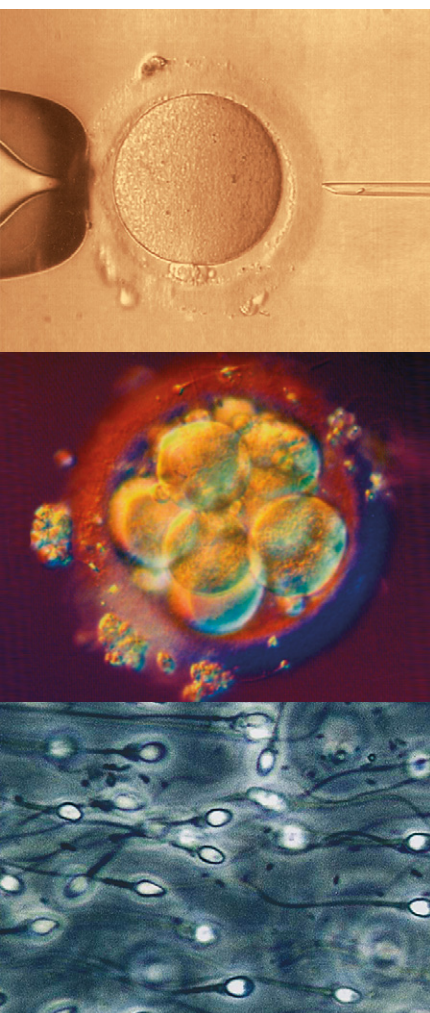


Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



Aseptische Vitrifikation in die Praxis umsetzen

Hiemer A, Zech N, Ectors F, Panagiotidis Y, Bach M

Nexer A, Vanderzwalmen S, Tomsin O, Vanderzwalmen P

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2008; 5 (3), 121-131

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

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

Aseptische Vitrifikation in die Praxis umsetzen

A. Hiemer^{1,7}, N. H. Zech^{2,3,7}, F. Ectors⁴, Y. Panagiotidis⁵, M. Bach¹, A. Neyer¹,
S. Vanderzwalmen⁶, O. Tomsin⁴, P. Vanderzwalmen^{1,6,7}

Vitrifikation ist eine Methode des Tiefgefrierens, bei der Zellen in glasähnliche amorphe Strukturen ohne Kristallbildung umgewandelt werden. Dies wird erzielt durch die Kombination von hohen Konzentrationen an Kryoprotektiva und sehr hohen Abkühlraten. In den vergangenen Jahren konnten Überlebensraten von Embryonen bis zu 80 % und Schwangerschaftsraten von fast 30 % mit dem Transfer von vitrifizierten und wiederaufgetauten Embryonen im Zygotenstadium, den verschiedenen Teilungsstadien sowie dem Morula- und Blastozystenstadium erreicht werden. Auch über Geburten gesunder Kinder wurde vielfach berichtet. Bis heute besteht trotzdem ein nur geringes Interesse an dieser Technik. Ein Grund dafür ist sicherlich die Abneigung vieler IVF-Zentren, Embryonen hohen Konzentrationen von Kryoprotektiva auszusetzen, verbunden mit der Lagerung solch tiefgefrorener Embryonen unter nicht-sterilen Bedingungen.

Das Ziel des ersten Teils dieses Artikels ist es zu analysieren, ob solche Ängste gerechtfertigt sind, da neuerdings das Tiefgefrieren und Lagern von Gameten und Embryonen unter aseptischen Bedingungen möglich geworden ist. Im zweiten Abschnitt werden Ergebnisse (Auf-tauraten, Schwangerschafts- und Baby-Take-Home-Raten nach Vitrifikation von Embryonen) vorgestellt und Probleme, die mit der Vitrifikation von Blastozysten auftreten können, diskutiert.

Schlüsselwörter: Vitrifikation, aseptische Kryokonservierung, Embryo, Blastozyste, In-vitro-Fertilisierung

Putting Aseptic Vitrification into Practice. Vitrification is a cryopreservation strategy where cells are converted into a glass-like amorphous solid, which is free of any crystalline structure. Such process is achieved by a combination of high concentrations of cryoprotectant and an extremely high cooling rate. In the last years, survival rates of up to 80 % after thawing and pregnancy rates of almost 30 % could be achieved after transfer of vitrified embryos at the zygote, cleavage, morula and blastocyst stages. Also deliveries of healthy babies have been reported numerous times. To this day, a limited interest in this technique can be noted. The explanation may lie in the apprehension of many ART units regarding exposure of embryos to high concentrations of cryoprotectants and storage in non sterile conditions.

The aim of the first part of the article is to analyse if such fears are justified due to the fact, that slow-cooling and storage of embryos based upon high aseptic conditions is presently possible. In the second part, results on survival after thawing, pregnancy-rates and baby-take-home-rates of vitrified embryos will be presented and the problems associated with vitrification of blastocysts will be discussed. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2008; 5 (3): 121–31.**

Key words: vitrification, aseptic cryopreservation, embryo, blastocyst, in vitro fertilization

Seit der Einführung der In-vitro-Fertilisierung in die medizinische Praxis 1978 wurden zahlreiche Neuerungen und Verbesserungen eingeführt: So zum Beispiel die ovarielle Stimulation, die Kriterien und Prozesse zur Auswahl von Gameten und Embryonen sowie die Kulturbedingungen und Kulturmedien. Daraus resultierend nahm die Zahl von Embryonen, die für einen Transfer geeignet sind, deutlich zu. Eine der Hauptkomplikationen der assistierten Reproduktion, die Mehrlingsschwangerschaft, geriet in den vergangenen Jahren immer mehr in den Vordergrund, sodass es für die Reproduktionsmediziner immer wichtiger wurde, den besten Embryo für den Transfer auszusuchen, überzählige Embryonen jedoch kompetent konservieren zu können.

In der Folge ist die Methode der Kryokonservierung von Embryonen vom Zygotenstadium bis zum Blastozystenstadium immer mehr in den Vordergrund gerückt. Zwei Verfahren zur

Kryokonservierung von Oozyten und Embryonen sind bekannt: langsames Tiefgefrieren [1] und Vitrifikation [2].

Mitte der 1990er-Jahre wurde die letztgenannte Technik in die Reproduktionsmedizin eingeführt und gewinnt immer mehr an Bedeutung.

Warum gilt die Vitrifikation als mögliche Alternative zur Technik des langsamen Tiefgefrierens?

Der Prozess der Kryokonservierung verläuft über folgende Stufen: Einbringen von Zellen in ein Kryoprotektivum, das Abkühlen und die Lagerung in flüssigem Stickstoff („liquid nitrogen“, LN₂). Für einen späteren Transfer erfolgt dann die Wiedererwärmung und das Zurückführen der Zellen in eine physiologische Lösung.

Im Zuge dieser Schritte ist die Eiskristallbildung während des Abkühlens

der bestimmende Faktor für die Überlebensfähigkeit von Embryonen nach dem Auftauen. In der Tat ist eine Kristallbildung in einigen Zellen des Embryos bis zu einem gewissen Grad unvermeidbar.

Während eines langsamen Gefrierprozesses unter Einsatz einer 1,5-molaren Konzentration eines permeablen Kryoprotektivums sind neben der Bildung intra- und extrazellulärer Eiskristalle der mechanische Stress (zu schnelles Tiefgefrieren) und der potenziell toxische Effekt des Kryoprotektivums (zu langsames Tiefgefrieren) für Zellschädigungen verantwortlich. Das Überleben einer Zelle während der Kryokonservierung hängt daher wesentlich vom Gleichgewicht dieser Faktoren ab.

In diesem Zusammenhang stellt die Vitrifikation ein anderes Verfahren der Kryokonservierung dar, da diese im Gegensatz zum programmierten Tiefgefrieren keine Bildung von Eiskris-

Eingegangen: 12.04.2007; angenommen nach Revision: 14.07.2008

Aus dem ¹Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, Brenz, Österreich, dem ²Reproductive Genetics Institute, Chicago, USA, dem ³Department of Obstetrics, University Hospital Zürich, Schweiz, der ⁴GIGA Transgenic Platform, Université de Liège, Belgien, dem ⁵Iakentro IVF Centre, Thessaloniki, Griechenland, und dem ⁶Centre Hospitalier Inter Regional Cavell (CHIREC), Braine l'Alleud – Bruxelles, Belgien; ⁷contributed equally

Korrespondenzadresse: Dr. med. Nicolas H. Zech, Departement Frauenheilkunde, Universitätsspital Zürich, CH-8091 Zürich, Frauenklinikstraße 10, Schweiz; E-Mail: nicolas.zech@usz.ch

tallen impliziert. Hinzu kommt, dass Zellschädigungen, die durch das Abkühlen entstehen, weitgehend vermieden werden können.

