

## Liebe Kolleginnen und Kollegen!

Dies ist die 5. Ausgabe unseres Newsletters, der euch eine Übersicht über das 18. EFA-Treffen am 26.9.09 in Innsbruck geben soll. Bedanken möchte ich mich besonders bei unseren internationalen Sprechern Hr. Bertheussen, Hr. Leese und Hr. Böhm, die eine längere Anreise für unsere Tagung auf sich genommen haben. Genauso bedanken möchte ich mich bei unseren heimischen Rednern Thomas und Irmhild, sowie bei unseren Sponsoren Merck/Serono und der Öster. IVF-Gesellschaft.

In all diesen Vorträgen und anschließenden Diskussionen haben wir uns mit dem Thema „Kulturmedien und –bedingungen“ auseinandergesetzt. Es war ein rundes Thema, das von verschiedenen Seiten sorgfältig beleuchtet wurde.

Im Rahmen dieses Treffen fand auch die Jahreshauptversammlung unseres Forums statt. Derzeit haben wir 74 Mitglieder, die zuverlässig ihren Beitrag zahlen, wodurch unsere Treffen auf solch hohem Niveau überhaupt erst möglich sind. An dieser Stelle möchte ich mich bei Uschi Sonnleitner für ihre Arbeit als Kassier bedanken.

Aufgrund unseres Budgets konnte eine neue Homepage [www.embryologenforum.at](http://www.embryologenforum.at) installiert werden. Diese enthält ein sog. Schwarzes Brett, wo wir alle dazu

eingeladen sind, Wissenswertes mitzuteilen. Auch werden alle wichtigen Informationen von bereits stattgefundenen AGES-Begehungen auf diese Homepage gestellt. Diese Daten sind nur EFA-Mitglieder, die ein eigenes Passwort bekommen, zugänglich. Ich glaube, wir sollten diese Chance der vernetzten Kommunikation für uns nutzen.



Apropos Kommunikation: Velden soll ein fixes Treffen mit geselligem Abend und Übernachtung werden. Bei einem Glas Bier oder Wein fällt das Reden doch viel leichter ☺

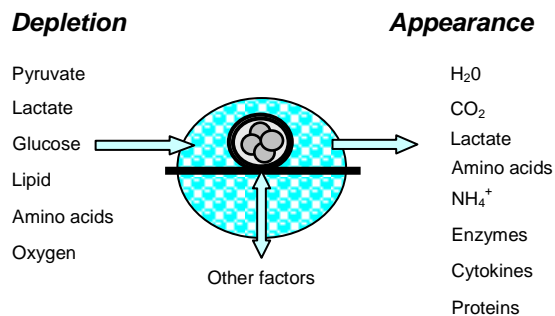
Michael Schenk vom Kinderwunsch Institut in Dobl hat uns noch über den Master of Science für Klinische Embryologie, den er ins Leben gerufen hat, informiert. Tatsächlich gibt es in Österreich keine strukturierte Ausbildung für IVF-Labormitarbeiter, was aber durchaus sinnvoll wäre und dankenswerterweise versucht M. Schenk das umzusetzen.

Viel Spaß beim Lesen der Zusammenfassungen und im Anhang findet ihr einige interessante Ankündigen.

## Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules

Henry Leese, University of York, UK

Der Single-Embryotransfer ist die günstigste und effektivste Strategie für die assistierte Reproduktion, daher braucht es objektive, einfache und nicht-invasive Methoden für die Selektion, d.h. Marker für die Embryonenvitalität. Der frühe Embryo braucht in einer Kultur Mineralsalze, Nährstoffe für den Metabolismus (Pyruvat, Glucose, Aminosäuren), Sauerstoff und Makromoleküle. Der Verbrauch dieser Substanzen, sowie ins Medium abgegebene Substanzen könnten als Marker verwendet werden.



