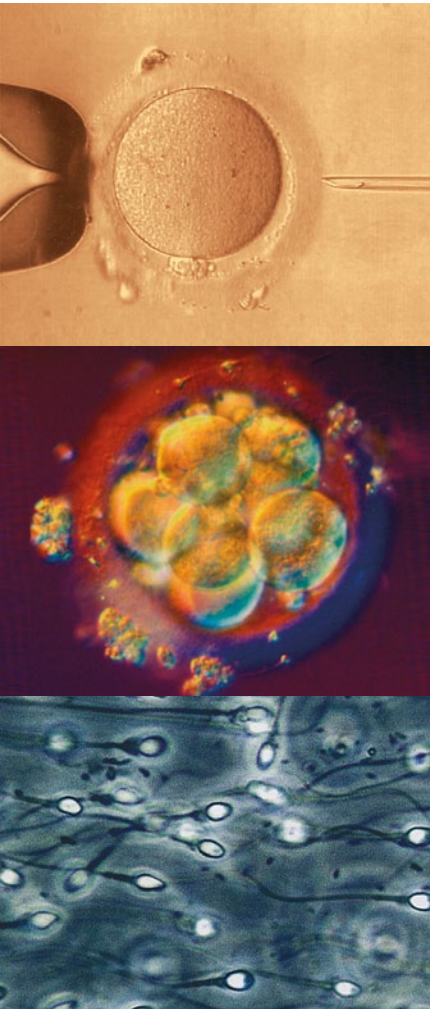


Journal für

# Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik  
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



## Die Vitrifikation von Eizellen, Vorkernstadien und Blastozysten verbessert die kumulative Schwangerschaftsrate pro Punktion im Rahmen eines IVF-Programms

Seifert B, Kwiatkowski B, Seifert C, Paulmann B

Seifert D, Gaßner C

*J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2016; 13 (1), 6-12*

[www.kup.at/repromedizin](http://www.kup.at/repromedizin)

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, DIR, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

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

# Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

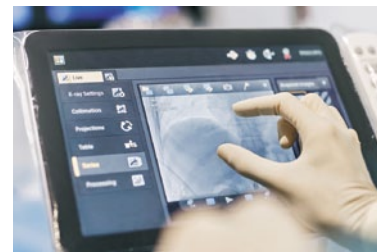
## [Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat  
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno  
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:  
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3  
Labotect GmbH



InControl 1050  
Labotect GmbH

## 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](#)

# Die Vitrifikation von Eizellen, Vorkernstadien und Blastozysten verbessert die kumulative Schwangerschaftsrate pro Punktion im Rahmen eines IVF-Programms

B. Seifert, B. Kwiatkowski, C. Seifert, B. Paulmann, D. Seifert, C. Gaßner

Die Kryokonservierung von Eizellen (MII), Vorkernstadien (PN) und Blastozysten ist als integrierter Bestandteil eines erfolgreichen IVF-Programms anzusehen. Für die einzelnen Entwicklungsstadien gibt es seit Jahren eine Vielzahl von etablierten Indikationen. Die Kryokonservierung durch Vitrifikation stellt eine Weiterentwicklung gegenüber dem Slow-freezing-Protokoll dar, da die Ergebnisse der Vitrifikationszyklen auch im Vergleich zu Stimulationszyklen besser sind. Die Umstellung erfordert verfahrenstechnischen Aufwand.

Die retrospektive Zentrumsstudie erfasst einen Zeitraum von Januar 2012 bis Mai 2014 mit 356 Patientinnen und insgesamt 312 Kryoembryotransfers (FET).

Aus Patientinnensicht spielt die kumulative Schwangerschaftsrate pro Punktion durch mehrere Kryozyklen eine große Rolle. Für die Gesamtheit aller Behandlungsfälle mit Vitrifikation konnte die Schwangerschaftsrate vom ersten Kryozyklus mit 64,2 % bis zum vierten Zyklus auf 71,1 % gesteigert werden.

Nach Vitrifikation von Eizellen aus 25 Punktionen betrug die klinische Schwangerschaftsrate pro Vitrifikation 48,0 %. In der Gruppe mit Vorkernstadien konnten 48,2 % (n = 141 Punktionen) fortbestehende Schwangerschaften erreicht werden. Die höchste Rate wurde nach dem Auftauen von Blastozysten mit 72,3 % (n = 65 Punktionen) erzielt. Die Unterschiede waren statistisch signifikant.

Die Vitrifikation stellt nach den aktuell vorliegenden Ergebnissen eine wichtige Ergänzung des IVF-Programms dar.

**Schlüsselwörter:** IVF/ICSI, Vitrifikation, Eizellen, Vorkernstadien, Blastozysten

**Effectiveness of Vitrification of Oocytes, Pronuclear Oocytes (PN) and Blastocysts for the Improvement of the Cumulative Pregnancy Rate as Part of an IVF programme.** The cryopreservation of oocytes (MII), pronuclear oocytes and blastocysts can be considered an integrated element of a successful IVF program. For many years, there have been a multitude of established indications for each of the developmental stages. The vitrification represents a further development in the cryopreservation process compared to the slow freezing protocol. The results using cryo cycles are better than those using stimulated cycles. This conversion requires certain procedural efforts.

The retrospective study was done between January 2012 and May 2014 and included 356 patients and a total of 312 freeze embryo transfer (FET).

From the patient's point of view, the cumulative pregnancy rate over numerous cryo cycles plays an important role. Over the course of all vitrification treatments, the pregnancy rate increased from 64.2% in the first cryo cycle to 71.1% in the fourth cycle.

The vitrification of oocytes collected over the course of 25 cycles resulted in a clinical pregnancy rate/vitrification of 48.0%. The group consisting of pronuclear oocytes resulted in a rate of 48.2% (n = 141 puncture) continuing pregnancies. The highest clinical pregnancy rate 72.3% (n = 65 puncture) was achieved after the thawing of blastocysts. The differences were statistically significant.

