

Embryo en eicel cryopreservatie:

Slow freezing versus vitrificatie

Stafvergadering 27 mei 2014
Elke Klerkx en Eva Creemers
Labo IVF

Methodes

Slow freezing

Gecontroleerd en traag afkoelen (tot -196°C)

Vitrificatie

Ultrasnel afkoelen en overgaan tot solidificatie van een oplossing door zeer hoge viscositeit en bij lage temperatuur zonder vorming van ijskristallen

Wat is cryopreservatie

Wat gebeurt er bij het invriezen van eicellen en embryo's?

-Water kristalliseert en vormt ijs

- Zoutconcentratie stijgt

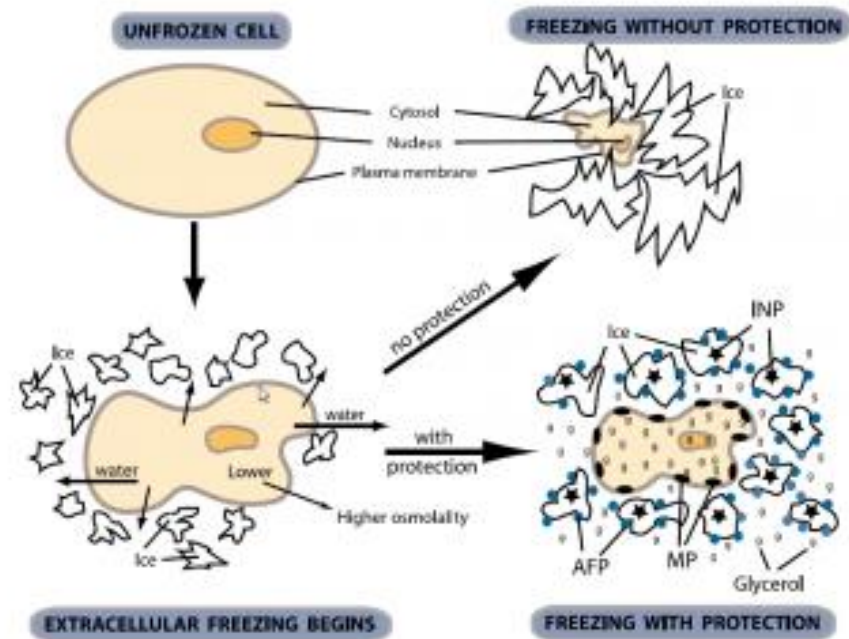
-> schade aan de cellen

Dehydratatie van cellen is afhankelijk van de permeabiliteit van de cel membraan.

Hoe vroeger het stadium van de eicel of het embryo, hoe minder permeabel.

onrijpe eicel versus M II

4-cellig embryo versus blastocyst



Cryoprotectanten

- Intracellulaire/membraan permeabele cryoprotectant

propyleen of ethyleen glycol (PG)

DMSO

glycerol (G)

Maakt een osmotische gradiënt en neemt de plaats van intracellulair water in

- Extracellulaire/ niet-membraan permeabele cryoprotectant

sucrose

glucose

ficoll

(lipo)proteinen

Verhoogt de extracellulaire osmolaliteit en geeft dehydratatie van de cellen
Invriesmedium is een mix van permeabele en niet-permeabele CPA

Slow freezing

Gecontroleerd en traag afkoelen van het embryo (tot -196°C)

- ✓ Embryos/eicellen: lage concentratie propyleenglycol (1,5M)+sucrose of eiwit
- ✓ Blastocyst: glycerol

Dehydrateren van het embryo met een invriesoplossing met toenemende hoeveelheid permeabel CPA (PG):

Protocol Freeze Cleave Vitrolife MOPS oplossing met propyleenglycol en sucrose

- 10 min oplossing 1 (KT)
- 10 min oplossing 2 (KT)

0.3ml CBSTM high security embryo straw (CryoBioSystem) – sealen van het rietje

Rapid thawing (30°C) en verwijdering van de cryoprotectans, rehydratatie door afnemende concentraties permeabel CPA

Slow freezing



VitrLife



Andere merken invriesmedium:

