

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

12. Jahrgang 2002
Nummer 2/2002

H. Zech, P. Vanderzwalmen, N. Zech, K. Pfau, P. Schwärzler
***Blastozystenkultur – praktisches Vorgehen –
Untersuchungen zum „Fetal Outcome“***

J Fertil Reprod 2002; 12 (2): 7–10

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche

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

BLASTOZYSTENKULTUR – PRAKTISCHES VORGEHEN – UNTERSUCHUNGEN ZUM „FETAL OUTCOME“

BLASTOZYSTEN-
KULTUR –
PRAKTISCHES
VORGEHEN –
UNTERSUCHUN-
GEN ZUM „FETAL
OUTCOME“

Summary

The in-vitro culture of embryos in sequential media allows the selection of the best embryos after their development to the blastocyst stage. After the transfer of blastocysts, the implantation- and pregnancy rates are significantly higher than after transfer on day 2 or day 3 in spite of transferring only 1–2 embryos. This leads to a reduction of the risk of multiple gestation. The observation in animal models, that the percentage of male offspring is increased after the transfer of blastocysts and that a increased birth-weight was observed, could not be encountered in humans. The aim of our study was to investigate the fetal outcome (including the malforma-

tion rate) after blastocyst culture (study group) as compared to culture up to day 3 (control group) and children after spontaneous conception.

Our results were in accordance with the international literature where the implantation and the pregnancy rates were significantly higher after culture to the blastocyst stage. The “baby-take-home-rate” after blastocyst culture was 41% as compared to the control group (25,6%). There was no statistically significant difference in the fetal outcome between the study group, the control group and the spontaneous conception group.

(Abb. 1). Durch die mit dem Alter der Frau einhergehende Abnahme der Energieträger (ATP) in den Mitochondrien kommt es zu einer Zunahme von Aneuploidien in der Eizelle, zum Anstieg der Abortursache und einer deutlichen Abnahme der Implantations- und Schwangerschaftsrate um das 38. Lebensjahr der Frau [1] (Abb. 2).

Die Kultur von Embryonen bis zum Blastozystenstadium am Tag 5 bietet eine exzellente, einfache, nicht invasive Möglichkeit, die besten Embryonen für den Transfer auszuwählen, da diese den Entwicklungsblock am Tag 3 durchbrochen haben [2]. Dieser Entwicklungsstopp kann aufgrund paternaler Effekte (Spermaqualität), maternalen Einflüsse (Eizellqualität, Alter der Mutter) oder infolge zytogenetischer Probleme resultieren und scheint mit dem Timing der Aktivierung des embryonalen Genoms und/oder mit der Produktion von toxischen Superoxyden und freien Sauerstoffradikalen einherzugehen.

Neben den Vorteilen zur Selektion der besten Embryonen für den Transfer bietet die Blastozystenkultur auch die Möglichkeit, eine Biopsie an

EINLEITUNG

Die in vitro-Kultur von Embryonen in sequentiellen Medien erlaubt die Beurteilung von deren Entwicklung bis zum Blastozystenstadium.

Die meiotische Ausreifung der Eizellen im Ovar, die Fertilisierung und die ersten drei Teilungszyklen des

frühen Embryos sind abhängig von den in der Eizelle gespeicherten Signalen (Tab. 1). Ab Tag 3, an welchem sich der Embryo im 8-Zell-Stadium befindet, nehmen die Eizellbestandteile ab, die Produkte der Genomaktivierung des Embryos zu

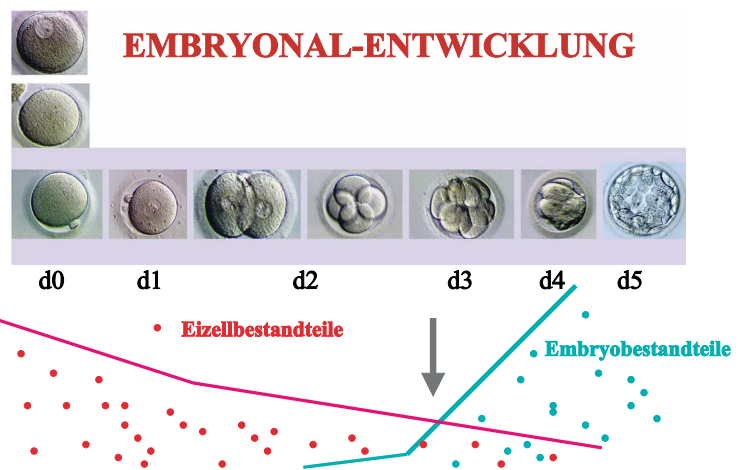
- 1) Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, Bregenz;
- 2) Univ. Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Innsbruck

