



PUBLICATIE VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD nr. 8630

Bewaring door vitrificatie van reproductieve weefsels en cellen

2 maart 2011

1. INLEIDING

Op 10 december 2009 heeft de Hoge Gezondheidsraad (HGR) een adviesaanvraag van het FAGG ontvangen betreffende de bewaring door vitrificatie van reproductieve weefsels en cellen. In het kader van de inspecties en van de toekenning van de erkenningen van de banken voor menselijk lichaamsmateriaal, verbonden aan de medisch begeleide voortplantingsprogramma's, wenst het FAGG de benadering van dit procedé te objectiveren.

Het FAGG vraagt de HGR de criteria voor dit type van bewaring en dit advies in de specifieke kwaliteitsnormen voor reproductieve weefsels en cellen op te nemen.

Op 9 augustus 2010 heeft de HGR een bijkomende vraag ontvangen van het FAGG betreffende het gebruik van *open* systemen voor de vitrificatie van eicellen en embryo's van de mens:

“Is het aanvaardbaar dat niet-steriele vloeibare stikstof gebruikt wordt voor de vitrificatiemethode of moeten er andere kwaliteitsaspecten gelden ter hoogte van vloeibare stikstof?”

Deze vragen werden eerst voorgelegd aan een subwerkgroep van deskundigen vooraleer het onderwerp behandeld werd door de werkgroep “Cellen, weefsels en organen van menselijke en dierlijke oorsprong”. In de subwerkgroep waren de expertises inzake menselijk lichaamsmateriaal, voortplantingsgeneeskunde, embryologie en cryobiologie vertegenwoordigd.

2. AANBEVELINGEN

Op de vragen van het FAGG formuleert de HGR de volgende antwoorden en stelt de HGR de volgende voorlopige aanbevelingen voor.

Dit advies bevat de huidige stand van de techniek betreffende de vitrificatie van reproductieve cellen.

1. Vitrificatie van embryo's en blastocysten:

Vitrificatie is een gevalideerde en robuuste techniek en er zijn geen verschillen in efficiëntie tussen vitrificatie met gesloten systemen en *open* systemen. Omwille van de veiligheid (contaminatie en kruiscontaminatie) beveelt de HGR daarom aan om gesloten systemen te gebruiken, zowel bij de afkoelingsfase als bij de stockage. Verschillende gesloten systemen zijn commercieel beschikbaar.

2. Vitrificatie van metafase II- eicellen:

2.1. Vitrificatie van eicellen is efficiënter dan traag gecontroleerd invriezen. Indien eicellen bewaard moeten worden, is het aan te raden om vitrificatietechnieken te gebruiken. De vitrificatietechnieken voor eicellen van de mens moeten echter verder geoptimaliseerd worden.

- 2.2. De literatuurgegevens die momenteel beschikbaar zijn, geven aan dat gesloten systemen lijken te werken, maar hun efficiëntie in vergelijking met *open* systemen moet verder geobjectiveerd worden. Het gebruik van gesloten systemen valt op theoretische grond te verkiezen, maar gezien het huidige gebrek aan voldoende informatie naar efficiëntie toe, is de HGR van mening dat *open* systemen tijdelijk verder kunnen worden gebruikt.
3. Vitrificatie van zaadcellen en gonadale weefsels:
Deze technieken zijn nog niet gebruiksklaar en het traag invriezen blijft de aanbevolen methode van cryopreservatie.
 4. Bij gebruik van zowel open als gesloten vitrificatie en stockage moeten de open systemen tijdens de stockage fysisch gescheiden zijn van de gesloten systemen.
 5. Voor open en gesloten systemen die in het verleden beiden gebruikt en gestockeerd zijn, wordt de gemengde stockage toegestaan voor een overgangperiode van vijf jaar. Indien er na vijf jaar stockage een wens is dat open stalen verder gestockeerd blijven of gedoneerd worden voor wetenschappelijk onderzoek dan moeten deze fysisch gescheiden worden van de gesloten systemen.
 6. Bij niet- gekende of niet- beschikbare serologiegegevens moeten vitrificatiesystemen bewaard worden in quarantainebanken in goed geïdentificeerde systemen die de afwezigheid van kruisbesmettingen (*High security straws*) waarborgen.
 7. Bij open, semigesloten en gesloten vitrificatieprocedures zijn vitrificatie en stockage in niet-steriele vloeibare stikstof toegestaan.
 8. Het advies zal na twee jaar herbekeken worden en op basis van eventuele nieuwe literatuurgegevens zal het aangepast worden.

3. UITWERKING EN ARGUMENTATIE

Lijst van de gebruikte afkortingen

ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CPA	Cryoprotectant
DMSO	Dimethylsulfoxide
EG	Ethyleen glycol
ESHRE	<i>European Society for Human Reproduction and Embryology</i>
EU	<i>European Union</i>
FAGG	Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten
HGR	Hoge Gezondheidsraad
HSV	<i>High security vitrification</i>
ICSI	Intra cytoplasmatische sperma injectie
IVF	<i>In vitro</i> fertilisatie
PG	Propyleen glycol
RCT	<i>Randomized controlled trial</i>

3.1 Methodologie

Het advies berust op een overzicht van de wetenschappelijke literatuur, de grijze literatuur en het oordeel van de experts.