Ein anderer Vorteil dieser Technik liegt darin, dass die Vitrifikation weniger Zeit benötigt und geringere Kosten verursacht, da der Einsatz programmierbarer Gefrierapparate nicht notwendig ist.

Was sind Voraussetzungen, um einen glasähnlichen Zustand zu erreichen?

Unter Vitrifikation versteht man die Erstarrung einer Lösung bei sehr niedrigen Temperaturen ohne Bildung von Eiskristallen. Dieser glasähnliche oder auch amorphe Zustand wird durch Anwendung einer Kombination von Kryoprotektiva in erhöhter Konzentration und mit sehr hohen Abkühlraten ($-2000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-20.000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) erreicht.

Erste Voraussetzung: erhöhte Konzentration an Kryoprotektiva

Die Medien, die normalerweise für die Vitrifikation verwendet werden, setzen sich aus Substanzen, welche die Zellwand passieren (Ethylengly-

kol [EG], Dimethylsulfoxid [DMSO], 1-2 Propandiol [PROH]), sowie Substanzen, die diese nicht durchdringen und aus niedermolekularen Teilchen bestehen (Saccharose oder Trehalose), zusammen.

In einigen Protokollen werden dem Vitrifikationsmedium Polymere mit großem molekularem Gewicht beigefügt, wie Polyethylenglykol (PEG) (Molekulargewicht 800), Ficoll (Molekulargewicht 70.000 bis 400.000) oder Polyvinylpyrrolidon (Molekulargewicht 360.000).

Die meisten Vitrifikationsprotokolle (Tiefgefrieren ohne Äquilibrierung) beruhen darauf, Embryonen in zwei Etappen kurzfristig Kryoprotektiva in steigenden Konzentrationen auszusetzen.

Wir analysierten am Modell von Mäusezygoten die Veränderungen der Volumina, welche durch die unterschiedlichen Kryoprotektiva hervorgerufen werden. Eine Fotografie wurde alle 10 Sekunden in den verschiedenen Kryoprotektiva-Lösungen (VS1 und VS2) gemacht. Um die Embryonen im selben Fokus zu haben, wurden die Zygoten auf einer Haltepipette fixiert (Abb. 1a, 1b):

- In einer ersten Phase wurden die Embryonen in eine nicht glasbildende Lösung (VS1) permeabler Kryoprotektiva für eine Zeitspanne von 2–5 Minuten eingebracht (abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium des Embryos, da jedes Teilungsstadium von Embryonen ein bestimmtes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen hat). Nach einer schnellen Dehydrierungsphase (maximal 30 Sekunden) dringt eine bestimmte Menge an Kryoprotektiva in die Zellen (z. B.: etwa 30 % des eigentlichen Sättigungsgrades für eine Zygote).
- In der zweiten Phase wurden die Embryonen einer „vitrifizierenden“ (glasbildenden) Lösung (VS2) in Kontakt gebracht, die aus permeablen (4,8–6,4-molar) und nicht-permeablen Kryoprotektiva zusammengesetzt war. Die Expositionszeit in VS2 wurde kurz gehalten (zwischen 30 und 45 Sekunden). Anschließend wurden die Embryonen auf einen Träger gegeben (max. 2 Embryonen pro Träger) und in LN2 eingebracht. Während dieser zweiten Etappe fand eine weitere Phase der Dehydrierung statt.

Im Laufe dieser beiden Phasen trat dank der Dehydrierung des Embryos

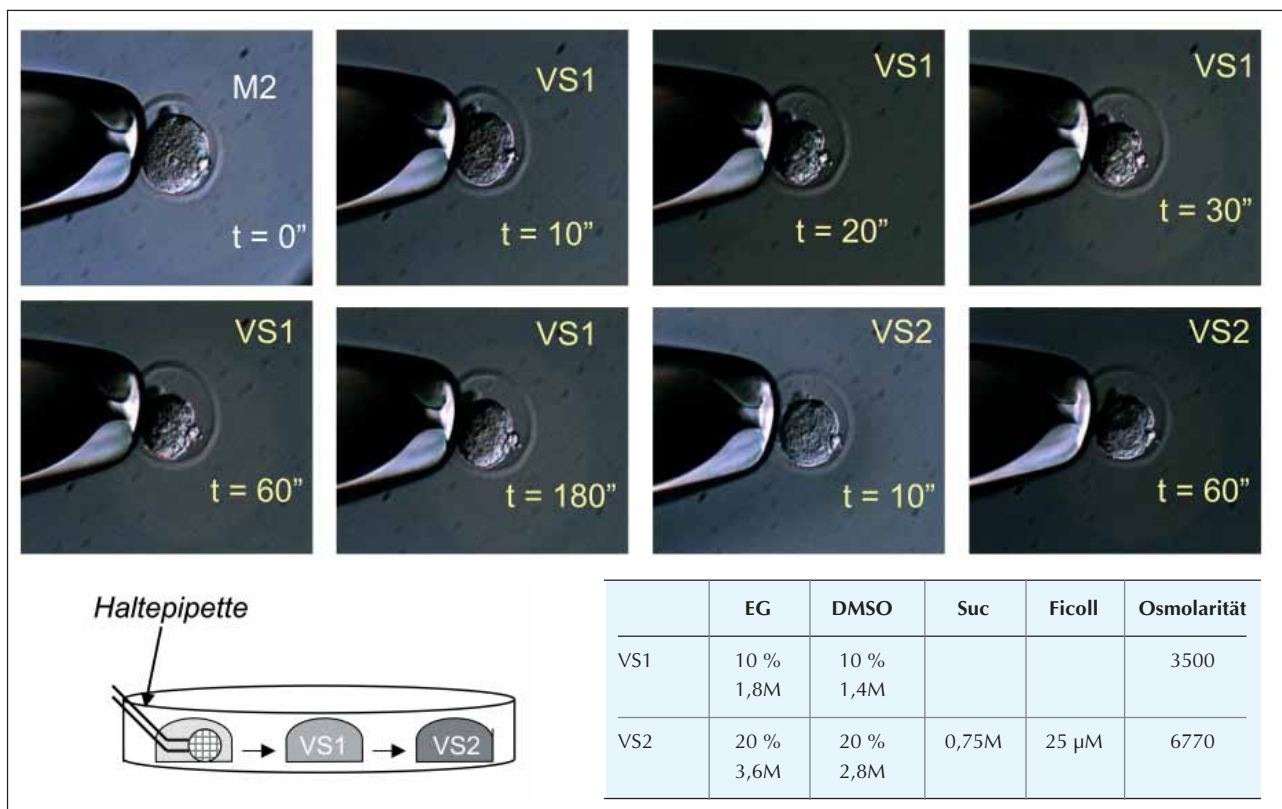


Abbildung 1a: Schwankung des Volumens (Mauszygote) in Relation zur Exposition in VS1- und VS2-Lösung.

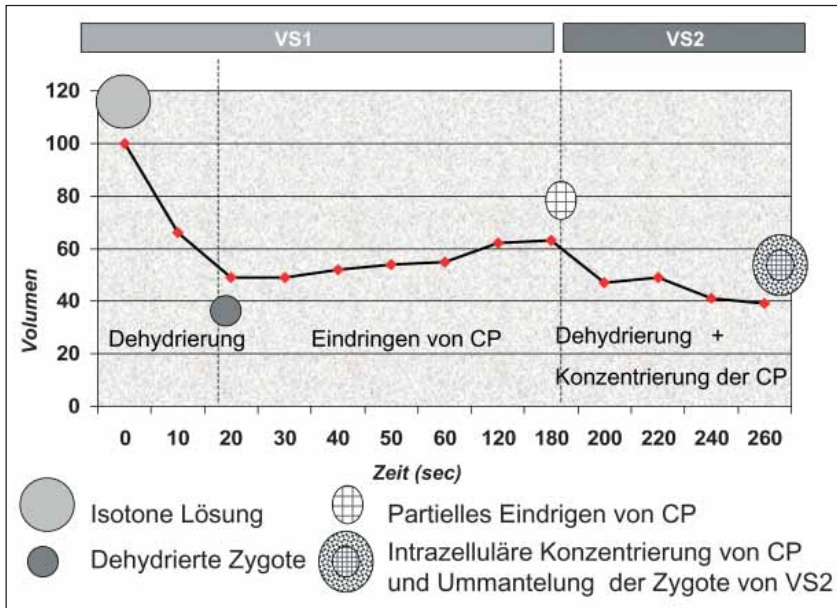


Abbildung 1b: Graphische Darstellung der Volumenschwankungen in Embryonen in Relation zur Exposition in Kryoprotektiva (CP).

in VS2, welches die intrazellulären löslichen Bestandteile wie z. B. Salze und Proteine konzentriert, durch die Kryoprotektiva, die im Laufe der Inkubation in VS1 in die Zelle eindrang, ein intrazellulärer glasähnlicher Zustand ein.

