

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

STECHER A, NIJS M, VANDAMME B, VANDERZWALMEN P, ZECH H, ZECH I
Embryonalentwicklung in sequentiellen Kulturmedien

*Journal für Fertilität und Reproduktion 1999; 9 (3) (Ausgabe für
Österreich), 7-11*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

EMBRYONALENTWICKLUNG IN SEQUENTIELLEN KULTURMEDIEN

Summary

In in vitro fertilisation the embryo transfer is done usually on day 2 or 3. It is common to transfer 2 or 3 embryos in order to overcome the low implantation rate and to improve the pregnancy rate. In vivo the embryo reaches the uterus not before the morula or blastocyst stage. A better synchronisation can be achieved between uterus and developmental stage with transfer of day 5 embryos. The embryos can be selected regarding to the potential of development or regarding to the activation of the embryonic genome for example. Cultivation until day 5 can be done with sequential media which consider the changing requirements of the embryo during its development and differentiation.

We looked at (a) the developmental potential of embryos in two different sequential media (IVF50-S2 or S1-S2) and (b) at two different culture systems (in

micro droplets under oil or in big volume without oil). Ad (a) 34% of the supernumary embryos developed to the blastocyst stage in IVF50-S2 and 29% in S1-S2. Supernumary embryos which showed quality grade A on day 2 developed more often to the blastocyst stage than embryos of grade B or C. The velocity of development was faster with S1-S2, but not significant in relation to IVF50-S2. Ad (b) We could find no significant difference between the two different culture systems.

The clinical application showed that for patients with repeated failure of implantation a high pregnancy rate with transfer of embryos on day 5 can be achieved. For 3 patients no transfer could be done because the embryos arrested earlier in their development. Transfer of morula on day 5 resulted in no pregnancy. But transfer of morula on day 4 resulted in a pregnancy rate of 33.3%.

ohne Öl). Ad (a): Es entwickelten sich 34% der nicht transferierten Embryonen in IVF50-S2 und 29% in S1-S2 bis zur Blastozyste weiter. Überzählige Embryonen, die am Tag 2 Qualität Grad A aufwiesen, entwickelten sich bedeutend öfter zu Blastozysten weiter als Embryonen der Qualität B und C. Die Entwicklungsgeschwindigkeit war mit S1-S2 etwas, aber nicht signifikant schneller im Vergleich zu IVF50-S2. Ad (b): Zwischen den beiden Kultursystemen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Die klinische Anwendung zeigt, daß bei Patienten mit wiederholt negativen Versuchen eine hohe Schwangerschaftsrate mit Transfer von Tag 5 Embryonen erzielt werden konnte. Bei 3 Patienten konnte kein Transfer vorgenommen werden, da sich ihre Embryonen alle nicht weiterentwickelten. Der Transfer von Morulae am Tag 5 resultierte in keiner Schwangerschaft. Transferierte man Embryonen, die bereits am Tag 4 im Morulastadium waren, so konnte eine Schwangerschaftsrate von 33,3% erreicht werden.

ZUSAMMENFASSUNG

In der *in vitro* Fertilisierung wird der Embryotransfer routinemäßig am Tag 2 oder 3 nach der Punktion vorgenommen. Oft werden 2 oder 3 Embryonen transferiert, um die niedrige Implantationsrate zu kompensieren und eine bessere Schwangerschaftsrate zu erzielen. *In vivo* erreichen Embryonen den Uterus erst im Morula- oder Blastozystenstadium. Durch Transfer von Embryonen am Tag 5 kann eine bessere Synchronisierung zwischen Uterus und Ent-

wicklungsstadium erreicht werden. Es können Embryonen z. B. bezüglich Entwicklungspotential und Aktivierung des embryonalen Genoms selektiert werden. Die Kultivierung bis Tag 5 kann mittels sequentiellen Medien, die die sich ändernden Bedürfnisse der Embryonen während ihrer Entwicklung berücksichtigen, erfolgen.