3.2 Inleiding

3.2.1 Wat zeggen de specifieke kwaliteitsnormen voor reproductieve weefsels en cellen nu? (HGR 8292)

Paragraaf E.2.2.4 van het advies HGR 8292 (Kwaliteitsnormen voor reproductieve weefsels en cellen) zegt het volgende over cryopreservatie in vloeibare of gasvormige stikstof: "Het bewaren en het opslaan door cryopreservatie zijn zowel in vloeibare als in gasvormige stikstof mogelijk voor zover een gevalideerd protocol in de bank aanwezig is. In verband met de donaties die een mogelijke besmetting inhouden, moeten veiligheidsmaatregelen in de bank worden bepaald om elke contaminatie te vermijden (bijvoorbeeld door gebruik van *high security straws* of afzonderlijke bewaarvaten)". Nu is het zo dat alle partnerdonaties een mogelijke besmetting inhouden (vermits ze niet in quarantaine geplaatst worden doch meteen worden ingevroren), zodat sowieso afzonderlijke bewaarvaten of *high security straws* moeten worden gebruikt. De methodes die gebruikt worden om in te vriezen (Traag gecontroleerd invriezen of vitrificatie) worden nergens vermeld.

3.2.2 Situering

Alle cryopreservaties in reproductieve geneeskunde hebben één doel: het stopzetten van de biologische tijds klok. Bij de voordelen van cryopreservatie van eicellen in de context van IVF valt allereerst te denken aan verbeterde mogelijkheden voor resultaten met donoreicellen. Optimale cryopreservatie kan ruimte scheppen voor het bewaren van donoreicellen onder de vorm van eicelbanken en voor een eventuele nadere screening van de donor op gezondheidsrisico's zoals besmetting met hepatitis B. Gebruik van gecryopreserveerde donoreicellen betekent ook dat de cycli van donor en acceptor niet meer gesynchroniseerd moeten worden. Cryopreservatie van eicellen kan ook plaatsvinden bij het tijdens de IVF/ICSI- behandeling ontbreken van spermatozoa of voorafgaand aan een voor de ovaria mogelijke schadelijke behandeling (bv. chemo- of radiotherapie). Tevens kan cryopreservatie een belangrijke bijdrage leveren aan het verkleinen van het aantal restembryo's dat in de huidige IVF praktijk ontstaat. Bij mensen die principiële bezwaren hebben tegen het ontstaan van restembryo's betekent de mogelijkheid om eicellen te cryopreserveren, een vermindering van de morele/ethische belasting. Omwille van al deze redenen is het belangrijk te beschikken over zeer efficiënte cryopreservatietechnieken voor eicellen van de mens. Omwille van hun grootte en van hun koudegevoeligheid blijft het invriezen van menselijke metafase II- eicellen met klassieke trage gecontroleerde vries en dooi-procedures, bijzonder moeilijk. De literatuur toont duidelijk aan dat traag gecontroleerd invriezen van eicellen suboptimaal is en niet zonder risico (Oktay et al., 2006).

Sinds de introductie van IVF is cryopreservatie van embryo's een integraal deel van elke onvruchtbaarheidsbehandeling. Een breed spectrum van embryo's kan worden ingevroren: eencellige embryo's op dag 1 (zygote) van de eicelcollectiecyclus, delingsembryo's op dag 2 en 3 van de cyclus en blastocysten op dag 5 en 6 van de cyclus. Deze laat toe de bevruchtungskansen te vergroten op basis van een enkele eicelpunctie dankzij de geboden mogelijkheid om één of zelfs meerdere bijkomende uitgestelde transfers uit te voeren. Overtallige embryo's kunnen later ontdooid worden indien de verse terugplaatsing niet succesvol was. Daarenboven wordt in België sinds 2003 (Belgisch Koninkrijk, 2003) onder welbepaalde voorwaarden het terugplaatsen van slechts één embryo toegepast teneinde de iatrogene epidemie van tweelingen en drielingen te vermijden. Men zou er ook moeten naar streven dat na transfer van ontdooid embryo's en blastocysten tweelingen en drielingen vermeden worden. Na dooi zou bij voorkeur slechts één ontdooid embryo teruggeplaatst moeten worden. Cryopreservatie is dus een uitstekend middel om meerlingzwangerschap in IVF te vermijden. Het is duidelijk dat in zulke strategieën efficiënte cryopreservatieprogramma's beschikbaar moeten zijn.

Wat betreft embryo's en blastocysten, moet men na meer dan 20 jaar praktijk met traag gecontroleerde invriestechnieken vaststellen dat ondanks uitgebreide cryo-expertise, de kans op geboorte van een gezond kind 3 tot 7 % per ingevroren en ontdooid embryo en 5 tot 10 % per teruggeplaatst embryo bedraagt, afhankelijk van de gebruikte procedure en van de morfologische kwaliteit en het stadium van ontwikkeling van het embryo voor invriezen. Daartegenover staat dat de implantatiekansen per terugplaatsing van verse embryo's in België gemiddeld 20 % bedragen

(*Belgian Register for Assisted Procreation: BELRAP*). Het blijkt soms moeilijk te zijn om menselijke embryo's volledig intact te recupereren onmiddellijk na dooi. Embryo's met celschade hebben daarenboven een lagere implantatiekans dan intacte embryo's. Blijkbaar kunnen gecontroleerde vriesprocedures die zeer succesvol blijken voor embryo's en blastocysten van andere zoogdiersoorten, niet zomaar toegepast worden voor menselijke embryo's en blastocysten. Recent werd een vitrificatiemethode geïntroduceerd (minimale volumevitrificatie) met veelbelovende resultaten voor zowel menselijke eicellen, embryo's en blastocysten (Kuwayama et al., 2005).

