

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

VANDERZWALMEN P, RIEDLER I, STECHER A, ZECH H, ZECH N
*Vitrifikation von humanen Embryonen in einem fortgeschrittenen
Entwicklungsstadium*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 1998; 8 (2) (Ausgabe für
Österreich), 20-26*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

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

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

VITRIFIKATION VON HUMANEN EMBRYONEN IN EINEM FORTGE- SCHRITTENEN ENTWICKLUNGSSTADIUM

Summary

The controlled slow cryopreservation is the routine method in cryopreservation of human embryos. Defects which occur during the conventional cryopreservation due to formation of ice for example are not given for vitrification. Vitrification is the solidification of a liquid brought about by an extreme elevation in viscosity during cooling. The influence of the stage of development, the ongoing development of embryos and the implantation after vitrification and thawing are analysed.

The toxicity of the vitrification solution on human embryos (pathologically fertilized) in the stage of morula or blastocyst is tested. Of all embryos vitrified 100 % (7 morulae, 5 blastocysts) survived with > 80 % intact cells. 43 % (3/7) of the morulae developed to blastocysts, 20 % (1/7) of the blastocysts stayed in the stage of blastocysts. 29 % (2/7) of the morulae and 60 % (3/5) of the blastocysts developed to expanded blastocysts.

The in vitro survival of embryos (pathologically fertilized) was evaluated

after a 2-step-vitrification. 50 % (4) of the vitrified morulae and 57 % (4) of the blastocysts survived after vitrification and thawing with > 80 % intact cells. 38 % (3) of the morulae and 29 % (2) of the blastocysts survived with > 50 % intact cells. 29 % (2/7) of the morulae developed to blastocysts, 33 % (2/6) blastocysts stayed in the stage of blastocysts. 29 % (2/7) of the morulae and 33 % (2/6) of blastocysts developed to expanded blastocysts. From 34 patients 86 embryos (24 morulae, 23 early blastocysts, 39 blastocysts) were vitrified. 74 % of the embryos survived and 91 % of the patients could have a transfer. The highest pregnancy rate (25 %) was achieved with embryos from the early blastocyst stage. The pregnancy rate per transfer was 16 % in average.

Pregnancy resulted from vitrified morulae only when the morulae reached this stage on day 4. This was the same for early blastocysts. Transfer of vitrified blastocysts which developed to blastocysts on day 5 resulted also in pregnancy. Embryos which developed slower did not result in a pregnancy.

rate humaner Embryonen (pathologisch aktiviert) wurde nach einer 2-Schritt-Vitrifikation ausgewertet. Es überlebten 50 % (4) der vitrifizierten Morulae und 57 % (4) der vitrifizierten Blastozysten die Vitrifikation mit > 80 % intakten Zellen, 38 % (3) der Morulae und 29 % (2) der Blastozysten überlebten mit > 50 % intakten Zellen die Vitrifikation und das anschließende Auftauen. 29 % (2/7) der Morulae entwickelten sich zu Blastozysten weiter, 33 % (2/6) der Blastozysten blieben im Blastozystenstadium. 29 % (2/7) der Morulae und 33 % (2/6) der Blastozysten entwickelten sich zu expandierten Blastozysten.

Von 34 Patienten wurden 86 Embryonen vitrifiziert (24 im Morulastadium, 23 im frühen Blastozystenstadium und 39 im Blastozystenstadium). 74 % der Embryonen standen für 91 % aller Patienten für einen Transfer zur Verfügung. Die höchste Schwangerschaftsrate (25 %) konnte mit Embryonen nach Vitrifikation im frühen Blastozysten erzielt werden. Die durchschnittliche Schwangerschaftsrate betrug 16 % pro Transfer.

Wurden Embryonen im Morulastadium vitrifiziert, so entwickelte sich eine Schwangerschaft nur bei Embryonen, die am Tag 4 im Morulastadium waren. Dies galt auch für frühe Blastozysten. Der Transfer von vitrifizierten Blastozysten, die am Tag 5 im Blastozystenstadium waren, führte zu einer Schwangerschaft. Embryonen, die sich morphologisch langsamer entwickelten ergaben keine Schwangerschaft.

