

Journal für

Gynäkologische Endokrinologie

Gynäkologie • Kontrazeption • Menopause • Reproduktionsmedizin

Sonderdruck aus
J Gynäkol Endokrinol 2011 (Österreich); 21 (3): 16–21

Aktuelles:
Eine prospektiv-randomisierte Studie zum Vergleich zweier Embryo-Kultursysteme nach IVF/ICSI: Sequential media in 5 % O₂-Atmosphäre und Single medium in 21 % O₂-Atmosphäre

P. Kemeter, J. Hajek, L. Carli, W. Feichtinger

**Offizielles Organ der Österreichischen
IVF-Gesellschaft**

**Offizielles Organ der Österreichischen
Menopausegesellschaft**

www.kup.at/gynaekologie

Indexed in EMBASE/Scopus/Excerpta Medica

Member of the



Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P.b.b. GZ07Z037636M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

Aktuelles: Eine prospektiv-randomisierte Studie zum Vergleich zweier Embryo-Kultursysteme nach IVF/ICSI: Sequential media in 5 % O₂-Atmosphäre und Single medium in 21 % O₂-Atmosphäre

P. Kemeter, J. Hajek, L. Carli, W. Feichtinger

■ Einleitung

Es hat sich in den vergangenen Jahren zunehmend herausgestellt, dass eine reduzierte (physiologische) Sauerstoff-Spannung in Inkubatoren für die Eizell- und Embryokultur zu einer besseren In-vitro-Entwicklung führt und auch die Schwangerschafts- und Lebendgeburtenrate gegenüber der Kultur in atmosphärischer O₂-Konzentration erhöht [1–4].

Was die Kulturmedien betrifft hat man angenommen, dass Sequential media notwendig sind, um eine optimale Entwicklung menschlicher Embryonen bis zum Blastozystenstadium zu erreichen, und zwar wegen der unterschiedlichen Sekretzusammensetzung von Tube und Uterus und wegen des sich ändernden Metabolismus des Embryos während seiner Entwicklung [5, 6].

Diesem „Zurück zur Natur“-Konzept folgend sind verschiedene Medien für die verschiedenen Phasen der Embryonalentwicklung, basierend auf Tierstudien, entwickelt worden, die zeigten, dass sich der Energiebedarf und die Aminosäurezusammensetzung des Embryonen von der prägenomischen zur postgenomischen Aktivierung ändert [7–10]. Tatsächlich zeigte auch eine erste Studie mit Sequential media beim Menschen, dass sich die Qualität der Blastozysten und deren Implantationspotenzial gegenüber Single media signifikant erhöhen ließ. [5].

Unabhängig von der Medienzusammensetzung hat es sich eingebürgert, das Kulturmedium in gewissen Intervallen aufzufrischen, in der Annahme, damit der möglichen Ansammlung von Ammonium, einem Abbauprodukt von Aminosäuren und atmosphärischen Substanzen, entgegenzuwirken. Single media versorgen den Embryo zu allen Zeiten mit Aminosäuren, weswegen ihre Verwendung ein höheres Risiko für die Entstehung von toxischen Aminosäuren in sich birgt als die Verwendung von Sequential media. Allerdings wurde in modernen Single media die Aminosäure Glutamin, die Hauptquelle von Ammonium, durch eine stabilere Form von Glutamin ersetzt und es

konnten sodann mit Sequential media vergleichbare Resultate erzielt werden, was die Embryonalentwicklung betrifft [11–13].

Die Intention der vorliegenden Studie war es herauszufinden, ob die neue Kulturmethode (Gruppe II: Sequential media in reduzierter O₂-Atmosphäre; 5 % O₂) bessere Resultate geben würde als die Routinemethode (Gruppe I: Single medium in Luft-Atmosphäre; 21 % O₂).

■ Material und Methoden

Es wurden nur Standardmethoden der ART („Assisted Reproductive Technology“) verwendet. Verglichen wurde die Embryo-Kultur in zwei verschiedenen kommerziell erhältlichen Medien bei zwei verschiedenen O₂-Konzentrationen in der Atmosphäre, beide weitverbreitet in der ART beim Menschen. Es wurden keine experimentellen Behandlungen durchgeführt. Deshalb war die Genehmigung durch ein *Institutional Review Board* nicht erforderlich.

Studiendesign

Die prospektive, randomisierte, unverblindete Studie wurde mit Patientinnen des regulären IVF-Programms unserer Klinik in der Zeit von Februar bis August 2009 durchgeführt. Es wurden nur Patientinnen in die Studie aufgenommen, die ihren ersten Behandlungszyklus bei uns absolvierten und bei welchen 2 Tage vor der Eizellentnahme per Ultraschall mindestens ein ovarieller Follikel größer als 16 mm nachweisbar war. Die zugrundeliegenden Diagnosen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Randomisierung erfolgte 2 Tage vor der Eizellentnahme, sodass der komplette Behandlungszyklus in der vorprogrammierten Weise, was die Kulturbedingungen und die Inkubator-Atmosphäre betraf, durchgeführt werden konnte.

