

Reproduktionsbiologie

Die Vitrifikation von Eizellen, Furchungsstadien und Blastozysten

Eine Alternative zur konventionellen Kryokonservierung

Vitrification of oocytes, cleavage stage embryos, and blastocysts: an alternative to traditional cryopreservation

J. Liebermann(✉) · M. J. Tucker

J. Liebermann · M.J. Tucker
Shady Grove Fertiliy Reproductive Science Center, Rockville, MD, USA

M.J. Tucker
Georgia Reproductive Specialists, Atlanta, GA, USA

Dr. J. Liebermann
Shady Grove Fertiliy Reproductive Science Center, 15001 Shady Grove Road, Suite 400, Rockville, MD, 20850, USA

✉ E-mail: juergen.liebermann@integramed.com

Published online:

Zusammenfassung

Die Vitrifikation als eine eiskristallfreie Kryokonservierungstechnik resultiert aus der Kombination einer hohen Kühlrate und Konzentration an Kryoprotektivum. Sie stellt eine Alternative zu konventionellen Einfrierverfahren dar und hat aufgrund dessen bereits Einzug in den Bereich der assistierten Reproduktionsmedizin gehalten. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, das "universelle" Vitrifikationsprotokoll zu definieren. Eine ideale Strategie, dies umzusetzen, liegt in einer Erhöhung des Wärmetransfers und einer Reduktion der Konzentration des Kryoprotektivums. Die in ihrer Anwendung einfachen Vitrifikationsprotokolle erfordern jedoch für einen universellen klinischen Einsatz eine weitere Validierung durch umfangreichere, experimentelle Studien. Es ist deshalb die Aufgabe der Grundlagenwissenschaft, Ergebnisse bereits existierender Protokolle zu stabilisieren, um

damit ein Standardprotokoll etablieren zu können, welches für die Vitrifikation der unterschiedlichsten Entwicklungsstadien eingesetzt werden kann. Es ist zu wünschen, dass die offensichtlichen Vorteile der Vitrifikation erkannt und dadurch eine zügige technische Entwicklung und praktische Verbreitung im klinischen Bereich vorangebracht wird.

Abstract

The total elimination of ice crystal formation during vitrification is a result of high cooling rates associated with high concentrations of cryoprotectant. Consequently, vitrification protocols are starting to enter the mainstream of human assisted reproduction technologies (ART). To date, the "universal" vitrification protocol has yet to be defined. Increasing the speed of thermal conduction and decreasing the concentration of cryoprotectant represent an ideal strategy for cryopreservation and storage of cells by vitrification methods. The more convenient protocols for vitrification require, however, validation from more extensive experimental studies on human developmental stages (zygotes to blastocysts). Therefore, it is important for researchers to achieve greater consistency with the results from existing protocols and to establish a standardized vitrification protocol, which can be applied to the cryopreservation of oocytes and all developmental stages of preimplantation embryos. For the future, we predict that the obvious convenience of vitrification will considerably promote the development of this technique to higher levels of clinical efficiency and utilization.

Schlüsselwörter Vitrifikation - Kryokonservierung - Kühlrate - Eiskristallbildung - Flüssiger Stickstoff

Keywords Vitrification - Cryopreservation - Cooling rate - Ice crystal formation - Liquid nitrogen

Vor 30 Jahren wurden erstmalig durch die Arbeitsgruppe um Whittingham et al. [51] Studien zur Kryokonservierung von Mausembryonen unter Verwendung von "Controlled-slow-rate freezing"-Protokollen publiziert. Seit dieser Zeit etablierte sich die Kryokonservierung von Eizellen, Zygoten, Furchungsstadien und Blastozysten mehr und mehr zu einem integralen Teil vieler IVF-Programme. Die Kryokonservierung von biologischem Material umfasst 6 Teilschritte:

1. Inkubation in einem Kryoprotektivum mit dem Ziel einer Dehydrierung der Zelle und einer teilweisen Penetration des Kryoprotektivums in die Zelle,
2. dem eigentlichen Einfrierprozess (die Zelle wird vom physiologischen Temperaturbereich auf extrem niedrige heruntergekühlt),
3. die Lagerung des Gefrierortes in flüssigem Stickstoff (LN₂),
4. den Prozess des Auftauens,
5. die Verdünnung und Entfernung des Kryoprotektivums und Rehydrierung der Zelle und
6. das Zurückführen der Zelle in eine für sie physiologische Umgebung.

Seit der ersten Publikation einer Schwangerschaft nach Kryokonservierung, Auftauen und Transfer eines menschlichen Achtzellembryos [45] verwenden IVF-Zentren weltweit sehr erfolgreich die traditionellen "Slow-rate"-Einfrierprotokolle mit Äquilibration. Nach wie vor ist jedoch jede Kryokonservierung mit einem Risiko für die Zelle verbunden. Dies sind vor allem Kälteschäden, die nachfolgend aufgrund spontaner Formation von Eiskristallen auftreten können. Konventionelle "Slow-rate-freezing"-Protokolle benötigen für den kompletten Einfriervorgang z. B. für Eizellen 1-3 h und für Zygoten oder Embryonen ca. 90 min bis zu 5 h. Dies hat folgende Gründe:

1. um die Präzipitation von Wasser und die damit verbundene Formation von Eiskristallen kontrollieren zu können, werden Kühlraten von 0,3-0,5°C/min bis -30 und -40°C verwendet und
2. um den toxischen Effekt des Kryoprotektivums über diesen langen Inkubationszeitraum auf die Zelle so gering als eben nur möglich zu halten, sind Konzentrationen in einer Molarität von etwa 1,5 M erforderlich.