ZUSAMMENFASSUNG

Die kontrollierte langsame Kryokonservierung ist zur Zeit Routinemethode bei der Kryokonservierung humaner Embryonen. Durch die Vitrifikation können Schädigungen, wie sie bei den konventionellen Methoden z. B. durch Eisbildung auftreten, ausgeschlossen werden, weil bei der Vitrifikation das Festwerden der Flüssigkeit nicht durch Kristallisation sondern durch Erhöhung der Viskosität beim Abkühlen erzielt wird. Der Einfluß des Entwicklungsstadiums, die weitere Entwicklung der Embryonen

sowie die Implantation nach Vitrifikation und Auftauen wurde von uns beobachtet.

Die Toxizität der Vitrifikationslösung an humanen pathologisch fertilisierten Embryonen im Morula- bzw. Blastozystenstadium wurde überprüft. Es überlebten 100 % aller vitrifizierten Embryonen (7 Morulae, 5 Blastozysten) mit mehr als 80 % intakten Blastomeren. 43 % (3/7) der Morulae entwickelten sich zu Blastozysten, 20 % (1/5) der Blastozysten, bleiben im Blastozystenstadium. 29 % (2/7) der Morulae und 60 % (3/5) der Blastozysten entwickelten sich zu expandierten Blastozysten. Die in vitro Überlebens-

EINLEITUNG

Die Kryokonservierung wird als eine akzeptable Lösung angesehen, um überzählige Embryonen, die durch die In vitro Fertilisierung häufig entstehen, für einen späteren Transfer aufzubewahren und die Gefahr von Mehrlingschwangerschaften zu reduzieren. Die Embryonen werden bei niedrigen Temperaturen in einem lebensfähigen Zustand gehalten, bei denen die metabolischen Aktivitäten sistieren [1].

Das Tiefgefrieren von Embryonen ist heute weltweit in der Sterilitätstherapie Standard.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, Embryonen tiefzueinfrieren:

1. Die kontrollierte langsame Kryokonservierungsmethode (Gleichgewichtskryokonservierung), die 1971 von Whittingham eingeführt wurde [2], und
2. die Nicht-Gleichgewichtskryokonservierung mit a) der ultra-schnellen Kryokonservierung und b) der Vitrifikation, die 1985 an Mäuseembryonen von Rall und Fahy [3] entwickelt wurde.

ad 1) Die *kontrollierte langsame Kryokonservierung* ist zur Zeit die Routinemethode zur Konservierung humaner Embryonen. Diese werden so langsam abgekühlt, daß eine Dehydrierung der Zellen in dem Ausmaß erfolgen kann, daß die Bildung von großen intrazellulären Eiskristallen reduziert wird. Die Kryoprotektiva entziehen der Zelle osmotisch Wasser, das extrazellulär

friert. Die Zelle darf nicht so stark dehydriert werden, daß der Embryo durch die hohe intrazelluläre Osmolalität geschädigt wird. Um eine zu starke Dehydrierung zu vermeiden, wird versucht, einen Gleichgewichtszustand zwischen ausströmendem intrazellulärem und extrazellulärem Wasser herzustellen. Dies wird durch Zugabe einer nicht den Embryo durchdringenden Lösung, wie z. B. Saccharose ermöglicht. Diese erhöht die extrazelluläre Osmolalität. Beim langsamen Abkühlen bleibt die Zelle im Gleichgewicht mit der gefrorenen Lösung und wird dabei dehydriert. Es besteht die Gefahr einer physikalischen Schädigung des Embryos durch eine extrazelluläre Eisbildung und eine Bruchschädigung durch die Ausbildung und das Wachstum von intrazellulärem Eis, wenn die Zellen zu schnell abgekühlt werden. Außerdem kann durch die zunehmende Konzentration der nicht gefrorenen extrazellulären Lösung eine toxische Schädigung des Embryos erfolgen.

Für die langsame Kryokonservierung ist ein teures computergesteuertes Gerät notwendig, außerdem ist dieses Verfahren sehr zeitintensiv.

ad 2a) Bei den *ultra-schnellen Gefriermethoden* werden nach der Äquilibration der Embryonen in einer Lösung aus 3,5–4,5 M DMSO (Dimethylsulfoxid) und 0,25–0,5 M Saccharose diese direkt in flüssigen Stickstoff gebracht [4, 5]. Dabei entstehen kleine Eiskristalle. Diese sind thermodynamisch instabiler als große Kristalle, weil sie bei niedrigeren Temperaturen schmelzen [6], und können bei zu langsa-

mem Auftauen zu großen Kristallen aggregieren (Rekristallisierung).

ad 2b) Bei der *Vitrifikation* wird nicht nur der Kühlprozeß sehr vereinfacht, es wird auch die Gefahr der physikalischen und chemischen Schädigung durch extrazelluläre und intrazelluläre Eisbildung ausgeschlossen.