Berechnung der Probandinnen-Anzahl

Der primäre Endpunkt für die Berechnung der Größe des Samples war die biochemische Schwangerschaftsrate (hCG-β > 10 mU/ml Serum). Sekundäre Endpunkte waren: Fertilisationsrate, Teilungsrate, Top-Qualitätsrate der Embryonen, Tag des Transfers nach Eizellgewinnung, Zahl der transferierten Embryonen, Implantationsrate, Lebendgeburts-Implantationsrate, klinische Schwangerschaftsrate, Lebendgeburtenrate und Zahl der kryokonservierten Embryonen. In einer ähnlich strukturierten Studie [1] war die biochemische Schwangerschaftsrate in der Studiengruppe 36,7 % (5 % O₂-Atmosphäre) und in der Kontrollgruppe 25,0 % (21 % O₂-Atmosphäre). Bei Antizipation einer Mindestdifferenz von 30 % zwischen den biochemischen Schwangerschaftsraten mit einer Power von 80 % und

Tabelle 1: Alter der Patientinnen und ihre Infertilitätsdiagnosen

	Gruppe I			Gruppe II			p
	N	X/SD	%	N	X/SD	%	
Alter (Jahre)	114	35,8 / 5,5		116	36,2 / 5,7		0,59
Infertilitätsdiagnosen							
Männlicher Faktor	48	42,1		37	31,9		
Tubar	28	24,6		21	18,1		
Hormonell	20	17,5		37	31,9		
Gemischt	9	7,9		9	7,8		
Ungeklärt	9	7,9		12	10,3		0,10

einem α -Fehler von 5 % konnte ein Sample von 240 Patientinnen errechnet werden.

Allerdings konnten Unterschiede schon früher entdeckt werden. Deshalb wurden die Endpunkt-Berechnungen kontinuierlich schon während der Studie durchgeführt, um eventuelle Behandlungseffekte früher erkennen zu können.

Randomisierung

Insgesamt wurden 261 Patientinnen in 4 Altersgruppen (≤ 34 , 35–37, 38–40 und ≥ 41 Jahre) – um einen eventuellen Einfluss des Alters auszuschließen – per Zufall einer von 2 Behandlungsgruppen zugeteilt (Abb. 1). Die prospektive Randomisierung erfolgte paarweise durch Münzwurf. Wenn die eine Patientin der Gruppe I zugeordnet wurde, so wurde die nächste der Gruppe II zugeordnet und umgekehrt.

Ovarielle Stimulation und ART (Artifizielle Reproduktionstechnik)

Unsere Standard-IVF/ICSI-ET-Methode wurde andernorts publiziert [14] und verschiedene Behandlungsformen sind, geteilt in Gruppe I und II, in Tabelle 2 aufgelistet.

Kulturbedingungen

Gameten und Embryonen wurden bei 37,0 °C entweder in einer Atmosphäre von 7,0 % CO₂ in Luft (21 % O₂) in einem kommerziellen Universal-Kultur-Medium (GM501 Cult, Gynemed, Lensahn, Deutschland) (n = 114), kurz Single medium genannt, oder in 7,0 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂, in 3 verschiedenen Medien nacheinander, den sog. Sequential media (Cook, Sydney IVF, Queensland, Australia) (n = 116), kultiviert.

Alle Medien sowie das Übersichtungs-Öl und die präparierten Mikrotropfen wurden über Nacht in den zugeordneten Inkubatoren mit entsprechender Atmosphäre vorinkubiert. Nach der Eizellentnahme wurden die Eizellen der Gruppe I in der GM501 Waschlösung gespült und in 600 µl GM501 Kulturmedium unter Öl bei 37 °C in einer Atmosphäre von 7,0 % CO₂ in Luft in 4 konventionellen, befeuchteten Inkubatoren (2 identische Cellmate-Inkubatoren, <genX> International, und 2 identische Mini Galaxy A CO₂-Inkubatoren, RS Biotech) inkubiert. Nach 3–6 Stunden erfolgte die Insemination oder die ICSI. Die In-vitro-Insemination wurde in 600 µl äquilibriertem GM501 Kulturmedium unter Öl durchgeführt. Eizellen, in die Spermien injiziert worden waren, wurden im gleichen äquilibrierten Medium in 30 µl Mikrotropfen über Nacht unter Öl inkubiert. Nach 16–19 Stunden wurden alle normal fertilisierten Eizellen (2 PN) gewaschen und in frische 30 µl Mikrotropfen des äquilibrierten GM501 Kulturmediums unter Öl transferiert und in ihre vorbestimmten Inkubatoren gebracht. Am Tag 2 wurden die Embryonen begutachtet und ohne Auffrischung des Mediums weiter inkubiert oder den Patientinnen in den Uterus transferiert. Am Tag 3 wurden die Embryonen begutachtet und entweder den Patientinnen transferiert oder kryokonserviert, oder es wurde die Inkubation in 30 µl Tropfen desselben aufgefrischten, äquilibrierten Mediums bis zum Blastozystenstadium verlängert.

