

Adviescommissie Vitrificatie (NVOG / KLEM)Leden

Dr. Sjoerd Repping (voorzitter)	klinisch embryoloog	AMC
Dr. Dagmar Gutknecht	klinisch embryoloog	UMC Utrecht
Dr. Nils Lambalk	gynaecoloog	VUmc

Introductie

Voor het invriezen van humane embryo's die overblijven na embryo plaatsing bij reguliere IVF/ICSI behandelingen, wordt in de meeste centra in de wereld (waaronder alle centra in Nederland) gebruikt gemaakt van "slow-cooling" methoden. In de laatste jaren is in een aantal centra in het buitenland "vitricatie" geïntroduceerd als nieuwe methode voor cryopreservatie van embryo's. Tevens is beschreven dat vitricatie ook succesvol is voor de cryopreservatie van humane eicellen, hetgeen niet mogelijk geacht wordt middels slow-cooling. Cryopreservatie van eicellen kan plaatsvinden bij het tijdens de IVF/ICSI behandeling ontbreken van spermatozoa, of voorafgaand aan een voor de ovaria mogelijk schadelijke behandeling (bv. chemo- of radiotherapie). In een aantal Nederlandse centra speelt de vraag of vitricatie van embryo's en/of eicellen klinisch toegepast moet/mag worden in Nederland.

Vraagstelling

Wat is het standpunt van de vereniging voor Klinisch Embryologen (KLEM) en de Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie (NVOG) ten aanzien van de vitricatie van humane eicellen en embryo's?

Uitgangspunt is dat iedere nieuwe techniek in de voortplantingsgeneeskunde in principe in drie categorieën te verdelen valt:

- (1) te experimenteel (mag vooralsnog niet klinisch toegepast worden),
- (2) nog onvoldoende bewijs voor "standaard" gebruik (het mag klinisch worden uitgevoerd in onderzoeksverband waarbij de effectiviteit en veiligheid bepaald dienen te worden),
- (3) voldoende bewijs voorhande omtrent effectiviteit en veiligheid (kan als standaard in de klinische praktijk toegepast worden).

Verschillen slow-cooling en vitricatie

In tabel 1 zijn de verschillen en overeenkomsten weergegeven tussen slow-cooling en vitricatie. Vanuit theoretisch oogpunt leidt vitricatie tot minder schade aan het embryo/de eicel doordat mechanische stress, chilling injury en osmotische schade door ijskristalvorming wordt tegengegaan. Bij vitricatie wordt initieel gestart met een hogere concentratie cryoprotectant maar de incubatieduur bij potentieel schadelijke temperatuursomstandigheden is aanzienlijk korter. De gebruikte chemicaliën zijn, behoudens hun concentratie, bij slow-cooling en vitricatie identiek. Op basis van theorie is er dus feitelijk gezien nagenoeg geen verschil tussen slow-cooling en vitricatie

Dierexperimenteel onderzoek (Pre-klinische studies)

Voor alle diersoorten waarbij (in grote getallen) in vitro reproductie plaatsvindt zijn vitrificatie protocollen ontwikkeld. Dit geldt voor het rund, het varken en de muis. In vergelijking met de slow cooling protocollen leidt vitrificatie bij deze diersoorten tot een verbeterde overleving en implantatie van embryo's (Vajta 2006; Huang et al., 2007), vooral van embryo's die zeer gevoelig zijn voor cryo schade, zoals die van het varken (Cameron et al. 2006).

Grote embryobanken voor (transgene) muizenstammen zoals de Jackson Laboratories en het Hubrecht Institute for Developmental Biology and Stem Cell Research gebruiken voornamelijk vitrificatie voor embryobanking (persoonlijke communicatie).

Bij de muis zijn er uiteenlopende studies naar de veiligheid van eicel- en embryo vitrificatie uitgevoerd:

Eicellen

Het metabolisme, de expressie van eiwitten en de integriteit van de meiotische spindle van oöcyten laten significant minder afwijkingen zien na vitrificatie dan na slow cooling (Gardner et al., 2007). In veel gevallen wijken de parameters na vitrificatie nauwelijks af van de waarden van niet gecryopreserveerde eicellen. Alle gegevens wijzen erop dat vitrificatie de schade aan eicellen sterk beperkt en de effectiviteit van eicel cryopreservatie significant verbetert.

Embryo's

In embryo's is er slechts beperkt onderzoek gedaan naar het effect van vitrificatie op de fysiologie van het embryo. De expressie van stress gerelateerde genen is tijdelijk verhoogd in gevitricificeerde zygoten van de muis, toch normaliseert de expressie binnen 10 uur na ontdooien. Ontdooide gevitricificeerde 8-cell embryo's laten 3 uur en 10 uur na ontdooien geen verhoogde expressie van stress gerelateerde genen zien (Boonkusol et al. 2006).