Unter Vitrifikation versteht man das Festwerden einer Flüssigkeit, die nicht durch Kristallisation, sondern durch extreme Erhöhung der Viskosität während des Abkühlens verursacht wird [7]. Eine Vitrifikationslösung besteht aus einer Mischung eines hochkonzentrierten permittierenden Kryoprotektivums (DMSO, Azetamid, Propylenglykol, Glycerol, Ethylenglykol) und eines nicht durchdringenden Kryoprotektivums (Polyethylenglykol, Ficoll, Saccharose) in gepufferter Salzlösung. Die Konzentration an Kryoprotektivum ist so hoch, daß bei sehr schnellem Abkühlen auf -196 °C (der Straw wird direkt in flüssigen Stickstoff gegeben) die Viskosität stark zunimmt. Der visköse Festkörper hat die physikalischen Eigenschaften eines festen Stoffes, behält aber die molekulare Struktur einer Flüssigkeit. Dies wird erreicht durch die Zugabe von sehr hohen Konzentrationen an Kryoprotektivum (6–8 M).

Unser Ziel war es, zu untersuchen, ob die Methode der Vitrifikation auch bei humanen Embryonen anwendbar ist. Im Verlauf der Zeit wurde diese nach Versuchen im Tiermodell und nach Toxizitätstests an pathologisch fertilisierten menschlichen Eizellen für humane

Embryonen adaptiert. Der Einfluß des Entwicklungsstadiums, die weitere Entwicklung der Embryonen nach dem Auftauen, sowie die Implantation nach Vitrifikation und Auftauen wurde analysiert.

MATERIAL UND METHODEN

Zunächst wurde im Rahmen der Toxizitätsprüfungen das Überleben nach Vitrifikation und Auftauen von Morulae/Blastozysten beobachtet. Diese wurden aus einer Kultur von Eizellen gewonnen, die pathologisch mit einem oder drei Vorkernen befruchtet waren. Anschließend wurden Embryonen schlechter Qualität verwendet.

Daraufhin wurde ein Teil schöner Tag-2-Embryonen in S2-Medium (Scandinavian IVF Science AB) bis zum Tag 4 bis 6 weiterkultiviert. Die Morulae/Blastozysten wurden mittels Vitrifikation kryokonserviert, und nach dem Auftauen der Patientin transferiert.

Die Vitrifikation erfolgte nach der Methode von Mahmoudzadeh [1] in zwei Schritten. Alle Lösungen basierten auf PBS-HSA (Phosphatgepufferte Salzlösung mit humanem Serum-Albumin). Ausgewählte Embryonen wurden bei Raumtemperatur in 20 % (v/v) Ethylenglykol (= EG 20) für drei Minuten äquilibriert.

Dann wurden diese in eine zweite Lösung, die aus 40 % (v/v) Ethylenglykol, 18 % (w/v) Ficoll und 0,3 M Saccharose (EFS) zusammengesetzt war, transferiert. Nach kurzer Exposition in dieser Lösung wurden die Embryonen

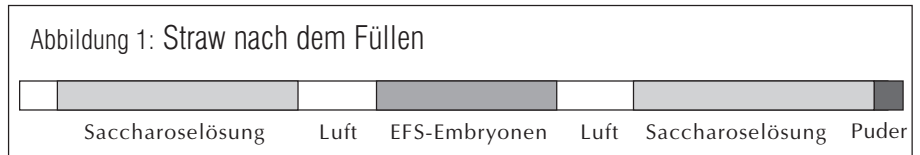


Tabelle 1: Toxizitätstest: In-vitro-Überleben pathologisch fertilisierter humaner Morulae und Blastozysten nach Äquilibrierung (3 min. in EG20 und 1 min. in EFS)