Die Eizellen der Gruppe II wurden im Sydney IVF Gamete Buffer gespült und dann 3–6 Stunden bei 37 °C im Sydney IVF Fertilization Medium im Bench-top-Inkubator K-Minc 1000

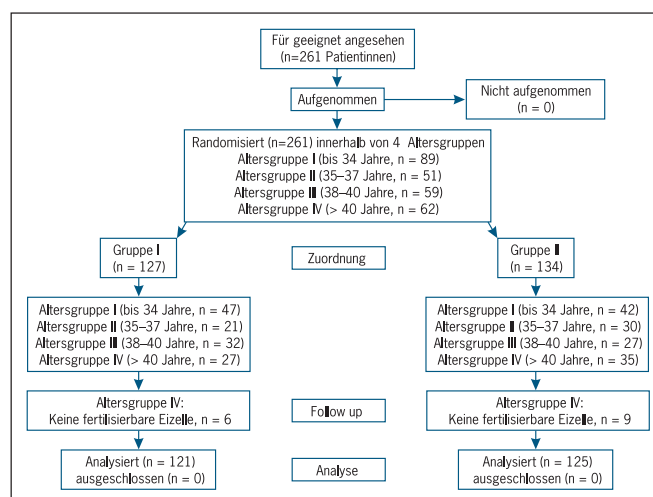


Abbildung 1: Flussdiagramm des Randomisierungsprozesses

(Cook Australia), in einer Atmosphäre von 7,0 % CO₂ und 5 % O₂ kultiviert. Nach der Insemination oder nach ICSI wurden sie in 30 µl Tropfen des äquilibrierten Sydney IVF Fertilization Mediums überschichtet mit Öl über Nacht inkubiert. Am Tag 1 wurden alle normal fertilisierten Eizellen gespült und in frische 30 µl Tropfen des äquilibrierten Sydney IVF Cleavage Mediums unter Öl transferiert. Am Tag 2 wurden sie begutachtet und entweder den Patientinnen transferiert oder zurück in den Inkubator gebracht, ohne das Medium aufzufrischen. Am Tag 3 wurde die Qualität der Embryonen begutachtet und sie wurden entweder den Patientinnen transferiert oder kryokonserviert, oder in 30 µl Tropfen des äquilibrierten Sydney IVF Blastozystenmediums weiter kultiviert bis zum Tag 5 oder 6 und dann im Blastozysten-Stadium transferiert.

Der pH-Wert eines Kulturmediums hat eine inverse Relation zur CO₂-Konzentration in der Atmosphäre nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung, wobei die Bikarbonat-Konzentration den größten Einfluss auf den pH-Wert hat. Da aber auch verschiedene andere Faktoren den pH beeinflussen, wie die Temperatur, der Luftdruck und die lokale Seehöhe, wurde der pH-Wert wöchentlich mit dem Mikroprozessor-pH-Meter pH 95 (WTW) gemessen, um den pH im Bereich von 7,20–7,40 zu halten.

Die Temperatur wurde täglich mit dem kalibrierten Thermometer Digitron (Research Instruments) gemessen.

Es wurden die Embryonen von höchstens drei Patientinnen zugleich in einem Inkubator inkubiert um eine Summation von Normalisierungsphasen der Temperatur und der Atmosphäre

Tabelle 2: ART- („Artificial Reproductive Technology“-) Spezifizierung

ART-Behandlungen	Gruppe I		Gruppe II		p
	N	%	N	%	
IVF	3	2,6	8	6,9	
ICSI	105	92,1	99	85,3	
TESE + ICSI	3	2,6	3	2,6	
IMSI + ICSI	3	2,6	4	3,4	
keine (unreife oder degenerierte Eizellen)	0	0,0	2	1,7	0,33

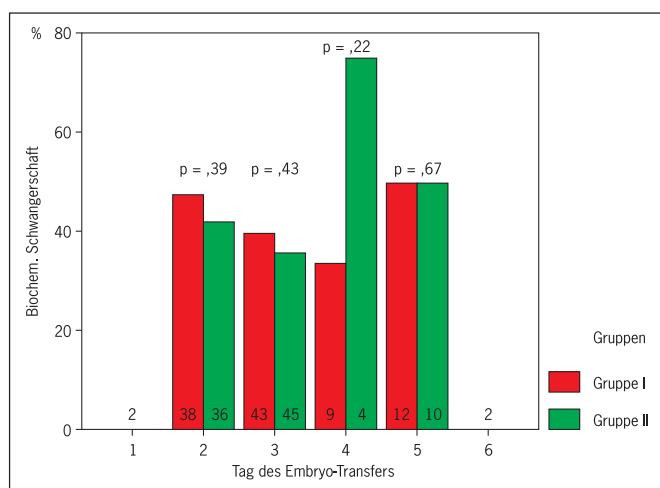


Abbildung 2: Transfers an den Tagen 1–6 nach der Eizellgewinnung und die daraus resultierenden biochemischen Schwangerschaften.

zu vermeiden, die entsteht, wenn die Inkubator-Türe oft hintereinander geöffnet wird (z. B. dauert die Normalisierung des CO₂ nach dem Öffnen eines Inkubators Galaxy Model 170, wenn die Türe 30 Sekunden geöffnet wird, 12 Minuten [15]).

Embryo-Transfer und Kryokonservierung

Die Embryonen wurden den Patientinnen an den Tagen 2, 3 und 5 nach der Eizellgewinnung transferiert, abhängig von deren Zahl und Qualität. In einigen wenigen Fällen wurden die Transfers auch an den Tagen 1, 4 und 6 durchgeführt. Typischerweise wurden die Embryonen früh transferiert, wenn die Zahl der fertilisierten Eizellen kleiner als 5 war und die Prognose auf Basis der Morphologie der Embryonen am Tag 2 oder 3 eher schlecht war. Mit dieser Strategie konnte die Wahrscheinlichkeit erfolgreich vermindert werden, dass für den Transfer keine lebensfähigen Embryonen vorhanden waren.