Sheehan et al. (2006) onderzocht het effect van herhaaldelijk invriezen en ontdooien op het ontwikkelingspotentieel van muizen embryo's. Zij vonden dat het herhaald invriezen van embryo's alleen onder gebruikmaking van vitrificatie mogelijk is: 99% van de embryo's overleefde drie keer vitrificeren en ontwikkelde vervolgens verder. In tegenstelling overleefde minder dan 2% van de embryo's drie keer slow cooling. De terugplaatsing van herhaaldelijk gevitricificeerde embryo's leidde tot een live birth rate van 30%. Ondanks dat dit significant lager is dan na de terugplaatsing van niet ingevroren embryo's (50% live birth rate) laat deze studie zien dat tijdens vitrificatie de cryo schade significant vermindert ten opzichte van slow cooling.

Samenvattend laat het onderzoek naar het effect van vitrificatie op muis-oöcyten en -embryo's een significante reductie van cryo schade t.o.v. slow freezing zien en toont het aan dat vitrificatie de integriteit en vitaliteit van muis eicellen en embryo's betrouwbaar preserveert.

Klinische studies

Eicellen

In de literatuur zijn data beschikbaar over 3896 eicellen die via slow-cooling zijn ingevroren en van 1547 eicellen die via vitrificatie zijn ingevroren. De overleving bedroeg respectievelijk 64% en 82% (tabel 2a en 2b). Uit een meta-analyse van cohort studies en niet-gerandomiseerde vergelijkende

studies blijkt dat vitrificatie leidt tot meer klinische zwangerschappen en live births per transfer (tabel 3). Er zijn echter geen gerandomiseerde studies gepubliceerd die slow-cooling met vitrificatie vergelijken waardoor niet met zekerheid te zeggen is of vitrificatie daadwerkelijk leidt tot betere zwangerschapsresultaten.

Embryo's

Er is in de literatuur meer data voorhanden mbt vitrificatie van embryo's in verschillende stadia van ontwikkeling. In totaal zijn de resultaten na vitrificatie beschreven van 5881 2-celligen, 897 4-celligen, 127 8-celligen en 6952 blastocysten. Het gaat echter wederom in alle gevallen om niet-gerandomiseerd onderzoek waardoor harde conclusies over effectiviteit niet te trekken zijn. Eén studie beschrijft betere overleving en ontwikkeling tot het blastocyste stadium van zowel 2-celligen als 4-celligen (tabel 4 en 5, Kuwayama et al., 2005). Een andere studie beschrijft hetzelfde voor 8-celligen (tabel 6, Rama Raju, 2005). Twee van de drie studies over blastocysten laten betere overlevingskansen zien na vitrificatie. Eén studie laat tevens een verhoging van het zwangerschapspercentage per ET zien (tabel 7).

Follow-up van kinderen

Kinderen na slow cooling

Hoewel de follow-up data van cryopreservatie beperkt is, zijn er vooralsnog geen aanwijzingen dat slow cooling van embryo's leidt tot een verhoogd risico op negatieve zwangerschapsuitkomst en aangeboren afwijkingen. Voor de langere termijn is de follow up periode nu ongeveer 10-12 jaar en er zijn vooralsnog geen aanwijzingen dat de ontwikkeling van dergelijk kinderen nadelig verloopt (Bonduelle, persoonlijke communicatie).

Kinderen na eicel vitrificatie

Met betrekking tot vitrificatie zijn maar zeer beperkt data beschikbaar. Tabel 8 geeft een overzicht van publicaties die rapporteren over levend geboren kinderen na eicel vitrificatie. Totaal zijn thans 28 gerapporteerde levend geboren kinderen welke allemaal a terme waren. Alle kinderen zijn zonder afwijkingen geboren. Er bevindt zich slechts één tweeling in deze serie.

Kinderen na embryo vitrificatie

Tabel 9 geeft een overzicht van publicaties die rapporteren over levend geboren kinderen na vitrificatie van embryo's. Totaal zijn er 151 gerapporteerde levend geboren kinderen. Gemiddeld werd ca 20% prematuur geboren. Dit betrof in alle gevallen een meerling zwangerschap. Eén kind van een tweeling werd geboren met het syndroom van Treacher-Collins terwijl het andere kind van deze tweeling een open ductus Botalli had. De overige kinderen van deze serie werden gezond geboren. Over langere termijn effecten zijn momenteel nog geen rapportages voor handen.