Wir untersuchten (a) das Entwicklungspotential von Embryonen in zwei verschiedenen sequentiellen Medien (IVF50-S2 oder S1-S2) und (b) in zwei verschiedenen Kultursystemen (in Mikrotropfen unter Öl oder in großem Volumen

EINLEITUNG

In der *in vitro* Fertilisierung wird der Embryotransfer routinemäßig am Tag 2 oder Tag 3 nach der Follikelpunktion vorgenommen. Die Implantationsraten sind relativ niedrig (ca. 12% pro Embryo). Deshalb werden oft 2 oder 3 Embryonen transferiert, um eine bessere Schwangerschaftsrate zu erzielen. Dadurch erhöht sich allerdings auch die Rate an Mehrlingschwangerschaften. Im Vergleich zur *in vitro* Fertilisierung erreicht

der Embryo *in vivo* den Uterus erst im Morula- oder im Blastozystenstadium (5 Tage nach der Ovulation). Deshalb liegt es nahe, daß ein Transfer von Blastozysten am Tag 5 die Schwangerschaftsrate und die Implantationsrate erhöht. Dadurch kann die Rate an Mehrlingsschwangerschaften reduziert werden [1], da nur 1 bis 2 Embryonen transferiert werden.

Es wird eine bessere Synchronisierung zwischen Uterus und Embryo-Entwicklungsstadium erreicht [2, 3]. Für den Transfer werden Embryonen mit einem maximalen Entwicklungspotential ausgewählt. Embryonen, bei denen keine vollständige Aktivierung des embryonalen Genoms erfolgt, oder die einem Entwicklungsstopp unterliegen, können damit ebenfalls identifiziert werden [1, 4].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Kultivierung zum Blastozystenstadium vorzunehmen. Dazu gehört die Co-Kultur mit somatischen Zelllinien [5], die eine sehr aufwendige Methode darstellt oder die Inkubation mit sequentiellen Medien, die seit ungefähr zwei Jahren durch neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Kultur in zellfreien Systemen entstanden sind [6–8]. Die sequentiellen Medien berücksichtigen die Änderungen der Ernährungspräferenzen der menschlichen Embryonen während ihrer Entwicklung und Differenzierung. Sie enthalten Komponenten, die für ein optimales Wachstum und für eine gute Entwicklung essentiell sind [9].

Wir untersuchten das Entwicklungspotential von Embryonen in zwei verschiedenen sequentiellen Medien und in zwei verschiedenen Kultursystemen.

MATERIAL UND METHODEN

Die Kultivierung von Eizellen und Embryonen (IVF und ICSI) wurde in 4-Well-Kulturschalen mit Kulturmedien von Scandinavian Science AB® durchgeführt. In einer ersten Studienreihe wurden die Eizellen am Tag der Punktions in IVF50 (Gruppe 1) oder S1 (Gruppe 2) eingebettet und fertilisiert. Der Embryotransfer erfolgte am Tag 2. Die überzähligen Embryonen wurden am Tag 3 in S2 transferiert und bis Tag 5 oder 6 weiterkultiviert und anschließend kryokonserviert.

In der zweiten Studienreihe wurde das Entwicklungspotential von Embryonen in Mikrotropfen (10 µl) unter Öl oder in einem großen Volumen (500–800 µl) ohne Öl verglichen. Bis zum Tag 3 wurde IVF50 Medium, ab Tag 3 S2 Medium verwendet.

Für die klinische Anwendung des Transfers von Embryonen am Tag 5 wurde die Kultivierung in IVF50 und anschließend in S2 in Mikrotropfen unter Öl vorgenommen.

ERGEBNISSE

Studienreihe 1: Entwicklungspotential überzähliger Embryonen in bezug auf Kulturmedium

Die Ergebnisse sind aus den Tabellen 1 und 2 ersichtlich.

Die Verteilung der Grad A Embryonen (Abb. 1) am Tag 2 betrug für die Gruppe 1 47,3%, für die Gruppe 2 46,3%. Die Qualität der überzähligen Embryonen für die Weiterkultivierung betrug am Tag 2 für Gruppe 1 36% Grad A, 36% Grad B und 28% Grad C, für Gruppe 2 30% Grad A, 31% Grad B, 38% Grad C. Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant.