Der extrazelluläre glasähnliche Zustand wurde durch die erhöhte Konzentration an Kryoprotektiva im VS2, welche die Embryonen in einen glasartigen Mantel hüllen, erreicht.

Zusammenfassend kann festhalten werden, dass die Dehydrierung der Zellen vor der Abkühlung auftrat und dadurch ein intra- und extrazellulärer glasähnlicher Zustand erreicht wurde. Während die Embryonen in LN2 getaucht wurden, erhöhte sich die Viskosität des Mediums so schnell, dass die Moleküle keine Zeit fanden, sich in kristalline Strukturen zu formieren, was die Überführung in den intra- und extrazellulären glasähnlichen Zustand förderte.

Zweite Voraussetzung: die Abkühlrate und das Trägersystem für Embryonen

Die ersten Erfolge mit Vitrifikationen wurden unter Verwendung der sogenannten „Minipaillette“ (250 µl) zur Lagerung von Mäuse- [2, 3], Rinder- [4] und auch menschlichen [5] Embryonen erzielt. Die Stärke der Paillettenwand, das Flüssigkeitsvolumen (250 µl) und die Entstehung eines thermischen Isolators während des

Eintauchens der Paillette in LN2 (Leidenfrost-Effekt) verhindern jedoch eine Steigerung der Abkühlrate über -2000 °C/min.

Martino et al. [6] sowie Lane et al. [7] konnten schon früh die Vorteile einer erhöhten Abkühlrate in Bezug auf das Überleben von Rindereizellen und Hamsterblastozysten aufzeigen. Eine schnellere Abkühlrate (-10.000 bis zu -20.000 °C/min) verringert das Risiko einer möglichen Eiskristallbildung während des Abkühlens und vermeidet eine vorzeitige Auflösung des glasähnlichen Zustandes beim Wiedererwärmen, wenn man weniger konzentrierte Kryoprotektiva verwendet.

Eine beschleunigte Abkühlrate vermag zudem die allgemein zellschädigende Wirkung des Abkühlens („chil-

ling injuries“ – besonders bei Oozyten zu beobachten) zu verhindern.

Die Geschwindigkeit, mit der abgekühlt wird, hängt wesentlich vom verwendeten Trägersystem und dem Volumen der Proben ab, d. h. je größer die Kontaktfläche, desto länger dauert es, bis LN2 seine vollständige Wirkung entfalten kann.

Bei den Techniken der ultraschnellen Vitrifikation werden kleinstmögliche Volumina einer Vitrifikationslösung (< 10 µl) und spezielle Trägersysteme verwendet, was Abkühlraten von bis zu -20.000 °C/min ermöglicht (Tab. 1).

Um den thermischen Gradienten zu verringern, besteht die Möglichkeit, verlängerte Pailletten zu verwenden, deren Wände dünner sind [8–10]. Direkter Kontakt des Mikrotropfens (bestehend aus Kryoprotektivum) mit dem LN2 begünstigt dies zusätzlich [6, 11–13].

Ein weiteres Trägersystem ist der „Hemi-Straw“, der aus einem an der Längsseite offenen Straw besteht, auf welchen Embryonen vor dem Eintauchen in LN2 platziert werden [11] (Abb. 2). Dieses System erlaubt das Einbringen einer sehr geringen Menge (0,3 ml) an Kryoprotektiva vor dem Eintauchen in LN2.

Der Nachteil der aufgezählten Konzepte liegt darin, dass ein direkter Kontakt zwischen dem LN2 und der Probe, die in den glasähnlichen Zustand überführt werden soll, nicht verhindert werden kann.

Deshalb sind in letzter Zeit verschiedene Methoden untersucht worden,

Tabelle 1: Die wichtigsten Trägersysteme für die Vitrifikation

Nicht-aseptische Trägersysteme		
Electron microscopic grids (EM)	Martino 1996	[6]
Open-Pulled straw (OPS)	Vajta 1998b	[8]
Flexipet denuding pipette (FDP)	Liebermann 2002	[9]
Fine diameter plastic micropipette (mOPS)	Cremades 2004	[10]
Cryoloop	Mukaida 2003	[12]
Hemi-Straw (HS)	Vanderzwalmen 2000	[11]
Cryotop (open system)	Kuwayama 2005	[13]
Aseptische Trägersysteme		
250 µl French mini-straw	Vanderzwalmen 1997	[5]
Cryotip (closed system)	Kuwayama 2005	[13]
OPS - Straw in straw	Isachenko 2007	[14]
Vitrification high security (VHS)	Vanderzwalmen 2005	[15]

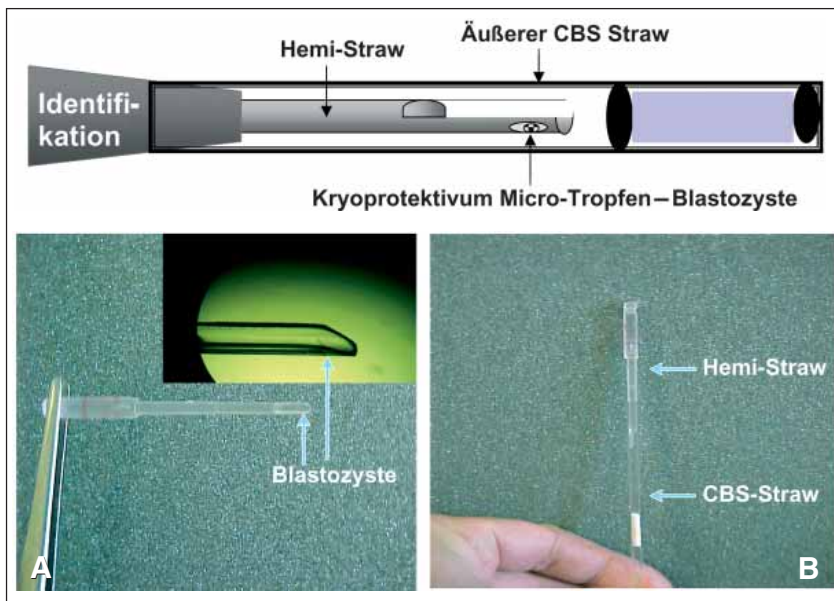


Abbildung 2: Schema des Hemi-Straw „Vitroplug“: (A) Aufbringen der Blastozyste auf die Spitze des Hemi-Straw; (B) Einbringen des Hemi-Straw in den größeren „CBS“-Straw.

die eine schnelle Abkühlrate sowie eine aseptische Lagerung der Proben ermöglichen.

Das Wiedererwärmen von Embryonen

Zur Wiedererwärmung wird der Träger mit Zygoten/Embryonen direkt in Saccharose (1 bis 0,33-molar, je nach Expositionszeit von Embryonen in VS1) eingetaucht, um so eine sehr rasche Wiedererwärmung zu ermöglichen. Es folgt darauf eine Dilution der Embryonen in Saccharoselösungen von abnehmender Konzentration, bevor diese in das Embryotransfer-Medium gegeben werden.

In den meisten Fällen wird bei der Vitrifikation dasjenige Ende der Vorrichtung, in welchem der Embryo lokalisiert ist, zuerst entweder im Stickstoff (nicht-aseptisch) oder außerhalb des Stickstoffs (aseptisch) mit einer Schere geöffnet und anschließend sehr schnell in die Saccharoselösung überführt. Die gewählte Konzentration der Saccharoselösung hängt davon ab, wie die Embryonen den Kryoprotektiva beim Tiefgefrieren ausgesetzt wurden. Bei einer kurzen Expositionszeit (3–4 min) können die Embryonen direkt in eine 0,33-molare Saccharoselösung eingebracht werden. Wenn die Expositionszeit 5–15 min beträgt, werden die Embryonen primär in eine 1-molare Saccharoselösung gegeben und anschließend mit absteigender Konzentration diluiert.

Gibt es Parallelen zwischen dem langsamen Tiefgefrieren und der Vitrifikation?

Um eine Zellschädigung so gering wie möglich zu halten, ist das Erreichen eines intrazellulären glasähnlichen Zustandes Voraussetzung.

Die klassischen Schritte des langsamen Tiefgefrierens (Gefrieren im Äquilibrium) laufen folgendermaßen ab:

- Äquilibration von Embryonen bei Normaltemperatur mit permeablen Kryoprotektiva (1,5-molar), bei der die Embryonen nach einer Phase der Dehydrierung ihr ursprüngliches Volumen in etwa 15 Minuten wieder erreichen

- Erste Abkühlung auf $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Induzieren der extrazellulären Eiskristallbildung („Seeding“)
- Abkühlen im Äquilibrium ($-0,3$ bis $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis auf eine Temperatur von -30 bis $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$), die eine Dehydrierung durch Austausch von Molekülen zwischen Zytoplasma (Mehrheit an freiem Wasser) und der extrazellulären Flüssigkeit (vor allem bestehend aus Kryoprotektiva) hervorruft.