Statistik

Daten mit kontinuierlichen Zahlen wurden als Mittelwert (X) ± Standardabweichung (SD) angegeben und Daten mit binären Zahlen als Prozente. Der primäre Endpunkt (die biochemische Schwangerschaftsrate) wurde auch mittels der logistischen Regression analysiert. Die sekundären Endpunkte wurden wie die primären analysiert. Für den Vergleich von Gruppen mit kontinuierlichen Zahlen wurde der Student's T-Test angewandt und für den von Gruppen mit binären Zahlen der Chi²-Test. Eine Differenz wurde als signifikant bezeichnet, wenn $p \leq 0,05$ war.

Die normale ICSI-Fertilisationsrate wurde errechnet, indem die Zahl der durch ICSI gewonnenen 2-PN-Embryonen durch die Zahl an reifen (MII-) Eizellen dividiert wurde. Da es schwierig ist, die Reife der Eizelle durch den Kumulus zu beurteilen, haben wir die IVF-Fertilisationsrate so errechnet, dass wir die Zahl der mit IVF entstandenen 2-PN-Embryonen durch die Gesamtzahl der gewonnenen Eizellen dividiert haben. Die Teilungsrate ist definiert durch die Zahl an geteilten Embryonen, dividiert durch die Zahl normal fertilisierter (2-PN-) Eizellen. Top-Qualität-Embryonen (TQE) sind definiert durch Embryonen mit einem Morphologie-Score von 4 (4 = höchster, 1 = niedrigster Score, nach Bongso [16]). Die Implantationsrate ist definiert durch die sonographisch festgestellte Zahl intrauteriner Fruchtsäcke innerhalb von 8 Wochen nach dem Embryo-Transfer, dividiert durch die Zahl transferierter Embryonen. Die Lebendgeburts-Implantationsrate ist definiert durch die Zahl lebend geborener Kinder, dividiert durch die Zahl transferierter Embryonen. Die klinische Schwangerschaftsrate wurde errechnet, indem die Zahl der Patientinnen mit mindestens einem sonographisch festgestellten intrauterinen Fruchtsack innerhalb von 8 Wochen nach dem Transfer durch die Zahl der Patientinnen mit einer Eizellentnahme dividiert wurde. Die Lebendgeburtenrate schließlich ergibt sich aus der Zahl an Patientinnen mit einem oder mehreren lebend geborenen Kindern, dividiert durch die Zahl der Patientinnen mit einer Eizellentnahme.

Ergebnisse

Die logistische Regression zeigte kein signifikantes Ergebnis (LR = 0,92), womit die Null-Hypothese bestätigt wurde. Die Altersgruppen ($p = 0,0042$) und die Zahl transferierter Embryonen ($p = 0,0003$) waren signifikante Prädiktoren, im Gegensatz zu den biochemischen Schwangerschaften in beiden Untersuchungsgruppen ($p = 0,88$ und $0,96$).

Keine signifikanten Unterschiede fanden sich zwischen folgenden Gruppen: Normale Fertilisationsrate, Teilungsrate, Rate an Embryonen mit Top-Qualität, Tag des Transfers und Zahl der transferierten Embryonen (Tab. 4, Abb. 2), Zahl der kryokonservierten Embryonen und die Schwangerschaftsraten (Tab. 3). Weiters wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Implantationsraten, den klinischen Schwangerschaftsraten, den Lebendgeburts-Implantationsraten sowie den Lebendgeburtenraten, sowohl gesamt als auch in den einzelnen Altersgruppen, gefunden (Tab. 5), mit Ausnahme der klinischen Schwangerschaftsrate in der Altersgruppe ≥ 41 Jahre (Tab. 6), wo der Pro-

Tabelle 3: Fertilisationsraten, Parameter der Embryonalentwicklung, Kryokonservierungsraten und Schwangerschaftsraten

	Summe	Gruppe I X / SD	%	Summe	Gruppe II X/SD	%	p
Eizellen / Entnahmen	1081 / 114	9,5 / 6,4	100,0	1097 / 116	9,5 / 6,2	100,0	0,98
Reife Eizellen für ICSI / Eizellen	732 / 1081		67,7	667 / 1097		60,8	0,25
IVF-fertilisierte Eizellen / IVF-Eizellen	6 / 22		27,3	78 / 142		54,9	0,39
ICSI-fertilisierte Eizellen / reife Eizellen	560 / 732		76,5	469 / 667		70,3	0,20
Fertilisierte Eizellen total / Eizellen gesamt	566 / 1081		52,4	547 / 1097		49,9	0,23
Embryonen in Teilung / fertilisierte Eizellen	547 / 566		96,6	536 / 547		98,0	0,48
Top-Qualität-Embryonen / Embryonen in Teilung	154 / 547		28,2	155 / 536		28,9	0,72
Kryokonservierte Embryonen / Embryonen in Teilung	81 / 547		14,8	81 / 536		15,1	0,96
Pos. hCG / Entnahmen	44 / 114		38,6	37 / 116		33,6	0,26
Pos. hCG / ET	44 / 102		43,1	37 / 98		39,8	0,37

zentsatz in Gruppe I signifikant höher war (11,1 % vs. 0,0 %). Im Durchschnitt waren die Lebendgeburts-Implantationsrate (Tab. 5) und die Lebendgeburtenrate (Tab. 6) in Gruppe II höher und die Abortusrate (Tab. 7) in Gruppe II niedriger als in Gruppe I, allerdings weit entfernt von einer Signifikanz.