Es entwickelten sich 34% (65/190) der überzähligen Embryonen von Gruppe 1 bis zum Blastozystenstadium (d. h. fBl, Bl und expBl) (Abb. 2, Tab 3). In Gruppe 2 entwickelten sich 29% (40/138) bis zur Blastozyste. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Der Anteil der sich schneller entwickelnden Embryonen (Bl. oder exp.

Tabelle 1: Vergleich der zwei Gruppen (IVF50-S2 versus S1-S2)

	IVF50-S2 (Gruppe 1)	S1-S2 (Gruppe 2)
Paare (n)	43	33
MII Eizellen (n)	377	296
Embryonen (n)/(%)	285/(76%)	220 (74%)
Embryonen für Transfer (n/ET)	95 (2,2)	82 (2,5)
für Weiterkultur (n)	190	138

Tabelle 2: Qualitätsverteilung der Embryonen am Tag 2

	IVF50-S2 (Gruppe 1)	S1-S2 (Gruppe 2)
Alle Embryonen am Tag 2		
Grad A (%)	135/285 (47,3 %)	102/220 (46,3 %)
<i>Überzählige Embryonen</i>		
Grad A	68 (36 %)	42 (30 %)
Grad B	69 (36 %)	43 (31 %)
Grad C	53 (28 %)	53 (38 %)

BI am Tag 5) betrug für Gruppe 1 20% (38/90) und für Gruppe 2 23% (32/138). Die Werte waren für Gruppe 2 leicht, aber nicht signifikant erhöht.

Aus Grad A Embryonen am Tag 2 entwickelten sich in beiden Gruppen bedeutend mehr Embryonen bis zur Blastozyste, als aus Embryonen des Grades B und des Grades C (Abb. 3). Zwischen den beiden Gruppen 1 und 2 war die Verteilung nicht signifikant unterschiedlich.

Die Prozentverteilung der sich schneller entwickelnden Embryonen (BI, expBI) war für Gruppe 2 höher als für Gruppe 1, allerdings nicht signifikant (Abb. 4). Dies zeigte sich sowohl für Grad A wie auch für Grad B Embryonen.

Studienreihe 2: Embryonen-Entwicklung in bezug auf das Kultursystem (Tab. 4)

In Mikrotropfen unter Öl entwickelten sich 41% (195/482), in großem Volumen 34% (65/190)

bis zur Blastozyste. Am Tag 5 waren 21% (102/482) im System mit Mikrotropfen und 20% (38/90) im großen Volumen bereits im Blastozystenstadium oder im expandierten Blastozystenstadium.

Klinische Anwendung (Tab. 5, 6, Abb. 5)

Für Patienten mit wiederholt negativen Versuchen konnten hohe Schwangerschafts- und Implantationsraten erzielt werden.

Es konnte keine Schwangerschaft mit Transfer an Tag 5 mit Embryonen im Morula-Stadium erzielt werden.

Abbildung 1: Beurteilung der frühen Embryonen

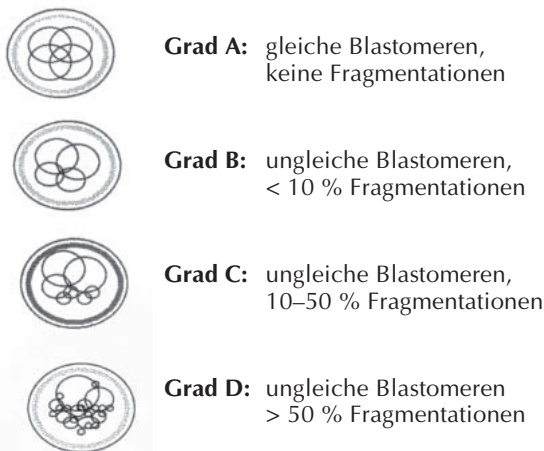
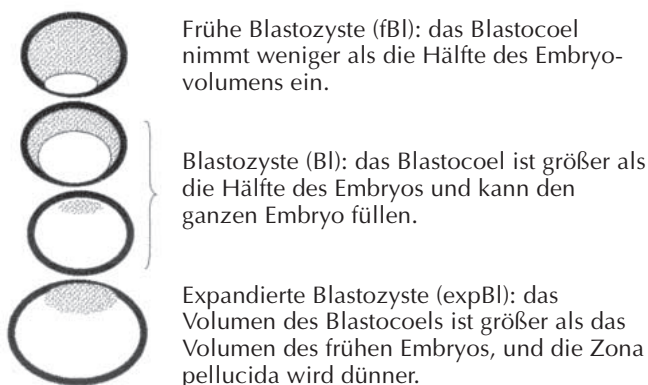