Die Zunahme an extrazellulärem kristallisiertem Wasser im Laufe des Abkühlens geht Hand in Hand mit einer extrazellulären Anreicherung von löslichen Bestandteilen und Kryoprotektiva, was zur Dehydrierung des Embryos wesentlich beiträgt („Lösungseffekt“) (Abb. 3).

Dieser „Lösungseffekt“ hat zum Ziel, die Menge des intrazellulären Wassers auf ein Minimum zu reduzieren und sollte eintreten, bevor sich Eiskristalle in den Zellen bilden können, denn diese Eiskristalle würden nur den Re-Kristallisierungseffekt, der mit der Wiedererwärmung einhergeht, potenzieren.

Da ein gewisser Prozentsatz an Embryonen diesen gesamten Prozess beim langsamen Tiefgefrieren überlebt, kann davon ausgegangen werden, dass die physikalischen Bedingungen eines intrazellulären glasähnlichen Zustandes bei den überlebenden Embryonen schon während des Ab-

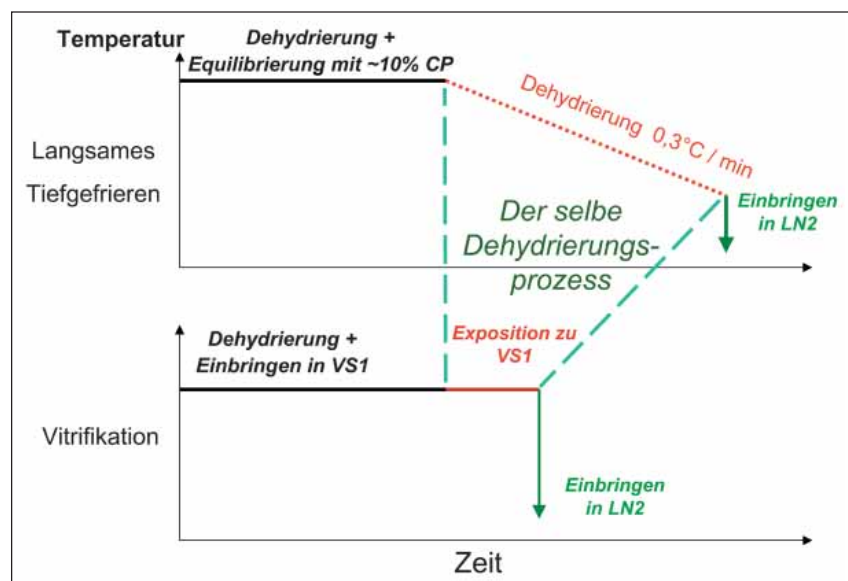


Abbildung 3: Gemeinsamkeiten zwischen dem langsamen Tiefgefrieren und der Vitrifikation.

kühlens und vor dem Einbringen in LN2 bestanden haben müssen.

Zusammenfassend kann man folgern, dass der intrazelluläre glasähnliche Zustand unabhängig von der Technik der Kryokonservierung entweder im Laufe der Abkühlung (langsameres Tiefgefrieren) oder vor der Abkühlung (Vitrifikation) eintritt (Abb. 3).

Worin liegt das geringe Interesse an der Vitrifikation? Ist dieses Desinteresse gerechtfertigt?

In vielen Publikationen wird die Vitrifikation als Methode der Wahl zur Kryokonservierung von Embryonen bestimmter Säugetierarten [16–18] angesehen. Trotz der Veröffentlichungen ermutigender Resultate besteht eine gewisse Skepsis betreffend der Etablierung dieser Technik im Zusammenhang mit der humanen Reproduktionsmedizin.

Für die Vitrifikation benötigt man höhere Konzentrationen an Kryoprotektiva: Entspricht dies der Tatsache?

Die Notwendigkeit, Embryonen einer hohen Konzentration an Kryoprotektiva auszusetzen (30–50 % v/v), bedingte eine gewisse Zurückhaltung bei der Etablierung dieser Methode. Es gibt jedoch Möglichkeiten, die Toxizität, die von den hohen Konzentrationen der Kryoprotektiva ausgeht, zu vermindern. Die Verwendung einer Lösung, die zwei verschiedene Kryoprotektiva beinhaltet, scheint die Toxizität/zellschädigende Wirkung jedes Einzelnen zu verringern [19, 20].

Eine andere Alternative besteht darin, Makromoleküle dem Gemisch an Kryoprotektiva hinzuzufügen. Solche Polymere mit großem Molekulargewicht sind normalerweise weniger toxisch und können Embryonen vor aggressiver Kälte schützen, indem sie die Viskosität der Lösung erhöhen.

Die zähflüssige Matrix, in der die Embryonen eingeschlossen sind, verhindert auch die Auskristallisierung des Wassers während des Abkühlens und des Wiedererwärmens.

Kuleshova und Mitarbeiter [21] haben gezeigt, dass Oozyten besser überleben, wenn Makromoleküle der Vitrifikationslösung beigelegt wer-

den, als wenn das Gemisch an Kryoprotektiva nur Moleküle enthält, die eine Zelle penetrieren können (wie bei der klassischen Vitrifikation).

Es ist dadurch auch möglich, die Toxizität der Vitrifikationslösung zu reduzieren, indem man die Temperatur der Kryoprotektiva herabsetzt sowie die Expositionszeit von Embryonen in diesen vor der Abkühlung verringert. Die Eindringgeschwindigkeit der Kryoprotektiva ist temperaturabhängig. Es konnte an Mäuseblastozysten gezeigt werden, dass ein vorangehendes Äquilibrieren mit einem Gemisch, bestehend aus PROH-Glycerol bei 4 °C, eine positive Wirkung auf das Überleben von Embryonen nach dem Auftauen hat [22]. Die routinemäßige Anwendung ist zur Zeit nicht möglich, da aufgrund der Wärmeentwicklung des Lichtmikroskops eine konstante Temperatur von 4 °C nicht gehalten werden kann.

Entscheidend ist auch die Frage, welche Konzentrationen der Kryoprotektiva als schädlich für das Überleben von Embryonen angesehen werden müssen. Einerseits müssen Kryoprotektiva eingesetzt werden, um der Bildung intrazellulärer Eiskristalle vorzubeugen, andererseits sollte die zellschädigende und allenfalls toxische Wirkung, die aus der Konzentration der eingesetzten Kryoprotektiva resultiert, so gering wie möglich gehalten werden.

Vansteenbrugge und Mitarbeiter [23] konnten feststellen, dass es keinen Unterschied in Bezug auf das Überleben nach Wiedererwärmen von vitrifizierten Blastozysten gibt, wenn man das Auftauen entweder nach Verdünnen mit PBS (n = 55 Auftauzyklen) oder mittels 0,5 M Succrose (n = 63 Auftauzyklen) (71 % vs. 69 %) vergleicht. Auch die Implantationsrate (IR) und Schwangerschaftsrate (SSR) war in beiden Gruppen identisch (16 % und 24 % nach PBS vs. 18 % und 27 % nach Verdünnen in 0,5 M Saccharose).

Da bei den meisten Vitrifikationsprotokollen eine Exposition der Embryonen in Kryoprotektiva nur von kurzer Dauer ist, kann gesagt werden, dass die Konzentration sowie die daraus resultierende zellschädigende Wirkung der beteiligten Kryoprotektiva insgesamt wesentlich geringer ist als dies beim langsamen Tiefgefrieren der Fall ist.

Die oben angeführten Daten belegen, dass es nicht nötig ist, humane Blastozysten beim Auftauen in ein Dilutionsmedium zu geben.

Die geringe Schädigung von Blastozysten nach direktem Einbringen in eine isotone Lösung wie PBS kann durch den geringen osmotischen Stress erklärt werden, was auch darauf hinweist, dass Kryoprotektiva nur in geringem Maße in die Zellen während der sehr kurzen Exposition eindringen. Dies ist nicht so beim langsamen Tiefgefrieren. Würde man die Embryonen beim Wiedererwärmen direkt in eine isotone Lösung geben, würde es zu einer plötzlichen Zellyse kommen, da wegen der viel zu raschen Rehydratation noch sehr hohe Konzentrationen von Kryoprotektiva in der Zelle vorhanden sind.

Kasai et al. [24] konnten zeigen, dass EG als Kryoprotektivum nur minimal toxisch auf Embryonen wirkt, weshalb EG derzeit vorwiegend zur Vitrifikation von Oozyten und Embryonen eingesetzt wird.

