hoch.

Bei der Kryokonservierung von Oozyten aus ovariellem Gewebe und von Primordialfollikeln mit und ohne Granulosa-Zellen ist die langsame Kryokonservierung als Standardmethode eingesetzt worden. Das größte Problem dabei ist – aufgrund der Kristallbildung – die mechanische Schädigung des Spindelapparates sowie die daraus resultierende Instabilität der Chromosomen [21, 22].

Deshalb suchten wir in der Vitrifikation einen Ansatz für die Lösung dieses Problems. Durch das direkte Überführen der Zelle in den amorphen Zustand können Schädigungen am Spindelapparat und an den Chromosomen weitestgehend vermieden werden.

Bei der Kryokonservierung von Blastozysten ist – bedingt durch das Blastozoele – die Gefahr der Eiskristallbildung sehr hoch. Durch die Eröffnung des Blastozoeles vor dem

Tiefrieren konnte eine Minimierung/Vorbeugung dieser Eiskristallbildung erzielt werden.

Die klassische Vitrifikationstechnik beruht auf dem „French-Mini-Straw“ [1]. Dieses System ist nur beschränkt geeignet für die Vitrifikation, da sich systembedingt die Kälte nur sehr inhomogen ausbreiten kann. Daher kamen andere Systeme zum Einsatz, wie offene und gezogene Straws, sowie elektronisch gezogene Kupferdrähte (Abb. 2).

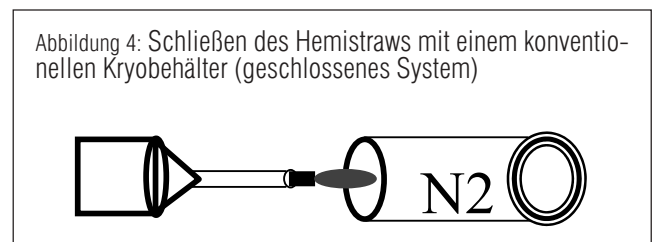
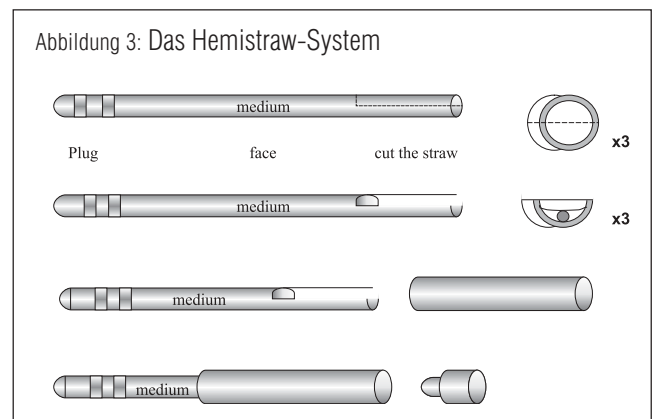
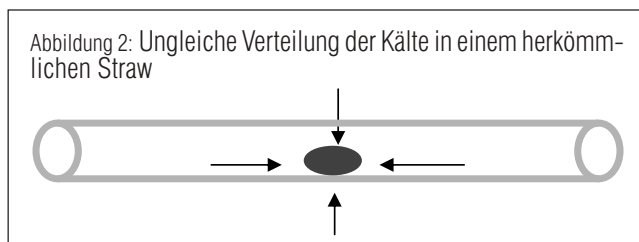
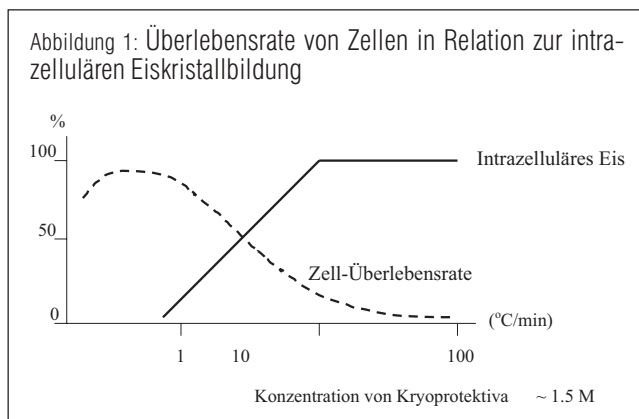
Um die Vitrifikationstechnik noch effizienter zu gestalten, wurde das „Hemi-Straw“-System von uns entwickelt. Durch die Modifikation eines gewöhnlich benutzten Straws wird ein intensiver Kontakt zwischen der Eizelle bzw. dem Embryo und dem flüssigen Stickstoff ermöglicht (Abb. 3). Zur Aufbewahrung dieser Straws dienen konventionelle Kryobehälter. Dies ist mit den anderen kommerziellen Systemen nicht möglich (Abb. 4).