Einerseits erfolgt die kontrollierte Formation von Eiskristallen in "Slow-rate-freezing"-Protokollen in Abhängigkeit vom Gefriersystem in der Regel durch automatisches oder manuelles "Seeding" bei -5 bis -7°C. Dies induziert die "kontrollierte" Bildung von großen Eiskristallen, welche sich nur sehr langsam innerhalb der Lösung ausbreiten. Mit fortschreitender Eiskristallbildung kommt es zu einer Trennung des Wassers von den gelösten Stoffen. Die Folge ist, dass die Konzentration dieser gelösten Stoffe intrazellulär ansteigt, andererseits jedoch der Gefrierpunkt dadurch intrazellulär niedriger als extrazellulär liegt. Auf diese Art und Weise wird das Risiko, das Eiskristalle auch in intrazelluläre Kompartimente wandern, reduziert. Andererseits ergibt sich aus der Anwendung niedriger Konzentrationen an Kryoprotektivum, welche üblicherweise Propandiol (PROH) oder Dimethylsulfoxide (DMSO) sind, auch eine negative Konsequenz hinsichtlich der Dauer dieser Protokolle. Der Dehydrierungsprozess kann nur sehr langsam ablaufen und macht deshalb eine sehr fein abgestufte Balance zwischen Dehydrierung und Eiskristallisation erforderlich. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass der Konzentrationsanstieg intrazellulärer Stoffe und Salze für die Zelle über einen längeren Zeitraum auch toxische Wirkung haben kann.

Weitere Faktoren, welche immense Schäden an der Zelle verursachen können und dadurch deren Überlebensfähigkeit einschränken, sind Kälte (durch Eiskristalle) oder osmotischer Druck. Als mögliche Schäden wären hier Frakturen an Zona pellucida, Blastomeren oder Veränderungen des Zytoskeletts erwähnenswert. Diese Schäden treten meistens in einem Temperaturbereich von +15°C bis -7°C auf. Zusammenfassend trifft für "Slow-rate-freezing"-Protokolle folgende Strategie zu: Eine niedrige Einfrierrate erweist sich am günstigsten, wenn ein Gleichgewicht (Äquilibrium) zwischen Wasserverlust der Zelle und Wasseraufnahme durch die sich extrazellulär bildenden Eiskristalle gewährleistet ist.

Vitrifikation - eine eiskristallfreie Kryokonservierung

Zahlreiche experimentelle Studien wurden in den vergangenen 2 Jahrzehnten unternommen, um die im Zusammenhang mit "Slow-rate-freezing"-Protokollen erwähnten kritischen Faktoren, die Dauer der Einfrierverfahren als auch letztendlich die Kosten für teure programmierbare Einfrieranlagen zu reduzieren bzw. zu vermeiden.

Ein Weg, um Schäden durch Eiskristallbildung zu verhindern, liegt in der Anwendung von Vitrifikationsprotokollen. Vitrifikation als eine Alternative zu konventionellen Einfrierverfahren stellt eine ultra-schnelle Einfriertechnik dar, welche auf dem direkten Kontakt zwischen der Vitrifikationslösung (enthält ein oder 2 Kryoprotektiva) und dem flüssigen Stickstoff basiert. Im Wesentlichen unterscheidet sich die Vitrifikation von traditionellen Einfrierverfahren in folgenden Punkten:

1. keine Eiskristallbildung,
2. höhere Konzentration des Kryoprotektivums,

3. geringeres Volumen des Gefriergutes,
4. höhere Kühlraten,
5. wenig zeitintensiv hinsichtlich Dauer und Durchführung,
6. niedrige Kosten und
7. Einfachheit der Protokolle.

Bis heute hat die Vitrifikation als eine alternative Methode zur konventionellen Kryokonservierung relativ wenig praktische Bedeutung im Bereich der Assistierte Reproduktionsmedizin erfahren, und die Vitrifikation von Eizellen, Furchungsstadien und Blastozysten wird nach wie vor mehr experimentell als praxisorientiert durchgeführt. Gründe dafür könnten neben den nicht konstanten Überlebensraten sein, dass zum einen eine große Vielfalt an verschiedenen Trägersystemen für die Vitrifikation beschrieben und zum anderen viele verschiedene Vitrifikationslösungen und Protokolle publiziert wurden. Beides kann nicht hilfreich sein, diese Technik einer breiten Anwendung vergleichbar der konventionellen Kryokonservierung, zuzuführen. Andererseits fordern Publikationen über erfolgreich abgeschlossene Schwangerschaften und Geburten bei Anwendung dieser Technik zu weiterer intensiver Forschung auf. Hierbei muss das Augenmerk besonders auf eine deutliche Steigerung der Überlebensrate und einer Vereinheitlichung der Protokolle gerichtet werden.

Historische Entwicklung und Charakteristika der Vitrifikation

Vitrifikationstechniken erlauben dem Anwender, biologisches Material für eine kurze Zeit direkt in einem Kryoprotektivum zu inkubieren und es im Anschluss daran unmittelbar in flüssigem Stickstoff (LN₂) einzutauchen und zu lagern. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass, aufgrund des direkten Kontaktes zwischen dem LN₂ und der Zelle, der LN₂ eine Quelle für eine Kontamination darstellen kann [5, 13, 44]. Um die Gefahr einer Kontamination auszuschließen, erfordert die Vitrifikation und die anschließende Lagerung des Gefriergutes den Gebrauch von sterilem LN₂ [47].