3.2.3 Rationale voor vitrificatie

Twee factoren spelen een belangrijke rol bij het ontstaan van schade door cryopreservatie aan eicellen en embryo's: (1) intracellulaire ijsvorming en (2) schade ontstaan door het ontwateringsproces (osmotische schade). Vitrificatie is een invriesmethode die, in tegenstelling tot het trage invriezen, geen vorming van ijskristallen tot gevolg heeft. Het gaat om de verglazing van een oplossing bij zeer lage temperatuur.

Vanuit een theoretisch oogpunt leidt vitrificatie tot minder schade aan het embryo/de eicel, doordat mechanische stress, koudgevoeligheid en osmotische schade door ijskristalvorming wordt tegengegaan. Het is daarom te verwachten dat vitrificatie van eicellen en embryo's zal leiden tot een hogere efficiëntie van cryopreservatie en dat vitrificatiemethoden voor reproductieve cellen de traag gecontroleerde methoden zullen verdringen.

Cryobiologie van vitrificatie

Vitrificatie is de complete verglazing van een oplossing zonder ijskristal, bij snel afkoelen tot bijvoorbeeld -196°C . Deze intra- en extracellulaire amorfe of verglaasde toestand wordt verkregen dankzij de combinatie van hoge concentraties cryoprotectant met een uiterst hoge afkoelingsnelheid. Wanneer het om eicellen en embryo's gaat die moeten gevitriciseerd worden, maakt men meestal gebruik van een oplossing van binnendringende en niet-binnendringende cryoprotectants. Binnendringende cryoprotectants (DMSO, PG, EG) beschermen de cel intra- en extracellulair, niet-binnendringende cryoprotectants (sucrose, galactose) beschermen de cel door osmotische ontwatering. Om succesvol en veilig te vitrificeren moeten verschillende parameters correct ingepast worden, met name de concentratie cryoprotectants en de tijd en temperatuur van blootstelling, de afkoel- en opwarmingssnelheden en het gebruikte *carrier system* (= systeem dat als embryocontainer dient) (Pegg, 2005; Vajta & Nagy, 2006; Vajta & Kuwayama, 2006; Yavin & Arav, 2007). In 2005 omschreef Paynter dat cryopreservatieprotocollen ontwikkeld moeten worden die zeer robuust zijn, vooral om variabiliteit in resultaten tussen centra en binnen centra te vermijden. Dit is vooral van belang bij het vitrificeren van eicellen en embryo's. Men spreekt over equilibriumvitrificatie als zeer hoge concentraties cryoprotectant gebruikt worden, typisch meer dan 50 % (v/v). Bij equilibriumvitrificatie is de verglazing relatief onafhankelijk van de afkoel- en opwarmingssnelheden en kan men relatief grote *sample volumes* vitrificeren. De gebruikte concentraties CPA zijn echter zo hoog dat ze toxisch zijn voor reproductieve cellen en deze techniek van vitrificatie is dus niet werkbaar voor menselijke gameten en embryo's. Bij non-equilibriumvitrificatie is de concentratie CPA gereduceerd tot niet-toxische concentraties (30 % v/v). Om verglazing te verkrijgen, zijn dan zeer hoge koel- en opwarmingssnelheden een absolute noodzaak. Hoe hoger de afkoel- en opwarmingssnelheden hoe lager de vereiste concentratie CPA die nodig is om te vitrificeren. De uitdaging van vitrificatie in IVF moet eruit bestaan om die balans te vinden tussen de minst toxische concentraties CPA die vitrificatie (extracellulair en intracellulair) garanderen onder doenbare koel- en opwarmingssnelheden. De eenvoudigste weg om realistische hoge koel- en opwarmingssnelheden te verkrijgen, is het gebruik van zeer lage volumes en directe onderdompeling van de sample in vloeibare stikstof. Deze techniek werd voor het eerst toegepast door Vajta et al. (1997). Hij ontwikkelde een *Open Pulled Straw*- systeem waar $<1 \mu\text{l}$ samples (30 % CPA) met eicellen of embryo's konden in opgeladen worden. Door het directe contact van de vloeistof met vloeibare stikstof creëerde hij koel- en opwarmingssnelheden hoger dan $20.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ met schijnbare vitrificatie van de druppel tot gevolg. Het succes van de vitrificatiemethode was ook gebaseerd op een correct samenspel van voldoende penetratie van binnendringende CPA's (EG, PG of DMSO, of mengsels) en voldoende ontwatering door een niet-binnendringend CPA (sucrose, trehalose,

galactose). Noteer dat gezien de verlaagde concentratie CPA in de vitrificatieoplossing, zowel tijdens het afkoelen als tijdens het opwarmen, de vitrificatieoplossing doorheen een risicozone moet passeren waar ijskristalvorming (intracellulair en extracellulair) mogelijk is. Deze “minimale volumebenadering” is nu de gouden standaard als vitrificatiemethode in IVF.

3.3 Probleemstelling

Vitrificatie (vooral gebruikt voor eicellen en embryo's) is een speciale invriestechiek waarbij kan worden gewerkt in open systemen (*open pulled straw*, cryoloop, *Cryotop*, *Electron Microscope grid*) of in de nieuwere gesloten systemen (*HSV straws*, *Cryo-Tip*, *Cryopette*, *Rapid VIT*). Als men in gesloten systemen werkt, voldoet men volkomen aan de normen van advies nr. HGR 8292; als men met open systemen werkt niet. Dan is er namelijk rechtstreeks contact tussen het weefsel of de cellen en de stikstof mogelijk, waardoor contaminatie (microbieel en viraal) kan optreden (Bielanski et al., 2000; Bielanski et al., 2003) en dit is toch een reden waarom men de fysische separatie van de stalen vereist in de Europese Richtlijn.