Tabelle 1: Bestandteile der Eizelle

**Meiotische Ausreifung
Fertilisierung
Erste 3 Teilungszyklen** } abhängig von den
in der Eizelle
gespeicherten Signalen

- 500 pg RNA
- 20–25 pg an Protein
- 150 pg an Glykogen
- 100.000 Mitochondrien
- 1.000.000 Ribosomen
- 250 pg Tubulin
- 100 pg Aktin
- hohe Level an Enzymen
- 800 pmol ATP

Abbildung 1: Embryonalentwicklung am Tag 0 bis Tag 5 mit Abnahme der „Eizellbestandteile“ und Zunahme der Produkte der Genom-Aktivierung („Embryobestandteile“)



BLASTOZYSTEN- KULTUR – PRAKTISCHES VORGEHEN – UNTERSUCHUN- GEN ZUM „FETAL OUTCOME“

Abbildung 2: Beziehung zwischen Abnahme der Schwangerschaftsrate, Zunahme der Abortus- und Aneuploidienrate in Embryonen in Relation zum Alter

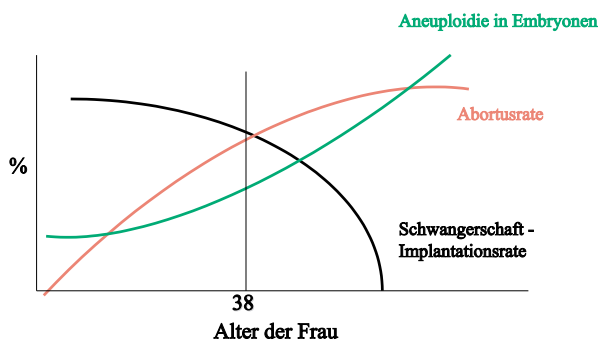


Tabelle 2: Zusammensetzung des klassischen IVF 50-Mediums (Tag 0 bis Tag 1) und des sequentiellen Mediums zwischen Tag 1 und Tag 3 (G1.2)

IVF 50 (d0–1)	G1.2 (d1–3)
Na-Chlorid K-Chlorid K-Hydrogenphosphat Mg-Sulfat Ca-Chlorid Na-Laktat Na-Pyruvat	Glukose*
EDTA HSA K-Dihydrogenphosphat Na-Bikarbonat Na-Laktat Na-Pyruvat**	Alanin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamat, Glycin, Prolin, Serin, Taurin
	Nicht essentielle AS

* Glukose: für Befruchtungsfähigkeit der Spermien wichtig, für frühe Embryonalentwicklung eher hemmend;
** Pyruvat: in früher Embryonalentwicklung wichtigstes Substrat

Abbildung 3: Chronologie der Kulturtechnik mit Umbettung von IVF 50 (Tag 0) in G1.2 am Tag 1 und G2.2 oder CCM-Medium am Tag 3 bis zum Blastozystenstadium

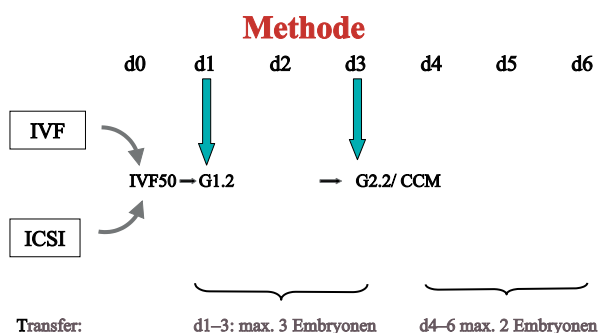


Abbildung 4: Prozentsatz an Transfers mit mindestens einer expandierten Blastozyste