Bereits 1985 wurde erstmalig, mit der Intention eine alternative Methode zur traditionellen Kryokonservierung zu entwickeln, eine eiskristallfreie Kryokonservierung durch Vitrifikation von Mausembryonen bei -196°C publiziert [40]. Erst 8 Jahre später gelang die erfolgreiche Vitrifikation von Mausembryonen im Präimplantationsstadium [1], 3 Jahre später konnte unter Zuhilfenahme hoher Kühlraten demonstriert werden, dass vitrifizierte bovine Eizellen nach Vitrifikation weiterhin die Fähigkeit besitzen, das Stadium der Blastozyste zu erreichen [30]. Auf dem Gebiet der Assistierte Reproduktionsmedizin gelang es 1999 und 2000, die erste Geburt resultierend aus vitrifizierten Eizellen zu veröffentlichen [23, 54]. Seit dieser Zeit kam es nicht nur zu einer sprunghaften Zunahme an wissenschaftlichen Publikation auf dem Gebiet der Vitrifikation, sondern auch zu einem gesteigerten Interesse, diese Technik im Bereich der Assistierte Reproduktionsmedizin erfolgreich anzuwenden [10, 20, 28, 29, 33, 43, 50, 53]

Die Anwendung der Vitrifikationstechnik kann für die Zelle sowohl positive als auch negative Konsequenzen mit sich bringen. Als positiv ist zu bewerten, dass Vitrifikationsprotokolle sehr einfach in ihrer Anwendung als auch in ihrer Durchführung sind. Hinzu kommt als ein charakteristisches Merkmal der Vitrifikation, dass es in einer Vitrifikationslösung auch bei sehr niedrigen Temperaturen nicht zu einer Präzipitation des Wassers kommt und somit eine vollkommen eiskristallfreie Kryokonservierung realisierbar ist. Um dies jedoch zu erreichen, sind 4,0-7,0 M Konzentrationen eines Kryoprotektivums erforderlich. Eine positive Konsequenz dieser hohen Konzentrationen ist, dass die

Inkubationszeit in der Vitrifikationslösung reduziert werden kann. Die Dehydrierung der Zelle benötigt nur Sekunden, wobei eine vollständige Dehydrierung der Zelle nicht erforderlich ist. Des Weiteren positiv ist die Tatsache zu bewerten, dass die Zelle aufgrund extrem hoher Kühlraten sehr schnell kryokonserviert und gelagert werden kann. Im Vergleich zu "Slow-rate-freezing"-Protokollen benötigen "Ultra-rapid-freezing"-Protokolle nur ca. 2-10 min.

Eine negative Konsequenz dieser hohen Konzentrationen liegt in der erhöhten Gefahr einer toxischen Wirkung auf die Zelle. Aus diesem Grunde muss bei der Entwicklung von Vitrifikationsprotokollen das Hauptaugenmerk auf eine Reduktion der Toxizität gerichtet werden. Eine Reduktion der Toxizität des Kryoprotektivums, ohne einen Verlust seiner Effektivität in Kauf nehmen zu müssen, ist über mehrere Wege realisierbar. Eine gebräuchliche Vorgehensweise besteht darin, die Zelle schrittweise in unterschiedlich konzentrierten Lösungen zu inkubieren (zuerst in einer Lösung mit geringer Konzentration für 1-5 min, im Anschluss daran in einer mit höherer, meist doppelt so hohen Konzentration für 15-20 s). Alternativ kann auch eine Mischung von 2 verschiedenen Kryoprotektiva verwendet werden, welche beide zu gleichen molaren Anteilen enthalten sind [29]. Auf diesem Wege ist es möglich, dass die Konzentration der Vitrifikationslösung von 5 M auf 3,2 M reduziert werden kann [29]. Des Weiteren unterstützt der Gebrauch geringer Arbeitsmengen (<0,5 µl) das Erreichen sehr hoher Kühl- und Aufwärmraten, womit eine Reduktion der Konzentration und damit der Toxizität erzielt werden kann.

Physikalische Grundlagen und Strategien der Vitrifikation

Die "radikale" Strategie der Vitrifikation resultiert in einer totalen Eliminierung der Formation von Eiskristallen, sowohl innerhalb der vitrifizierten Zelle (intrazellulär) als auch in der sie umgebenden Lösung (extrazellulär). Möglich wird dies durch eine sehr hohe Kühlrate in Kombination mit der Verwendung eines oder mehrerer hochkonzentrierter Kryoprotektiva, wobei der kritische Temperaturbereich schnell passiert werden kann. Die physikalische Definition der Vitrifikation ist die *Solidifikation einer Lösung* (Übergang des flüssigen Aggregatzustandes in einen festen, amorphen Zustand). Dabei wird die Vitrifikationslösung so extrem schnell auf -196°C heruntergekühlt, dass sie einen glasartigen, *vitrifizierten* Zustand einnimmt. Dieser feste Zustand wird jedoch nicht durch die Bildung von Eiskristallen, sondern durch eine extreme Zunahme der Viskosität der Vitrifikationslösung während des Herunterkühlens erreicht [12]. Aus diesem Grunde ist in der wissenschaftlichen Literatur die Verwendung von Begriffen wie "Einfrieren oder Auftauen" im Zusammenhang mit der Beschreibung der Vitrifikation nicht korrekt. Vielmehr sind Begriffe wie "Vitrifizierten und Erwärmen" gebräuchlich und korrekter.

Grundsätzlich existieren 2 Wege, die Vitrifikation von intrazellulärem Wasser zu erreichen:

1. durch eine Beschleunigung der Wärmeleitung (erhöhte Kühlrate) und
2. durch eine Erhöhung der Konzentration des Kryoprotektivums.

Somit können unter Verwendung einer geringen Menge an hochkonzentriertem Kryoprotektivum (0,5-1 µl) sehr hohe Kühlraten von ungefähr -15.000 bis -30.000°C/min und mehr ($\Delta T=25^{\circ}\text{C}$ bis $-196^{\circ}\text{C}=-221^{\circ}\text{C}/30\text{ s}=-26.520^{\circ}\text{C}/\text{min}$) erzielt werden [3, 30, 46] (Tabelle 1).