Looking at the current data, vitrification represents an important complement to the IVF program. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2016\_Online; 13 (1): 6–12.**

**Key words:** IVF/ICSI, vitrification, oocytes, pronuclear oocytes, blastocysts

## ■ Einleitung

Die Kryokonservierung von Eizellen (MII), Vorkernstadien (PN) und Blastozysten erweitert wesentlich den Erfolg eines IVF-Programms. Die Kryokonservierung verhindert das Verwerfen überzähliger Metaphase-II-Eizellen z. B. bei nicht erfolgter Ejakulation [1]. Sie ermöglicht weiterhin den Transfer von wenigen Embryonen pro Zyklus und damit eine geringere Mehrlingsrate [2–4]. Eine Kryoprotektion bei Patientinnen mit voraussehbarer Überstimulation, beispielsweise beim Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) oder vor onkologischen Behandlungen, ist möglich [1, 5–7]. Die weiblichen Keimzellen können erfolgreich in allen Entwicklungsstadien kryo-

konserviert werden [8]. Mit einer solchen Vorgehensweise gelingt es, die kumulative Schwangerschaftsrate pro Punktion zu verbessern [9].

Die Kryokonservierung nach dem Slow-freezing-Protokoll wird seit etwa 20 Jahren erfolgreich praktiziert. Dieses Vorgehen ist zeitaufwendig und benötigt eine anspruchsvolle technische Ausstattung. Das Problem dieses Verfahrens besteht in der Eiskristallbildung, sodass die Erfolgsraten seit Jahrzehnten begrenzt sind und sich wohl kaum steigern lassen [8].

Diese wenig effiziente Methode wurde zu Beginn der 1990er-Jahre durch die Vitrifikation ergänzt [10]. Der Vorteil dieser aktuellen Entwicklung ist durch die

Prävention der Eiskristallbildung im embryonalen Gewebe gekennzeichnet. Die Vitrifikation geht von einer einfachen Technik aus. Sie spart Zeit, benötigt aber eine relativ hohe Konzentration von Kryoprotektiva (5–8 mol/l) und eine sehr hohe Gefriertrate von 15.000–30.000 °C pro Minute [11, 12]. Der praktische Vorteil ist die Schnelligkeit des Gefrierprozesses und damit die Garantie einer kurzen Periode, die der Embryo außerhalb des Inkubators verweilt [13]. Ein Nachteil besteht vor allem darin, dass die Vitrifikation verfahrenstechnisch anspruchsvoll ist und mehr Handarbeit erfordert [14]. Die hohe Konzentration von Kryoprotektiva und ihre mögliche Toxizität für den Embryo sind nach den vorliegenden perinatalogischen Befunden wohl

Eingegangen: 20.4.2015; akzeptiert nach Revision: 24.6.2015 (verantwortlicher Rubrik-Herausgeber: Prof. Dr. W. Würfel, München)

Aus dem KITZ, Regensburg

**Korrespondenzadresse:** Prof. Dr. med. Bernd Seifert, KITZ-KinderwunschTherapie im Zentrum, D-93047 Regensburg, Hemauerstraße 1; E-Mail: info@kitz-regensburg.de

ohne negativen Einfluss [2]. Schwangerschaftsraten und Embryonalentwicklung verbessern sich im Vergleich zum Slow freezing [13–15]. Sie haben in den vergangenen Jahren dazu beigetragen, dass ein weiterer Anstieg der Kryokonservierung von Eizellen und Embryonen zu verzeichnen war [16]. Die Erfolgsquoten nach Vitrifikation sind im Vergleich zum Transfer von frischen Embryonen nicht schlechter [17, 18]. Es ist zu erwarten, dass die Vitrifikation möglicherweise zu besseren Ergebnissen führt, da ein Kryozyklus weniger Stress für Patientinnen bedeutet und einen besseren Schleimhautaufbau zur Folge hat [19, 20]. Die Ergebnisse der Vitrifikation hängen im Wesentlichen davon ab, ob die morphologischen Befunde der Ausgangssituation nach dem Auftauen wieder erreicht werden [17, 21].

Nach Angaben des Deutschen IVF-Registers 2013 führen von 130 IVF-Zentren 128 Einrichtungen Kryobehandlungen durch, wobei nicht dokumentiert ist, ob es sich um Kryokonservierung nach dem Slow-freezing-Protokoll oder um Vitrifikation handelt. Der Anteil von Kryozyklen beträgt 27,98 % aller Maßnahmen zur künstlichen Befruchtung und erreicht eine klinische Schwangerschaftsrate von 22,57 % pro Embryotransfer. Damit werden die seit Jahrzehnten international bestätigten Schwangerschaftsraten nach Kryokonservierung von maximal 25 % nahezu bestätigt [22].

Die vorliegende Studie soll die Vorteile der Vitrifikation zur Verbesserung der kumulativen Schwangerschaftsrate pro Punktionszyklus im Rahmen eines zentrumspezifischen IVF-Programms nachweisen.

Die Vitrifikation stellt in Ländern mit Verbot des Präimplantations-Screenings (PGS) eine Alternative zur Verbesserung der Erfolgsquoten dar. Bedeutsam ist in diesem Zusammenhang der Zeitpunkt der Vitrifikation, da Eizellen, Vorkernstadien oder Blastozysten unterschiedliche Schwangerschaftsraten im Rahmen eines Praxisprogramms erwarten lassen.