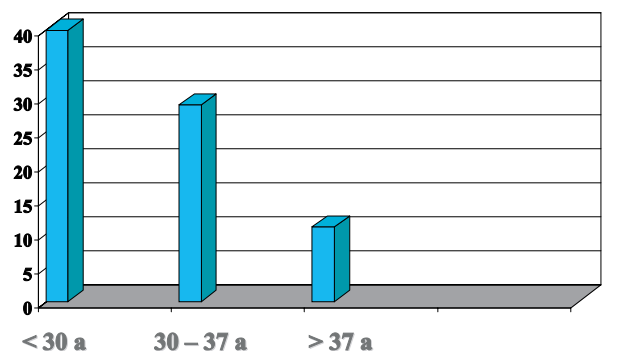


Abbildung 5: Prozentsatz der verschiedenen Typen an Embryonen, die am Tag 5 transferiert wurden

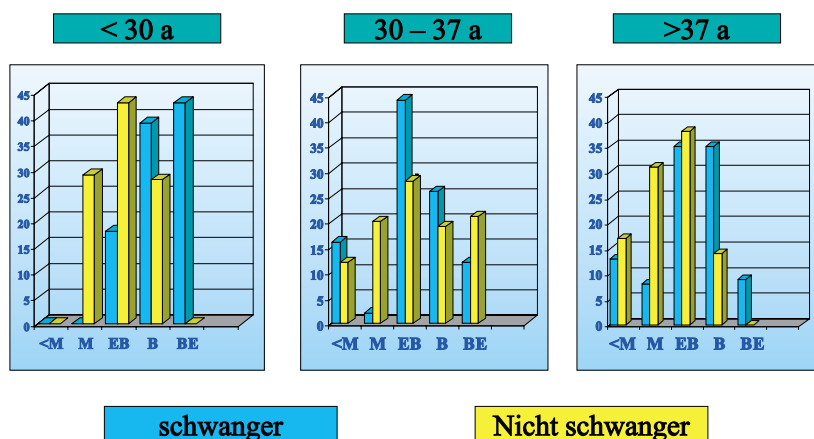
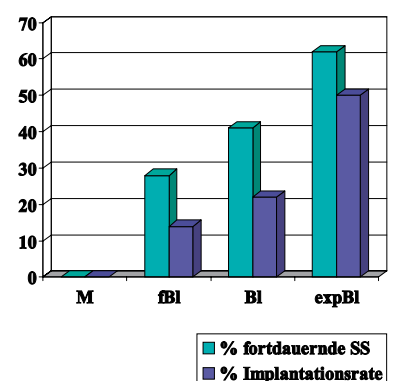


Abbildung 6: Entwicklungskapazität von Morula, früher Blastozyste, Blastozyste und expandierter Blastozyste



mehreren Zellen im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik am Tag 3 durchzuführen, um Anomalien zu erkennen und nach weiterer Entwicklung zum Blastozystenstadium einen Transfer von unauffälligen Embryonen vornehmen zu können [3].

Bei einigen Tierarten (Mäusen und Kälbern) wurde beobachtet, daß sich männliche Embryonen schneller zu Blastozysten entwickeln und nach Transfer dieser Blastozysten die Anzahl männlicher Nachkommen höher ist [4, 5]. In der Humanmedizin wurden diesbezüglich sehr gegensätzliche Publikationen veröffentlicht [6].

Bei Wiederkäuern wurde nach Blastozystentransfer ein erhöhtes Geburtsgewicht beobachtet [7]. Die exakte Ursache konnte nicht gefunden werden, es wird diskutiert, ob das Serum oder verschiedene Proteine als Ursache in Frage kommen.

Weder konnten eine Veränderung der „Sex ratio“, noch ein Unterschied im Geburtsgewicht bei Kindern nach in vitro-Fertilisierung beim Menschen dokumentiert werden [8].

Für jede in vitro-Kultur, besonders aber für eine längere Kultur bis zum Blastozystenstadium, stellen die

Qualität und die Stabilität der Medien ein zentrales Problem dar [9]. Einerseits kann im Rahmen der Herstellung der Medien, bei der Auswahl der Substanzen (Reinheit) und des Wassers eine unsichere Größe resultieren, Kontaminationen müssen auf jeden Fall vermieden werden. Beim Transport der Medien vom Herstellungsort zum IVF-Zentrum ist darauf zu achten, daß die Kühlkette nicht unterbrochen wird, da die Qualität der Medien durch Zerfall von Pyruvat infolge Temperatur und Zeit leidet.

Nach dem Transfer von Blastozysten (BI) guter Qualität beträgt die Implantationsrate (IR) pro Embryo 35–40 % [10]. Ziel unserer Untersuchungen war es, zu überprüfen, ob sich das „Fetal Outcome“ (inklusive der Mißbildungsrate) nach BL-Kultur (Studien-Gruppe) im Vergleich zu Kulturen bis zum Tag 3 (8–10-Zeller) (Kontroll-Gruppe) und Kindern nach Spontan- konzeption unterscheidet.