Beschouwing

In theorie is vitrificatie niet wezenlijk anders dan slow cooling. Uit dierexperimenteel onderzoek blijkt dat vitrificatie van eicellen en embryo's veilig en effectief is. Vitrificatie van eicellen en embryo's wordt dan ook veelvuldig toegepast bij dieren (bv. in transgene muis faciliteiten). Uit klinische studies bij de mens lijkt vitrificatie van oöcyten en embryo's een effectieve methode te zijn hoewel goed opgezette gerandomiseerde studies ontbreken. Ook de follow-up van kinderen geboren na vitrificatie van eicellen of embryo's lijkt geruststellend hoewel het aantal kinderen dat bestudeerd is erg klein is. De methode wordt nog te kort toegepast om iets te kunnen zeggen over lange termijn effecten op het nageslacht.

Alles in ogenschouw nemend adviseert de commissie om vitrificatie van eicellen en embryo's in Nederland toe te staan waarbij er een gedegen follow up moet zijn van kinderen die geboren worden na vitrificatie. Daarnaast adviseert de commissie om in een gerandomiseerde studie de effectiviteit van vitrificatie van embryo's ten opzichte van slow-cooling van embryo's te onderzoeken. Omdat er in Nederland voor de vitrificatie van eicellen op dit moment geen alternatief bestaat en vitrificatie van eicellen voorsnog op beperkte schaal plaats zal vinden, kan hier volstaan worden met een cohort studie met follow up van de geboren kinderen.

Referenties

- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(1):72-79.
- Azambuja R, Badalotti M, Teloken C, Michelon J, Petracco A. Successful birth after injection of frozen human oocytes with frozen epididymal spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2005 Oct;11(4):449-51.
- Boldt J, Cline D, McLaughlin D. Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum Reprod*. 2003 Jun;18(6):1250-5.
- Borini A, Bonu MA, Coticchio G, Bianchi V, Cattoli M, Flamigni C. Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2004 Sep;82(3):601-5.
- Borini A, Lagalla C, Bonu MA, Bianchi V, Flamigni C, Coticchio G. Cumulative pregnancy rates resulting from the use of fresh and frozen oocytes: 7 years' experience. *Reprod Biomed Online*. 2006 Apr;12(4):481-6.
- Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, Gorhony B, Kitiyanant Y, Dinnyes A. Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. 2006 Jun;73(6):700-8.
- Cameron RD, Beebe LF, Blackshaw AW. Cryopreservation and transfer of pig embryos. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2006;62:277-91.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY, Yang YS. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod*. 2005 Jul;20(7):1975-80.
- Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev*. 2004 Dec;50(6):685-96.
- Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jove I, Martin P, Perez N, Arnedo N, Marina S. The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Hum Reprod*. 2003 Jul;18(7):1417-21.
- Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007 Jan 1;67(1):64-72.
- Huang JY, Chen HY, Tan SL, Chian RC. Effect of choline-supplemented sodium-depleted slow freezing versus vitrification on mouse oocyte meiotic spindles and chromosome abnormalities. *Fertil Steril*. 2007 Oct;88(4 Suppl):1093-100.
- Jain A, Robins JC, Williams DB, Thomas MA. The effect of multiple cycles in oocyte donors. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 May;192(5):1382-4.
- Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 80(1):223-224.
- Kim DH, Park HS, Kim SW, Hwang IS, Yang BC, Im GS, Chung HJ, Seong HW, Moon SJ, Yang BS. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. *J Reprod Dev*. 2007 Aug;53(4):843-51.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999; 14(12):3077-3079.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(3):300-308.
- Kyono K, Fuchinoue K, Yagi A, Nakajo Y, Yamashita A, Kumagai S. Successful pregnancy and delivery after transfer of a single blastocyst derived from a vitrified mature human oocyte. *Fertil Steril* 2005; 84(4):1017.
- Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod*. 2006 Feb;21(2):370-5.

Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril*. 2006 Jul;86(1):20-6.

Li XH, Chen SU, Zhang X, Tang M, Kui YR, Wu X, Wang S, Guo YL. 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 Dec;20(12):3390-4.

Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril*. 2006 Jan;85(1):108-11.

Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 2001; 76(3):618-620.

Okimura T, Kato K, Zhan Q, Kuwayama M, Zhang J, Kato O. Update on Clinical Efficiency of the Vitrification Method for Human Oocytes in an In Vitro Fertilization Program. *Fertility and Sterility* 2005; 84(Supplement 1):S174.

Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006 Jul;86(1):70-80.

Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Hum Reprod*. 2002 Dec;17(12):3149-52.

Rama Raju GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online*. 2005 Oct;11(4):434-7.

Sheehan CB, Lane M, Gardner DK. The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum Reprod*. 2006 Nov;21(11):2978-84.

Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online*. 2005 Jul;11(1):53-7.

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(1):88-92.

Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2006 Jun;12(6):779-96.

Yokota Y, Sato S, Yokota M, Yokota H, Araki Y. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil Steril* 2001; 75(5):1027-1029.

Yoon TK, Kim TJ, Park SE et al. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2003; 79(6):1323-1326.