Beim Sauerstoffverbrauch zeigt sich, dass Embryonen, die weder zu aktiv noch zu „ruhig“ sind, das höchste Implantationspotential haben. Bei Embryonen, die zu einer Schwangerschaft führten, lag die Pyruvataufnahme in einem Bereich von 10 bis 30 pmol/embryo/h. Bei Embryonen, die zu keiner Schwangerschaft führten, war die Streubreite wesentlich größer (2 bis 55 pmol/embryo/h). Nimmt man die glykolytische Aktivität als Marker, haben lebensfähige Blastozysten eine niedrige glykolytische Rate. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Embryonen, die ein Potential haben zu einer Schwangerschaft zu führen, einen niedrigen Aminosäureumsatz (Summe von As-Verbrauch und As-Abgabe ins Medium) haben.

„Cleavage stage“ Embryonen haben einen niedrigeren Metabolismus als Blastozysten und die Zellen der inneren Zellmasse sind „ruhiger“ als die des Trophektoderms.

Die Entwicklung von Keimzellen geschieht bei einer Temperatur, die niedriger ist als die Körpertemperatur.

Es ist gut bekannt, dass Spermien im Hoden eine niedrigere Temperatur haben, aber auch die Eizellentwicklung passiert bei 1,5 – 2°C unter Körpertemperatur. In den Tuben gibt es einen Temperaturgradient, der dafür sorgt, dass der Metabolismus der frühen Embryonen niedriger ist. Ob daher die *in vitro* Kultivierung von Embryonen bei 35,5°C durchgeführt werden sollte, muss noch ermittelt werden.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass *in vitro* entwickelte Embryonen weniger lebensfähig und mehr gestresst sind als *in vivo* entwickelte, z.B. haben sie eine 2-fach höhere Glykolyserate und eine höhere Proteinsyntheserate. Daraus folgt, dass gestresste (*in vitro*) Embryonen aktiver waren und mehr Nährstoffe brauchten, d.h. einen erhöhten Metabolismus hatten. *In vitro* kultivierte Embryonen, die einen niedrigen Metabolismus haben, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit zu einer Schwangerschaft zu führen.

Ein „guter“ Embryo hat in seinen zellulären Abläufen eine hohe Effizienz, d.h. er braucht nur ein Minimum an Nährstoffen zu konsumieren und hat somit einen „ruhigen“ Metabolismus. Es wird angenommen, dass es für einen „ruhigen“ Metabolismus einen optimalen Bereich von Embryonenaktivität, die zu einer erfolgreichen Entwicklung führt, gibt. Die Herausforderung besteht darin, diesen Bereich für spezifische Marker zu etablieren, um so Embryonen, die zu einem gesunden Baby werden, identifizieren zu können (Leese et al., Human Reprod 2007).

Vortrag zusammengefasst von A. Maier

## Back to nature – sequential media

Kjell Bertheussen

Medicult, Tromsø, Norwegen

Die Nachteile von Serum im Kulturmedium sind, dass es keine physiologische Flüssigkeit für Spermien, Eizellen und Embryonen ist und es kann Pathogene wie Viren, Prionen und andere Artefakte wie Antikörper, Hormone enthalten, die den Embryo beeinflussen. Ein Serumersatz besteht z.B. aus einem Metallionenbuffer,

Albumin oder ähnlichen Bindeproteinen (binden giftige Stoffe), Ionen, Spurenelementen (wie Mn, Cu, Zn), wichtige Hormonen (wie Insulin), Cholesterin und freie Fettsäuren. Solche Systeme für Serumersatz konnten für die Kultivierung von Embryonen optimiert werden.

Standardmedien für die *in vitro* Kultivierung von Embryonen basieren auf einer Salzlösung, die 1 mM Phosphat, 2–3 mg/ml Proteine (wie Albumin), organische Komponenten, 1 mM oder mehr Osmolyte (wie Glycine) und Glucose enthält. Der Zusatz von Vitaminen führte zu einer besseren Embryonenentwicklung.

Der frühe Embryo d.h. vor dem Kompaktieren wird vom maternalen Genom reguliert, hat einen niedrigen Sauerstoffverbrauch und einen niedrigen Metabolismus, bevorzugt Pyruvat als Energiesubstrat und braucht nicht alle Aminosäuren. Ein post-kompaktierender Embryo wird vom embryonalen Genom reguliert, hat einen hohen Sauerstoffverbrauch und einen höheren Metabolismus, braucht Glucose als Energiesubstrat und alle Aminosäuren. Wegen der Sauerstofftoxizität braucht der frühe Embryo 10 – 100  $\mu$ M EDTA, hingegen ist der post-kompaktierte Embryo toleranter gegenüber Sauerstoff und braucht weniger bzw. kein EDTA.