Abbildung 2: Beurteilung der Blastozysten: Scoring-System für humane Blastozysten [Gardner DK, unpublished data]



DISKUSSION

Es konnte gezeigt werden, daß mit den sequentiellen Medien IVF50-S2 (Gruppe 1) und mit

Abbildung 3: Prozentsatz an Blastozysten (fBI, BI, expBI) in bezug auf die Embryoqualität an Tag 2

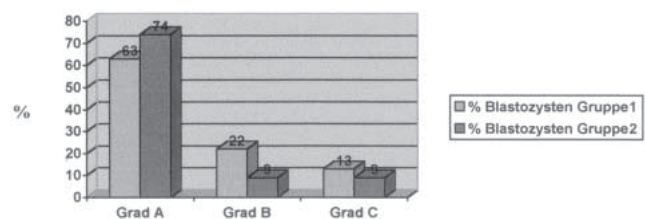
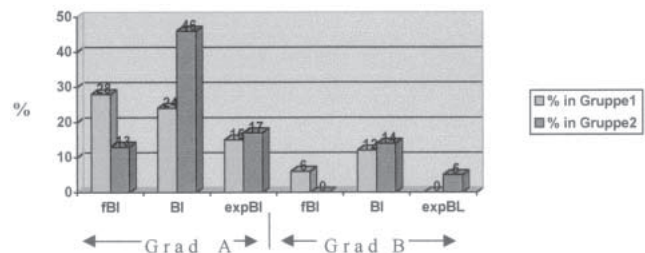


Abbildung 4: Prozentsatz an Blastozysten (fBI, BI, expBI) in bezug auf die Embryoqualität an Tag 2



S1-S2 (Gruppe 2) überzählige Embryonen bis zum Blastozystenstadium kultiviert werden können. Embryonen, die am Tag 2 nach der Follikelpunktion eine Qualität des Grades A aufwiesen, entwickelten sich bedeutend öfter zu Blastozysten weiter als Embryonen der Qualität B und C.

Die Entwicklungsgeschwindigkeit war mit S1-Medium schneller, aber es war diesbezüglich keine Signifikanz feststellbar. Die Zusammensetzung des S1 Mediums (v. a. der Gehalt an nicht-essentiellen Aminosäuren und das Fehlen der essentiellen Aminosäuren) im Vergleich zum IVF50 Medium scheint die Entwicklung der Embryonen (höherer Prozentsatz an Blastozyten und expandierten Blastozysten am Tag 5) besser zu unterstützen.

Zwischen den zwei Kultursystemen (Mikrotropfen oder großes Kulturvolumen) konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

In der klinischen Anwendung zeigte es sich, daß bei Patienten mit wiederholt negativen Versuchen hohe Schwangerschaftsraten mit Tag 5-Transfer erzielt werden konnten. Im Eileiter und im Uterus liegen unterschiedliche Bedingungen bezüglich des Nährstoffangebotes vor. Ein Transfer von sich teilenden Embryonen in den Uterus ist demzufolge zu früh [10, 11] und kann durch einen Transfer am Tag 5 besser synchronisiert werden.

Für 3 Patienten konnte kein Transfer am Tag 5 vorgenommen werden, weil alle Embryonen vorher in ihrer Entwicklung arretierten [12]. Ein Entwicklungsstopp kann allgemein durch Defekte im Zyto-

Tabelle 3: Entwicklung überzähliger Embryonen bis zum Blastozysten-Stadium

	IVF50-S2 (Gruppe1)	S1-S2 (Gruppe2)
Blastozysten (fBI, BI, expBI) (%)	65/190 (34)	40/138 (29)
Schnellere Blastozysten (BI, exp. BI)	38/ 90 (20)	32/138 (23 %)