## ■ Material und Methoden

Die Einführung der Vitrifikation erfolgte in unserer Einrichtung im Jahre 2011 durch Testung und Validierung verschiedener verfügbarer Vitrifikationskits und wurde Ende 2011 mit reproduzierbaren

**Tabelle 1:** Behandlungsfälle der Studie (n = 356). © B. Seifert

Gruppen	Punktionszyklen mit Vitrifikation	Transfer im Stimulationszyklus	Klinische Schwangerschaften pro Transfer im Stimulationszyklus
Eizellen	28	0	0
Vorkernstadien	252	220	91 (41,4 %)
Blastozysten	58	47	27 (57,4 %)
Eizellen und Blastozysten	3	0	0
PN und Blastozysten	54	36	23 (63,9 %)
<b>Gesamt</b>	<b>395</b>	<b>303 (76,7 %)</b>	<b>141 (46,5 %)</b>

**Tabelle 2:** Stimulationsprotokolle (n = 395). © B. Seifert

Alter zum Zeitpunkt der Punktions	32,9 Jahre
Agonisten-Protokolle	277 (70 %)
Antagonisten-Protokolle	118 (30 %)
<b>Gesamt</b>	<b>395</b>
Estradiol zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion	3448 pg/ml
<b>Auftauzyklen von 231 Vitrifikationen (n = 312 FET)</b>	
Eizell-Auftauzyklen	30 (9,6 %)
Vorkernstadien-Auftauzyklen	202 (64,7 %)
Blastozysten-Auftauzyklen	80 (25,7 %)
<b>Gesamt</b>	<b>312</b>

Ergebnissen abgeschlossen. Mit Beginn des Jahres 2012 wurde die generelle Anwendung der Vitrifikation im Rahmen des IVF-Programms unseres Zentrums wirksam.

Die vorliegende Studie geht von 356 Patientinnen aus, bei denen im Zeitraum Januar 2012 bis Mai 2014 eine Vitrifikation von Eizellen, PN oder Blastozysten vorgenommen worden ist. Die retrospektive Fall-Kontroll-Studie ermöglicht den Vergleich von Stimulationszyklen und Auftauzyklen nach Vitrifikation. Bei den 356 Patientinnen erfolgten 395 Punktionszyklen und die Vitrifikation von Eizellen, PN und Blastozysten. Ein primärer Embryotransfer nach Stimulation wurde in 303 Fällen vorgenommen (Tab. 1). Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug zum Zeitpunkt der Punktions 32,9 Jahre.

## Stimulationsprotokolle

Unter Berücksichtigung von Alter und ovarieller Reserve wurden die Patientinnen entweder nach dem langen Protokoll in 277 Fällen (GnRH-Agonist Buserelin: Ferring, Kiel) oder dem Antagonistenprotokoll in 118 Fällen (Cetrorelix: Merck Serono, Darmstadt bzw. Ganirelix: MSD, Haar) behandelt. Frauen mit Endometriose

wurden nach dem ultralangen Agonistenprotokoll (Triptorelin: Ferring, Kiel) therapiert. Der Stimulationsbeginn für dieses Protokoll erfolgte nach etwa 10 Wochen. Der Anstieg der LH-Werte (luteinisierendes Hormon) auf Serumspiegel von etwa 1,0 mU/ml sowie einem Estradiolspiegel ( $E_2$ ) < 30 pg/ml gilt als Nachweis optimaler ovarieller Suppression. Bei einem LH-Wert deutlich < 1,0 mU/ml sind Eizellqualität und Schwangerschaftsraten geringer. Bei einer Down-Regulation zwischen 1,0 und 3,0 mU/ml LH wurde mit Menotropin (Ferring, Kiel) stimuliert (Tab. 2).

Die Ovarstimulation wurde bei Patientinnen mit geringer ovarieller Reserve in der Regel mit rekombinantem FSH, Follitropin beta (MSD, Haar) oder Follitropin alfa (Serono, Darmstadt) vorgenommen. Die Dosierung betrug maximal 450 IE in Abhängigkeit von Alter und ovarieller Reserve. Die Ovarstimulation wurde durch vaginalen Ultraschall und Bestimmung von LH,  $E_2$  und Progesteron kontrolliert. Die Stimulationsdauer betrug durchschnittlich 11 Tage. Bei einer Größe der Leitfollikel zwischen 18 und 20 mm sowie mittlerem  $E_2$ -Spiegel von 3448 pg/ml wurde die Ovulation mit

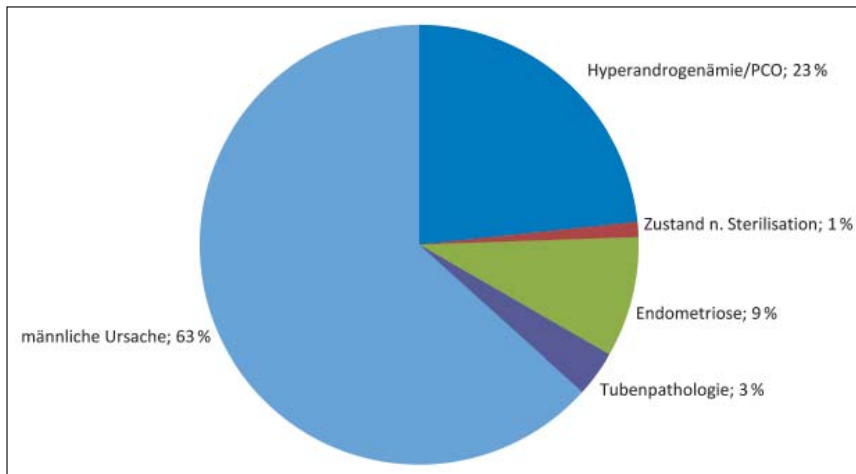


Abbildung 1: Anamnestic Angaben zur Studiengruppe (n = 356 Patientinnen). © B. Seifert

5000 IE HCG (Choriongonadotropin: Ferring, Kiel) ausgelöst. In Fällen mit Antagonistenprotokoll und möglicher Überstimulation wurde die Ovulationsinduktion mit 0,2 mg Buserelin (Ferring, Kiel) vorgenommen. Die ultraschallkontrollierte Follikelpunktion erfolgte 34–36 h später.