De controverse aangaande open en gesloten systemen voor vitrificatie is gebaseerd op tegenstrijdige meningen in de literatuur. Sommigen zweren bij de (oude) open systemen, maar in vele landen en omwille van de bekommernis rond (kruis-) contaminatie schakelt men meer en meer over op gesloten systemen. Tijdens gesloten vitrificatiemethoden is zowel de vitrificatiestap als de stockagestap gesloten (*straw in straw*-methode; Kuleshova, 2009).

Naast de problematiek van mogelijke contaminatie bij open systemen wordt de controverse rond open en gesloten systemen ook gevoed door de stelling:

- dat zonder direct contact van het sample met de vloeibare stikstof de koelsnelheid zodanig beïnvloed wordt dat verglazing gecompromitteerd is (Vajta et al., 2009);
- dat de warmsnelheid dominant is over de koelsnelheid, zodat gesloten vitrificatie mogelijk wordt als men open opwarming toepast (Seki & Mazur, 2008);
- dat de koelfase ontkoppeld kan worden van de stockagefase (Vajta et al., 2009).

Besluiten

Bij gebruik van zowel open als gesloten vitrificatie en stockage moeten de open systemen tijdens de stockage fysisch gescheiden zijn van de gesloten systemen

Voor open en gesloten systemen die in het verleden beiden gebruikt en gestockeerd zijn, wordt de gemengde stockage toegestaan voor een overgangperiode van 5 jaar. Indien er na 5 jaar stockage een wens is dat open stalen verder gestockeerd blijven of gedoneerd worden voor wetenschappelijk onderzoek dan moeten deze fysisch gescheiden worden van de gesloten systemen.

Bij niet-gekende of niet-beschikbare serologiegegevens moeten vitrificatiesystemen bewaard worden in quarantaine banken. In goed geïdentificeerde systemen die de afwezigheid van kruisbesmettingen (*High security straws*) waarborgen.

Bij open, semigesloten en gesloten vitrificatieprocedures is vitrificatie en stockage in niet-steriele vloeibare stikstof toegestaan.

3.4 Wat zegt de literatuur over de efficiëntie van vitrificatie in vergelijking met traag vriezen en over de efficiëntie van open en gesloten vitrificatiesystemen voor eicellen, embryo's en blastocysten van de mens?

3.4.1 Embryo's en blastocysten

In één RCT en in verschillende meta-analyses en reviews werd recent aangetoond dat vitrificatie van embryo's en blastocysten superieur is tegenover traag vriezen (AbdelHafez et al., 2010; Balaban et al., 2008; Kolibianakis et al., 2009).

In 2005 vergeleken Kuwayama et al. het Cryotop open systeem met het Cryo-Tip gesloten systeem voor blastocysten en vonden dat beide systemen even goede resultaten opleverden. Een tabel uit deze publicatie toont dit goed aan:

Tabel 1. Survival, pregnancy and delivery rates after single embryo transfer of human blastocysts vitrified with either the Cryotop or the CryoTip method.

	Cryotop (open)	Cryotip (gesloten)
<i>Survived/vitrified rate (%)</i>	221/227 (97)	82/88 (93)
<i>Pregnancy/transfer rate (%)</i>	131/221 (59)	42/82 (51)
<i>Delivery/transfer rate (%)</i>	113/221 (51)	39/82 (48)

No significant differences between corresponding values were found.

In een recente review schrijven Kader et al. heel duidelijk dat excellente resultaten kunnen worden verkregen met zowel gesloten als open systemen voor blastocysten (Kader et al., 2009). Hieronder vindt u een vergelijkende tabel uit deze publicatie:

Tabel 2: Comparison of survival, implantation and pregnancy rates according to loading device.

	Loading Device	Sample Size	Survival Rate	Implantation Rate	Pregnancy Rate
Mukaida et al., 2001	Cryoloop (open)	N = 60	63 %	-	31 %
Cho et al., 2002	EM grid (open)	N = 21	83 %	-	34 %
Reed et al., 2002	Cryoloop (open)	N = 54	100 %	15 %	-
Mukaida et al., 2003	Cryoloop (open)	N = 725	80 %	20 %	37 %
Osada et al., 2003	Cryotop (open)	N = 580	99 %	-	56 %
Stehlik et al., 2005	Cryotop (open)	N = 41	100 %	-	50 %
Takahashi et al., 2005	Cryoloop (open)	N = 1.129	86 %	29 %	44 %
Kuwayama et al., 2005	Cryotip (gesloten)	N = 5.695	90 %	-	53 %
Liebermann et al., 2006	Cryotop (open)	N = 547	97 %	31 %	46 %
Mukaida et al., 2008	Cryoloop (open)	N = 5.412	92 %	36 %	49 %

De Kuwayama et al. (2005)- studie is de enige die gebruik maakt van een gesloten systeem in dit overzicht, maar het is wel een zeer grote studie (n = 5.695).

Een recent abstract op de ASRM (*American Society for Reproductive Medicine*)- meeting in Atlanta in 2009 (Desai et al., 2009) vergeleek één open met twee gesloten systemen voor wat betreft embryo's en blastocysten en kwam tot de conclusie dat zowel het open systeem

(cryoloop™) als één van de gesloten systemen (HSV straws™) de beste systemen zijn en beide beter dan het Cryo-Tip™ gesloten systeem.