Tabelle 1. Die wichtigsten Vorteile der Vitrifikation

1.	Sie ermöglicht einen direkten Kontakt zwischen dem Gefriergut (Zellen) und dem flüssigen Stickstoff, was wiederum eine signifikante Erhöhung der Kühlrate bedeutet
2.	Dies hat eine erhöhte Konduktion der Wärme zur Folge, die den Prozess der Eiskristallisation unterbindet
3.	Sie erfordert eine geringe Menge an Kryoprotektivum
4.	Erhöhte Kühlraten ("ultra-rapid") erlauben den Gebrauch einer niedrigeren Konzentration des Kryoprotektivums, das damit letztendlich in seiner toxischen Wirkung vermindert wird
5.	Sie reduziert deutlich Schäden, die sonst durch Kälte und osmotischen Stress entstehen (Zerstörung intrazellulärer Lipidtropfen, lipidhaltiger Membranen und des Zytoskeletts)
6.	Sie erlaubt in ihrer Anwendung sehr einfache Gebrauchsprotokolle
7.	Die erforderliche Zeit für den Beginn der Kryokonservierung wird erheblich reduziert
8.	Die Vitrifikation ermöglicht eine Rationalisierung und Verminderung der Kosten im Gesamtprozess der Kryokonservierung, besonders durch Verzicht auf sonst teure und aufwendige EDV-Ausrüstung

Die Bedeutung von Kühl- und Aufwärmraten

Das Hauptrisiko jedes Einfrierverfahrens sind Kälteschäden, welche durch intrazelluläre Eiskristallbildung verursacht werden. Aufgrund dessen ist die Kühlrate einer der wichtigsten Parameter, der den Erfolg oder Misserfolg der Vitrifikation beeinflussen kann [4, 16, 18, 29]. Für die konventionelle Kryokonservierung gilt eine Kühlrate dann als optimal, wenn sie es erlaubt, dass das meiste intrazelluläre Wasser die Zelle verlassen und extrazellulär frieren kann. Für die Vitrifikation gilt ganz im Gegensatz zu konventionellen Verfahren, den gefährlichen Temperaturbereich zwischen +15°C und -7°C schnell zu passieren, um die Gefahr von Kälteschäden zu reduzieren [19]. Eine hochkonzentrierte Vitrifikationslösung von 3,2 M oder 5 M ist im Vergleich zu Wasser viskös. Der Grad der Viskosität steigt mit der Konzentration und nimmt letztendlich mit steigender Kühlrate während des Vitrifikationsprozesses rapide zu. Über die zunehmende Viskosität der Lösung wird die Formation von Eiskristallen unterdrückt.

Verantwortlich für die Eiskristallbildung beim Arbeiten mit LN2 ist dessen Gasphase. Der Siedepunkt des LN2 liegt bei -196°C (Verdampfungspunkt - Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand). Mit dem Eintauchen der Zelle in LN2 kommt es zu einer Erwärmung des LN2, welches wiederum ein intensives Kochen und Verdampfen des LN2 in Form von gasförmigem Stickstoff bewirkt. Der entstehende Dampf umgibt dabei als Isolierschicht die Zelle. Dies hat zur Folge, dass die Wärme nur langsam vom Gefriergut wegtransportiert werden kann und damit die Kühlrate erniedrigt wird. Um aber hohe Kühlraten erzielen zu können, ist es notwendig, dass der Wärmetransfer in flüssigem anstelle von gasförmigem Stickstoff erfolgt. Physikalisch betrachtet wandert Wärme in dampfförmigem Aggregatzustand langsamer als in Flüssigkeiten. Deshalb muss es gelingen, die Bildung von Dampf und die Größe der Isolierschicht zu reduzieren. Fördernd wirken hier eine kleine Probengröße (maximal 4-5 Zellen) als auch eine Minimierung der Menge an Vitrifikationslösung (<1 µl). Des Weiteren ist es erforderlich, dass der Kontakt des Gefriergutes sehr schnell und direkt mit dem LN2 erfolgt. Somit wird die Größe als auch die zeitliche Existenz des Gasmantels reduziert und die Kühlrate pro Minute deutlich erhöht. Bezüglich Aufwärmraten wurde in den meisten Experimenten mit ca. +4460°C/min ($\Delta T = -196^\circ\text{C bis } 37^\circ\text{C} = +233^\circ\text{C}/3 \text{ s}$) gearbeitet. Hierbei wird die Zelle dem LN2 entnommen und unmittelbar in die Aufwärmlösung gegeben.

Trägersysteme für die Vitrifikation

Da eine Erhöhung der Kühlrate auch über eine Reduktion des Volumens der Vitrifikationslösung erzielt werden kann, wurden für die Vitrifikation besonders kleiner Mengen (0,5-1 µl) spezielle Trägersysteme entwickelt. Hier ist die Verwendung sog. "open pulled straws" (OPS) erwähnenswert, selbstgezogene sehr dünne Glaskapillaren [6, 7, 17, 35, 48] sowie die "Flexipet-denuding pipette" (FDP), eine kommerziell zu erwerbende Kapillare aus Polycarbonat, die zugleich für die Entfernung von Kumuluszellen der Eizelle vorteilhaft ist [28, 29]. Weiterhin sind zu nennen:

- Mikrotropfen, welche das Gefriergut enthalten und direkt in LN2 gegeben werden [37],
- das Elektronenmikroskop-Kupfernetz (EM) [8, 15, 38, 39],
- das Hemi-Straw-System, bestehend aus einem 0,25 ml Straw, von dem ein Ende mit einem Skalpell halbiert wird [25, 49],
- das "Nylon mesh", ein Nylonnetz, welches die gleichzeitige Vitrifikation einer großen Anzahl an Zellen erlaubt [31] oder
- das "Cryoloop" [26, 27, 29, 35, 52].

Das Cryoloop besteht aus einer sehr kleinen Nylonschlinge (20 µm breit, 0,5-0,7 mm Durchmesser), welche auf einen Metallstab montiert ist. Dieser Metallstab kann wiederum auf ein Gefäß aufgeschraubt werden, welches als Container für die Lagerung in LN2 dient.