Die gewonnenen Eizellen wurden in 89,9 % der Fälle durch ICSI befruchtet und in Mikrotropfen mit sequenziellem Medium der Firma Cook (Limerick, Irland) inkubiert. Die 5-Tage-Kultur wurde bevorzugt (72 %) im EmbryoScope (Unisense FertiliTech A/S, Aarhus, Dänemark) durchgeführt.

Die generelle Vitrifikation (FET) von Eizellen oder PN erfolgte bei Patientinnen mit der Gefahr einer Überstimulation bei mehr als 20 Eizellen und einer Estradiolkonzentrationen über 7000 pg/ml. Die Blastozysten-Vitrifikation wurde in Fällen einer frühen Überstimulation oder unvorhergesehen überzähligen Blastozysten angewendet.

Der Kryo-Embryotransfer wurde im Regelfall am Tag 5 mit der Übertragung von maximal 2 Blastozysten vorgenommen.

Bei Fällen mit nur 1 oder 2 vitrifizierten Eizellen oder PN wurde am Tag 3 transferiert.

### Kryozyklen

Der Embryotransfer erfolgte im Sponzanzzyklus oder in einem Substitutionszyklus mit Estradiolvalerat (Progynova, Jenapharm, Jena) und Progesteron (Utrogest, Dr. Kade/Besins Pharma GmbH, Konstanz). Die klinischen Ergebnisse

beider Vorgehensweisen waren nach eigenen Erfahrungen gleichwertig.

### Methode der Vitrifikation

Vitrifikation und Auftauen wurden nach dem Kitazato Cryotop Safety Kit (Shizuoka, Japan) – Vitrifikation bzw. Thawing – vorgenommen. Das methodische Vorgehen ist in Anlehnung an die Veröffentlichung von Kuwayama et al. [23] erfolgt.

### Einfrieren

Die Vitrifikation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Der erste Schritt ist die Äquilibration in Ethylenglykol und Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Endkonzentration von jeweils 7,5 %. Die Zeitdauer der Inkubation betrug insgesamt 15 Minuten.

Bei der Vitrifikation von Eizellen ist zu beachten, dass die Bearbeitung innerhalb von 2 Stunden nach der Follikelpunktion vorzunehmen ist. Im Unterschied zu Eizellen erfolgte für Vorkernstadien und Blastozysten die Äquilibration ausschließlich in der Endkonzentration.

Die Äquilibrationszeiten für PN-Stadien betragen 8–9 Minuten, bei Blastozysten 12–15 Minuten. Nach Ablauf der Äquilibration wurden die Zellen bzw. Embryonen in 300 µl Vitrifikationslösung überführt, die 15 % Ethylenglykol, 15 % DMSO und 0,5 M Saccharose enthält. In dieser Lösung verblieben die Zellen eine Minute, danach wurden die MII-Eizellen, PN oder Blastozysten in einem kleinen Tropfen Vitrifikationslösung auf den Kryotop gegeben.

Von besonderer Bedeutung ist das Absaugen der Flüssigkeit um jede Zelle, so-

dass nur ein geringer Flüssigkeitsfilm um das Kryogut verbleibt. Der Kryotop wurde danach in flüssigen Stickstoff eingetaucht. In diesem Medium erfolgte die Einlagerung des Kryotops in einer Plastikhülse. Ab diesem Zeitpunkt dürfen die Behälter die flüssige Phase des Stickstoffs nicht mehr verlassen. Die vitrifizierten Proben wurden im offenen System gelagert [24].

### Auftauen

Der Kryotop wurde noch unter flüssigem Stickstoff aus seiner Hülse entfernt und sofort in 3,5 ml der Erwärmungslösung (37 °C) gegeben, die 1,0 M Saccharose enthält. Die Proben müssen dabei vorsichtig vom Kryotop entfernt werden. Nach einer Minute ist das Kryogut in 300 µl Lösung mit 0,5 M Saccharose 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden. Danach erfolgte ein Waschen für 6 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur in einem Waschpuffer. Anschließend wurden die Proben in 3 Schritten mit äquilibriertem Kulturmedium behandelt. Die überlebenden Zellen und Embryonen haben wir nach dem Auftauprozess bei 37 °, und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei Eizellen erfolgte die ICSI-Therapie 2 Stunden nach dem Auftauen. Für Vorkernstadien wurde der Transfer am Tag 3 oder Tag 5 vorgenommen. Wenn Blastozysten aufgetaut wurden, sollte nach unserer Vorgehensweise innerhalb von 3 Stunden die Expansion der Blastozyste als Hinweis der Vitalität abgewartet werden.

Die Überlebensrate nach dem Auftauen war mit durchschnittlich 94 % für alle Entwicklungsstufen der Keimzellen nahezu gleich.

### Klinische Ergebnisse

Anamnestic wurde als häufigste Indikation der Frau ein PCO-Syndrom (23 %) erfasst, das aufgrund der sehr guten ovariellen Reserve überzählige Eizellen erwarten lässt. Endometriose (9 %), tubare Sterilität (3 %) und Zustand nach Sterilisation (1 %) waren nur mit wenigen Fällen beteiligt. Erwartungsgemäß häufig waren männliche Ursachen als ICSI-Indikation (63 %) vorhanden (Abb. 1).

Die Häufigkeit der Eizell-Auftauzyklen betrug in der Studie 9,6 % (30 Zyklen). Anteilig höher war die Vitrifikation von PN mit 64,7 % (202 Zyklen). Diese Vorgehensweise hat eine langjährige Tradi-

tion, da auch mit dem Slow-freezing-Protokoll im Wesentlichen PN eingefroren worden sind.