Stadium der Embryonen	Anzahl der äquilibrierten Embryonen	Anzahl der aufgetauten überlebenden Embryonen		Anzahl der Embryonen, die sich weiterentwickelten zu	
		> 80 % intakte Blastomeren	> 50 %	Blastozysten	expand. Blastozysten
Morula	7	7 (100 %)	0	3/7 (43 %)	2/7 (29 %)
Blastozyste	5	5 (100 %)	0	1/5 (20 %)	3/5 (60 %)

in einen 0,25 ml Straw geladen. Der Straw wurde zuvor mit ca 3,5 cm 0,5 M Saccharoselösung gefüllt, auf die dann 9 mm Luft und ca. 2,5 cm EFS, in das die Embryonen gegeben wurden, folgten. Dann wurde wieder 9 mm Luft belassen, und der Straw mit 0,5 M Saccharoselösung aufgefüllt, mit Puder verschlossen und sofort in flüssigen Stickstoff gegeben (siehe Abb. 1). Die Zeit zwischen der Zugabe der Embryonen zur EFS-Lösung und der Deposition in flüssigem Stickstoff wurde möglichst kurz gehalten (max. 60 Sekunden).

Die Embryonen wurden im Wasserbad bei 40 °C für 10 Sekunden aufgetaut, darauf der Straw in eine 0,25 M Saccharoselösung entleert. Nach 3 min. Äquilibrierung wurde die Vitrifikationslösung herausverdünnt, indem die Embryonen in S2 Medium mehrmals gewaschen wurden. Die weitere Kultivierung für in vitro Beobachtungen oder für den Transfer erfolgte auch in S2-Medium.

ERGEBNISSE

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Toxizitätsprüfung an humanen pathologisch fertilisierten Embryonen im Morula- bzw. Blastozystenstadium zusammengefaßt. Von 7 Morula und 5 Blastozysten wiesen alle Embryonen (100 %) mehr als 80 % intakte Blastomeren nach der Vitrifikation und dem Auftauen auf. Drei von 7 Morulae entwickelten sich weiter zu Blastozysten (43 %), zwei entwickelten sich zu expandierten Blastozysten (29 %). Eine von 5 Blastozysten blieb im Blastozystenstadium (20 %), drei von 5 erreichten das Stadium der expandierten Blastozyste (60 %).

Die In-vitro-Überlebensrate humaner Embryonen schlechter Qualität nach einer 2-Schritt-Vitrifikation ist in Tabelle 2 dargestellt. Von 8 vitrifizierten Morulae überlebten 50 % [4] mit mehr als 80 % intakten Blastomeren, 38 %

Tabelle 2: In-vitro-Überleben vitrifizierter humaner Embryonen schlechter Qualität nach 2-Schritt-Vitrifikation: 3 min. in EG20, 1 min. in EFS

Stadium der Embryonen	Zahl der vitrifizierten Embryonen	Zahl der überlebenden Embryonen nach Auftauen		Zahl der Embryonen, die sich entwickelten zu	
		> 80% intakte Blastomeren	> 50%	Blastozyten	expand. Blast.
Morula	8	4 (50 %)	3 (38 %)	2/7 (29 %)	2/7 (29 %)
Blastozyste	7	4 (57 %)	2 (29 %)	2/6 (33 %)	2/6 (33 %)

Tabelle 3: In-vivo-Überleben der vitrifizierten humanen Embryonen nach 2-Schritt-Vitrifikation: 3 min. in EG20 und 1 min. in EFS

	Morula	Blastozyten	expandierte Blastozyten	gesamt
Zahl der Patienten	8	8	18	34
Zahl der vitrifizierten Embryonen	24	23	39	86
Zahl der Embryonen für Transfer (%)	17 (71 %)	18 (78 %)	29 (74 %)	64 (74 %)
Zahl der Transfers	7	8	16	31 (91 %)
Mittlere Anzahl der Embryonen pro Transfer	2,4	2,3	1,8	2,0
Fortdauernde Schwangerschaften pro Transfer (%)	1/7 (14,2 %)	2/8 (25%)	2/16 (12,5 %)	5/ 31 (16 %)
Fortdauernde Schwangerschaften pro Vitrifikation	1/8 (12,5 %)	2/8 (25 %)	2/18 (11 %)	5/34 (15 %)
Implantationsrate	6 %	11 %	7 %	8 %

[3] wiesen mehr als 50 % intakte Blastomeren auf. Zwei von 7 (29 %) dieser Morulae entwickelten sich zu Blastozysten und 2 von 7 (29 %) zu expandierten Blastozysten.