Es scheint so zu sein, dass der Embryo bis Tag 3 ein Standardmedium mit den kleinen Aminosäuren, aber danach ein komplexeres Medium braucht. Offensichtlich ändert sich der Bedarf an Nährstoffen während der Kultivierung und es scheint so zu sein, dass sich auch der optimale pH-Wert bei bestimmten Entwicklungsstufen ändert. Spermien, Eizellen und frühe Embryonen brauchen wahrscheinlich einen hohen pH-Wert ( $\sim$  7,40), hingegen Blastozysten einen niedrigeren ( $\sim$  7,25). In der Maus konnte gezeigt werden, dass das Absenken des pH-Wertes von 7,30 ab Tag 2-3 auf 7,15 zu höheren Blastozystenraten führt. Die Änderung des pH-Wertes kann durch eine veränderte Konzentration von Natriumcarbonat oder durch eine Änderung der Kohlendioxid-Begasung erreicht werden.

Alle Medien bestehen aus einer Salzlösung und verschiedenen Komponenten. Die Zusammensetzung

der Medien wird entsprechend den Entwicklungsstadien der Embryonen ständig optimiert.

Vortrag zusammengefasst von A. Maier

## Let the embryo choose – Globale Medien

Ralf Böhm, Gynemed, Mönchengladbach, Deutschland

Sequentielle Medien wurden entwickelt, indem man die Flüssigkeiten in den Tuben bzw. im Endometrium untersucht hat. Die Messwerte reflektieren die Zusammensetzung der gemessenen Flüssigkeiten, nicht aber das Mikromilieu um den Embryo. *In vivo* stehen die Eizellen bzw. Embryonen im Kontakt mit tubaren bzw. endometrialen Zellen, d.h. die *in vitro* Situation unterscheidet sich dramatisch von der *in vivo*. Mit der Entwicklung von globalen Medien wurde versucht nicht die *in vivo* Situation zu imitieren, sondern eine optimale Umgebung für die *in vitro* Kultivierung zu schaffen.

Der Vorteil von globalen Medien liegt darin, dass von Tag 1-5 die Embryonen im gleichen Medium kultiviert werden, wobei eine einfachere Handhabung gegeben ist, sowie günstigere Preise und ein längeres Haltbarkeitsdatum als bei sequentiellen Medien.

Wenn bestimmte Substanzen in einer zu hohen Konzentration vorliegen, kann dies zu einer Blockierung der Embryoentwicklung führen, z.B. führt eine hohe NaCl-Konzentration zu einem 2-Zell-Block. Eine höhere Konzentration von KCl und Glucose führte zu einer besseren Blastozystenentwicklung. Auch der Zusatz von Aminosäuren verbesserte diese Entwicklung. Allerdings ist es bei 20 Aminosäuren nicht möglich die optimale Konzentration herauszufinden, denn man müsste 3,5 Mrd Medien miteinander vergleichen. Glutamin zerfällt in Ammonium, was die Zellatmung blockiert, und wird daher durch andere Aminosäuren ersetzt.

Es zeigte sich, dass eine zu hohe Glucosekonzentration im Medium zur Inhibierung der respiratorischen Gene führt, was zur Folge hat, dass die Zellen statt einer Atmung eine Gärung durchführen (sog. Crabtree-ähnliche Effekt).

Der Zusatz von EDTA begünstigt die Embryoentwicklung, da es toxische Schwermetalle bindet. Allerdings darf die Konzentration nicht über 0,01 mM liegen, da EDTA dann eine artefakte Wirkung hat.

Aus diesen Erkenntnissen wurde das sog. KSOM<sup>AA</sup> Medium entwickelt. Allerdings fehlen noch Studien, die eindeutig einen Vorteil von globalen Medien im Vergleich mit sequentiellen Medien zeigen.