Die Blastozysten-Vitrifikation hatte einen Anteil von 25,7 % durch 80 Zyklen (Tab. 2).

Die praxisbezogene klinische Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer aller Behandlungsfälle, demnach auch der Patientinnen ohne Vitrifikation, wurde nach IVF und ICSI im Jahresdurchschnitt 2013 mit 43,4 % berechnet.

Für die Studiengruppe mit Vitrifikation (1/12–5/14) betrug der Anteil klinischer Schwangerschaften pro Embryotransfer im Stimulationszyklus 46,5 %. 92 Patientinnen (23,3 %) hatten wegen drohender Überstimulation zunächst keinen Embryotransfer (Tab. 1).

Die klinischen Schwangerschaftsraten pro Kryotransfer aller Entwicklungsstadien in Summe mit bis zu 4 aufeinander folgenden Kryozyklen waren im 1. Zyklus mit 43,7 % am höchsten. Im 2. Kryozyklus konnten 32,8 % klinische Schwangerschaften erzielt werden, während im dritten Kryozyklus 31,3 % und im 4. Zyklus noch 25 % der Patientinnen schwanger wurden (Abb. 2).

Für die Gruppe eingefrorener Eizellen betrug die kumulative klinische Schwangerschaftsrate pro Vitrifikation und Tag-5-Transfer 48 %. Durch das Einfrieren von PN und Kultur bis Tag 5 konnten kumulativ 48,2 % fortbestehende Schwangerschaften erzielt werden. Am höchsten war die klinische Schwangerschaftsrate durch Vitrifikation nach dem Auftauen von Blastozysten mit 72,3 %. Die Blastozysten-Vitrifikation wies im Vergleich zu den anderen beiden Protokollen höhere Schwangerschaftsraten auf. Die prozentualen Unterschiede waren nach statistischer Berechnung mit dem Chi-Quadrat-Test signifikant (p-Wert 0,029 zu Eizellen und 0,001 zu PN). Die Anzahl der Transfers pro Punktion betrug für Eizellen und Blastozysten 1,2 sowie für PN 1,4 Transfers (Abb. 3).

Die kumulative Schwangerschaftsrate pro Punktion unter Einbeziehung aller Fälle mit Vitrifikation (Eizellen, PN und Blastozysten) konnte vom 1. Kryozyklus (64,2 %) bis zum 4. Kryozyklus auf 71,1 % gesteigert werden (Abb. 4).

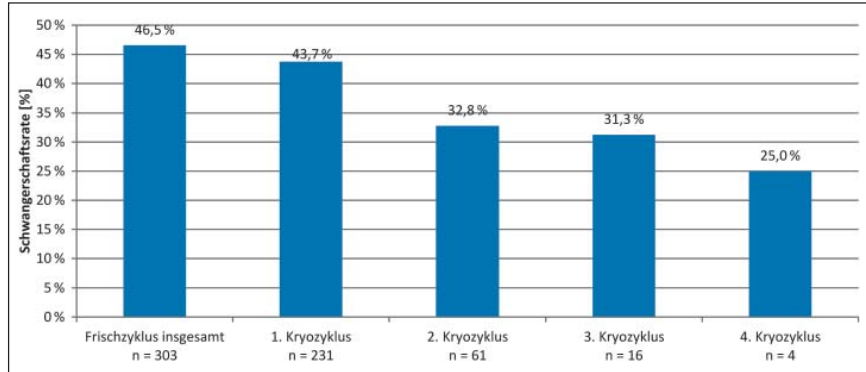


Abbildung 2: Schwangerschaftsraten pro Transfer in Stimulationszyklen und Auftauzyklen (n = 312) von Eizellen, PN und Blastozysten nach IVF-/ICSI-Behandlung. © B. Seifert

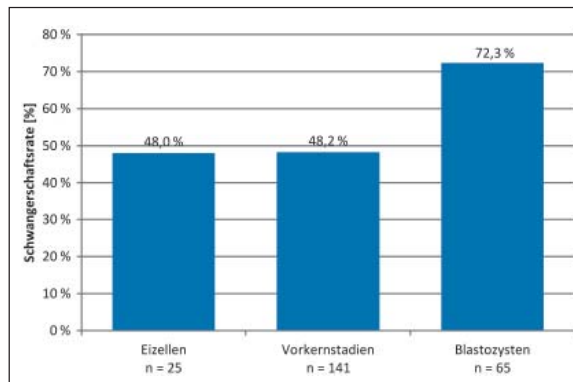


Abbildung 3: Die kumulative klinische Schwangerschaftsrate pro Vitrifikation (n = 231) nach Auftauen (n = 312) von Eizellen, PN und Blastozysten. Signifikanz bestand zwischen Eizellen und Blastozysten (p-Wert 0,029) sowie zwischen PN und Blastozysten (p-Wert 0,001). © B. Seifert

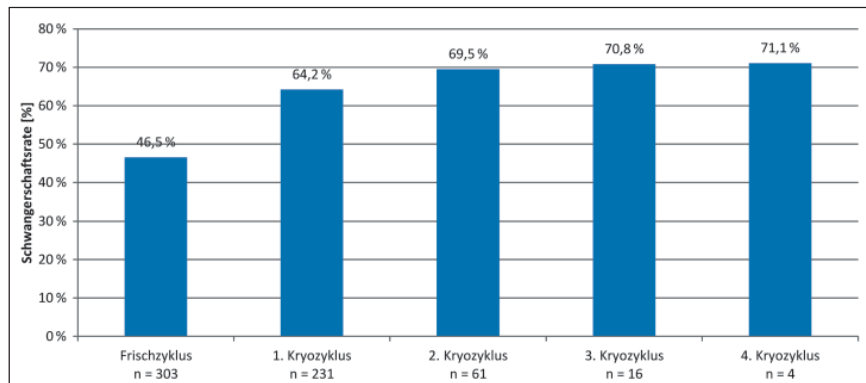


Abbildung 4: Kumulative klinische Schwangerschaftsraten pro Punktion mit Stimulationszyklus und Kryozyklen aller Entwicklungsstadien nach IVF-/ICSI-Behandlung. © B. Seifert

Die durchschnittliche Abortrate nach Vitrifikation betrug 22 %. Die unterschiedliche Abortrate der einzelnen Protokolle kann wegen der geringen Anzahl als statistisch nicht relevant angesehen werden. Es wurden im Durchschnitt 2,0 Embryonen transferiert, daraus resultierte eine mittlere Mehrlingsrate von 15,7 % (Tab. 3).