Von 7 vitrifizierten Blastozysten überlebten 57 % (4) mit mehr als 80% intakten Blastomeren, 29 % (2) wiesen mehr als 50 % intakte Blastomeren auf. Zwei von 6 (33 %) Blastozysten blieben im Blastozystenstadium, zwei von 6 (33 %) entwickelten sich zur expandierten Blastozyste.

Von 34 Patienten (Tab. 3) wurden 86 Embryonen vitrifiziert (24 im Morulastadium, 23 im Blastozystenstadium und 39 im expandierten Blastozystenstadium). Insgesamt standen davon 64 Embryonen (74%) nach dem Auftauen für einen Transfer zur Verfügung. Es konnte in 91% aller Patienten ein Transfer vorgenommen werden. In der Folge ergab sich eine fortdauernde Schwangerschaftsrates durchschnittlich von 15 % pro Vitrifikation/ Patient und von 16 % pro Transfer/ Patient. Die höchste

Schwangerschaftsrate (25 %) konnte mit frühen Blastozysten erzielt werden.

Die Schwangerschaftsrate in Relation zum Tag der Vitrifikation wird in Tabelle 4 aufgelistet. Wurden Embryonen im Morulastadium vitrifiziert, so entwickelte sich eine Schwangerschaft nur bei Embryonen, die am Tag 4 im Morulastadium waren. Dasselbe konnte für Blastozysten beobachtet werden. Waren die Embryonen morphologisch in ihrer Entwicklung etwas langsamer, so trat keine Schwangerschaft ein. Transfer von Tag-5-Embryonen, die im expandierten Blastozystenstadium waren, führten zu einer Schwangerschaft, nicht jedoch von Embryonen, die am Tag 4 oder Tag 6 das Blastozystenstadium erreichten.

DISKUSSION

Die Vitrifikation erleichtert und vereinfacht den Gefrierprozess für Embryonen wesentlich. Ein Vorteil dieser Methode ist es, daß die Embryonen nicht der Schädigung durch Eisbildung ausgesetzt sind, wie dies bei der kontrollierten langsamen Kryokonservierung der Fall ist. Der einzige Nachteil der Vitrifikation ist die chemische Toxizität, die sich aus der hohen Konzentration an Kryoprotektivum ergibt. Die Intensität der chemischen Toxizität korreliert direkt mit der Konzentration des Kryoprotektivums und der Zeit und Temperatur der Exposition der Embryonen in dieser Lösung [8].

Der Permeabilitätskoeffizient steht in direktem Zusammenhang mit dem Molekulargewicht und

Tabelle 4: Schwangerschaftsraten in Relation zum Tag der Vitrifikation

	Tag 4	Tag 5	Tag 6
MORULAE			
Zahl der Patienten	6	2	
Anzahl der Transfers	6	1	
Schwangerschaft	1	0	
BLASTOZYSTEN			
Zahl der Patienten	2	2	2
Anzahl der Transfers	2	2	2
Schwangerschaft	1	0	0
EXPANDIERTE BLASTOZYSTEN			
Zahl der Patienten	1	9	6
Anzahl der Transfers	1	9	4
Schwangerschaft	0	2	0

ist ein Maß für die Geschwindigkeit eines Kryoprotektivums, einen Embryo zu durchdringen bzw. ihn zu verlassen [9]. Ein niedriges Molekulargewicht ist von Vorteil, weil das Kryoprotektivum einen schnelleren Fluß in bzw. aus dem Embryo aufweist. Dadurch wird eine geringere chemische Toxizität induziert, weil die Zeit der Exposition von Embryonen im Vitrifikationsmedium verkürzt werden kann [10].

Kasai zeigte, daß eine Vitrifikationslösung, die Ethylenglykol enthält, weniger toxisch ist, als 1,2-Propanediol [11]. Er optimierte im Mäusemodell eine Vitrifikationsmethode, bei der 40 % Ethylenglykol, 30% Ficoll und 0,5 M Saccharose verwendet wurden. Diese EFS-Lösung wurde für die Vitrifikation von Mäuse-, Hasen- und Kuhmorulae verwendet [11].