Klug et al. [25] berichten allerdings von einer toxischen Wirkung des EG und besonders seiner Metabolite auf Ratten-Embryonen (Tag 9,5–11,5 der Tragzeit).

Laut Vajta et al. [26] hat keine Studie, weder beim Menschen noch in Tiermodellen, eine Störung in der Entwicklung nach einer Vitrifikation mit EG belegen können.

Trotzdem sollten alternative Verfahren erforscht werden, wie zum Beispiel die Verwendung anderer permeabler Kryoprotektiva (PROH) oder das Hinzufügen von Polymeren in größerer Konzentration, mit dem Ziel, die permeablen Kryoprotektiva zu reduzieren [23].

In ihrer Studie berichten Takashi und Mitarbeiter [27], dass es keinen Unterschied hinsichtlich Fehlbildungen bei Kindern gibt, die nach einem Transfer von frischen bzw. vitrifizierten Blastozysten auf die Welt kamen.

Aseptische Vitrifikation: das Ende des Tunnels?

Ein Nachteil der Techniken der ultraschnellen Vitrifikation liegt darin, dass die Probe mit dem LN2 direkt in Kontakt tritt (Abb. 4). Da die Stick-

stoffbehälter im Laufe der Verteilung des LN₂, während der Lagerung oder durch die überkreuzte Kontaminierung mit Proben, die nicht korrekt geschützt wurden, verunreinigt sein können, ist es eine absolute Notwendigkeit, die Embryonen unter aseptischen Bedingungen zu behandeln und abzukühlen, ohne dass dadurch die Überlebensraten der Embryonen nach Auftauen beeinträchtigt werden. Verschiedenste aseptische Systeme wurden entwickelt [13, 14, 15].

Vanderzwalmen et al. [11] haben einen Kit eines aseptischen Vitrifikationssystems entwickelt, das auf dem Hemi-Straw-Prinzip basiert (Abb. 5a). Dieser Kit höchster Sicherheit (HSV) erlaubt es, einen Mikrotropfen (< 0,02 ml) von Kryoprotektiva, welcher die Embryonen enthält, auf eine hauchdünne Rinne aufzubringen, bevor diese in eine Minipaillette gegeben wird.

Sie wird unter Hitze mit einer speziellen Schweißmaschine, die eine dichte Versiegelung garantiert und einem Druck von 150 kg/cm² widersteht, vor dem Eintauchen in LN₂ versiegelt.

Ein direkter Kontakt mit LN₂ erlaubt es, Embryonen mit sehr schneller Geschwindigkeit abzukühlen. Im Gegensatz dazu kann ein aseptisches System, das Embryonen vom LN₂ isoliert, einen negativen Effekt auf das Überleben nach dem Auftauen ausüben, denn je geringer die Abkühlrate ist, desto höher muss die Konzentration an Kryoprotektiva sein.

Deswegen ist es unumgänglich, die notwendige Mindestmenge an Kryoprotektiva für jede Abkühlrate zu wis-

sen, um so die Gefahr der Toxizität einzugrenzen und trotzdem eine akzeptable Überlebensrate sicherzustellen.

Vitrifikation menschlicher Embryonen: Wo steht man heute?

Im Jahre 1985 berichtet die Zeitschrift *Nature* von den ersten Fortschritten bei der „In-vitro-“ Technik von vitrifizierten Mäuseembryonen unter Verwendung einer komplexen Mischung von Kryoprotektiva: DMSO, Acetamid, PROH und PEG [2]. Im darauf folgenden Jahr wurde von den ersten Geburten von Mäusen und Kälbern nach einer Vitrifikation von Morulae und Blastozysten bei Verwendung einer Mischung aus Glycerin und PROH berichtet [3, 4].

In der Folge wurden zahlreiche Artikel veröffentlicht, und die Technik wird zurzeit als Alternativmethode zur Konservierung von Embryonen bestimmter Säugetierarten (die vom Aussterben bedroht sind) und von Embryonen, die aus transgenen Linien stammen, angesehen [22].

Trotz Skepsis konnte man ein wachsendes Interesse an dieser Technik bei einigen Arbeitsgruppen feststellen. Studien, die Vergleiche zwischen dem langsamen Tiefgefrieren und der Vitrifikation anstellten, sind zum Schluss gekommen, dass die Technik der Vitrifikation in Hinsicht auf das Überleben von Embryonen sowie die SSR bei Mäusen [28] und bei Menschen [29–31] überlegen ist.

Vitrifikation von Zygoten

Man erreicht hohe Überlebensraten nach Wiederauftauen von Zygoten

(81–100 %), hohe Raten in der Weiterentwicklung bis zum Blastozystenstadium und hohe SSR, indem man Zygoten für kurze Zeit einer Lösung von Kryoprotektiva aussetzte und Trägersysteme verwendete, die nicht hermetisch abgeschlossen sind, wie zum Beispiel die „Flexipipette“ [8], „electron microscopic grids“ [32], das „open pulled straw (OPS)“ [33, 34] oder den „Cryotop“ [35]. Nach Vitrifikation von 339 Zygoten mit dem „Cryotop“ konnten Al Hasani et al. [35] eine Überlebensrate von 89 % und eine SSR von 37 % nach Wiederauftauen erzielen, was 3x höher war als mit dem langsamen Tiefgefrieren (10 %).

Unter Verwendung aseptischer Träger verwiesen Isachenko und Mitarbeiter [14] auf eine Überlebensrate von 75 %, 25 % der Zygoten entwickelten sich bis hin zum Blastozystenstadium. Das Forscherteam schließt daraus, dass die Verminderung der Abkühlrate keinen nennenswerten negativen Effekt auf die darauffolgende Entwicklung der Embryonen hat.

Vitrifikation von Embryonen im 8-Zellstadium (Tag 3)

Die ersten Schwangerschaften, die nach einer Vitrifikation von Embryonen im 8-Zellstadium erzielt wurden, gehen auf das Jahr 1998 zurück. Dabei verwendete die Arbeitsgruppe um Mukaida eine Mischung aus EG-Ficoll und Saccharose sowie die 250 ml-Minipailletten als Trägersystem [36]. El-Danasouri und Selman [37] haben 215 Embryonen am Tag 3 der Kultur mit Hilfe des OPS vitrifiziert. Eine Überlebensrate von 79 % bzw. 40 % wurden nach Vitrifikation im 8-Zellstadium bzw. 6–7-Zellstadium beobachtet. Nach dem Transfer wurden



Abbildung 4: Ultra-schnelle Vitrifikation. A: Hemi-Straw + CBS-Straw, B: Einbringen des Hemi-Straw direkt in LN₂, dadurch direkter Kontakt mit LN₂, C: Hemi-Straw wird unter LN₂ in den CBS-Straw gegeben.

bei 30 % Schwangerschaften erzielt mit einer IR von 10 %.

Gottumukkala und Mitarbeiter [38] haben Tag-3-Embryonen durch langsames Tiefgefrieren bzw. Vitrifikation mit Hilfe des Cryoloop kryokonserviert. Ihre Studie hat eine erhöhte Überlebensrate (95 % gegenüber 60 %), erhöhte SSR (35 % gegenüber 17 %) sowie erhöhte IR (15 % gegenüber 4 %) nach Vitrifikation gezeigt.

Kuwayama und Mitarbeiter [13] berichten von wesentlich höheren Überlebens- und SS-Raten (98 % gegenüber 91 %) nach Vitrifikation von mehr als 890 Embryonen im 4-Zellstadium mit dem Cryoloop, verglichen mit der langsamen Kryokonservierung.

Tabelle 2 zeigt unsere Resultate nach Vitrifikation von Tag-3-Embryonen mit verschiedenen Kryoprotektiva und dem Hemi-Straw als Trägersystem. Unsere Analyse ergab, dass die Ergebnisse mit der Konzentration der zweiten Vitrifikationslösung (VS2) korrelierten, was darauf hindeutet, dass der glasähnliche Zustand nicht vollständig eintritt, wenn Embryonen in eine 15 %-15 %-VS2 gebracht werden. Es ist davon auszugehen, dass eine Inkubationszeit von 2–3 Minuten in der ersten Lösung (VS1) zu kurz ist, um ein suffizientes Eindringen von Kryoprotektiva in die Zellen zu gewähren, welche dann in der zweiten Dehydratationsphase mittels der VS2 konzentriert werden. Das Verwenden einer höher konzentrierten VS2 (20 %-20 %) erlaubt es, die Embryonen stärker zu dehydrieren, und als Folge daraus wird ein Schwellenwert an intrazellulärer Lösung erreicht, welche Eigenschaften eines glasähnlich Zustandes besitzt.