### ■ Diskussion

Die Vitrifikation von Eizellen, PN oder Blastozysten hat den Vorteil, dass in Relation zum Slow-freezing-Protokoll die Eiskristallbildung während des Einfrie-

rens und dem Auftauen unerheblich ist [23]. Im Vergleich der Erfolgsraten stellt die Vitrifikation gegenüber dem Slow-freezing-Protokoll eine deutliche Verbesserung dar [25, 26]. Es ist weiterhin davon auszugehen, dass das Slow-freezing-Protokoll aufgrund der gestörten Spindel-Integrität nicht für eine Verbesserung der Schwangerschaftsraten über 25 % geeignet ist [5, 27]. Es war deshalb im Interesse einer besseren Ergebnisqualität dringend erforderlich, die Vitrifikation als neues Verfahren einzuführen.

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse bestätigen diesen Trend, der auch mit ei-

**Tabelle 3:** Schwangerschaften nach Vitrifikation. © B. Seifert

Vitrifikation	Aborte	Abort-Rate	Mehrlinge	Mehrlings-Rate	Transferierte Embryonen
<b>Klinische Schwangerschaften pro Transfer (n = 127)</b>					
Eizellen (n = 12)	3	25,0 %	4	33,3 %	2,0
Vorkernstadien (n = 68)	13	19,1 %	8	11,8 %	2,1
Blastozysten (n = 47)	12	25,5 %	8	17,0 %	1,7
<b>n = 127</b>	<b>28</b>	<b>22,0 %</b>	<b>20</b>	<b>15,7 %</b>	<b>2,0</b>

genen Ergebnissen belegt werden konnte. Die aktuellen Meta-Analysen weisen nach, dass die Vitrifikation im Vergleich zum Slow-freezing-Protokoll eine höhere Überlebensrate von Eizellen, PN-Stadien und Blastozysten ermöglicht [13]. Die Vitalität nach dem Auftauen betrug bei unseren Untersuchungen 94 %. Die Ursache für Verluste ist in der Regel nicht mangelnde Technik, sondern war durch Atresie der Eizellen oder Embryonen bedingt. Die entwicklungsfähigen Eizellen und PN wurden unter Berücksichtigung von Patientenwünschen in der Regel bis zum Tag 5 kultiviert.

Die Vitrifikation von Eizellen ist ethisch unproblematisch [1]. Die damit verbundenen klinischen Ergebnisse sind identisch zum Vorgehen mit frischen Eizellen [28].

In der Arbeit von Rienzi et al. [27] wird über Erfahrungen mit der Vitrifikation von Eizellen berichtet. Sie empfehlen, dass das Einfrieren sofort nach der Denudation von Eizellen erfolgen sollte. Nach dem Auftauen werden die Oozyten für 2 Stunden kultiviert, um den Eizellen die vollständige Restaurierung des Zytoskeletts, vor allem der meiotischen Spindel, zu ermöglichen. Unter diesen Voraussetzungen haben diese Eizellen die gleiche Qualität wie frische Eizellen.

Der Tag-5-Transfer von vitrifizierten Eizellen verspricht nach den Ergebnissen von Rienzi et al. hohe Schwangerschaftsraten von 60 % [7]. Die Vitrifikation von menschlichen Eizellen ist somit der Slow-freezing-Kryokonservierung überlegen und kann vom Überleben bis zu den Schwangerschaftsraten für alle Kriterien der embryonalen Entwicklung bessere Ergebnisse vorweisen. Es wurden weiterhin 46,8 % klinische Schwangerschaften mit Blastozystentransfer nach Vitrifikation erreicht [5].

Die kumulative Schwangerschaftsrate nach Eizell-Vitrifikation mit bis zu 2 unselektierten Transfers am Tag 5 betrug in der Veröffentlichung von Ubaldi et al. 53,3 % [9]. In unserer Studie wurden vergleichbare kumulative klinische Schwangerschaftsraten für vitrifizierte Eizellen mit Tag-5-Transfers von 48,0 % erzielt.

Die Arbeitsgruppe in Lübeck [29] konnte durch Vitrifikation von PN und Embryotransfer am Tag 5 im Vergleich zur klassischen Kryokonservierung 46,8 % zu 19 % klinische Schwangerschaften pro Transfer erreichen.

Bei unseren Untersuchungen betragen die kumulativen klinischen Schwangerschaftsraten für die Vitrifikation von Vorkernstadien mit 1,4 Tag-5-Transfers 48,2 %. Somit waren die Ergebnisse nach Vitrifikation von Eizellen oder Vorkernstadien mit 48 % und 48,2 % identisch. Diese Angaben belegen die Flexibilität für den klinischen Alltag.