Die OPS-Vitrifikationsmethode [46] wurde erfolgreich für die Kryokonservierung von bovinen Eizellen und Embryonen [48] als auch für Eizellen und Embryonen von Maus und Mensch [6, 7] verwendet. Erst kürzlich wurden nach Verwendung von Trägersystemen wie OPS und Cryoloop für die Vitrifikation von menschlichen Eizellen, Furchungsstadien und Blastozysten über erfolgreich resultierende Schwangerschaften und Geburten berichtet [10, 24, 33, 53]. Auch die Effizienz der FDP und des EM als eine schnelle und geeignete Möglichkeit der Vitrifikation von PN-Stadien wurde bereits publiziert [28, 39].

Die Ergebnisse dieser Studien fanden ihre Untermauerung durch erst jüngst erschienene Publikationen, welche unter Anwendung der OPS erfolgreiche Schwangerschaften von vitrifizierten Zygoten demonstrieren konnten [20, 43]. Das EM als Trägersystem fand ebenso seine erfolgreiche Verwendung in der Vitrifikation von bovinen Eizellen und Blastozysten [30, 38]. Mukaida und Kollegen [33] erzielten mit Hilfe des Cryoloops und der Vitrifikation von Blastozysten Schwangerschaften und Geburten. Ein relativ neues Einfriergerät, auch als VitMaster[®] bezeichnet, ist in der Lage, die Temperatur des LN2 auf ca. -205 bis -208°C zu erniedrigen, was wiederum einer erhöhten Kühlrate zugute kommt. Die deutliche Absenkung der LN2-Temperatur über -196°C hinaus wird erreicht, indem der LN2 und die ihn umgebende Luft einem Vakuum unterworfen werden. Das Gerät wurde erstmalig beschrieben von Arav und Zeron [3] und wurde bereits für die Vitrifikation von bovinen, ovinen und humanen Eizellen eingesetzt [4, 19, 29].

Pufferlösungen, Kryoprotektiva und Makromoleküle

Die Basislösungen für letztendlich angewandte Vitrifikationslösungen beruhen überwiegend auf der Verwendung von phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) oder Hepes-gepufferten Kulturmedien.

Kryoprotektiva sind für die erfolgreiche Kryokonservierung und Vitrifikation von Zellen essenziell. In Anbetracht ihrer bekannten biologischen als auch physikalisch-chemischen Eigenschaften und Wirkungen erscheint ihre Toxizität der begrenzende Faktor für ihren Einsatz in der Kryobiologie. Hinzu kommt, dass nicht nur die Toxizität den optimalen Effekt und Einsatz dieser Kryoprotektiva reduziert, sondern durch sie auch Schäden auftreten können, welche sich weitestgehend von denen im klassischen Sinne als "Kryoschäden" beschriebenen unterscheiden.

Das am häufigsten verwendete Kryoprotektivum für die Vitrifikation ist Ethylenglykol (EG; MG 62,06). Es hat den Anschein, dass es eine geringe toxische Wirkung auf Mausembryonen und Blastozysten hat [1, 11, 21, 55] sowie eine hohe Diffusionsrate durch die Zona pellucida und Zellmembran in die Zelle besitzt [11]. Aufgrund dessen, dass gesunde Lebendgeburten unter Verwendung von EG aus vitrifizierten Eizellen und Embryonen bei Tieren [1, 55] als auch beim Menschen [10, 23, 33, 53] erzielt wurden, scheint diese Substanz ein guter Kandidat für die Vitrifikation in der klinischen Anwendung zu sein. Interessanterweise zeigten Shaw und Kollegen [41], dass Mauszygoten und Mausembryonen im Vierzellstadium in EG oder PROH eingefroren als auch aufgetaut werden können, ohne dass ein signifikanter Verlust ihrer Lebensfähigkeit auftritt. Dagegen präsentierten Emiliani et al. [11] Resultate, welche zeigten, dass EG kein gutes Kryoprotektivum für Vorkernstadien der Maus sein soll.

Das Hinzufügen von nichtpermeablen Substanzen mit einem großen Molekulargewicht wie Disacchariden (Sucrose MG 342,3 oder Trehalose MG 378,3) kann ebenfalls zu einer Reduktion der Toxizität beitragen. Ihr Hinzufügen zur Vitrifikationslösung und die Inkubation der Zelle in dieser Lösung vor der eigentlichen Vitrifikation unterstützt den Dehydrierungsprozess und erlaubt somit eine wesentlich kürzere Exposition der Zellen im Kryoprotektivum. Die Sucrose wirkt als eine Art osmotischer Puffer, indem sie den osmotischen Schock auf die Zelle reduziert, der besonders beim Aufwärmprozess und dem Ausdünnen des Kryoprotektivums auftritt [32]. Bereits Freedman et al. [14] zeigten, dass die Verwendung von Sucrose sehr hilfreich ist, indem es die Regeneration von menschlichen Vorkernstadien nach dem Auftauprozess unterstützt.