Vitrifikation von Morulae

Cremades et al. [39] untersuchten das Überleben von überzähligen humanen Morulae, welche experimentell mit dem OPS-Verfahren mittels einer Plastik-Mikropipette vitrifiziert wurden. Nach Vitrifikation von Morulae am Tag 4 und Tag 5 konnte die Arbeitsgruppe zufriedenstellende Überlebensraten von 73,7 % und 72,7 % zeigen. Während der vergangenen 2 Jahre wurde die Vitrifikation von Morulae routinemäßig mit Erfolg in unserem Programm umgesetzt

(Tab. 2). Wie mit Tag-3-Embryonen haben wir mit unserem Vitrifikationsprotokoll bei Morulae ein besseres Ergebnis in Bezug auf SSR und IR erzielt, wenn höher konzentrierte Kryoprotektiva-Lösungen eingesetzt wurden.

Vitrifikation von Blastozysten

Während der vergangenen Jahre wurden zahlreiche Artikel zum Thema der Vitrifikation von Blastozysten veröffentlicht. Verschiedenste Verfahren und Ansätze zur Vitrifikation von Blastozysten wurden ausprobiert. Unterschiedliche Mischungen von Kryoprotektiva wurden eingesetzt, die Expositionszeit und die Temperatur der Lösungen variierten, ebenso die Methoden der Verdünnung der Kryoprotektiva sowie die Trägersysteme. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine Blastozyste gegenüber den vorangehenden Teilungsstadien eines Embryos eine schon sehr komplexe Struktur darstellt, die schwierig zu kryokonservieren ist. In der Folge ist es aktuell sehr schwer zu resümieren, welche der Methoden die optimalste darstellt.

Trotzdem werden 2 wichtige Studien von Mukaida und Mitarbeiter [40] und Kuwayama und Mitarbeiter [13] vorgestellt.

Mukaida und Mitarbeiter [40] haben eine beachtliche Serie von 1150 ultraschnellen Vitrifikationszyklen (als Träger wurde der Cryoloop verwendet) vorgestellt: die Blastozysten wurden während maximal 2 min 30 sec einer Mischung aus DMSO-EG ausgesetzt. Nach der Wiedererwärmung von 2749 Blastozysten konnte eine Überlebensrate von 89,7 % verzeichnet werden. Es wird von 543 beginnenden Schwangerschaften, 174 fortgeschrittenen Schwangerschaften und 247 Geburten (295 Kinder, davon 153

Knaben und 142 Mädchen) berichtet. Die IR lag bei 34,5 %.

Es ist anzumerken, dass ein gezielter Kollaps des Blastozoels bei den Blastozysten und den sich expandierenden Blastozysten durchgeführt wurde. Dies wird genauer im nächsten Abschnitt beschrieben.

Kuwayama und Mitarbeiter [13] gehen von einem anderen Ansatz aus. Sie erreichen eine SSR von 59 % und 51 %, indem sie als Träger den Cryoloop (kein aseptisches System) und den Cryotop (aseptisches System) verwenden. Im Protokoll wird beschrieben, dass die Blastozysten nicht mehr den Kryoprotektiva ausgesetzt werden, dafür aber eine längere Periode (5–15 min) mit der DMSO-EG-Lösung äquilibriert werden. Eine Blastozyste ist solange mit diesem Gemisch in Kontakt, bis diese ihr ursprüngliches Volumen wieder erreicht hat.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der ultraschnellen Vitrifikation von Blastozysten mit Hilfe des Hemi-Straw als Trägersystem. Die Verwendung der selben Technik in 3 verschiedenen IVF-Zentren zeigt die besten Resultate in Zentrum B. Im Zentrum B wurden nur Blastozysten guter Qualität für die Vitrifikation herangezogen. Daraus kann gefolgert werden, dass ein wichtiger Parameter, welcher vor einer Vitrifikation bedacht werden muss, die Auswahl von Embryonen darstellt. Die Qualität von Blastozysten, die zur Vitrifikation selektiert werden, hat einen großen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Überlebens und der Weiterentwicklung nach dem Auftauen. Wenn die Qualität der Blastozysten schon vor der Vitrifikation nicht optimal war, ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass diese die Vitrifikation und das Wiederauftauen überleben, eher gering.

Tabelle 2: Vitrifikation-Auftauzyklen von Tag-3- und Tag-4-Embryonen unter Verwendung des Hemi-Straw als Trägersystem.

Tag der Vitrifikation	Tag 3	Tag 4
N° Vitrifikationszyklen	61	59
N° Embryonen	151	140
Überlebensrate nach 1 h	87 % (132)	88 % (123)
Überleben nach 24 h	68 % (90)	71 % (88)
SSR	36 %* (22)	27%** (16)
IR	24 %	20 %

* 1x Zwillingss-SS, ** 2x Zwillingss-SS; Abkühlrate: > 20.000 °C/min, Auftaurate: > 20.000 °C/min; Vitrifikationslösung: EG – DMSO (VS1 [15 % od. 20 %]: 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur, VS2 [40 %]: 45 Sekunden in VS2)

Tabelle 3: Vitrifikation von Blastozysten mit Hilfe des Hemi-Straw als Trägersystem (Ergebnisse von 3 IVF-Zentren).

IVF- Zentren	A	B	C
N° Vitrifikation-Auftauzyklen	506	230	147
N° vitrifizierte Blastozysten	1467	527	342
Überlebensrate nach 24 Stunden	69 %	68 %	68 %
Transfers	454 (90 %)	209 (91 %)	118 (80 %)
Mittlere Zahl transf. Embryonen	1,9	1,6	1,95
SSR	34 % (172)	41 % (95)	33 % (49)
Schwangerschaften und Geburten pro:			
Vitrifikation-Auftauzyklus	27 % (139)	35 % (80)	26 % (38)
Transfer	31 %	38 %	32 %
IR	17 %	26 %	17 %

Abkühlrate: > 20.000 °C/min, Auftaurate: > 20.000 °C/min; Vitrifikationslösung: EG – DMSO (VS1 [15 % od. 20 %]: 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur, VS2 [40 %]: 45 Sekunden in VS2)

Aseptische Vitrifikation von humanen Embryonen

Der Nachteil der Vitrifikation, wie wir sie durchführen, ist, dass sie nicht aseptisch ist. Es ist zwingend nötig, den direkten Kontakt von Embryonen mit LN2 zu vermeiden. Durch diese physische Trennung von Anfang an reduziert sich allerdings unweigerlich die Abkühlgeschwindigkeit von -20.000 °C/min auf weniger als -2000 °C/min . Da man weiß, dass die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines glasähnlichen Zustandes von der Geschwindigkeit des Abkühlens und Wiedererwärmens abhängt, besteht ein Ansatz zur Lösung des Problems in der Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Kryoprotektiva.

Aufgrund der neuen EU-Direktiven (EU/2004/23 EC) wurde schon vor Jahren ein aseptischer Kit für die Vitrifikation entwickelt, welcher sich an das Prinzip des Hemi-Straw anlehnt. Der Vorteil dieses Systems ist, dass die Proben so schnell wiedererwärmt werden, dass keine Kristallisierung auftreten kann und der glasähnliche Zustand unmittelbar aufgehoben wird.

Da eine Verminderung des Überlebens von Blastozysten festgestellt wurde, welche aseptisch mit der üblichen kurzen Expositionszeit mit Kryoprotektiva vitrifiziert wurden, bestand die Notwendigkeit, eine aseptische Technik zu entwickeln, die akzeptable Überlebensraten nach Wiederauftauen gewährleistet. Als erstes wurde versucht, eine verlängerte Expositionszeit in der ersten Lösung (VS1) zu erreichen, um so eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Kryopro-

tektiva zu erzielen. Obwohl eine erhöhte Überlebensrate gezeigt werden konnte, war diese dennoch insgesamt gering.

In einem zweiten Ansatz entwickelten wir ein Protokoll, welches „mimic slow freezing concept vitrification“ genannt wurde.

Die Idee dahinter war, die Phänomene, die während des langsamen Tiefgefrierens auftreten, nachzuahmen.

Die Annahme beruht darauf, dass, wenn die reduzierten Überlebensraten von Blastozysten wirklich im Zusammenhang mit einem unzureichenden Eindringen von Kryoprotektiva in die Zelle stehen oder mit einer zu geringen Abkühlrate korreliert sind, andere Verfahren, wie die Verlängerung der Expositionszeit in den Kryoprotektiva, ins Auge gefasst werden müssen, um einer Eiskristallbildung vorzubeugen.

Beim konventionellen langsamen Tiefgefrieren werden Blastozysten zunächst einer 10%igen Kryoprotektivum-Lösung für eine Dauer von 10–20 min ausgesetzt. Wenn Blastozysten ein langsames Tiefgefrieren mit geringen Abkühlraten ($-0,3\text{ °C/min}$) bis auf -30 °C bis -40 °C und anschließend direkter Exposition in LN2 überleben, kann man postulieren, dass die Embryonen deswegen überlebten, weil ein glasähnlicher Zustand in den Blastomeren und dem Blastozooel schon vor dem Einbringen in LN2 bestand.