Meer recente literatuur in verband met **blastocysten en gesloten systemen** (Stachecki et al., 2008; Van der Zwalmen et al., 2010a; Liebermann, 2009) bevestigen de resultaten en observaties van Kuwayama et al. (2005).

Liebermann, 2009

Implantation/Blastocyst replaced: 166/543 (30,6 %)

Implantation/Blastocyst warmed: 166/563 (29,6 %)

Vander Zwalmen et al., 2010a

Implantation/Blastocyst replaced: 60/231 (25,9 %)

Implantation/Blastocyst warmed: 60/348 (17,2 %)

Stachecki et al., 2008

Implantation/Blastocyst replaced: 37/80 (46,2 %)

Implantation/Blastocyst warmed: 37/93 (39,7 %)

Ook Wilding et al. (2010) beschreef uitstekende resultaten voor de vitrificatie van menselijke zygoten en embryo's, gebruik makend van gesloten systemen.

In een recent abstract op de ESHRE- meeting in Rome in 2010 (Portmann et al., 2010) vergeleek men een nieuw gesloten systeem (Cryopette™) met een bestaand gesloten systeem (Cryo-TIP™) voor de vitrificatie van menselijke eicellen, embryo's en blastocysten. Voor al deze stadia bleek het gebruik van Cryopette™ vergelijkbare resultaten op te leveren met Cryo-TIP™.

In een abstract van Balaban et al. (2008) voorgesteld tijdens de ESHRE meeting in Barcelona (2008), werden resultaten van de vitrificatie van 8-cellige menselijke embryo's getoond, gebruik makend van een gesloten RapidVit™ systeem gecommmercialiseerd door Vitrolife. Na het opwarmen van > 250 embryo's bleken er 72,1 % volledig intact te zijn. Een implantatiepercentage per teruggeplaatst embryo van 29,7 % werd verkregen. De firma Vitrolife presenteerde in 2010 bijkomende geruuststellende klinische data online voor zowel embryo's als blastocysten van de mens gebruik makend van het gesloten RapidVit™- systeem.

Bij al deze verschillende gesloten systemen dient echter opgemerkt dat, onder invloed van extreme temperaturen en druk, niet alle plasticsoorten die gebruikt worden in dragers ondoorlaatbaar zijn voor gevaarlijke virussen en andere contaminanten. Het onzorgvuldig dichtlassen van de dragers kan in sommige gevallen tot onveiligheid leiden, vooral bij gebruik van laag kwaliteit plastic in de dragers (Vajta et al, 2009).

Besluit

Voor embryo's en blastocysten is de vitrificatie een gevalideerde en robuuste techniek en er zijn geen verschillen in efficiëntie tussen vitrificatie met gesloten systemen en *open* systemen. Omwille van de veiligheid (contaminatie en kruiscontaminatie) beveelt de HGR daarom aan om gesloten systemen te gebruiken zowel bij de koeling als bij de stockage. Verschillende gesloten systemen zijn commercieel beschikbaar.

3.4.2 Eicellen

Uit een meta-analyse van cohortstudies en niet-gerandomiseerde vergelijkende studies blijkt dat vitrificatie leidt tot betere morfologische overleving, tot meer klinische zwangerschappen en *live births* per transfer (Oktay et al., 2006).

Volgens Vajta et al. (2009) is het absoluut noodzakelijk om zeer hoge koelsnelheden te hebben voor de vitrificatie van menselijke eicellen en dit omwille van hun grootte. Daar in gesloten systemen de koelsnelheid lager ligt dan bij open systemen zou volgens hem geen enkel gesloten systeem voldoende garantie bieden op succesvolle vitrificatie. Daarenboven sluit hij ook koeling door middel van “vaste gekoelde oppervlakken” volledig uit als zijnde onbetrouwbaar. De literatuur schijnt hem tot dusver gelijk te geven. Verschillende auteurs die succesvolle vitrificatie van eicellen rapporteerden maken allemaal gebruik van open systemen (Antinori et al., 2007; Cobo et al., 2010; Kuwayama et al., 2005; Nagy et al., 2009; Rienzi et al., 2010). Allen beschrijven zij een morfologische overleving van > 90 %, een bevruchtingsgraad van > 90 %, een blastocystvorming vergelijkbaar met verse eicellen en een *live birth rate* vergelijkbaar met verse eicellen. Het is echter wel zo dat in deze publicaties voornamelijk donoreicellen gevitriciseerd worden. Per definitie zijn dit eicellen van jongere vrouwen en dus van optimale kwaliteit. Het blijft een open vraag of eicelvitricatie voor infertiliteitspatiënten dezelfde resultaten zal opleveren.