Der toxische Effekt des Kryoprotektivums beschränkt sich jedoch nicht nur auf den Prozess der Vitrifikation. Ein viel ernsthafteres Problem ergibt sich gerade während des Aufwärmprozesses, mit dem die Entfernung des Kryoprotektivums aus der Zelle verfolgt wird. Während dieses Prozesses ist dessen toxischer Effekt nach wie vor existent. Mit Beginn der Aufwärmprozedur ist die Zelle bestrebt, die intrazellulär hohe Konzentration des Kryoprotektivums auszugleichen, indem sie extrazelluläres Wasser aufnimmt. Da das Wasser wesentlich schneller in die Zelle eintritt als im Gegenzug das Kryoprotektivum austreten kann, kommt es zu einem "Schwellen" der Zelle. Der Zusatz von Zucker als osmotischer Puffer zur Aufwärmlösung spielt hierbei eine entscheidende Rolle für die erfolgreiche schrittweise Entfernung des Kryoprotektivums. Für Aufwärmprozeduren nach Vitrifikation werden in der Regel Sucrose-Konzentration zwischen 0,5-1,0 M verwendet. Diese hohen extrazellulären Sucrose-Konzentrationen haben nur geringe toxische Wirkung auf die Zelle [23]. Sie wirken der hohen Konzentration des Kryoprotektivums innerhalb der Zelle puffernd entgegen, indem sie die unterschiedlichen Osmolaritäten zwischen intra- und extrazellulären Kompartimenten reduzieren. Die Verwendung solcher hoher Sucrose-Konzentrationen kann das "Schwellen" der Zelle nicht verhindern, reduziert aber dessen Geschwindigkeit und Größe [29].

Zusätzlich zum Zucker ist die Verwendung von Polymeren mit hohem Molekulargewicht gebräuchlich. Hier sind vor allem Polyethylenglykol (PEG; MG 8.000), Polyvinylpyrrolidon (PVP, MG 360.000) und Ficoll (MG 70.000 und 400.000) zu erwähnen. Die Polymere modifizieren die Eigenschaften der Vitrifikationslösung, aber es liegen sehr wenig detaillierte Informationen darüber vor, wie sie verändert werden. Erwiesen ist, dass sie die Zelle gegen Kälteschäden schützen, indem sie den mechanischen Stress auf die Zelle während der Kryokonservierung mildern [9]. Des Weiteren

modifizieren sie die Eigenschaften der Lösung in solch einer Form, dass die Menge an Kryoprotektivum, welche für seine Vitrifikation erforderlich ist, reduziert werden kann [42]. Sie beeinflussen ebenso die Viskosität der Vitrifikationslösung und erlauben die Verwendung einer niedrigeren Konzentrationen des Kryoprotektivums [29, 34]. Dies hat wiederum zur Folge, dass deren Toxizität reduziert wird. Letztendlich sind sie möglicherweise in der Lage eine visköse Matrix zu bilden, welche die Zelle umhüllt und sie damit vor Eiskristallisation während des "cooling" und "warming" schützt [21, 24].

Frühere Studien untersuchten den potenziell fördernden Effekt dieser Polymere als Bestandteil der Vitrifikationslösung mit dem Ziel, den Vitrifikationsprozess zu erleichtern bzw. zu beschleunigen [36, 42]. Tatsächlich konnten O'Neill und Kollegen [36] zeigen, dass PEG als Bestandteil einer Vitrifikationslösung eindeutig positiv die Lebensfähigkeit von Eizellen nach deren Vitrifikation beeinflusst. Dabei wurde deutlich die Variabilität in den Ergebnissen reduziert, wenn ein Vergleich mit dem Gebrauch einer Vitrifikationslösung ohne PEG gemacht wurde. Im Gegensatz dazu folgern Shaw und Kollegen [42] aus den Ergebnissen ihrer Studie, dass Ficoll einen geringen bzw. keinen Effekt auf die den Zeitpunkt des ■ Glasphasenübergangs hat. Wir selbst verwendeten PEG und Ficoll als Additive zur Vitrifikationslösung, und die Ergebnisse unserer Studie zeigten, das beide Polymere weder eine fördernde noch eine negative Wirkung auf die Überlebensfähigkeit von Eizellen nach Vitrifikation haben [28, 29] (Tabelle 2).

Tabelle 2. Wesentliche Parameter, welche die Effektivität der Vitrifikation beeinflussen können

1.	Der Typus (einzeln oder als Mischung) und die Konzentration des verwendeten Kryoprotektivums/Kryoprotektiva (jedes Kryoprotektivum ist im gewissen Grade toxisch)
2.	Die Wahl des Mediums, welches als Basismedium verwendet wird ("holding media")
3.	Die Temperatur der Vitrifikationslösung zum Zeitpunkt der Inkubation der Zelle (25°C oder 37°C)
4.	Die Zeitdauer, über welche die Zelle der hohen Kryoprotektivumkonzentration vor der eigentlichen Lagerung in flüssigem Stickstoff (LN2) ausgesetzt wird
5.	Die Variabilität im verwendeten Volumen der Vitrifikationslösung
6.	Das Material des Trägersystems, welches für die Vitrifikation verwendet wird (wie schnell es Wärme abtransportiert und damit Einfluss auf die Höhe der Kühlrate haben kann)
7.	Das technische Geschick des Embryologen (!)
8.	Die "Qualität" der Eizellen, Furchungsstadien und Blastozysten und ebenso das präzise zelluläre Entwicklungsstadium (Germinalvesikel, Metaphase-I- oder Metaphase-II, Zweizell- oder Achtzellstadium, kompaktes oder expandiertes Blastozystenstadium)
9.	Der direkte Kontakt zwischen LN2 und der Vitrifikationslösung, welche die Zelle enthält (Anmerkung: LN2 kann eine Quelle der Kontamination sein, aus diesem Grunde ist es unbedingt erforderlich, sterilen LN2 zu verwenden, z. B. durch UV-Bestrahlung oder Einsatz von speziellen Filtersystemen)

Heutiger Stand der Vitrifikationsergebnisse in der Assistierten Reproduktion

Eizellen

Die Vitrifikation von Eizellen, ihre spätere Fertilisation und schließlich resultierende Geburten wurden beschrieben. Die Überlebensrate nach dem Aufwärmen ist jedoch immer sehr niedrig. Die Vitrifikation von Eizellen stellt nach wie vor eine große wissenschaftliche Herausforderung dar. Kuwayama und Kato [25] gelang unter Verwendung eines dem Hemi-Straw-System ähnlichen Trägers die Überlebensrate von menschlichen Eizellen erheblich zu steigern, wobei der Erfolg u. a. auch dem geringen Volumen an Vitrifikationslösung zuzuschreiben ist. Wir haben in eigenen Untersuchungen eine Überlebensrate vitrifizierter Eizellen in Abhängigkeit des verwendeten Trägersystems (FDP vs. Cryoloop) von 56-77% erzielt [29]. Der hohe Stellenwert der Kühlrate gerade für die Vitrifikation von menschlichen Eizellen wurde immer wieder erkannt [2, 16, 18, 19, 29].