Massip et al. [12] berichten, daß zuerst eine Äquilibrierung an niedrigere Konzentrationen des Kryoprotektivums (EG 20) erfolgen sollte, dann erfolgt erst die Exposition an die höhere Konzentration (EFS) für eine kurze

Zeit. Dadurch wird die Toxizität gering gehalten. Es wird die niedrigste Konzentration, die eine „Glasbildung“ bei einer Vitrifikation herbeiführen kann, verwendet [11, 13, 14].

Unsere Ergebnisse der Voruntersuchungen (Tab. 1) belegen, daß diese auch von uns verwendete Vitrifikationslösung eine geringe Toxizität aufweist.

Die Vitrifikation benötigt ein ideales Kryokonservierungsmedium, welches eine Eiskristallbildung sowohl in den extrazellulären als auch in den intrazellulären Kompartimenten verhindert.

Die Vitrifikation wird für in vitro produzierte Morulae/Blastozysten angewandt, weil die konventionellen Kryokonservierungsmethoden für diese Embryonen nicht befriedigende Ergebnisse liefern, im Vergleich zu in vivo entwickelten Embryonen im Tiermodell. Die Methoden, die für in vivo gebildete Embryonen angewandt wurden, sind an in vitro produzierte Embryonen adaptiert worden. Dabei zeigte es sich, daß diese Embryonen

wesentlich sensitiver gegenüber dem Kryokonservierungsprozeß waren [1]. Die extreme Sensitivität in vitro produzierter Embryonen gegenüber Schädigungen durch die Abkühlung ist bei einer genügend schnellen Kühlrate vermeidbar [15].

In vitro entstandene Embryonen, die schon in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium sind, zeigen eine bessere Resistenz gegenüber Vitrifikation als Embryonen in einem weniger fortgeschrittenen Stadium [15, 16, 17, 18, 19]. Unsere Ergebnisse, zusammengefaßt in Tabelle 2 und 3, bestätigten diese Erfahrungen.

In vitro ist das Potential zur Blastozystenentwicklung geringer, es werden also weniger Blastozysten tiefgefroren, die Überlebensrate und Schwangerschaftsrate für Blastozysten ist höher [20].

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist, beträgt die durchschnittliche Schwangerschaftsrate nach Vitrifikation pro Patientin 16 %, die Überlebensrate und weitere Entwicklung vitrifizierter humaner Embryonen (Tab. 2) ist akzeptabel. Für Blastozysten konnte die höchste Schwangerschaftsrate (25 %) erzielt werden (Tab. 3).

Die Entwicklungsgeschwindigkeit zu Morulae oder Blastozysten hat einen wesentlichen Einfluß auf die Überlebens- und Schwangerschaftsrate [21].

Dies konnte durch unsere Ergebnisse (Tab. 4) bestätigt werden. Embryonen, die am Tag 4 das Morulae/ Blastozystenstadium erreicht hatten, führten jeweils

zu einer Schwangerschaft. Auch bei expandierten Blastozysten, die schon am Tag 5 entwickelt waren, konnten 2 Schwangerschaften erzielt werden. Bei einer zeitlich langsameren Entwicklung konnte für solche Embryonen keine Implantation erzielt werden. Das bestätigt die Beobachtungen von Massip et al. [22], daß sich langsamer entwickelnde Embryonen schlechter kryokonservieren lassen.

Die Definition „Entwicklung“ basiert bei unseren Ergebnissen rein auf einer lichtmikroskopischen Beurteilung der Blastomen. Die Aufgabe weiterer Untersuchungen könnte sein, das Entwicklungspotential näher zu definieren und z. B. verschiedene Proteinmuster als Indikatoren heranzuziehen.

Die Vorteile der Vitrifikation sind, daß die Überlebensrate für in vivo und in vitro produzierte Embryonen akzeptabel ist, wie auch unsere Ergebnisse (Tab. 3, Tab. 4) zeigen. Die potentielle Gefahr der Schädigung durch Eisbildung in der Suspension ist ausgeschlossen.

Die Vitrifikation ist ein schnelleres Verfahren als die konventionellen Methoden, zudem ist keine teure computergesteuerte Ausrüstung erforderlich. Die Nachteile der Vitrifikation liegen in der chemischen Toxizität. Allerdings sind die Schädigungen durch die Kühleffekte im konventionellen langsamen Verfahren wahrscheinlich schwerer als die chemische Toxizität der Vitrifikationslösung [7].