De stelling van Vajta werd recent uitgedaagd stellende dat de warmsnelheid dominant is over de koelsnelheid als het op overleven aankomt na vitrificatie. Een hoge opwarmsnelheid kan voorkomen dat microscopisch kleine onschadelijke ijskristalletjes die ontstaan zijn tijdens de vitrificatiestap, niet groeien tot schadelijke vormen tijdens de opwarmstap (Seki & Mazur, 2008). Er zijn twee studies gepubliceerd die eicellen vitrificeren met gesloten systemen en die een hoge opwarmsnelheid garanderen (Smith et al., 2010; Van der Zwalmen et al., 2010a). Beide studies tonen aan dat vitrificatie van eicellen met gesloten systemen kan werken, maar dat de efficiëntie wat lager is dan deze in de literatuur beschreven met open systemen. Recent werd eveneens het gesloten cryo-TIP™-systeem vergeleken met het open cryo-TOP-systeem. Uit deze studie bleek duidelijk dat cryo-TOP beter scoort in termen van efficiëntie (Paffoni et al., 2010). In het UZ Brussel werd een prospectief gerandomiseerde studie opgezet die een open systeem vergelijkt met een gesloten systeem voor de vitrificatie van donoreicellen. De studie was gerandomiseerd op morfologische overleving. Geen verschil in morfologische overleving werd aangetoond tussen gesloten systeem (92 %, 73 eicellen) en open systeem (83 %, 64 eicellen). Na gesloten vitrificatie werden in deze studie 6 zwangerschappen verkregen na 12 embryoterugplaatsingprocedures. Hoewel deze studie enkel kracht heeft ter hoogte van de morfologische overleving, tonen de zwangerschapsresultaten aan dat gesloten vitrificatie van menselijke eicellen kan werken. Deze studie loopt nog en is dus nog niet gepubliceerd.

Kuleshova (2009) suggereerde dat elke drager open of gesloten efficiënt kan werken op voorwaarde dat de vitrificatieprocedure (type en concentratie CPA, toevoegen en uitverdunnen van CPA) geoptimaliseerd wordt voor elk stadium van ontwikkeling en Van der Zwalmen et al. (2010b) beschreef dat om het verlies aan koelsnelheid te compenseren, het aangewezen is om de concentratie CPA te verhogen.

Een andere methode die gesuggereerd wordt is om de koeling stap (de vitrificatie) te ontkoppelen van de stockage (semigesloten vitrificatiemethoden) (Bielanski & Vajta, 2009; Kuleshova, 2009; Vajta et al., 2009). Hun redenering is dat het contact van de vloeistof (en de eicel) met de vloeibare stikstof absoluut noodzakelijk is voor de veilige verglazing intra- en extracellulair. Na de koelingstap wordt de gevitriciseerde drager ingebracht in een *High Security*-rietje, dichtgelast (gesloten) en gestockeerd in niet-steriele vloeibare stikstof. Bij het opwarmen kan één uiteinde van de *straw* afgeknipt worden zodat open opwarmen mogelijk wordt.

Het nadeel van deze methode blijft dat tijdens de koelingstap contaminatie kan optreden. Kruiscontaminatie tijdens de stockage echter is uitgesloten gezien het gebruik van de *High Security* externe dragers. De koelingstap kan uitgevoerd worden in niet-steriele vloeibare stikstof

(Vajta et al., 2009). Sommigen suggereren echter het gebruik van steriele vloeibare stikstof tijdens de koelingsfase (Parmegiani et al., 2010). Steriele vloeibare stikstof kan door 0,2 µm filtratie of UV- straling bekomen worden (Bielanski & Vajta, 2009; Parmegiani et al., 2010; Vajta et al., 2009). Steriele stikstof blijft steriel in volledig steriele omstandigheden. Om deze reden is steriele vitrificatie bijzonder complex om in de dagelijkse routine uit te voeren. Stockage in steriele vloeibare stikstof is tot dusver zelfs technisch niet realistisch. Bij gebruik van open, semigesloten en gesloten methoden zouden metalen containers die vloeibare stikstof moeten bevatten, zorgvuldig en telkenmale (patiënt per patiënt) gedesinfecteerd moeten worden. Het is ook belangrijk om te duiden dat er in de IVF- wereld nog nooit kruiscontaminatie en contaminatie van patiënten en kinderen gedocumenteerd werd (Pomeroy et al., 2010; Vajta et al., 2007).

De problematiek van open systemen en (kruis-) contaminatie tijdens de stockage zou kunnen opgelost worden door middel van stockage in stikstof onder gasvormige fase (Cobo et al., 2010). In grotere gesofistikeerde gasfase tanken blijkt echter dat gasfasestockage geen garantie biedt dat er geen contaminatie kan optreden (Grout & Morris, 2009; Pomeroy et al., 2010). Bovendien moet men absolute garantie hebben over amplitude van temperatuurgradiënten binnen het gasfasesysteem (Pomeroy et al., 2010). Kleine herhaalde temperatuurschommelingen kunnen op termijn leiden tot onherroepelijke schade aan de eicel. Bovendien is het risico op spontane devitrificatie (gezien de bijzonder kleine volumes) veel groter in de gasfase dan in de vloeibare stikstof.

Voor eicellen van de mens beschouwt ASRM de vitrificatiemethode nog steeds als experimenteel. Om te komen tot een robuuste (reproduceerbare) vitrificatieprocedure die in overeenstemming is met de EU- richtlijn en die veilig is, is verder onderzoek aangewezen.

Het is te verwachten dat in 2011 voor eicellen van de mens meer data beschikbaar zullen gesteld worden met gesloten vitrificatiesystemen.

Besluit

Vitrificatie van eicellen is efficiënter dan traag gecontroleerd invriezen. Indien eicellen bewaard moeten worden is het aan te raden om vitrificatietechnieken te gebruiken. De vitrificatietechnieken voor eicellen van de mens moeten echter verder geoptimaliseerd worden.

De literatuurgegevens die momenteel beschikbaar zijn geven aan dat gesloten systemen lijken te werken, doch hun efficiëntie in vergelijking met *open* systemen moet verder geobjectiveerd worden. Het gebruik van gesloten systemen valt op theoretische grond te verkiezen, doch gezien het huidige gebrek aan voldoende informatie naar efficiëntie toe, is de HGR van mening dat *open* systemen tijdelijk verder kunnen worden gebruikt.