Nach wie vor existieren wenige Publikationen, die der Frage nachgehen, ob unreife Eizellen (Germinalvesikel oder Meiose-I-Stadien) im Vergleich zu inseminierten Eizellen eine ähnliche Überlebensrate nach Vitrifikation zeigen. Ein exzellenter Vergleich wäre es, Eizellen zu testen, die einerseits 24 h nach Eizellentnahme noch nicht das Metaphase-II-Stadium erreichten, andererseits solche Eizellen zu analysieren, welche inseminiert wurden, jedoch keine erfolgreiche Fertilisation zeigen. Dieser Versuch kann als ein Modell dafür dienen, den möglichen Einfluss von Variationen verschiedener Vitrifikationsprotokolle zu untersuchen. Unter Verwendung von gealterten unreifen und inseminierten, aber nicht befruchteten Eizellen ca. 24 h nach Eizellentnahme, wurde bereits gezeigt, dass nach der Vitrifikation unreife Eizellen eine um 10% niedrigere Überlebensrate (71% vs. 80%) gegenüber inseminierten, aber nicht befruchteten Eizellen aufweisen [29].

Zygoten im Pronukleusstadium

Die erfolgreiche Vitrifikation von Zygoten, deren nachfolgende Fähigkeit zur Bildung des Blastozystenstadiums, als auch der Transfer mit nachfolgenden Schwangerschaften wurden beschrieben [20, 28, 39, 43]. Aufgrund des Embryonenschutzgesetzes ist in Deutschland nur die routinemäßige Kryokonservierung von Eizellen und Zygoten legalisiert und sinnvoll. Die guten Überlebensraten und embryonalen Entwicklungen von Zygoten nach Vitrifikation sollten gerade in Deutschland ein Ansporn sein, dieser Technik zu einer verstärkten klinischen Anwendung und Verbreitung zu verhelfen.

Embryonen in der Präimplantationsphase (Furchungsstadien)

El-Danasouri und Selman [10] publizierten Schwangerschaften und Geburten, die von vitrifizierten Tag-3-Embryonen resultierten. Dabei zeigten sie, dass die Überlebensrate nach Vitrifikation signifikant von der embryonalen Entwicklungsgeschwindigkeit (Anzahl der Blastomeren) abhängig ist. So wiesen Embryonen im Zweizellstadium eine deutlich niedrigere Überlebensrate (22%) auf als im Vergleich zu Embryonen mit 8 und mehr Blastomeren (70%). Da die Kryokonservierung von Embryonen im Furchungsstadium in Deutschland gesetzlich zwar nicht ausdrücklich verboten ist, jedoch wegen der gesetzlichen Limitierung der "einzeitigen" Herstellung von Embryonen außerordentlich ineffektiv wäre und für die Patienten daher nicht akzeptabel ist, spielt dieses Stadium für die Vitrifikation momentan eine untergeordnete Rolle.

Blastozysten im Stadium der Expansion

Autoren, welche dieses embryonale Stadium für Vitrifikationsprotokolle nutzen, konnten erfolgreiche Schwangerschaften und Geburten veröffentlichen [33, 50, 53]. Trotz dieser Erfolge ist dieses embryonale Entwicklungsstadium aufgrund seiner Größenzunahme und des mit einer wässrigen Lösung gefüllten Blastozysten kavums schwierig zu vitrifizieren und liefert unbefriedigende Überlebensraten. Gerade dieses Stadium fordert einen Kompromiss heraus - eine ausreichend lange Inkubation im Kryoprotektivum, um einen entsprechenden Wasserentzug sicherzustellen. Demgegenüber steht jedoch der mit zunehmender Inkubationsdauer steigende toxische Effekt des Kryoprotektivums.

Vanderzwalmen et al. [50] zeigten, dass eine künstliche Volumenverminderung eines voll expandierten Blastozysten kavums mit Hilfe einer ICSI-Kapillare vor der eigentlichen Vitrifikation die Überlebensrate der Blastozyste deutlich steigerte (20,3% vs. 70,6%). Dieses Verfahren erscheint nicht unproblematisch und bedarf der Suche nach Alternativen, auch mit dem Ziel, die hier eingesetzte Konzentration (40%) des Kryoprotektivums zu reduzieren. Dieses embryonale Stadium spielt ebenfalls für die Anwendung einer Vitrifikation in Deutschland eine untergeordnete Rolle.

Hinweise für die Praxis

Die Vitrifikation stellt im embryologischen Labor einer reproduktionsmedizinischen Praxis eine weniger zeitintensive und kostengünstige Alternative zu konventionellen Kryokonservierungsverfahren dar. Da das deutsche Embryonenschutzgesetz nur die Kryokonservierung von Eizellen und Vorkernstadien sinnvoll erscheinen lässt, beschränkt sich die Anwendung der Vitrifikation in Deutschland leider nur auf diese Zellen. Die Kryokonservierung von unbefruchteten Eizellen durch traditionelle Einfrierverfahren liefert nach wie vor niedrige Überlebensraten, so dass zur Verbesserung der Situation die alternative Anwendung der Vitrifikation erfolgversprechend erscheint. Des Weiteren belegen Studien die erfolgreiche Vitrifikation von Zygoten, so dass es Ansporn genug sein sollte, dieser Technik besonders in Ländern wie Deutschland zu einer größeren Verbreitung zu verhelfen.