Die klinischen Schwangerschaftsraten nach Embryotransfer von vitrifizierten Blastozysten betragen in der Literatur bis zu 60 % [4]. Dabei ist es unerheblich, ob der Transfer am Tag 5 oder 6 erfolgt [17]. Die Schwangerschaftsraten scheinen aber am Tag 5 signifikant besser zu sein [4]. Die Ursache dafür sind häufigere Spindelauffälligkeiten und morphologische Defizite bei Blastozysten am Tag 6 [25, 30]. Die Ergebnisse des Embryotransfers von vitrifizierten Blastozysten sind wegen der besseren Synchronisation zwischen Embryo und Endometrium im unstimulierten Zyklus möglicherweise besser [19]. Durch die Vitrifikation von Blastozysten konnten Implantationsraten von 30 % und klinische Schwangerschaftsraten von 49 % bzw. 42,8 % erreicht werden [4, 14]. Die Abortrate und die perinatalen Ergebnisse sollen durch Vitrifikation nicht negativ

beeinflusst sein [13]. Unsere Studie mit 65 Vitrifikationen und 1,2 Tag-5-Transfers konnte eine kumulative klinische Schwangerschaftsrate von 72,3 % nachweisen.

Die Vitrifikation von überzähligen Eizellen zur Verbesserung der kumulativen Schwangerschaftsrate hat unter der strengen gesetzlichen Regelung in Italien zu 53 % fortbestehender Graviditäten geführt [9].

Aus Sicht der Patientinnen ist die kumulative Schwangerschaftsrate Motivation, die hohen Kosten einer Vitrifikation zu tragen. Unter Berücksichtigung kryokonservierter Eizellen, PN und Blastozysten konnte in unserer Studie durch Vitrifikation eine kumulative Schwangerschaftsrate/Punktion von 64,2 % (1. Kryozyklus) bis zu 71,1 % (4. Kryozyklus) erreicht werden. Diese Chance zum Vorteil der Patientinnen wird in der Literatur [9] nur selten berücksichtigt. Italien war mit seinen strengen gesetzlichen Regelungen auf diesen Zusatzeffekt angewiesen. Die Vorteile der Vitrifikation sind vor allem für jüngere Patientinnen mit einem guten AMH-Wert interessant. Ein Anteil von 10–15 reifen Eizellen ist die optimale Voraussetzung für die Vitrifikation mit hohen kumulativen Schwangerschaftsraten. Das Konzept „all freeze Embryotransfer“ (FET) wird mit seinen höheren Schwangerschaftsraten die Zukunft gehören [20].

Ein internationaler Trend zum Erreichen höherer Schwangerschaftsraten ist die Aneuploidiediagnostik von Blastozysten (PGS). Durch diese Selektion stehen am Ende der Diagnostik nur wenige Embryonen zum Transfer zur Verfügung; 8,3 % der Patientinnen haben keinen Transfer [31].

In Deutschland wird PGS nach dem PID-Gesetz nicht erlaubt sein, sodass wir al-

ternativ auf einen seriellen Transfer nach Vitrifikation angewiesen sind, da bezüglich der Geburtenrate ein vergleichbares Ergebnis erzielt wird [32]. Diese Alternative kann die Abwanderung von Patientinnen in ausländische Zentren einschränken.

Die dargestellten eigenen Ergebnisse mit kumulativen Schwangerschaftsraten pro Punktion von 71,1 % erreichen die Prozentsätze nach Anwendung von PGS und stellen somit eine sinnvolle Alternative im Rechtsgefüge des Deutschen Embryonenschutzgesetzes dar.

Der Anteil von Aborten mit 22 % nach Vitrifikation war jedoch höher als 10,5% nach PGS [31]. Die Mehrlingsrate von 15,7 % erreichte im Vergleich zum Single-Embryotransfer nach PGS (0 %) eine erwartete Größenordnung [33]. Der Nachteil von Vitrifikationszyklen gegenüber PGS bewegt sich unter Berücksichtigung von Abortrate und Mehrlingen im vertretbaren Rahmen, sodass die Vitrifikationsstrategie aus klinischer und ökonomischer Sicht keine Nachteile aufweist. Die Aneuploidie-Selektion hat jedoch für ältere Patientinnen den Nachteil, dass ein nicht geringer Anteil der Frauen keinen Embryotransfer bekommen kann.

Trotz aller bisher dargestellten Vorzüge der Vitrifikation von Eizellen und Embryonen wird es notwendig sein, diese Ergebnisse durch weiterführende Studien hinsichtlich des neonatalen Outcomes und der Fehlbildungsraten zu verfolgen. Inzwischen wurden in größeren Studien die geburtshilflichen und perinatalen Ergebnisse bewertet, die im Vergleich zu spontanen Konzeptionen bzw. nach assistierter Reproduktion nicht verändert waren [2, 34, 35]. Diese Aussage betrifft im Besonderen die perinatalen Ergebnisse der Vitrifikation von Blastozysten [18]. Im Vergleich zum Transfer zu frischen Blastozysten waren alle untersuchten Parameter gleich. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass der Anteil monozygoter Zwillinge in beiden Blastozystengruppen mit oder ohne Kryokonservierung erhöht war [36].

Wir können diese Ergebnisse nach Vitrifikation von Blastozysten mit einer Zwillingsrate von 15,7 % nicht bestätigen.

## ■ Relevanz für die Praxis

Die Vitrifikation von Eizellen, PN und Blastozysten ist dem Einfrieren nach dem klassischen langen Protokoll überlegen. Dieses Verfahren ist jedoch manuell sehr aufwändig. Alle Stadien der Eizellentwicklung sind mit dem Ergebnis hoher Schwangerschaftsraten für dieses Verfahren geeignet. Die unterschiedlichen Raten waren statistisch signifikant.

Mit maximal 4 Kryozyklen können kumulative Schwangerschaftsraten pro Punktion von 71,1 % erreicht werden. Die neonatologischen Ergebnisse konnten bisher keine nachteiligen Folgen der Vitrifikation nachweisen.

## ■ Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Bei der Einrichtung handelt es sich um eine private Einrichtung. Die Mitautoren sind Partner oder Angestellte dieser Praxis.