MATERIAL UND METHODE

Germinalvesikel-Eizellen (GV), Eizellen in Metaphase I (MI) und in Metaphase II (M II), Vorkernstadien (2 PN), 4 bis 8-Zeller (Tag 2/Tag 3), Morulae (M-Tag 4), sowie Blastozysten (Tag 5 und Tag 6) wurden in einfachen und sequentiellen Medien kultiviert und vitrifiziert. Eizellen, die mit 1 Vorkern (1 PN) und mit 3 Vorkernen (3 PN) befruchtet waren, wurden auch vitrifiziert.

Die Vitrifikationslösung bestand aus einer Mischung von Ethylenglykol (EG)-Dimethylsulfoxid (DMSO) in PBS.

Die Gefrierschritte bestanden in einer Inkubation der Zellen für 2 Minuten in einer EG (7,5 %)-DMSO (7,5 %) -Lösung. Dann folgte ein Inkubationsschritt für 15 Sekunden in EG (15 %)-DMSO (15 %). Das Auftragen auf den Hemi-Straw erfolgte in einem dünnen Film. Dieser Straw wurde direkt in flüssigen Stickstoff einge-



bracht. Danach wurde der Hemi-Straw in einen größeren Straw (300 µL) mittels Pinzette unter flüssigem Stickstoff überführt und zur Langzeitlagerung in Stickstofftanks gegeben.

Das Auftauen erfolgte, indem man das gesamte System direkt bei 40°C in 0,5 molare (M) Saccharose-Lösung einbrachte. Nach 2-minütiger Inkubation wurden die Zelle(n) in das Kulturmedium gegeben.

Es wurde die Fertilisations- und Teilungsrate über 3 Tage in G1-Medium (Vitrolife), sowie die in vitro-Entwicklung über 48 Stunden in G2-Medium (Vitrolife) und das in vitro-Entwicklungspotential bis zur Blastozyste beurteilt.

ERGEBNISSE (TAB. 1–3)

Es wurden insgesamt 24 Germinalvesikel-Eizellen und 13 Metaphase I-Eizellen vitrifiziert. Dabei waren nach dem Auftauen 17 (71 %) der Germinalvesikel-Eizellen sowie 10 (59 %) der Metaphase I-Eizellen nach dem Auftauen intakt. 29 % (7) der Germinalvesikel-Eizellen, sowie 46 % (6) der Metaphase I-Eizellen entwickelten sich weiter zum Metaphase II-Stadium.

Bei den aus in vitro-maturierten Germinalvesikel-Eizellen und Metaphase I-Eizellen resultierenden MII-Eizellen waren die Ergebnisse folgende: Es wurden 12 MII-Eizellen (aus in vitro-maturierten Germinalvesikel-Eizellen), sowie 9 MII-Eizellen (aus in vitro-maturierten Metaphase I-Eizellen) vitrifiziert. Nach dem Auftauen waren 67 % (8) der aus Germinalvesikel-Eizellen abstammenden und 78 % (7) der aus Metaphase I-Eizellen abstammenden MII-Eizellen intakt und konnten zur ICSI herangezogen werden. 33 % der aus Germinalvesikeln resultierenden MII-Eizellen waren mit 2 Vorkernen fertilisiert (4 x 2 PN). 33 % der aus Metaphase I-Eizellen nachgereiften

MII-Eizellen (3 x 2 PN) waren nach 24 Stunden normal fertilisiert.

In der weiteren Kultur entwickelten sich ein 2-Zeller sowie zwei 4-Zeller aus den von Germinalvesikeln abstammenden Eizellen. Bei den aus Metaphase I-Eizellen abstammenden befruchteten Eizellen entwickelten sich ein 2-Zeller und auch zwei 4-Zeller weiter.

Es wurden 27 unbefruchtete Metaphase II-Eizellen vitrifiziert, wobei 74 % (20) nach dem Auftauen intakt waren. Von den nicht-inseminierten

Metaphase II-Eizellen wurden 29 vitrifiziert. Nach dem Auftauen waren 79 % (23) intakt und konnten für eine ICSI eingesetzt werden. Nach 24 Stunden sah man 17 x 2 PN-Stadien (59 %). Es entwickelten sich daraus 13 x ein 2-Zeller und 4 x ein 4-Zell-Stadium.