Literatur

1. Ali J, Shelton N (1993) Vitrication of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 98: 459-465
2. Ali J, Shelton N (1993) Design of vitrication solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil* 99: 471-477
3. Arav A, Zeron Y (1997) Vitrication of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and concentration of the vitrication solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 47: 341
4. Arav A, Zeron Y, Ocheretny A (2000) A new device and method for vitrication increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 248
5. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T et al. (2000) Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 40: 110-116

- 6.Chen SU, Lien YR, Chen HF et al. (2000) Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod* 15: 2598-2603
- 7.Chen SU, Lien YR, Chao KH et al. (2000) Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 74: 804-808
- 8.Chung HM, Hong SW, Lim JM et al. (2000) In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 73: 545-551
- 9.Dumoulin JC, Bergers-Janssen JM, Pieters MH et al. (1994) The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertil Steril* 62: 793-798
- 10.El-Danasouri I, Selman H (2001) Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 76: 400-402.
- 11.Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS et al. (2000) Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 15: 905-910
- 12.Fahy GM, McFarlane DR, Angell, CA et al. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426
- 13.Fountain DM, Ralston M, Higgins N et al. (1997) Liquid nitrogen freezer: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion* 37: 585-591
- 14.Freedman M, Farber M, Farmer L et al. (1988) Pregnancy resulting from cryopreserved human embryos using a one-step in situ dilution procedure. *Obstet Gynecol* 72: 502-505
- 15.Hong SW, Chung HM, Lim JM et al. (1999) Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 72: 142-146
- 16.Hochi S, Akiyama M, Minagawa G et al. (2001) Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. *Cryobiology* 42: 69-73.
- 17.Hurt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel GE Jr et al. (2000) Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 54: 119-128
- 18.Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F et al. (2001) The open pulled straws vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo-Lett* 22: 157-162
- 19.Isachenko V, Soler C, Isachenko E et al. (2001) Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36: 250-253
- 20.Jelinkova L, Selman HA, Arav A et al. (2002) Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos. *Fertil Steril* 77: 412-414
- 21.Kasai M, Komi JH, Takakamo A et al. (1990) A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89: 91-97

- 22.Kasai M, Hamguchi Y, Zhu SE et al. (1992) High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol based solution by a simple method. *Biol Reprod* 46: 1042-1048
- 23.Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C et al. (1999) Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 14: 3077-3079
- 24.Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO (2001) Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43: 21-31
- 25.Kuwayama M, Kato O (2000) Successful vitrification of human oocytes. *Fertil Steril* 74 [Suppl 3]: 49 [Abstr O-127]
- 26.Lane M, William B, Schoolcraft MD et al. (1999) Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 72: 1073-1078
- 27.Lane M, Bavister BD, Lyons EA et al. (1999) Container-less vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 17: 1234-1236
- 28.Liebermann J, Tucker M, Graham J et al. (2002) Blastocyst development after vitrification of multipronucleate zygotes using the flexipet denuding pipette (FDP). *RBMOnline* 4: 146-150
- 29.Liebermann J, Tucker M, Graham J et al. (2002) Vitrification of human oocytes: Comparison of the efficacy of flexipet-denuding pipette (FDP) vs. cryoloop technique. *Fertil Steril* (in press)
- 30.Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996) Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54: 1059-1069
- 31.Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T et al. (2001) Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42: 139-144
- 32.McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP (1995) Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum Reprod* 10: 1163-1171
- 33.Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T et al. (2001) Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 76: 618-623
- 34.Nakagata N (1989) High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 87: 479-483
- 35.Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE et al. (2001) Cryopreservation of equine embryos by open pulled straws, cryoloop, or conventional cooling methods. *Theriogenology* 15: 607-613
- 36.O'Neill L, Paynter SJ, Fuller BJ (1997) Vitrification of mature mouse oocytes: Improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology* 34: 295-301
- 37.Papis K, Shimizu M, Izaike Y (2000) Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 15: 651-658
- 38.Park SP, Kim EY, Kim DI et al. (1999) Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscopic grid. *Hum Reprod* 14: 2838-2843

- 39.Park SP, Kim EY, Oh JH et al. (2000) Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod* 15: 1787-1790
- 40.Rall WF, Fahy GM (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575
- 41.Shaw JM, Ward C, Trounson AO (1995) Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Hum Reprod* 10: 396-402
- 42.Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR et al. (1997) Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology* 35: 219-29
- 43.Selman HA, El-Danasouri I (2002) Pregnancies derived from vitrified human zygotes. *Fertil Steril* 77: 422-423
- 44.Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH et al. (1995) Hepatitis-B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 346: 137-140
- 45.Trounson A, Mohr L (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305: 707-709
- 46.Vajta G, Booth PJ, Holm P et al. (1997) Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo-Lett* 18: 191-195
- 47.Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M et al. (1998) Sterile application of the open pulled straws (OPS) vitrification method. *Cryo-Lett* 19: 389-392
- 48.Vajta G, Holm P, Kuwayama M et al. (1998) Open Pulled Straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51: 53-58
- 49.Vandervorst M, Vanderzwalmen P, Standaart V et al. (2001) Blastocyst transfer after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Hum Reprod* 16 [Abstr book 1]: 153-154, P-133
- 50.Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch (2002) Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 17: 744-751
- 51.Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 178 :411-414
- 52.Yeoman RP, Gerami-Naini B, Mitalipov S et al. (2001) Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 16: 1965-1969
- 53.Yokota Y, Sato S, Yokota M et al. (2000) Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod* 15: 1802-1803
- 54.Yoon TK, Chung HM, Lim JM et al. (2000) Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization transfer program. *Fertil Steril* 74: 180-181
- 55.Zhu SE, Kasai M, Ootogawa H et al. (1993) Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fertil* 98: 139-145