MATERIAL UND METHODE

Die Blastozystenkultur wurde an einer selektionierten (mehrfaches Fehlschlagen der Konzeption nach IVF/ICSI oder bei älteren Frauen) oder

einer unselektionierten Population durchgeführt.

Für die Kultur von Embryonen bis zum Tag 0 (Punktionstag) werden klassischerweise die Standardmedien (IVF 50, Scandinavian IVF) mit einem erhöhten Anteil an Glukose verwendet, ab dem Tag 1–3 das G1.2 mit einer erniedrigten Glukose-Konzentration und zusätzlich nicht essentiellen Aminosäuren eingesetzt (Tab. 2). Für die weitere Kultur von Tag 3–5 werden sequentielle Medien mit einer erniedrigten Konzentration von Pyruvat und Natrium-Laktat, sowie Glukose und Taurin verwendet. Die essentiellen Aminosäuren sind vorhanden, EDTA wird bei der Blastozystenkultur nicht eingesetzt, um eine Glykolyse zu ermöglichen [10] (Tab. 3).

Im Zeitraum von Dezember 1998 bis einschließlich April 2000 wurden alle konsekutiven Zyklen (1253 Zyklen), in welchen eine Blastozystenkultur möglich schien (mehr als sieben Eizellen), analysiert. Die Daten wurden mittels Fragebogen, geburtshilflichem und pädiatrischem Entlassungs- brief erhoben. Dabei wurden die Patientinnen in eine Studiengruppe (Blastozystentransfer am Tag 5) und in eine Kontrollgruppe (Transfer am Tag 2–3) eingeteilt.

Am Tag 1–3 wurden maximal drei Embryonen, am Tag 4–6 maximal zwei Embryonen transferiert (Abb. 3).

Endpunkte der Studie waren: „Baby- take-home-rate“, mütterliche und fetale Komplikationen, sowie kindliche Mißbildungen.

Die Einteilung der Blastozysten erfolgte in frühe Blastozysten (fBI), volle Blastozysten (BI) und expandierte Blastozysten (expBI) (Tag 5), am Tag 4 ist der Nachweis einer Kompaktierung mit Übergang in das Morula-Stadium (M) ebenfalls als Genom-Aktivierung zu betrachten.

Tabelle 3: Unterschiede in den sequentiellen Medien (S1/G1.2 und S2/G2.2/CCM)

Inhalt (mMol)	S1 / G1.2	S2 / G2.2 / CCM
NaCl	85,16	85,16
KCl	5,5	5,5
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,5	0,5
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8	1,8
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0	1,0
NaHCO ₃	25,0	25,0
Na-Pyruvat	0,32	0,10
Na-Laktat	10,5	5,87
Glukose	0,5	3,15
Glutamin	1,0	1,0
Taurin	0,1	0,0 *
Nichtessentielle Aminosäuren	alle	alle
Essentielle Aminosäuren	keine	alle
EDTA	0,01	0,0
Humanes Serumalbumin	2 g/l	2 g/l

*für CCM: Taurin enthalten

ERGEBNISSE

Der Prozentsatz an Transfers mit mindestens einer expandierten Blastozyste betrug bei Frauen < 30 Jahre 40%, zwischen 30 und 37 Jahren 27%, bei Frauen > 37 Jahre 10% (Abb. 4).

Bei Frauen unter 30 ist der Anteil früher Blastozysten, voller Blastozysten und expandierter Blastozysten höher als bei Frauen zwischen 30 und 37 Jahren und über 37 Jahren, damit korreliert auch die Schwangerschaftsrate (Abb. 5).

Wenn man die Ergebnisse weiter aufschlüsselt, so konnte nachgewiesen werden, daß bei einem Transfer von ausschließlich „Top“-Embryonen die Ergebnisse mit positivem beta-hCG, die Schwangerschafts- und Implantationsrate pro Embryo höher ist, als bei einem Transfer gemischter Embryonenqualität (Abb. 6).