TABELLEN

Tabel 1. Verschillen en overeenkomsten slow-cooling en vitrificatie

	Slow-cooling	Vitrificatie
Cryoprotectant	DMSO / Ethyleen glycol / Propaandiol	DMSO / Ethyleen glycol
Concentratie cryoprotectant initieel	Laag (1.5 M)	Hoog (2-5 M)
Incubatieduur	Lang (~3-5 uur)	Extreem kort (enkele minuten)
Afkoelingssnelheid	Langzaam (-0.3...-1 °C / min)	Ultra snel (-20.000 °C / min)
Osmotische stress	Ja	Beperkt
Toxische stress	Ja	Ja
Chilling injury	Ja	Zeer beperkt
Mechanische stress (ijskristal vorming)	Ja	Nee
Apparatuur nodig	Ja	Nee
Drager	Ampul / rietje ("gesloten")	EM grid / Cryoloop / CryoTip / Cryotop (semi gesloten) / High security Straw ("gesloten")
Direct contact met LN2	Nee	Ja / (Nee i.g.v. high security straw)

Tabel 2a. Eicellen slow-cooling (overleving)

publicatie	aantal ontdood	aantal overleefd	% overleefd
Winslow et al. 2001	324	222	68
Quintans et al. 2002	109	58	63
Boldt et al. 2003	90	67	74
Fosas et al. 2003	88	79	90
Borini et al. 2004	737	273	37
Jain et al. 2005	56	33	59
Azambuja et al. 2005	276	172	62
Chen et al. 2005	159	119	75
Borini et al. 2006	927	687	74
Levi Setti et al. 2006	1087	760	70
Li et al. 2005	43	38	88
totaal	3896	2508	64

Tabel 2b. Eicellen vitrificatie (overleving)

publicatie	aantal verwarmd	aantal overleefd	% overleefd
Kuleshova et al. 1999	17	11	65
Yoon et al. 2003	474	325	69
Katayama et al. 2003	46	43	94
Chian et al. 2005	180	169	94
Kim et al. 2005	233	165	71
Ruvalcaba et al. 2005	60	46	77
Kuwayama et al. 2005	64	58	91
Lucena et al. 2006	143	120	89
Antinori et al. 2007	330	328	99
totaal	1547	1265	82

Tabel 3. Meta-analyse slow-cooling vs. vitrificatie eicellen
(cohort studies / niet gerandomiseerde studies)

	slow cooling	vitrificatie
% fertilisatie (n)	61 (2217)	74 (859)
% klinische zwangerschappen per verwarmde eicel (n)	4,3 (2217)	4,5 (1354)
% klinische zwangerschappen per transfer (n)	27 (351)	45 (134)
% live birth per transfer (n)	22 (351)	37 (134)

Oktay et al. 2006 Fertil.Steril.

Tabel 4. Vitrificatie van 2-celligen (niet-gerandomiseerd vergelijkend)

	slow cooling	vitrificatie
% overleefd/gecryopreserveerd (n)	89 (1944)	100 (5881)
% blastocyst/gecryopreserveerd (n)	41 (1944)	52 (5881)

Kuwayama et al. 2005

Tabel 5. Vitrificatie van 4-celligen (niet-gerandomiseerd vergelijkend)

	slow cooling	vitrificatie
% overleving (n)	91 (942)	98 (897)
% zwangerschappen per ET (n)	32 (536)	27 (504)

Kuwayama et al. 2005

Tabel 6. Vitrificatie 8-celligen (niet-gerandomiseerd vergelijkend)

	slow cooling	vitrificatie
% overleving (n)	60 (120)	95 (127)
% zwangerschappen per ET (n)	17 (23)	35 (40)

Rama Raju et al. 2005

Tabel 7. Vitrificatie blastocysten (niet-gerandomiseerd vergelijkend)

	% overleving (n)		% zwangerschappen per ET (n)	
	slow cooling	vitrificatie	slow cooling	vitrificatie
Kuwayama et al. 2005	84 (156)	90 (6328)	51 (98)	53 (4745)
Stehlik et al. 2005	86 (147)	100 (77)	18 (51)	43 (35)
Liebermann and Tucker 2006	92 (570)	96 (547)	53 (254)	52 (254)

Tabel 8 Levend geborenen na eicel vitrificatie

publicatie	Aantal Levend geborenen	% Fullterm
Kuleshova et al. 1999	1	100
Yoon et al. 2003	7	100
Katayama et al. 2003	2	100
Kyono et al. 2003	1	100
Okimura et al. 2005	7	100
Kuwayama et al. 2006	7	100
Antinori et al. 2007	3	100

Tabel 9 Levend geborenen na embryo vitrificatie

publicatie	Aantal Levend geborenen	% Fullterm
Yokota et al. 2001	1	100
Mukaida et al. 2001	3	67
Takahashi et al. 2005	147	81,5