Diskussion

Überraschenderweise zeigte diese Studie in keinem der untersuchten Parameter mit Ausnahme der klinischen Schwangerschaftsrate in Altersgruppe ≥ 41 Jahre einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Dies steht im Gegensatz zu der früher durchgeführten prospektiv-randomisierten Studie, in der die Embryokultur im K-Minc 1000 Bench-top-Inkubator mit reduzierter O₂-Atmosphäre mit der Kultur in einem konventionellen Inkubator mit hoher O₂-Atmosphäre verglichen wurde, wobei in beiden Gruppen kommerzielle Sequential media verwendet wurden [1]. Dabei wurde in der Gruppe mit niedrigem O₂ eine signifikant höhere Fertilisations- und Teilungsrate und eine nicht signifikant höhere Schwangerschaftsrate ($p = 0,12$) gefunden.

Es ist natürlich sehr fragwürdig, Erklärungen für unterschiedliche Resultate von Studien zu finden, die viele Jahre auseinander liegen und unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt

wurden. Dennoch dürfte eine Differenz offensichtlich von Bedeutung sein: 2002 wurden im konventionellen Inkubator keine Kontrollmessungen durchgeführt; weder pH noch CO₂ wurden kontrolliert bei einer konstanten Einstellung der CO₂-Konzentration auf 5 %, so wie es der Hersteller damals empfohlen hatte. Im Gegensatz dazu wurde im K-Minc 1000 Bench-top-Inkubator die CO₂-Konzentration so gewählt, dass der pH-Wert im Bereich von 7,20–7,40 zu liegen kam. Damals war die biochemische Schwangerschaftsrate in der Gruppe mit niedrigem O₂ fast gleich wie in der jetzt vorliegenden Studie (36,7 % vs. 33,6 %), hingegen war sie viel niedriger im konventionellen Inkubator mit der hohen O₂-Konzentration (25,0 % vs. 38,6 %). In der jetzigen Studie wurden die pH-Werte in allen Inkubatoren laufend kontrolliert und, wenn nötig, durch Modifizierung der CO₂-Konzentration in den oben beschriebenen Normalbereich gebracht. Wir haben inzwischen gelernt, dass in unserem Labor eine Mindestkonzentration von 6 % CO₂ notwendig ist, um den pH im Bereich von 7,20–7,40 halten zu können. Wir können deshalb annehmen, dass 2002 die pH-Werte im konventionellen Inkubator die meiste Zeit oberhalb des Bereichs für eine optimale Embryoentwicklung lagen, was als Hauptgrund für die niedrigere Schwangerschaftsrate angesehen werden kann.

In der Zwischenzeit haben gut geplante, prospektiv-randomisierte Studien den vorteilhaften Effekt der Kultur mit niedriger

Tabelle 4: Anzahl transferierter Embryonen an den Tagen 1–6 nach Eizellgewinnung

	Gruppe I			Gruppe II			p
	Anzahl/Gesamt	X / SD	%	Anzahl/Gesamt	X/SD	%	
Transfer-Tag 1	0 / 2		0,0	2 / 2	1,0 / 0,0	100,0	
Transfer-Tag 2	70 / 137	1,84 / 0,59	51,1	67 / 137	1,86 / 0,59	48,9	0,99
Transfer-Tag 3	88 / 173	2,04 / 0,63	50,9	85 / 173	1,89 / 0,53	49,1	0,28
Transfer-Tag 4	16 / 23	1,77 / 0,44	70,6	7 / 23	1,75 / 0,50	29,4	0,71
Transfer-Tag 5	25 / 45	2,08 / 0,51	55,0	20 / 45	2,00 / 0,47	45,0	0,90
Transfer-Tag 6	0 / 2		0,0	2 / 2	1,00 / 0,0	100,0	
Gesamt-Transfer	199 / 382	1,95 / 0,59	52,1	183 / 382	1,87 / 0,55	47,9	0,47

Tabelle 5: Implantationsergebnisse der 4 Altersgruppen

Alter (Jahre) (Patientinnen pro Gruppe)	Implantation*			Lebendgeburts-Implantation**		
	Gruppe I	Gruppe II	p	Gruppe I	Gruppe II	p
≤ 34 (87)	26 / 95 (27,4 %)	23 / 71 (32,4 %)	0,86	15 / 95 (15,8 %)	21 / 71 (29,6 %)	0,14
35–37 (47)	11 / 32 (34,4 %)	14 / 41 (34,1 %)	0,20	4 / 32 (12,5 %)	10 / 41 (24,4 %)	0,31
38–40 (52)	9 / 50 (18,0 %)	5 / 46 (10,9 %)	0,11	4 / 50 (8,0 %)	1 / 46 (2,2 %)	0,23
≥ 41 (44)	2 / 22 (9,1 %)	0 / 25 (0,0 %)		0 / 22 (0,0 %)	0 / 25 (0,0 %)	
Total (230)	48 / 199 (24,1 %)	42 / 183 (23,0 %)	0,72	21 / 199 (10,6 %)	24 / 183 (13,1 %)	0,30