Cook
FertiCult
Origo
Irvine Scientific

Slow freezing

Slow-freeze toestel: Planer KRYO 360 1.7, T.S. Scientific, Perkasi, PA, USA

- ✓ Precooling tot 20°C
- ✓ 10 minuten equilibratie op 20°C
- ✓ Afkoelen tot -6°C (-2°C / minuut)
- ✓ 4 minuten equilibratie
- ✓ 'seeding' manueel (tussen -5°C en -8°C)
- ✓ 15 minuten equilibratie
- ✓ Afkoelen tot -30°C (-2°C / minuut)
dehydratatie van het embryo gaat tot -30°C
- ✓ Afkoelen tot -160°C (-10°C / minuut)
supercooling
- ✓ 10 minuten equilibratie
- ✓ Opslag in vloeibare stikstof (-196°C)



Vitrificatie

Ultrasnel afkoelen van het embryo en overgaan tot solidificatie van een oplossing door zeer hoge viscositeit en bij lage temperatuur zonder vorming van ijskristallen

Cleavage stage embryo



Blastocyst



Vitrificatie

Vitrimedium 1: PBS + MOPS + gentamycine + HSA

Vitrimedium 2: PBS + MOPS + gentamycine + HSA + ethyleenglycol + propanediol

Vitrimedium 3: PBS + MOPS + gentamycine + HSA + ethyleenglycol + propanediol + ficoll

Protocol:

-5-20 min vitrimedium 1

-2 min vitrimedium 2

op 1'30" druppel 20 μ l op deksel

op 1'50" embryo in druppel vitrimedium 3

-30 seconden vitrimedium 3

rietje in stikstof, verwijder metaal

laad de Rapid-i carrier binnen 30 sec – sealen van het rietje

Literatuur: Vitrificatie eicellen

Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J. et al. Prospective randomised comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. Fertil steril 2010; 94: 2088-2095

230 patienten tussen 2005 en 2009, 587 eicellen

Resultaten:

- Overlevingskans hoger in vitrificatie groep (75% versus 65%, $p=0.01$)
- Bevruchtungskans hoger in vitrificatie groep (77% versus 67%, $p= 0.03$)
- Doorgaande zwangerschapskans hoger in vitrificatie groep (38% versus 13%, $p= 0.02$)

Literatuur: Vitrificatie eicellen

Molinari E, Revelli A, Racca C, et al. Slow freezing-induced changes of birefringent structures in human oocytes are related to responsiveness to ovulation induction. Reprod Biomed Online 2010; 20:619-624

De binnenste laag van de zona pellucida verliest zijn structurele organisatie en wordt dikker door slow freezing geïnduceerde schade. De meiotische spindle kan beschadigd zijn.

Magli MC, Lappi M, Ferraretti AP et al. Impact of oocyte cryopreservation on embryo development. Fertil Steril 2010; 93: 510-516

Vergelijkende studie tussen slow-freeze en vitrificatie van eicellen

Resultaten:

Slow-freezing heeft een negatieve impact op eicelpotentiaal:

- bevruchtungskans lager (83% versus 73%)
- Transfer per gestarte cyclus lager (93% versus 79%)

Literatuur: Vitrificatie embryo

[Hum Reprod.](#) 2008 Sep;23(9):1976-82. doi: 10.1093/humrep/den222. Epub 2008 Jun 10.

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.

Balaban B1, [Urman B](#), Ata B, Isiklar A, Larman MG, [Hamilton R](#), [Gardner DK](#).

METHODS:

[A total](#) of 466 [Day 3 embryos](#), donated [with consent](#), underwent cryopreservation by either slow freezing in straws or vitrification using the cryoloop. The vitrification procedure did not include dimethyl sulfoxide, but rather employed ethylene glycol and 1,2-propanediol as the cryoprotectants. Survival, embryonic metabolism and subsequent development to the blastocyst were used to determine the efficacy of the two procedures.

RESULTS:

Significantly, more embryos survived the vitrification procedure (222/234, 94.8%) than slow freezing (206/232, 88.7%; $P < 0.05$). Consistent with this observation, pyruvate uptake was significantly greater in the vitrification group, reflecting a higher metabolic rate. Development to the blastocyst was also higher following vitrification (134/222, 60.3%) than following freezing (106/206, 49.5%; $P < 0.05$). In a separate cohort of 73 patients who had their supernumerary embryos cryopreserved with vitrification, the resulting implantation rate and clinical pregnancy rate were 30 and 49%, respectively.

CONCLUSIONS:

Analysis of metabolism revealed that vitrification had less impact on the metabolic rate of the embryo than freezing, which was reflected in higher survival rate and subsequent development in vitro. Excellent pregnancy outcomes followed the warming and transfer of vitrified cleavage-stage embryos. These data provide further evidence that vitrification imparts less trauma to cells and is, therefore, a more effective means of cryopreserving the human embryo than conventional slow freezing.