Tabelle 4: Vergleich der Gruppen

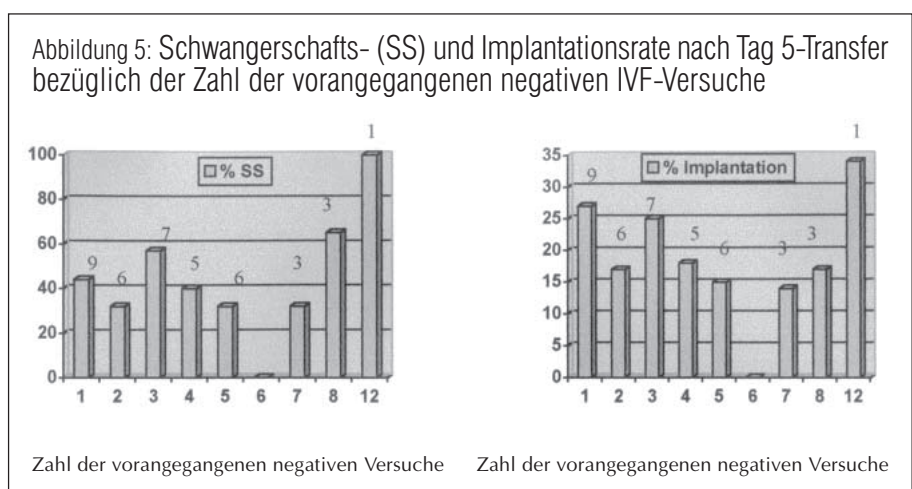
	Mikrotropfen	Großes Volumen
Paare (n)	69	43
MII Eizellen (n)	707	377
Embryonen (%)	482 (69%)	285 (76%)
Embryonen für Kultur (n)	482	190

Tabelle 5: Auflistung der Daten

Patienten (n)	45
Transfers (n)	42
Transferierte Embryonen (n)	99
Morula	26
Frühe Blastozyste	23
Blastozyste	32
Expandierte Blastozyste	18
Durchschnittl. Embryonen/Transfer	2,4
Schwangerschaftsrate (%)	20/42 (47,6)
Weitergehende Schwangerschaften (%)	18/42 (42,8)
Weitergehende SS-Rate/Patient mit Tag 5-Transfer-Protokoll (%)	18/45 (40)
Implantationsrate (16 Einlinge, 2 Zwillinge) (%)	20/99 (20,2)

Tabelle 6: Morula-Tansfer am Tag 4 oder Tag 5

	Tag 4	Tag 5
Transfer (n)	6	4
Morula transferiert (n)	11	11
Durchschnittl. Embryonen/Transfer	1,8	2,8
SS-Rate	2 (33,3%)	0
Weitergehende SS	2 (33,3%)	
Implantationsrate	20/99 (20,2%)	



plasma oder im embryonalen Genom verursacht werden [10, 13]. Das Risiko, daß sich eventuell kein Embryo bis zum Blastozystenstadium entwickelt, wurde

vorher mit den Patienten ausführlich besprochen.

Die Ergebnisse des Transfers von Embryonen im Morula-Stadium



Mag. rer. nat. Astrid Stecher

Geboren 1966 in Hard, Vorarlberg. Diplomstudium der Biologie an der Karl-Franzens-Universität Graz, im 2. Studienabschnitt Zoologie und Vertiefung in Mikrobiologie und Molekulargenetik, Biochemie und Immunologie. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie in Graz, Thema „Erzeugung einer *kdsA* temperatursensitiven Mutante in *E. coli*“. Sponsion 1993.

1993 bis 1995 Anstellung in der Lebensmittelbranche (Mikrobiologie und Spezialanalytik). Seit April 1995 am Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, Bregenz, tätig.

Korrespondenzadresse:
Mag. Astrid Stecher
Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie
A-6900 Bregenz, Römerstraße 2
e-mail: zech@ivf.at

am Tag 4 bzw. Tag 5 zeigen, daß die Entwicklungsgeschwindigkeit von Embryonen ausschlaggebend ist. Erreichten die Embryonen bereits am Tag 4 das Morula-Stadium und wurden am selben Tag transferiert, so konnte in 33,3% eine Schwangerschaft erzielt werden. Entwickelten sich die Embryonen erst am Tag 5 zur Morula, so konnte keine Schwangerschaft erzielt werden. Berücksichtigt man diese Beobachtungen, so wäre in unserer klinischen Anwendung die Schwangerschafts- und Implantationsrate weit höher, würde man die am Tag 5 transferierten Morula-Embryonen vernachlässigen.