*Zahl der sonographisch festgestellten Fruchtsäcke 8 Wochen nach dem Embryo-Transfer dividiert durch die Zahl der transferierten Embryonen

**Zahl der lebend geborenen Kinder dividiert durch die Zahl der transferierten Embryonen

Tabelle 6: Klinische Schwangerschaften und Lebendgeburtenraten der 4 Altersgruppen

Alter (Jahre) (Patientinnen pro Gruppe)	Klinische Schwangerschaften*			Lebendgeburten**		
	Gruppe I	Gruppe II	p	Gruppe I	Gruppe II	p
≤ 34 (79)	19 / 47 (40,4 %)	14 / 40 (35,0 %)	0,38	13 / 90 (18,9 %)	24 / 73 (31,5 %)	0,22
35–37 (43)	6 / 20 (30,0 %)	11 / 27 (40,7 %)	0,32	4 / 32 (12,5 %)	10 / 42 (23,8 %)	0,60
38–40 (50)	6 / 29 (20,7 %)	5 / 23 (21,7 %)	0,45	6 / 55 (10,9 %)	2 / 47 (4,3 %)	0,34
≥ 41 (34)	2 / 18 (11,1 %)	0 / 26 (0,0 %)	0,028	3 / 26 (11,5 %)	0 / 27 (0,0 %)	0,26
Total (230)	33 / 114 (28,9 %)	30 / 116 (25,8 %)	0,60	25 / 118 (21,2 %)	26 / 120 (21,7 %)	0,53

* Zahl der Patientinnen mit zumindest einem sonographisch festgestellten Fruchtsack 8 Wochen nach dem Embryo-Transfer dividiert durch die Zahl der Patientinnen mit Eizellentnahmen

**Zahl der Patientinnen mit zumindest einem lebend geborenen Kind dividiert durch die Zahl der Patientinnen mit Eizellentnahmen

Tabelle 7: Schwangerschaftsverläufe bzw. Ausgang der Schwangerschaften

	Gruppe I (N = 44)		Gruppe II (N = 37)		p
	N	%	N	%	
Biochemische Schwangerschaft (hCG > 10 mU/ml)	9	20,5	7	18,9	
Abortus	8	18,2	3	8,1	
Extrauterine Schwangerschaft	0	0,0	1	2,7	
Ein Kind geboren	20	45,5	17	45,9	
Zwillinge geboren	5	11,36	9	24,3	
Drillinge geboren	2	4,5	0	0,0	0,27

O₂-Atmosphäre bestätigt [2–4]. Insbesondere wurden eine raschere Teilung und eine bessere Morphologie der Embryonen vom Frühstadium bis zum Blastozysten-Stadium nachgewiesen [2]. Die klinischen Resultate wurden hingegen nur geringfügig verbessert. Nur wenn Schwangerschaften, die nach Kryokonservierung und Wiederauftauen der Embryonen entstanden waren, bei der Berechnung miteinbezogen wurden, war die kumulative Schwangerschaftsrate in der Gruppe mit niedrigem O₂ signifikant höher [4].

Meintjes et al. [3] verwendeten auch Sequential media und fanden signifikant höhere Raten an Implantationen, Lebendgeburts-Implantationen, klinischen Schwangerschaften und Lebendgeburten bei Behandlungen mit niedrigem O₂ verglichen mit hohem O₂. Sie verwendeten P-I Medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), sowie G1- und G2-Medium (Vitrolife, Göteborg, Schweden), welche die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von humanem Serum Albumin (HSA) vor der Verwendung benötigen. Cooks Sequential media hingegen sind gebrauchsfertig und benötigen keine Zusätze. Die Konzentrationen der anderen Bestandteile der kommerziellen Medien werden von den Firmen leider nicht publiziert.

Biggers und Racowsky konnten keinen Vorteil der Sequential media gegenüber Single media finden [11] und Macklon et al. fanden sogar, dass Single media den Sequential media überlegen sind, was die Embryoentwicklung und den Schwangerschafts-Outcome betrifft [12]. Perin et al. [17] konnten zeigen, dass das kommerzielle KSOM Single medium den Sequential G1/G2 media im Maus-IVF-Modell überlegen ist, sowohl was die Entwicklung von der Zygote zur Blastozyste als auch was den signifikant höheren Prozentsatz an Blastozysten hoher Qualität betrifft. In einer Studie von Pommeroy et al. [18] war der Prozentsatz an transfergeeigneten Blastozysten signifikant höher nach Kultur in einem Single medium verglichen mit Sequential media oder Split media ($p < 0,0005$). Schneider et al. [19] fanden einen signifikant höheren Anteil an Morula-Stadien am Tag 4 bei Embryonen, die im Global single medium kultiviert wurden im Vergleich zu G1/G2-Sequential media, allerdings war die Blastulationsrate sehr ähnlich. Sepulveda et al. [20] untersuchten ausschließlich Eizellen und Embryonen von sorgfältig ausgesuchten Eizellspenderinnen und konnten dadurch die große Variabilität der Eizellqualität, die ja bei infertilen Frauen gefunden wird, deutlich reduzieren und sie fanden nicht nur eine signifikant bessere In-vitro-Entwicklung der Embryonen bis zum Blastozystenstadium, sondern auch eine signifikant bessere Implantationsrate in der Single-medium-