Es wurden 8 1 PN-Stadien, sowie 11 3 PN-Stadien vitrifiziert. Nach dem Auftauen waren 75 % (6) der 1 PN-Stadien, sowie 82 % (9) der 3 PN-Stadien intakt. Nach weiteren 24 Stunden konnten 2 x 2 bis 4-Zeller bei den vitrifizierten 1 PN Zellen

Tabelle 1

Typ	Nr. vitrifiziert	Nr. intakt nach Auftauen	Entwicklung nach 24 h	Weitere Entwicklung
Unreife EZ				
GV	24	17 (71 %)	7 MII (29 %)	
MI	13	10 (59 %)	6 MII (46 %)	
MII EZ				
IVM GV	12	8 (67 %) ICSI	4 x 2 PN (33 %)	1 x 2-Zeller, 2 x 4-Zeller
IVM MI	9	7 (78 %) ICS	3 x 2 PN (33 %)	1 x 2-Zeller, 2 x 4-Zeller
Unbefr. MII	27	20 (74 %)		
Nicht insem. MII	29	23 (79 %) ICSI	17 x 2 PN (59 %)	13 x 2-Zeller, 4 x 4-Zeller

Tabelle 2

Typ	Nr. vitrifiziert	Nr. intakt nach Auftauen	Entwicklung nach 24 h
1 PN u. 3 PN			
1 PN	8	6 (75 %)	2 x 2–4-Zeller (50 %)
3 PN	11	9 (82 %)	6 x 2–4–6-Zeller (55 %)

Tabelle 3

Typ	Nr. vitrifiziert	Nr. intakt nach Auftauen	Entwicklung nach 24 h
Embryonen Tag 2/3			
von 1 PN	2	1 (50 %)	1 (50 %)
von 3 PN	12	12 (100 %)	6 (50 %)
> 50 % Fragmentierungen	28	22 (79 %)	18 (64 %)
nach Entwicklungsstopp	56	42 (75 %)	
	Nr. vitrifiziert	Nr. transferiert	% Implantationen/Bl.
Blastozysten Tag 4–6	54	42 (78 %)	12/42 (28,5 %)

gesehen werden (25 %), sowie 6 x 2 bis 4 bis 6-Zeller (55 %) bei den 3 PN-Stadien.

50 % (1) der Embryonen, die am Tag 2/3 vitrifiziert wurden und ursprünglich mit 1 PN fertilisiert waren, waren nach dem Auftauen intakt und entwickelten sich nach 24 Stunden weiter. Insgesamt 12 der Tag 2/3 Embryonen – von 3 PN-Stadien resultierend – wurden vitrifiziert. Alle (100 %) waren nach dem Auftauen intakt und 50 % (6) entwickelten sich weiter.

Von den Embryonen, die mehr als 50 % Fragmentationen aufwiesen und ursprünglich aus Eizellen, die mit 3 PN befruchtet waren, abstammten, wurden 28 vitrifiziert. Nach dem Auftauen waren 79 % (22) intakt und 64 % (18) entwickelten sich über 24 Stunden hinaus weiter.

56 Embryonen, die sich nicht mehr weiterentwickelt hatten, wurden vitrifiziert. 75 % (42) waren nach dem Auftauen intakt.

Insgesamt wurden 54 Blastozysten vitrifiziert. 78 % (42) von diesen Blastozysten konnten nach dem Auftauen transferiert werden. Die Implantationsrate pro Blastozyste lag bei 28,5 % (12/42).

DISKUSSION

Wir versuchten, die Methode der Vitrifikation in mehreren Punkten zu optimieren. Um die ungleiche Verteilung der Kälte im Straw bei der Vitrifikation zu umgehen, haben wir den sogenannten „Hemi-Straw“ entwickelt. Durch das Aufbewahren des Hemistraws in einem herkömmlichen Straw ist die Kontaminationsgefahr des offenen Systems nicht gegeben. Unsere Ergebnisse mit der Vitrifikation von Eizellen und Embryonen zeigen, daß das Hemistraw-System einen großen Stellenwert in der Zukunft haben kann.

Die Vitrifikation stellt eine Möglichkeit dar, MII-Eizellen zu vitrifizieren, ohne dabei den Spindelapparat zu beschädigen, da keine Eiskristallbildung erfolgt. Unsere Ergebnisse (Tabelle 1) zeigen eine hohe Überlebensrate nach Vitrifikation, speziell bei Eizellen, die ohne in vitro-Maturation im Metaphase II-Stadium vitrifiziert wurden. Nach dem Auftauen konnten diese Eizellen erfolgreich mit ICSI befruchtet werden (33 %).

Die Vitrifikation von Blastozysten nach Eröffnen des Blastozoels ergab eine gute Auftaurate (78 % intakte Blastozysten). Es konnten 42 Embryonen transferiert werden. Die Implantationsrate pro Blastozyste betrug 28,5 %.