Literatuur: Vitrificatie embryo

Review Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatz BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which is better? Curr Opin Obstet Gynecol 2009; 92: 270-274.

Vitrificatie is niet geassocieerd met een hogere zwangerschapskans dan slow freezing in ervaren labo's maar de overlevingskans na vitrificatie is hoger in cleavage stage embryo's alsook in blastocysten waardoor er minder embryo's verloren gaan tijdens de procedure.

Keskintep L, Sher G, Machnicka A, et al. Vitrification of human embryos subjected to blastomere biopsy for preimplantation genetic screening produced higher survival and pregnancy rates than slow freezing. J Assist Reprod Genet 2009; 26: 629-635

Overleving beter na vitrificatie (95% versus 71%)

Zwangerschapskans hoger na vitrificatie (37% versus 23%)

Intermediaire resultaten

	Slow Freeze	Vitrificatie
Overleving	57,0% (114/200)	68,0% (65/95)
Embryo Transfer	86,3% (82/95)	91,7% (44/48)
HCG+	20,7%(17/82)	29,5% (13/44)

Januari – april 2014

Vitrificatie versus slow freeze

Voordelen vitrificatie:

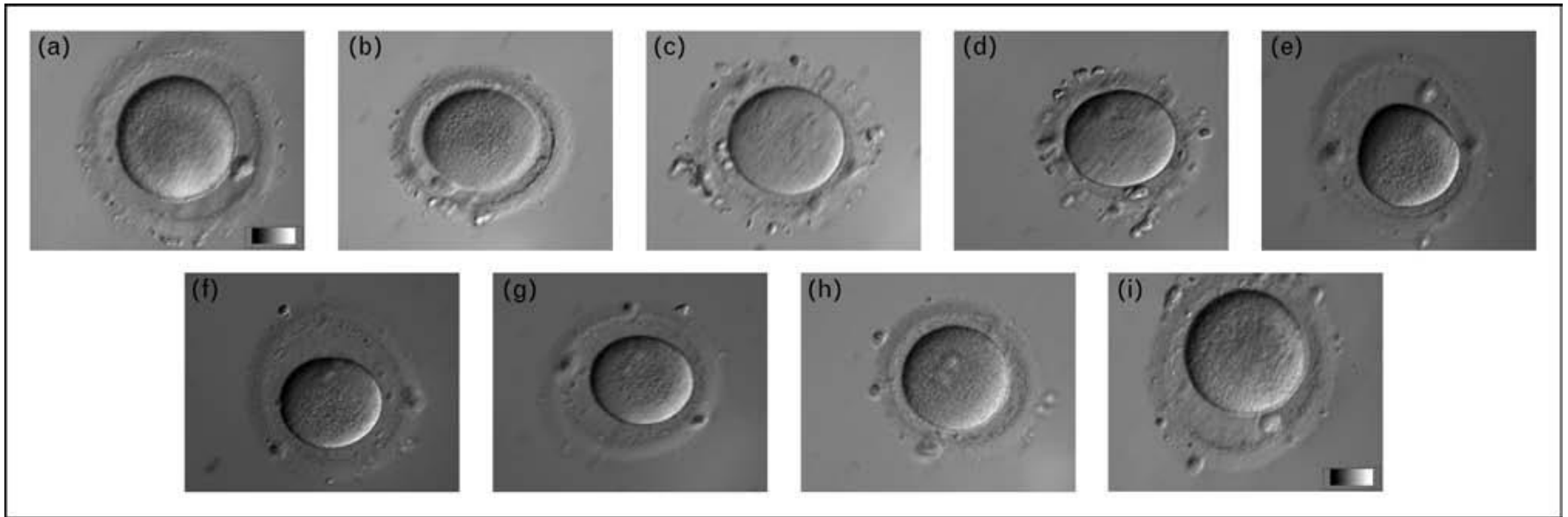
- Minder cellulaire schade
- Snelle invriezing per rietje (20min)
- Betere overlevingskans (literatuur + eerste resultaten ZOL)
- Hoger zwangerschapspercentage ?