3.4.3 Ovarieel en testiculair weefsel

De toepassing van cryopreservatie van ovarieel en testiculair weefsel door middel van vitrificatie staat nog in de kinderschoenen en wordt als zuiver experimenteel beschouwd. Twee studies rapporteren over het gebruik van vitrificatietechnieken voor menselijk ovarieel weefsel (Keros et al., 2009; Xiao et al., 2010). Traag gecontroleerd invriezen blijft hier voorlopig de standaard.

Vitrificatie van testiculair weefsel en zaadcellen staat alsnog in zijn kinderschoenen.

Besluit

Voor ovarieel en testiculair weefsel zijn deze technieken nog niet gebruiksklaar en het traag invriezen blijft de aanbevolen methode van cryopreservatie.

4. REFERENTIES

- AbdelHafez F, Desai N, Abou-setta A, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. . RBM Online 2010; 20:209-22.
- 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. RBM Online 2007; 14:72-9.
- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman M, Hamilton R, et al. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism, and blastocyst formation. Hum Reprod 23 2008; 23:1976-82.
- Belgisch Koninkrijk. Koninklijk besluit van 4 juni 2003, bijlage 4 – bijlage 15 betreffende de modaliteiten voor de regeling inzake medisch geassisteerde voortplanting. BS van 16 juni 2003. p. 32127.
- Bielanski A, Bergeron H, Lau P, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. Cryobiology 2003; 46:146-52.
- Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. Cryobiology 2000; 40:110-16.
- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. . Hum Reprod 2009; 24(10):2457-67.
- Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. Hum Reprod 2010; 25:2239-46.
- Cobo A, Romero J, Perez S, de los Santos M, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. Fertil Steril 2010; 94:1903-7.
- Desai N, Xu J, AbdelHafez F. Vitrification carriers and DNA damage: open versus closed systems for cryopreservation of cleavage and blastocyst stage embryos. Fertil Steril 2009; 92(3):349 Suppl 2009.
- Grout B., Morris J. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. Theriogenology 2009; 71:1079-82.
- HGR - Hoge Gezondheidsraad. Specifieke kwaliteitsnormen voor reproductieve weefsels en cellen. Brussel: HGR; 2009. Advies nr. 8292.
- Kader A, Choi A, Orief Y, Argawal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. Reprod Biol Endocrinol 2009; 16(7):99.
- Keros V, Xella S, Hultenby K, Petterson K, Sheiki M, Volpe A, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of ovarian tissue. Hum Reprod 2009; 24:1670-83.
- Kolibianakis E, Venetis C, Tarlatzis B. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? . Current Opinion in OB Gyn 2009; 21:270-4.
- Kuleshova L. Fundamentals and current practice of vitrification. In: Borini A, Coticchio G, editors. Preservation of human oocytes: from cryobiological science to clinical applications: Informa Healthcare United Kingdom; 2009. p. 63-1.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005; 11:300-8.
- 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(5):608-15.
- Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. RBM Online 2009; 19 suppl 4:4328.
- Nagy Z, Chang C, Shapiro D, Bernal D, Elsner C, Mitchel-Leef D, et al. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. . Fertil Steril 2009; 92:520-6.

- Oktay K, Cil A, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. . *Fertil Steril* 2006; 86:70-80.
- Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, Liliana R, Nicolosi A, Claudia S, et al. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *RBM Online*: doi: 10.1016/j.rbmo. 2010. Available from: URL:< [http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)00722-4/abstract](http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)00722-4/abstract)>
- Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni G, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. . *Fertil Steril* 2010; 94:1525-28. Internet: accessed.
- Pegg D. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. 5. *Hum Fertil* 2005; 8:231-9.
- Pomeroy K, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, et al. Storage of cryopreserved tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. . *Fertil Steril* 2010; 94:1181-8.
- Portmann M, Nagy Z, Behr B. Evaluation of blastocyst survival following vitrification/warming using to different closed carrier systems. . *Hum Reprod Suppl*, in press 2010.
- Rienzi L, Romano S, Albricci L, Magiulli R, Capalbo A, Baroni E, et al. Embryo development of fresh versus vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010; 25(66-73).
- Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified Mouse oocytes and the recrystallization of intracellular ice. *Biol Reprod* 2008; 79:727-37.
- Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of Mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009; 59:75-82
- Smith G, Serafini P, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vittification. . *Fertil Steril* 2010; 94:2088-95.
- Stachecki J, Garrisi J, Sabino S, Caetano J, Wiemer K, Cohen J. A new safe, simple ans successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *RBM Online* 2008; 17:360-7.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006; 65:236-44.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Vitrification of procine embryos using the open-pulled straw (OPS) method. . *Acta Vet Scand* 1997; 38:349-52.
- Vajta G, Kuwayama M, Van der Zwalmen P. Disadvantages and benefits of vitrification. . In: Tucker M, Liebermann J, editors. *Vitrification in assisted reproduction: a user's manual and trouble shooting guide*: Informa Healthcare United Kingdom; 2007. p. 33-44.
- Vajta G, Nagy Z. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *RBM Online* 2006; 12:779-96.
- Van der Zwalmen P, Zech N, Lejeune B, Wirtleiner B, Zech M, Ectors F. Vitrification and the use of high concentrations of cryoprotectants: is it a justified argument to prefer slow freezing? *Gyn Ob Fertil* 2010; 38(9):536-40.
- Van der Zwalmen P, Zech N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Papatheodorou A, Lejeune B, et al. Closed carrier device: a reality to vitrify ovocytes and embryos in aseptic condition. *Gyn OB Fertil* 2010; 38(9):541-6.
- Wilding M., Capobianco C., Montanaro N., Kabili G., Di Matteo L., Fusco E., Dale . Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 27: 549-554, 2010.
- Xiao Z, Wang Y, Lei L, Lou S, Shan-wei L. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril* 2010; 94:2323-8.
- Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007; 67:81-9.