Die Vitrifikation mit dem „Hemistraw“ in Kombination mit definierten Kryoprotektiva und adaptierten Äquilibrierungs- sowie Inkubationszeiten entwickelt sich zu einer klinisch bedeutenden Technik. Es darf angenommen werden, daß diese neue Technik durch das einfache Handling und die guten Ergebnisse Einzug in die konventionellen Gefriertechniken der Reproduktionsmedizin halten wird. Damit können in der Zukunft neue Therapien in der Reproduktionsmedizin angeboten werden.

Literatur:

1. Al-Hasani S, Diedrich K et al. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987; 2: 695–700.
2. Ashwood-Smith MJ, Farrant J. *Low temperature preservation in medicine and biology*. Pitman Press, Bath, 1980.
3. Elliot K, Whelan J. *CIBA Foundation Symposium 52. The freezing of mammalian embryos*. Elsevier/ North Holland, Amsterdam, 1977.
4. Fahay GM. The relevance of cryoprotectant „toxicity“ to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23: 1.
5. Friedler S et al. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988; 49: 743.
6. Kola I et al. Vitrication of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology* 1988; 38: 467–74.

7. Kono T, Tsunoda Y. Ovicidal effects of vitrification solution and the vitrification-warming cycle and establishment of the proportion of toxic effects on nuclei and cytoplasm of mouse oocytes. *Cryobiology* 1988; 25: 197.

8. Park SE et al. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril* 1997; 68: 920–6.

9. Carroll J. et al. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*, 1990; 90: 547

10. Dulioust E et al. Long-term effects of embryo freezing in mice. *PNAS USA* 1992; 92: 589–93.

11. Edgar DH et al. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2000; 15: 175–9.

12. Leibo S. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Membr Biol* 1980; 53: 179.

13. Mandelbaum J et al. Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod* 1987; 2: 709–15.

14. Mandelbaum J, Menezo Y. Embryo cryopreservation in humans. In: Gardner DH et al (eds). *A comprehensive textbook of assisted reproductive technology: laboratory and clinical perspectives*. Martin Dunitz Publisher, London, 2001: 244–57.

15. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and non-equilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysiol* 1990; 17: 53.

16. Willadsen SM. Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. In: Elliot K, Whelan J (eds). *CIBA Foundation Symposium 52. The freezing of mammalian embryos*. Elsevier/ North Holland, Amsterdam, 1977.

17. Fahay GM et al. Vitrication as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407.

18. Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrication. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 479.

19. Rall W, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C vitrication. *Nature* 1985; 313: 573.

20. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by

VITRIFIKATION VON DER EIZELLE BIS ZUR BLASTOZyste

vitrification. *Cryobiology* 1987; 24: 387.
21. Glenister PH et al. The incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. *Gamete Res* 1987; 16: 205.
22. Wright G et al. Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990; 5: 109–15.



Dr. Nicolas Zech

Geboren 1973 in Vorarlberg (A). Studium in Innsbruck, Promotion 1998, Dissertationsthema: Hämatopoetische Stammzellen. Von 1998 bis 2001 Absolvierung der Gegenfächer zum Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie in

Bregenz und am Landeskrankenhaus Bregenz. Mehrere Studienaufenthalte in Amerika (Davis, San Diego, Louisville, Boston, Chicago) und Schweden (Göteborg). Seit Oktober 2001 Assistenzarzt an der Universitäts-Frauenklinik Zürich.

Arbeitsschwerpunkte: Stammzellen, Onkologie, Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, Anti-Aging.

Korrespondenzadresse:

*Dr. Nicolas Zech
CH-8004 Zürich, Sihlfeldstraße 141
E-mail: nikizech@hotmail.com*

NEUES AUS DEM VERLAG

Abo-Aktion

Wenn Sie Arzt sind, in Ausbildung zu einem ärztlichen Beruf, oder im Gesundheitsbereich tätig, haben Sie die Möglichkeit, die elektronische Ausgabe dieser Zeitschrift kostenlos zu beziehen.

Die Lieferung umfasst 4–6 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Das e-Journal steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) zur Verfügung und ist auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

➔ **Bestellung kostenloses e-Journal-Abo**

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)

Krause & Pachernegg GmbH · Verlag für Medizin und Wirtschaft · A-3003 Gablitz

Wir stellen vor:



Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Offizielles Organ: – Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen (AGRBM); – Berufsverband der Reproduktionsmedizinischen Zentren Deutschlands (BRZ); – Dachverband Reproduktionsbiologie und -medizin (DVR); – Dt. Gesellschaft für Andrologie (DGA); – Dt. Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF); – Dt. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM); – Deutsches IVF-Register (DIR); – Embryologenforum Austria (EFA); – Österr. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie (OEGRM); – Sektion Reproduktionsbiologie und -medizin der Dt. Gesellschaft für Endokrinologie (SRBM/DGE)

Homepage: <http://www.kup.at/reproduktionsmedizin>