Die Patientenzahlen sind in dieser Untersuchungsreihe sehr gering, doch kristallisiert sich die Tendenz heraus, daß am Tag 5 Embryonen idealerweise im frühen Blastozystenstadium sein sollten, um eine gute Schwangerschafts- und Implantationsrate zu erzielen. Es müssen noch größere Zahlen an Transfers am Tag 5 vorgenommen werden, um diese Ergebnisse zu bestätigen. Es fehlen noch prospektiv randomisierte Studien, die die Effizienz der Blastozysten-Kultivierung in sequentiellen Medien bestätigen.

Durch eine Optimierung des Timings der Umbettung von Embryonen in das zweite Medium und durch verbesserte *in vitro* Kultursysteme können sicherlich noch mehr Embryonen bis zum Blastozystenstadium kultiviert und in der Folge höhere Schwangerschafts- und Implantationsraten erzielt werden. Eine genauere Qualitätsbeurteilung von Blastozysten (Innere Zellmasse, Trophektoderm) sollte angestrebt werden, um die kompetentesten Embryonen zu transferieren [14]. Weitere Analysen von Nährstoffaufnahme und -metabolismus in der Zukunft werden weitere Verbesserungen der sequentiellen Medien mit sich bringen.

Literatur:

1. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367–82.
2. Ménézou YJR, Guerin J-F, Czyba J-C. Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990; 42: 301–6.
3. Turner K, Lenton EA. The influence of Vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotropin production *in vitro*. *Hum Reprod* 1996; 11: 1966–74.
4. Gardner DK, Vell P, Lane M et al. Culture and Transfer of human

- blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 69: 84–8.
5. Ménézou YJR., Hazout A, Dumant M et al. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. *Hum Reprod* 1992; 7: 101–6.
6. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. A prospective randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1996; 65: 1245–8.
7. Gardner DK, Lane M, Kouridakis K, Schoolcraft WB. Complex physiologically based serum-free culture media increase mammalian embryo development. In: Gomel V, Leung PCK. *In vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, Monduzzi Editore, Bologna 1997; 187–91.
8. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK et al. Evolution of a culture protocol for successful development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 169–77.
9. Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 1998; 49: 83–102.
10. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91–148.
11. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus free cells. *Fertil Steril* 1996; 65: 349–53.
12. Bolton VN, Hawes SM, Tayler CT, Parsons JH. Development of spare human preimplantation embryos *in vitro*: an analysis of the correlation among gross morphology, cleavage rates, and development to blastocyst. *J. In vitro Fertil Embryo Transfer* 1989; 6: 30–5.
13. Munné S, Alikani M, Tomkin G et al. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 64: 382–91.
14. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; 8: 2119–27.

NEUES AUS DEM VERLAG

Abo-Aktion

Wenn Sie Arzt sind, in Ausbildung zu einem ärztlichen Beruf, oder im Gesundheitsbereich tätig, haben Sie die Möglichkeit, die elektronische Ausgabe dieser Zeitschrift kostenlos zu beziehen.

Die Lieferung umfasst 4–6 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Das e-Journal steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) zur Verfügung und ist auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

➔ **Bestellung kostenloses e-Journal-Abo**

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)

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

Wir stellen vor:



Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Offizielles Organ: – Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen (AGRBM); – Berufsverband der Reproduktionsmedizinischen Zentren Deutschlands (BRZ); – Dachverband Reproduktionsbiologie und -medizin (DVR); – Dt. Gesellschaft für Andrologie (DGA); – Dt. Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF); – Dt. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM); – Deutsches IVF-Register (DIR); – Embryologenforum Austria (EFA); – Österr. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie (OEGRM); – Sektion Reproduktionsbiologie und -medizin der Dt. Gesellschaft für Endokrinologie (SRBM/DGE)

Homepage: <http://www.kup.at/reproduktionsmedizin>