5. SAMENSTELLING VAN DE WERKGROEP

Al de deskundigen hebben **op persoonlijke titel** aan de werkgroep deelgenomen. De namen van de deskundigen van de HGR worden met een asterisk * aangeduid.

De volgende deskundigen hebben hun medewerking verleend bij het opstellen van het advies:

DE SUTTER Petra*	gynaecologie, voortplantingsgeneeskunde	UZ Gent
THONON Fabienne*	voortplantingsgeneeskunde, embryologie	CHR de la Citadelle de Liège
VANSTEENBRUGGE Anne*	embryologie	CHR Namur
VAN DEN ABBEEL Etienne*	embryologie	UZ Gent

Het voorzitterschap werd verzekerd door Petra DE SUTTER en het wetenschappelijk secretariaat door Muriel BALTES.

De volgende experts hebben het advies herlezen en goedgekeurd:

ANGENON Elyane*	verpleegkunde, transplantatiecoördinator	ULB
BAUDOUX Etienne*	geneeskunde, celtherapie	Ulg
BEELE Hilde*	geneeskunde, dermatologie	UZ Gent
DELFORGE Alain*	geneeskunde, celtherapie	ULB
DELLOYE Christian*	geneeskunde, orthopedische chirurgie	UCL
GUNS Johan*	medisch-sociale wetenschappen	UZ Brussel
MUYLLE Ludo*	geneeskunde, klinische biologie	FAGG Vigilantie - UZA
PIRNAY Jean-Paul*	medische wetenschappen	LabMCT HCB-KA
VAN GEYT Caroline*	medisch-sociale wetenschappen	UZ Gent
VAN RIET Ivan*	geneeskunde, celtherapie	UZ Brussel
VANDERKELEN Alain*	geneeskunde, algemene chirurgie	EHB
VERBEKEN Gilbert*	biologie, QA/QC/RA	LabMCT HCB-KA

De administratie werd vertegenwoordigd door:

BONTEZ Walter	Coördinatie bloed, cellen, weefsels en organen	FAGG
VANTHUYNE Karen	Coördinatie bloed, cellen, weefsels en organen	FAGG

Het voorzitterschap werd verzekerd door Hilde BEELE en het wetenschappelijk secretariaat door Muriel BALTES.

Over de Hoge Gezondheidsraad (HGR)

De Hoge Gezondheidsraad is een federale dienst die deel uitmaakt van de FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu. Hij werd opgericht in 1849 en geeft wetenschappelijke adviezen i.v.m. de volksgezondheid aan de ministers van volksgezondheid en van leefmilieu, aan hun administraties en aan enkele agentschappen. Hij doet dit op vraag of op eigen initiatief. De HGR neemt geen beleidsbeslissingen, noch voert hij ze uit, maar hij probeert het beleid inzake volksgezondheid de weg te wijzen op basis van de recentste wetenschappelijk kennis.

Naast een intern secretariaat van een 25-tal medewerkers, doet de Raad beroep op een uitgebreid netwerk van meer dan 500 experts (universiteitsprofessoren, medewerkers van wetenschappelijke instellingen), waarvan er 200 tot expert van de Raad zijn benoemd; de experts komen in multidisciplinaire werkgroepen samen om de adviezen uit te werken.

Als officieel orgaan vindt de Hoge Gezondheidsraad het van fundamenteel belang de neutraliteit en onpartijdigheid te garanderen van de wetenschappelijke adviezen die hij aflevert. Daartoe heeft hij zich voorzien van een structuur, regels en procedures die toelaten doeltreffend tegemoet te komen aan deze behoeften bij iedere stap van het tot stand komen van de adviezen. De sleutelmomenten hierin zijn de voorafgaande analyse van de aanvraag, de aanduiding van de deskundigen voor de werkgroepen, het instellen van een systeem van beheer van mogelijke belangenconflicten (gebaseerd op belangenverklaringen, onderzoek van mogelijke belangenconflicten, en een referentiecomité) en de uiteindelijke validatie van de adviezen door het College (eindbeslissingorgaan). Dit coherent geheel moet toelaten adviezen af te leveren die gesteund zijn op de hoogst mogelijke beschikbare wetenschappelijke expertise binnen de grootst mogelijke onpartijdigheid.

De adviezen van de werkgroepen worden voorgelegd aan het College. Na validatie worden ze overgemaakt aan de aanvrager en aan de minister van volksgezondheid en worden de openbare adviezen gepubliceerd op de website (www.hgr-css.be), behalve wat betreft vertrouwelijke adviezen. Daarnaast wordt een aantal onder hen gecommuniceerd naar de pers en naar doelgroepen onder de beroepsbeoefenaars in de gezondheidssector.

De HGR is ook een actieve partner binnen het in opbouw zijnde EuSANH netwerk (European Science Advisory Network for Health), dat de bedoeling heeft adviezen uit te werken op Europees niveau.

Indien U op de hoogte wil blijven van de activiteiten en publicaties van de HGR kan U zich abonneren op een mailing-list en/of een RSS-feed via volgende link: <http://www.hgr-css.be/rss>.