Kultur im Vergleich zur Sequential-medium-Kultur. Reed et al. [21] fanden in ihrer „Sibling Embryo Study“ einen signifikant höheren Mittelwert an Blastozysten am Tag 5 nach kontinuierlicher (ohne Medienauffrischung) Kultur im Single medium im Vergleich zu Sequential media und es wurden signifikant mehr Blastozysten aus der Single-medium-Gruppe für den Transfer ausgesucht als aus der Sequential-media-Gruppe, die Ratio war rund 2:1).

Paternot et al. [22] verglichen die gleichen Medien, die wir in dieser Studie verglichen haben, und fanden eine signifikant höhere Fertilisationsrate und ein signifikant häufigeres Auftreten eines zytoplasmatischen „Halos“ in den Zygoten (ein Zeichen, das positiv mit der Embryoqualität und der Schwangerschaftsrate korreliert [8, 23, 24]). Weiters fanden sie signifikant mehr Blastomeren an den Tagen 2 und 3 in den Embryonen, welche im Single medium kultiviert wurden, und diese zeigten auch eine signifikant höhere Utilisationsrate (Embryonen, die für den ET oder die Kryokonservierung verwendet werden können, dividiert durch die Gesamtzahl der Embryonen) im Vergleich zu Embryonen nach Kultur in Sequential media. Diese Ergebnisse werden durch die Schlussfolgerung einer jüngst erschienenen Übersichtsarbeit unterstützt [13], in der das Fehlen von deutlichen Beweisen für die Empfehlung von Sequential media auf Basis biologischer Fakten unterstrichen wird.

Ein Vergleich des GM501 Mediums mit dem Universal IVF Medium (Medicult, Copenhagen, Denmark), welches speziell für Embryonen im Teilungsstadium entwickelt wurde, zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Implantations- und Schwangerschaftsrate, aber eine signifikant niedrigere Abortusrate in der GM501-Medium-Behandlungsgruppe [25].

Devreker et al. [26] verglichen ihre selbst erzeugten Sequential media (Earle's + Aminosäuren) mit den kommerziell erhältlichen K-SICM sequential media (Cook, Sydney, Australia) und fanden keine signifikanten Unterschiede. Ben-Yosef et al. [27] hingegen berichtete eine signifikant niedrigere Teilungsrate, wenn Embryonen in den COOK IVF media (Cook, Sydney, Australia) kultiviert wurden, verglichen mit dem glukosefreien P1-Medium, angereichert mit 20 % synthetischem Serum-Substitut (SSS).

Was die Frage betrifft, ob der Transfer im Blastozystenstadium dem Transfer im Teilungsstadium überlegen ist, gibt es widersprüchliche Studienergebnisse (Überblick bei Emiliani et al. [28]). Wir konnten keine Unterschiede zwischen den Transfers an den Tagen 2, 3, 4 und 5 finden (Abb. 2), womit die Ergebnisse von Emiliani et al. bestätigt werden, die Transfers der Tage 2 und 5 nach Kultur in Sequential media miteinander verglichen haben und ebenfalls keine Unterschiede fanden [28].

Unsere Studie zeigte nur ein signifikantes Ergebnis, nämlich die klinische Schwangerschaftsrate zugunsten des Single mediums in der Altersgruppe ≥ 41 Jahre (Tab. 5). Auch die biochemische Schwangerschaftsrate war höher, aber nicht signifikant (38,6 % vs. 33,6 %). Andererseits waren die Mittelwerte der Lebendgeburts-Implantationsrate (Tab. 5) und die Lebendgeburtenrate etwas höher (Tab. 6) sowie die Abortusrate etwas niedriger (Tab. 7) in der Sequential-media-Gruppe, allerdings weit von einer Signifikanz entfernt.

■ Relevanz für die Praxis

Im Lichte der zitierten Studien und unserer Ergebnisse können wir keinen Vorteil der Sequential media gegenüber Single media bei der Embryokultur erkennen. Unsere Studie konnte erstmals zeigen, dass die Verwendung von Sequential media in Kombination mit einer niedrigen O₂-Atmosphäre (5 %) keinen Vorteil bringt gegenüber einem Single medium in Kombination mit einer hohen O₂-Atmosphäre (21 %, Luft).

Danksagung

Die Autoren bedanken sich sehr herzlich bei folgenden Personen für ihre engagierte Mitarbeit: Dr. Ana Fischelmaier, Dr. Veronik Flich, Markus Reinhalter, Ulrike Mädel, Irene Leibnitz, Bernadette Prendinger und Ulrike Khoss. Unser besonderer Dank gilt Prof. Dr. Anselm Eder aus der Universitätsklinik für Soziologie der Universität Wien für die Supervision der statistischen Auswertung.