Vortrag zusammengefasst von A. Maier

### **Embryokultur. Allein oder in der Gruppe**

**Thomas Ebner, Landesfrauenklinik, Linz**

Nimmt man die EFA-Umfrage von vor 2 Jahren zur Hand, stellt man fest, dass sich Österreichs Embryologen uneinig sind, was die Art (Embryodichte, Volumen) der *in vitro* Kultur betrifft. Damals arbeiteten 5 Zentren mit Einzelkultur, 17 mit Gruppenkultur und 3 Zentren verwendeten sowohl als auch.

Bei der Entscheidungsfindung muss man an den spontanen (oder pH-bedingten) Zerfall der Aminosäuren ins Kalkül ziehen, was in weiterer Folge zu einer Anhäufung embryotoxischer Ammoniumionen führt. Durch die Verwendung stabilerer Formen der Aminosäuren, z.B. des Glutamins, oder durch einen zusätzlichen Mediumwechsel kann man diesem Problem entgegenwirken, allerdings riskiert man dadurch eine Ausdünnung sogenannter autokriner Faktoren, also vom Embryo produzierte stimulierende Metaboliten. Es gilt also im IVF-Labor das optimale Verhältnis zwischen Embryo und Mediumvolumen zu finden.

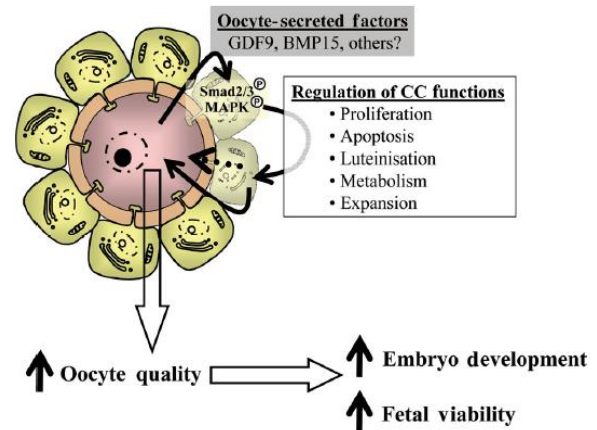
Im Tiermodell ist die Sachlage eindeutig. Sowohl bei der Maus, als auch beim Rind zeigte sich die Gruppen gegenüber der Einzelkultur hinsichtlich Zellzahl, Blastozystenentwicklung, Hatchingrate und Genexpression deutlich überlegen. Beim Menschen hingegen fand sich in zwei prospektiven Studien kein Benefit durch die Erhöhung der Embryodichte bzw. die Verringerung des Volumens. Betrachtet man sich aber die Studiendesigns genauer, finden sich logische Erklärungen für das Ausbleiben jeglichen Effektes.

Spyropoulou et al. (1999) erlaubten z.B. nur eine Gruppenkultur von 24h und unterbanden damit die beschriebene Akkumulation der autokrinen Faktoren, während Rijnders und Jansen (1999) die Embryonen erst am dritten Tag in Einzel- und Gruppenkultur splitteten.

Diese Unstimmigkeiten veranlassten uns eine prospektive Studie ins Leben zu rufen, in der am Tag 1 alle Zygoten (mindestens 9) in drei Gruppen aufgeteilt wurden. Die erste Kohorte wurde einzeln in 30 µl Tropfen inkubiert. Im selben Volumen wurde auch mit Gruppen von 3-5 gearbeitet. Das dritte Drittel der Zygoten wurde in Einzelkultur gehalten, allerdings erlaubte ein spezielles Kulturschälchen (Embro Corral®) den Kontakt zu Nachbarembryonen, also theoretisch auch den Austausch embryotropher Metaboliten. Es zeigte sich, dass bis zum Tag 3 die Embryoentwicklung ident war, ab Tag 4 allerdings, die Gruppenkultur signifikant mehr kompaktierende Embryonen und Blastozysten (Tag 5) hervorbrachte. Ausserdem war die Gruppengröße offenbar für die Blastulationsrate mitentscheidend (nicht signifikant). Da ausschließlich „single blastocyst transfers“ durchgeführt wurden, konnte das Implantationsverhalten ganz gut abgeschätzt werden. Diesbezüglich lässt sich vermuten, dass, bei größerer Stichprobenanzahl, Embryonen aus der Gruppe besser anwachsen als individuell kultivierte (in unserem Klientel 55,6% vs. 33,3%).