Die verlängerte in vitro Kultur der Embryonen bis zum Morula-

oder Blastozystenstadium kann die Entwicklungskapazität der Embryonen reduzieren.

Um diese Technik zu verbessern, sollte untersucht werden, wie die Kultursysteme für weiter fortgeschrittene Embryonenstadien verbessert werden können (z. B. durch Anwendung von Co-Kulturen).

Weiters sollte versucht werden, die Vitrifikationsmethode an frühe Entwicklungsstadien anzupassen, sodaß die in vitro Kultur kurz gehalten werden kann.

Literatur

1. Mahmoudzadeh, Cryopreservation of in vivo and in vitro produced bovine embryos. Memory- PH Thesis, Ghent 1994.
2. Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 1971; 233: 125–6.
3. Rall WF and Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573–5.
4. Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N, Kainuma H. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylen glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 1993; 40: 427–33.
5. Abas Mazni O, Valdez CA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa M. Quick freezing of mouse embryos using ethylenglycol with lactose or sucrose. *Anim Reprod Sci* 1990; 22: 161–9.
6. Mazur P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247: 125–42.
7. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HAT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407–26.
8. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; 24: 387–402.
9. Szell A, Shelton JN, Szell K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 1989; 26: 297–301.
10. Pfaff R, Seidel JrGE, Squires EL, Jasko DJ. Permeability of equine blastocysts to ethylen glycol and glycerol. *Theriogenology* 1993; 39: 284.
11. Kasai M, Komi H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990; 89: 91–7.
12. Massip A, Vanderzwalmen P, Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 1987; 27: 69–79.
13. Massip A, Vanderzwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 1986; 7: 270–3.
14. Rall WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim Reprod Sci* 1992; 28: 237–45.
15. Pollard JW, Leibo SO. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994, 41: 101–6.
16. Zhang L, Barry DM, Denniston RS, Bunch TD, Godke RA. Birth of live calves after transfer of frozen-thawed bovine embryos fertilized in vitro. *Vet Rec* 1993; 132: 247–9.
17. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Van Vlaenderen I, de Kruijff A. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 1291–302.
18. Pollard JW, Leibo SP. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 287.
19. Dinnyés A, Keefer CL, Stice SL, Solti L, Vajta G, Machaty Z, Rall WF. Vitrification of IVMFC bovine embryos in VS3a and EFS solutions: A preliminary report. *Theriogenology* 1994; 41: 189.
20. Van Steirteghem A, Van den Abbeel, Van der Elst J. Freezing of oocytes and embryos. Center for Reproductive Medicine, Dutch speaking Brussels Free University, scriptum for a lecture in cryopreservation, 1995.

Dr. Pierre Vanderzwalmen

Geboren 1953 in Ath, Belgien. Studium der Biochemie. 1978 Abschluß als Bioengineer. Anschließend Forschung am Institut für Agrikultur in der Veterinär-Universität von Lüttich und am Department für Embryologie. Spezialisierung auf dem Gebiet der Proteinpurifikation, Kryokonservierung von Maus- und Rinderembryonen, In Vitro Maturation und Fertilisation von Rindereizellen. Spezialisierung in Gentechnik. 1988 Beginn der wissenschaftlichen und praktischen Tätigkeit an der Schoysman Infertility Management Foundation (SIMAF) in Vilvoorde bei Brüssel, 1989 Einführung der Mikro assistierten Techniken wie PZD, SUZI. 1993 ICSI mit testikulären Spermatozoen, Kryokonservierung von Embryonen. Wissenschaftliche Beschäftigung mit dem Thema Spermatic Injection, Embryokultur bis zum Blastozyststadium, in Vitro Maturation von Eizellen und Vitrifikation von humanen Embryonen. Seit 1994 wissenschaftliche Zusammenarbeit mit dem Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, Doz. Dr. H. Zech in Bregenz.

Veröffentlichung als Erstautor oder Co-Autor von mehr als 240 Publikationen und Kommunikationen.

Korrespondenzadresse:

Univ.-Doz. Dr. Herbert Zech
Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie
A-6900 Bregenz, Römerstraße 2



21. Del Campo MR, Donoso MX, Palasz AT, Garcia A, Mapletoft RJ. The effect of days in co-culture on survival of deep frozen bovine IVF blastocysts. *Theriogenology* 1993; 39: 208.

22. Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum Reprod* 1995; 11: 3004-11.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung 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](#)