Literatur:

- Kemeter P, Lietz K. IVF/ICSI mit 5% O₂ im Mini-Inkubator verglichen mit 21% O₂ im klassischen Inkubator. J Fertil Reprod 2002; 12: 20–6.
- Kovacic B, Vlasisavljevic V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. Reprod Biomed Online 2008; 17: 229–36.
- Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. Human Reprod 2009; 24: 300–7.
- Kovacic B, Sajko MC, Vlasisavljevic V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2010; 94: 511–9.
- Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. Human Reprod 1998; 13 (Suppl 3): 148–59.
- Gardner DK, Lane M. Development of viable mammalian embryos in vitro: evolution of sequential media. In: Cibelli JB, Lanza RP, Campbell KHS, et al. (eds). Principles of cloning. Academic Press, Amsterdam, 2002; 187–213.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. Hum Reprod Update 1995; 1: 91–148.
- Bavister BD, Squirrell JM. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. Hum Reprod 2000; 15 (Suppl 2): 189–98.
- Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Hum Reprod Update 2003; 9: 557–82.
- Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2007; 21: 83–100.
- Biggers J, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? Reprod Biomed Online 2002; 5: 133–40.
- Macklon NS, Pieters MH, Hassan MA, et al. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. Hum Reprod 2002; 17: 2700–5.
- Biggers JD, Summers MC. Choosing a culture medium: making informed choices. Fertil Steril 2008; 90: 473–83.
- Weghofer A, Margreiter M, Bassim S, et al. Minimal stimulation using recombinant follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone antagonist in women of advanced age. Fertil Steril 2004; 81: 1002–6.
- Mortimer D, Mortimer ST. Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. Cambridge University Press, Cambridge, 2005; 194.
- Bongso A. Handbook on blastocyst culture. Sydney Press/Indusprint (s) Pte Ltd, Singapore, 1999; 62–79.
- Perin PM, Maluf M, Nicolosi Foltran Januário DA, et al. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. Fertil Steril 2008; 90 (4 Suppl): 1503–10.
- Pomeroy KO, Foley S, Faber B, et al. A comparison of sequential medium with non-sequential medium: do some patients' embryos culture better in one than in the other? Reprod Fertil Dev 2008; 21: 162–3.
- Schneider DT, Verza S, Esteves SC. Single or sequential medium are equally effective for the culture of human embryos to the blastocyst stage: a pilot study. Fertil Steril 2009; 92 (3 Suppl): S231–S232.
- Sepulveda S, Garcia J, Arriaga E, et al. In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. Fertil Steril 2009; 91: 1765–70.
- Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, et al. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. Fertil Steril 2009; 92: 1783–6.
- Paternot G, Debrock S, D'Hooghe TM, et al. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. Reprod Biol Endocrinol 2010; 8: 83.
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, et al. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16: 2177–81.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. Hum Reprod 2003; 18: 2406–12.
- Völklein K, Szypajlo B, Tomalak K, et al. Prospective comparison of two commercially available culture media under the provisions of German embryo protection law. J Turkish-German Gynecol Assoc 2009; 10: 10–3.
- Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, et al. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. Hum Reprod 2001; 16: 749–56.
- Ben-Yosef D, Amit A, Schwartz T, et al. Prospective randomized comparison of two embryo culture systems: P1 medium by Irvine Scientific and the COOK IVF medium. J Assist Reprod Genet 2004; 21: 291–5.
- Emiliani S, Delbaere A, Vannin AS, et al. Similar delivery rates in a selected group of patients. For day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. Hum Reprod 2003; 18: 2145–50.

Korrespondenzadresse:

Univ.-Doz. Dr. Peter Kemeter
 Arzt für Gynäkologie und Geburtshilfe
 Wunschbaby-Zentrum Wien
 A-1130 Wien, Lainzerstraße 6
 E-Mail: peter.kemeter@aon.at

Impressum

- Offizielles Organ der Österreichischen IVF-Gesellschaft
- Offizielles Organ der Österreichischen Menopause-Gesellschaft

Herausgeber und Chefredakteur:

Univ. Prof. Dr. Franz Fischl,
 Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Klin. Abt. f. gynäkolog.
 Endokrinologie und Sterilitätsbehandlung,
 A-1090 Wien, Währinger Gürtel 18–20.

PD Dr. med. Petra Stute,
 Universitäts-Frauenklinik, Inselspital, Abteilung für gynäkologische
 Endokrinologie und Reproduktionsmedizin,
 CH-3010 Bern, Effingerstrasse 102

Medieninhaber, Verleger, Produktion, Anzeigen, Vertrieb:

Krause & Pachernegg GmbH
 Verlag für Medizin und Wirtschaft
 A-3003 Gablitz, Mozartgasse 10, Tel. 02231/61258-0, Fax DW 10.
 Internet: www.kup.at/gynaekologie

Lektorat: Krause & Pachernegg GmbH,
 Mag. Stefanie Bachl

Layout: Creativstudio Fohler
 2380 Perchtoldsdorf.

Druck: Edelbacher Druck Ges.m.b.H.
 A-1180 Wien, Eduardgasse 6–8.

Verlags- und Erscheinungsort: 3003 Gablitz.

Erscheinungsweise: 4x im Jahr.

Grundlegende Richtung: Gynäkologische Fachzeitschrift zur Information und Weiterbildung. Veröffentlichung von wissenschaftlichen Originalarbeiten sowie einschlägigen Berichten aus dem In- und Ausland.