Die Implantationsrate pro Blastozyste betrug 39% bei Frauen unter 30 Jahren, 27% zwischen 30 und 37 Jahren und 18% über 38 Jahren (Tabelle 4). Die „Baby-take-home-rate“ nach Blastozystentransfer betrug insgesamt 41%, in der Kontrollgruppe 25,6% (Tabelle 5). Ein signifikanter Unterschied im „Fetal Outcome“ zwischen der Studien- und Kontrollgruppe und Spontankonzeptionen konnte nicht beobachtet werden.

DISKUSSION

Nach Blastozystenkultur konnte eine signifikante Steigung der Schwangerschaftsrate trotz Transfers von nur maximal 2 Embryonen erzielt werden.

Tabelle 4: Implantationsrate / Embryo

Alter	Implantationsrate/Blastozyste
< 30 a	39 %
30–37 a	27 %
> 37 a	18 %



a.o. Univ.-Prof. Dr. Herbert Zech

Geboren 1948 in Vorarlberg. Studium in Innsbruck, Promotion 1975, jus-practicandi 1978, Facharzt-Ausbildung an der Uni Graz und Innsbruck 1978–1982, Forschungsaufenthalt in den USA (Univ. of Louisville/Kentucky) 1982–1983, Oberarzt Universitäts-Frauenklinik Innsbruck 1983–1985, Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie seit 1985 in Bregenz, Habilitation im Spezialfach Gynäkologie und Geburtshilfe an der Uni Innsbruck 1992, a.o.-Professur 1997, Gründung eines Institutes für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie in Meran/Italien 2001, Gründung eines Institutes für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie im Kanton St. Gallen Januar 2002.

Korrespondenzadresse:

a.o. Univ.-Prof. Dr. Herbert Zech
Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie
A-6900 Bregenz, Römerstraße 2
e-mail: zech@ivf.at

Komplikationen durch höhergradige (> 2) Mehrlinge konnten so vermieden werden.

Es konnte kein signifikanter Unterschied im „Fetal Outcome“ zwischen der Studiengruppe mit Blastozystentransfer und der Kontrollgruppe (mit Transfer bis zum Tag 3) und Spontankonzeptionen beobachtet werden.

Literatur

1. Plachot M, Veiga A, Montagur J, De Grouchy J, Calderon G, Lepretre S. Are clinical and biological IVF parameters correlates with chromosomal disorders in early life? a multicentric study. Hum Reprod 1988; 3: 627–35.
2. Gardner DK, Lane M, Calderane I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. Fertil Steril 1996; 65: 349–53.
3. Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation Genetics. J Assist Reprod Genet 1998; 15: 215–8.
4. Tsunoda Y, Tokunaga T, Sugie T. Altered sex ratio of live young after transfer of

- fast- and slow-developing mouse embryos. Gamete 1985; 12: 301–4.
5. Avery B, Madison V, Greve T. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. Theriogenology 1991; 35: 953–63.
6. Tarin JJ, Bernabeu R, Baviera A, Bonada M, Cano A. Sex selection may be inadvertently performed in in-vitro fertilization-embryo transfer programmes. Hum Reprod 1995; 22: 2992–8.
7. Thompson JG, Gardner DK, Pugh A, McMillan WH, Tervit HR. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. Biol Reprod 1991; 53: 1385–91.
8. Kausche A, Jones GM, Trounson AO, Figueiredo F, MacLachlan V, Lolatgis N. Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers. Fertil Steril 2001; 76: 688–93.
9. Huisman GJ, Fauser BCJM, Eijkemans MJC, Pieters MHEC. Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. Fertil Steril 2000; 73: 117–22.
10. Zech H, Zech N, Vanderzwalmen P. Der Blastozystentransfer im Vergleich zum klassischen Embryo-Transfer. In: Fischl F (Hrsg). Kinderwunsch: Möglichkeiten, Erfüllbarkeit und Machbarkeit im neuen Jahrtausend. Verlag Krause und Pachernegg, Gablitz, 2000; 185–92.

Tabelle 5: Baby-take-home-Rate

Studiengruppe (BL)	41 %
Kontrollgruppe (d3)	25,6 %

ANTWORTFAX

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

Hiermit bestelle ich

ein Jahresabonnement
(mindestens 4 Ausgaben) zum
Preis von € 30,- (Stand 1.4. 2002)
(im Ausland zzgl. Versandkosten)

Name

Anschrift

Datum, Unterschrift

Einsenden oder per Fax an:

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft,
Postfach 21, A-3003 Gablitz, **FAX: 02231 / 612 58-10**

Bücher & CDs
Homepage: www.kup.at