Wie dargelegt, ist eine niedrigere Konzentration an Kryoprotektiva bei verlängerter Expositionszeit mit Bezug

auf eine zellschädigende Wirkung schlechter als höher konzentrierte Kryoprotektiva für eine kürzere Zeitdauer.

Nach diesem Äquilibrationsschritt wurden die Blastozysten für kurze Zeit aufsteigend einer höher konzentrierten (20 %–20 %) Lösung von Kryoprotektiva ausgesetzt, bevor diese auf das aseptische Trägersystem (HSV) (Abb. 5a), in ein 0,25 ml aseptisches CBS-Straw oder in das 0,5 ml aseptische VitriSafe-System platziert (Abb. 5b), versiegelt und direkt in LN2 eingetaucht wurden.

Unsere vorläufigen Ergebnisse mit dem HSV als auch mit dem VitriSafe-System zeigen, dass diese Technik gut einsetzbar ist, sowohl zum Vitrifizieren von Tag-3-Embryonen als auch von Blastozysten (Tab. 4–6).

Warum reagieren manche Blastozysten auf die Kryokonservierung anders als erwartet?

1995 hat uns das Einführen sequenzieller Medien auf dem Markt dazu gebracht, verlängerte Kulturen bis zum Blastozystenstadium durchzuführen, und 1996 erzielte unsere Gruppe erste Schwangerschaften nach Vitrifikation früher Blastozysten [5].

Wir haben festgestellt, dass das Überleben umgekehrt proportional zum Volumen des Blastozooels ist. Der Überlebensrate von nur 22 % bei Blastozysten und expandierenden Blastozysten stand eine Überlebensrate von 60 % bei frühen Blastozysten und Morulae gegenüber [41].

Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass die Blastozystenhöhle der Urheber dieser Abweichungen sein könnte. In der Tat ist es so, dass man, wenn man die Zellgröße in den verschiedenen Zellstadien analysiert, feststellen kann, dass die Zellen der inneren Zellmasse ebenso wie der Trophoblasten das größte Verhältnis von Oberfläche zu Volumen aufweisen und daher diese am leichtesten zu kryokonservieren sind.

Die geringere Überlebensrate von Blastozysten und expandierten Blastozysten gegenüber früheren Stadien könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine nicht ausreichende Menge



Abbildung 5a: Aseptische Vitrifikation mit dem High Security Vitrification Kit (HSV). A: Mini-Hemi-Straw, B: Mini-Hemi-Straw mit Tropfen inkl. 2 Embryonen, C: Mini-Hemi-Straw in 250 µl Straw eingebracht, D: Versiegeln von 250 µl Straw, E: Einbringen des versiegelten Straws in LN2, F: Einbringen der Spitze des Mini-Hemi-Straws, in eine Lösung von Succrose.

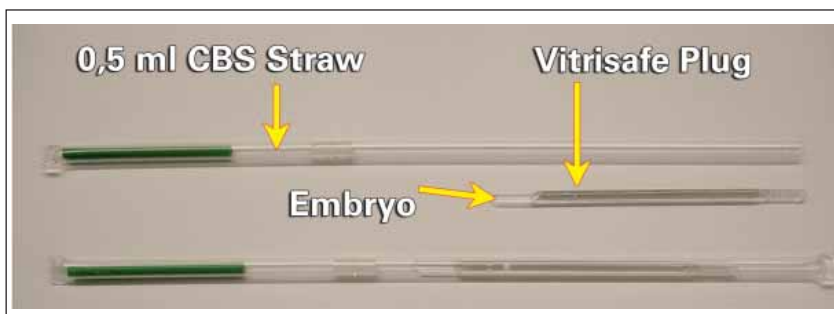


Abbildung 5b: Aseptische Vitrifikation mit dem Vitrisafe. Vitrisafe in 0,5 ml Straw eingefügt – versiegelt – bereit in LN2 eingetaucht zu werden (Abkühlrate: ~1300 °C/min, Auftaurate: > 20.000 °C/min).

Tabelle 4: Überlebensrate, SSR und IR nach Vitrifikation und Lagerung von Blastozysten mit Hilfe des Vitrisafe Kit.

	Herkunft der Blastozysten		
	Männliche-weibliche Infertilität	Eizellspende	In-vitro-Maturation
N° Vitrifikation-Auftau-Zyklen	73	46	15
N° vitrifizierter Blastozysten	213	177	40
N° aufgetauter Blastozysten	213	111	40
Überleben nach Auftauen	85 % (181)	98 % (109)	80 % (32)
Überleben 24h nach Auftauen	75 % (160)	95 % (106)	65 % (26)
N° Blastozysten transferiert (mean)	133 (1,8)	106 (2,3)	26 (1,9)
N° Embryotransfers	73 (100 %)	46 (100 %)	14 (93 %)
Schwangerschaften	51	30	11
Schwangerschaftsrate pro Vitrif. Zyklus	51 % (37)	61 % (28)	60 % (9)
N° Fötaler Herzschlag	45	37	12
% Implantation	34 %	35 %	46 %

an Kryoprotektiva in der vorgegebenen Zeit der Äquilibration in die Blastozystenhöhle eindringt und dort kein glasähnlicher Zustand erreicht werden kann. Somit würde es in diesem Bereich zur Eiskristallbildung und Schädigung umgebender Zellen kommen. Um unsere Hypothese zu untermauern, haben wir die Flüssigkeit in der Blastozystenhöhle mit Hilfe einer Mikronadel noch vor dem Abkühlen abgesaugt und festgestellt, dass diese Volumenreduktion eine vorteilhafte Wirkung in Bezug auf das Überleben hat [41].

Diese Volumenreduktion erreicht man durch das Einsetzen von 2 Nadeln, die das Blastozoel von beiden Seiten etwas zusammendrücken. Alternativ wird die Blastozyste in eine Pipette gesaugt, deren Durchmesser etwas kleiner ist als der Durchmesser des Embryos, bzw. man öffnet die Zona pellucida mit einem Laser, der auf die Zellen des Trophoblasten gerichtet ist [42–44].

Wenn das Blastozoel ein Problem darstellt, können zur Verminderung der Eiskristallbildung in der Blastozystenhöhle andere Strategien eingesetzt werden:

Tabelle 5: Überlebensrate, SSR und IR nach Vitrifikation und Lagerung von Blastozysten unter Verwendung des HSV.

	Herkunft der Blastozysten Männliche-weibliche Infertilität
N° Vitrifikation-Auftau-Zyklen	42
N° aufgetauter Blastozysten	96
Überleben nach Auftauen	81 % (78)
Überleben 24 h nach Auftauen	75 % (72)
N° Blastozysten transferiert (mean)	68 (1,6)
N° Embryotransfers	42
Schwangerschaften	18 (43 %)
Schwangerschaftsrate pro Vitrif. Zyklus	38 % (16)
N° fötaler Herzschlag	19
% Implantation	28 %

Tabelle 6: Überlebensrate, SSR und IR nach Vitrifikation und Lagerung von Tag-3-Embryonen unter der Verwendung des HSV.

	Tag-3-Embryonen
N° Vitrifikation-Auftau-Zyklen	14
N° vitrifizierter Tag-3-Embryonen	52
N° aufgetauter Tag-3-Embryonen	38
Überleben nach Auftauen	95 % (36)
Entwicklung zum Morula Stadium	69 % (25)
N° Morulae transferiert (mean)	25 (1,8)
N° Embryotransfers	14
Schwangerschaften	5 (36 %)
Schwangerschaftsrate pro Vitrif. Zyklus	36 % (5)
N° fötaler Herzschlag	6
% Implantation	24 %

- Verwendung eines Trägers, der eine ultraschnelle Abkühlung erlaubt
- Anlegen einer Öffnung in der Zona pellucida (ZP) vor der Vitrifikation
- Aussetzen der Blastozysten für eine längere Zeitspanne in den Kryoprotektiva
- Vitrifikation von frühen Blastozysten oder gar Morulae am Tag 4

Öffnung der ZP vor der Vitrifikation

Wir konnten feststellen, dass nach einem spontanen oder herbeigeführten Öffnen der ZP die Überlebensrate nach Tiefgerieren knapp 80 % beträgt [45]. Wir haben 2 Hypothesen aufgestellt, um diese positive Wirkung zu erklären. Man kann, je nach Öffnung der ZP, unterschiedliche Reaktionen des Embryos auf die Kryoprotektiva feststellen. Wenn die ZP offen ist, ziehen sich die Embryonen bei Anwesenheit der Kryoprotektiva zusammen. Im Gegensatz dazu erfährt diese bei intakter ZP einen Druck, der von den Trophoblastzellen im Laufe der Ausdehnung des Blastozoels ausgeübt wird. Dies ruft die Bildung von Haltemarkern („breakpoints“) der Trophoblastzellen in der ZP hervor, was dazu führt, dass die Blastozysten sich in Anwesenheit der Kryoprotektiva schwer zusammenziehen.