Nadelen vitrificatie:

- Tijdrovend indien meerdere patienten en veel embryos (20min per patient)
- Duurder (schatting per patient: 73 euro (4 embryos/2 rietjes) versus 25 euro)
- Vraagt goede kennis en oefening om topresultaten te behalen

Slow Freeze

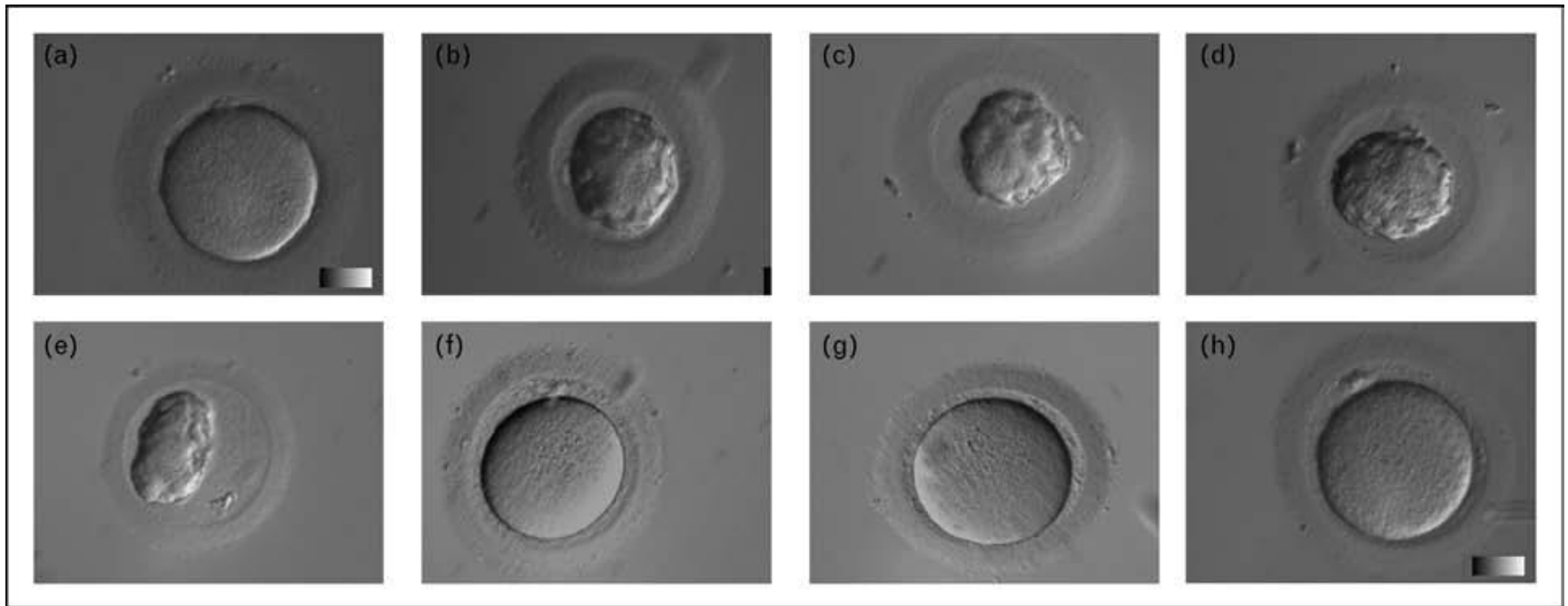
Slow Freeze = gecontroleerd en traag afkoelen (tot -196°C)



(a) Oocyte after decumulation; (b) Oocyte in FS1; (c) Oocyte in FS2; (d) Oocyte in FS3; (e) Oocyte in TS1; (f) Oocyte in TS2; (g) Oocyte in TS3; (h) Oocyte in TS4; (i) Oocyte after cryopreservation process.

Vitrificatie

Ultrasnel afkoelen en overgaan tot solidificatie van een oplossing door zeer hoge viscositeit en bij lage temperatuur zonder vorming van ijskristallen



(a) Oocyte after decumulation; (b) Oocyte in ES1; (c) Oocyte in ES2; (d) Oocyte in ES3; (e) Oocyte in DS; (f) Oocyte in WS1; (g) Oocyte in WS2; (h) Oocyte after cryopreservation process.

Veiligheid

Veel vitrificatie systemen beschikbaar op de markt zijn open systemen waarbij de eicellen of embryo's direct in aanraking komen met vloeibare stikstof waardoor er een risico is op cross-contaminatie. Oplossing:

- Gesloten vitrificatie systeem
- Opslag van gevitriceerd materiaal in de gasfase van vloeibare stikstof
- Steriliseren van vloeibare stikstof

Gosden. Cryopreservation. Fertil Steril 2011.