## ■ Danksagung

Die statistische Bewertung der klinischen Ergebnisse mit Chi-Quadrat-Tests erfolgte durch Unterstützung von Herrn Florian Zeman, Zentrum für klinische Studien, Universitätsklinikum Regensburg.

## Literatur:

- Li XH, Chen SU, Zhang X, Tang M, Kui YR, et al. Cryopreserved oocytes of infertile couples undergoing assisted reproductive technology could be an important source of oocyte donation: a clinical report of successful pregnancies. *Hum Reprod* 2005; 20: 3390–4.
- Wikland M, Hardarson T, Hillensjö T, Westin C, Westlander G, et al. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2010; 25: 1699–7.
- Stoop D, van Landuyt L, Paquay R, Fatemi H, Blockeel C, et al. Offering excess oocyte aspiration and vitrification to patients undergoing stimulated artificial insemination cycles can reduce the multiple pregnancy risk and accumulate oocytes for later use. *Hum Reprod* 2010; 25: 1213–8.
- Liebermann J. Contribution from 11<sup>th</sup> World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility (COGI) 'Celebration – 30 years of IVF' and Sero Symposium International Foundation Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online* 2009; 19: 105–14.
- Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril* 2009; 92: 1306–11.
- Van Landuyt L, Verpoest W, Verheyen G, de Vos A, van de Velde H, et al. Closed blastocyst vitrification of biopsied embryos: evaluation of 100 consecutive warming cycles. *Hum Reprod* 2011; 26: 316–22.

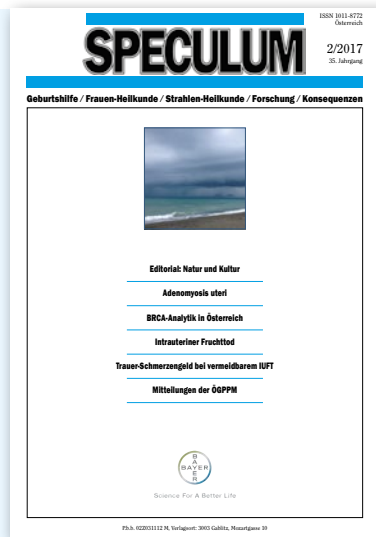
- Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, et al. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod* 2012; 27: 1606–12.
- Liebermann J, Tucker MJ. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation methods. *Mol Biol* 2004; 254: 345–64.
- Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, Baroni E, Albricci L, et al. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Hum Reprod* 2010; 25: 1199–5.
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, et al. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 53–7.
- Huang CC, Lee TH, Chen SU, Chen HH, Cheng TC, et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Human Reprod* 2004; 20: 122–8.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Hum Reprod* 2007; 22: 153–4.
- Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006; 86: 20–6.
- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008; 23: 1976–82.
- Shu Y, Watt J, Gebhardt J, Dasig J, Appling J, Behr B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. *Fertil Steril* 2009; 91: 401–6.
- Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006; 86: 70–80.
- Ahlström A, Westin C, Wikland M, Hardarson T. Prediction of live birth in frozen-thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw morphology. *Hum Reprod* 2013; 28: 1199–209.
- Li Z, Wang YA, Ledger W, Edgar DH, Sullivan EA. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by Vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum Reprod* 2014; 29: 2794–801.
- Evans J, Salamonsen L. Too much of a good thing? Experimental evidence suggests prolonged exposure to hCG is detrimental to endometrial receptivity. *Hum Reprod* 2013; 28: 1610–9.
- Evans J, Hannan NJ, Edgell TA, Vollenhoven BJ, Lutjen PJ, et al. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Hum Reprod Update* 2014; 20: 808–21.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 608–14.
- Jahrbuch 2013. Deutsches IVF-Register. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2014; 11: 21.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300–8.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 608–14.
- Kuleshova L, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449–54.
- Hiraoka K, Miyazaki M, Fukunaga E, Horiuchi T, Kusuda T, et al. Perinatal outcomes following transfer of human blastocysts vitrified at day 5, 6 and 7. *J Exp Clin Assist Reprod* 2009; 6–14.
- Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010; 25: 66–73.
- Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010; 25: 2239–46.
- Schultze-Mosgau A, Schöpfer B, Griesinger G, Griesinger G, von Otte S, et al. Hohe Überlebens- und Schwangerschaftsraten von zuvor vitrifizierten Vorkernstadien im Gegensatz zur slow-cooling Kryokonservierung. *Geburtsh Frauenheilk* 2006; 67: 1–20.



30. Hashimoto S, Amo A, Hama S, Ito K, Nakaoka Y, Morimoto Y. Growth retardation in human blastocysts increases the incidence of abnormal spindles and decreases implantation potential after vitrification. *Hum Reprod* 2013; 28: 1528–35.
31. Forman EJ, Tao X, Ferry KM, Taylor D, Treff NR, Scott Jr RT. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Hum Reprod* 2012; 27: 1217–22.
32. Mastenbroek S, Repping S. Preimplantation genetic screening: back to the future. *Hum Reprod* 2014; 29: 1846–50.
33. Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013; 100: 100–7.
34. Rama Raju GA, Jaya Prakash G, Krishna KM, Madan K. Neonatal outcome after vitrified day 3 embryo transfers: a preliminary study. *Fertil Steril* 2009; 92: 143–8.
35. Wang YA, Chapman M, Costello M, Sullivan EA. Better perinatal outcomes following transfer of fresh blastocysts and blastocysts cultured from thawed cleavage embryos: a population-based study. *Hum Reprod* 2010; 25: 1536–42.
36. Mukaida T, Takahashi K, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of vitrified human blastocysts in 7 year experience (2670 attempted cycles). *Hum Reprod* 2008; 23: i48.

# Mitteilungen aus der Redaktion

## Die meistgelesenen Artikel



Speculum

## Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