Als zweite Hypothese wird angenommen, dass im Laufe der kurzen Exposition des Embryos in der glasartigen

Mischung (VS2) die Öffnung der ZP den Eintritt von hochmolekularen Kryoprotektiva wie Ficoll in den perivitellinen Raum zulässt und so die Bildung einer glasähnlichen Hülle um die Zellen des Trophoblasten fördert.

Diese Beobachtungen sind hervorzuheben, da die Tatsache, dass man die Blastozysten mit offener ZP kryokonservieren kann, eine Lösung für diejenigen Zentren darstellt, die Präimplantationsdiagnostik durchführen. In der Tat wurde gezeigt, dass das Überleben von Embryonen nach einer Embryobiopsie am Tag 3 sehr gering ist. Die Lösung des Problems könnte darin bestehen, die biopsierten Embryonen bis zum Tag 5 in Kultur zu belassen und sie erst dann zu vitrifizieren.

Konklusion und Perspektiven

Zwischen 1996 und 2003 hat sich die Technik der Vitrifikation weiterentwickelt. Die Verwendung von ultraschnellen Techniken sowie das Absaugen des Blastozoels haben es ermöglicht, die Ergebnisse deutlich zu verbessern. Dank des neuen Forschungsstandes kann davon ausgegangen werden, dass sich die Methoden der Vitrifikation weiter verbessern werden.

Kann man sich die Vitrifikation als Alternative zum langsamen Tiefgerieren vorstellen? Es ist möglich,

dass sich in Zukunft die Vitrifikation als vorteilhaftere Technik zur Kryokonservierung von Embryonen durchsetzt.

Dennoch muss die Methodik an die jeweiligen embryonalen Entwicklungsstadien angepasst werden, auch trotz der vielversprechenden Ergebnisse, die bis dato erzielt wurden. In der Tat muss danach getrachtet werden, für das jeweilige Entwicklungsstadium von Embryonen, das sich unter anderem durch das Verhältnis Oberfläche/Volumen und spezifische Durchlässigkeit der Zellmembran charakterisiert, die Balance zu finden zwischen minimalem Eindringen der Kryoprotektiva in die Zellen und der Abkühl- und Wiedererwärmungsgeschwindigkeit, die eine größtmögliche Überlebensrate ohne toxische Wirkungen zulassen. In Anbetracht der stets möglichen Risiken einer Kontamination wurden kürzlich Alternativen der Trägersysteme entwickelt, die den direkten Kontakt mit LN2 verhindern.

Unsere Technik der aseptischen Vitrifikation besteht darin, die Embryonen auf Minipailletten, die versiegelt und daher hermetisch abgedichtet sind, abzukühlen und aufzubewahren.

Unsere ersten Ergebnisse nach dem Auftauen und Transfer dieser so konservierten Embryonen zeigen, dass es möglich ist, den Bedingungen der Asepsis ohne Einbußen der Qualität nachkommen zu können.

Relevanz für die Praxis

Zwei Verfahren zur Kryokonservierung von Oozyten und Embryonen sind bekannt: langsames Tiefgefrieren und Vitrifikation.

Mitte der 1990er-Jahre wurde die Vitrifikation in die Reproduktionsmedizin eingeführt und gewinnt immer mehr an Bedeutung durch Verbesserungen der Technik.

Der Nachteil der konventionellen Vitrifikation ist, dass sie nicht aseptisch durchgeführt werden kann.

Aufgrund der neuen EU-Direktiven (EU/2004/23 EC) wurde schon vor Jahren ein aseptischer Kit für die Vitrifikation entwickelt, jedoch mit unbefriedigenden Resultaten.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es heute möglich ist, aseptisch zu vitrifizieren, ohne Einbußen der Qualität.

Literatur:

- Whittingham D, Leibo S, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 1972; 178: 411–4.
- Rall W, Fahy G. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573.
- Scheffen B, Vanderzwalmen P, Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-letters* 1986; 7: 260–9.
- Massip A, Vanderzwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-letters* 1986; 7: 270–3.
- Vanderzwalmen P, Delval A, Chatziparasidou A, Bertin G, Ectors F, Lejeune B, Nijs M, Prapas N, Prapas Y, Vandamme B, Schoysman R. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. *Hum Reprod* 1997; 12 (Suppl 1): 98.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059–69.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999; 72: 1073–8.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to avoid cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53–8.
- Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ. Blastocyst development after vitrification of multipronucleate zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reprod BioMed Online* 2002; 4: 146–50.
- Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod* 2004; 19: 300–5.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, van Roosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, Zech H. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 2003; 18: 1504–511.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003; 18: 384–91.
- Kuwayama M, Vajta G, Leda 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.
- Isachenko V, Katkov I, Yakovenko S, Lugat AG, Ulug M, Arvas A, Isachenko E. Vitrification of hu-

- man laser treated blastocysts within cut standard straws (CSS): Novel aseptic packaging and reduced concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology* 2007; 54: 305–9.
- Vanderzwalmen P, Lejeune B, Stecher A, Zech N, Delval A, Zech H. Survival of day 3 and day 5 embryos following vitrification in aseptic and non-aseptic conditions: a prospective randomized analysis. *Fertil Steril* 2005; 84 (Suppl 1): S175.
- Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449–54.
- Liebermann J, Dieltl J, Vanderzwalmen P, Tucker M. Recent developments in human oocytes, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 623–33.
- Shaw J, Jones G. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Updates* 2003; 9: 583–605.
- Todorow SJ, Siebzehnrübl ER, Koch R, Wildt L, Lang N. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. I. Mouse and hamster. *Hum Reprod* 1989; 4: 805–11.
- Todorow SJ, Siebzehnrübl ER, Spitzer M, Koch R, Wildt L, Lang N. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. II. Human. *Hum Reprod* 1989; 4: 812–6.
- Kuleshova L, Shaw J, Trounson A. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 2001; 43: 21–31.
- Vanderzwalmen P, Gauris B, Ectors FJ, Massip A, Ectors F. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology* 1988; 30: 1177–83.
- Vansteenbrugge A, Vanderzwalmen P; Vaster-saegher C, Pauwels P. Does high concentration of cryoprotectant during vitrification of blastocysts present any risks? *Hum Reprod* 2007; 22 (Suppl 1): i152, P387.
- Kasai M, Nishimori M, Zhu S, Sakurai T, Machida T. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. *Biol Reprod* 1992; 47: 1134–9.
- Klug S, Merker H, Jackh R. Effects of ethylene glycol and metabolites on in vitro development of rat embryos during organogenesis. *Toxicology in vitro* 2001; 15: 635–42.
- Vajta G, Nagy Z. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod BioMed Online* 2006; 7: 623–33.
- Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 2005; 84: 88–92.

- Walker D. Vitrification versus programmable rate freezing of late stage murine embryos: a randomised comparison prior to application in clinical IVF. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 558–68.
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama K, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 53–7.
- Liebermann J, Tucker M. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006; 86: 20–6.
- Rama Raju G, Haranath G, Krishna K, Prakash G, Madan K. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 434–7.
- Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, Park EM, Yoon SH, Chung KS, Lim JH. Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod* 2000; 15: 1787–90.
- Jelinkova L, Selman HA, Arav A, Strehler E, Reeka N, Sterzik K. Twin pregnancy after vitrification of 2 pronuclei human embryos. *Fertil Steril* 2002; 77: 412–4.
- Selman HA, El-Danasouri I. Pregnancies derived from vitrified human zygotes. *Fertil Steril* 2002; 77: 422–3.
- Al Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 288–93.
- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro P, An T, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 2874–9.
- El-Danasouri I, Selman HA. Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 2001; 76: 400–2.
- Gottumukkala A, Geddam B, Kota K, Gomedhikam P, Kalagara M. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 434–7.
- Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod* 2004; 19: 300–5.
- Mukaida T, Takahashi K, Goto T, Oka C. Ultra-rapid vitrification using cryoloop technique for human blastocyst cryopreservation. *Fertil Steril* 2005; 84 (Suppl.) VP2, S476.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, Bollen N, Zech H, Mukaida T, Takahashi K, Schoysman R. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 2002; 17: 744–51.
- Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoel. *Hum Reprod* 2003; 18: 137–9.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoel collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004; 19: 2884–8.
- Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoel using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2006; 21: 3246–52.
- Zech N, Lejeune B, Zech H, Vanderzwalmen P. Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 355–61.

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](#)