Stellen sich uns am Schluss 2 Fragen. Warum haben jene Embryonen, die untereinander in Kontakt stehen, trotz Stoffaustausches keine besseren Blastulations- und Implantationsraten? Und ist der autokrine embryotrophe Faktor schon identifiziert worden? Zur Klärung der Frage eins nimmt man am besten Daten von Rinderembryonen zur Hand, die besagen, dass der optimale Abstand innerhalb einer Gruppenkultur von direktem Kontakt bis max. dem Embryodurchmesser ist. Folglich können in den neuen Schälchen jene stimulierenden Faktoren gar nicht auf den/die Nachbarn wirken, weil der Abstand 4mm (anstatt 140µm) betrug. Die fraglichen Embryonen sind also wie eine Einzelkultur in 30µl zu betrachten.

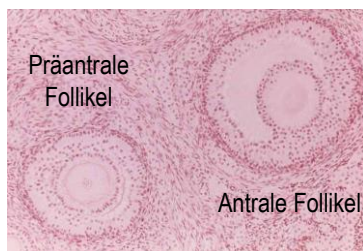
Der wahrscheinlichste Kandidat für einen autokrinen Faktor ist 1-alkyl-2-acetyl-glycero-3-phosphocholin, oder auch „platelet-activating factor“ (PAF). Diese Vermutung basiert auf der Erkenntnis, dass eine *in vitro* Supplementation von Kulturmedium mit PAF die Erfolgsraten steigert. Zudem erhöht PAF die Mitoserate und wirkt Apoptose entgegen, was die in unserer Studie beobachteten Phänomene eindeutig erklären würde.



### Die Entwicklung der Oocyte *in vivo* und die Anwendbarkeit dieser Erkenntnisse für die IVF

Alexandra Maier, Inst. für Hormonstörungen und Kinderwunsch, Graz

Zur Zeit der Geburt sind die Eizellen (EZ) im diploiden Stadium der Prophase I und bleiben in diesem meiotischer Arrest im primordial Follikel. Im präantralen Follikel wächst die EZ und die Granulosazellen (GZ) proliferieren. EZ und GZ sind über trans-zonale zytoplasmatische Fortsätze der GZ stark miteinander assoziiert. EZ-Wachstum und Entwicklung ist abhängig von GZ, die 85% des Nährstoffbedarfs der EZ decken und lösliche Wachstumsfaktoren, Inhibitoren der Meiose und stimulierende Faktoren produzieren.



Longbenton Community College

Die vollständig gewachsene EZ regt im antralen Follikel die GZ zur Differenzierung in Cumuluszellen (CZ), die im Cumulus-Oozyten-Complex stark mit der EZ assoziiert sind, und in steroidsynthetisierende murale Granulosazellen an. Nach derzeitiger Meinung sezerniert die EZ parakrine Wachstumsfaktoren, die sog. Oocyte-secreted Factors, die auf benachbarte GZ einwirken und deren Differenzierung regulieren und somit die Funktion ändern (Sutton et al., Reproduction 2003, Gilchrist et al., Reproduction 2008).

Nur wenn GZ in CZ differenzieren, produzieren diese Faktoren, die die EZ-reifung induzieren, welche aus der nukleären Reifung (Wiederaufnahme der Meiose bis zur Metaphase II (Rearrest), Ausstoßung des 1.PK) und aus der zytoplasmatischen Reifung (Relokation der Organellen, Synthese und Modifikation von RNA und Proteinen) besteht. Eine vollständige Reifung verleiht der EZ die Kompetenz sich in einen implantationsfähigen Embryo zu entwickeln.

Bei *in vitro* gereiften EZ scheint die zytoplasmatische Reifung nicht vollständig erreicht zu werden. Daher wird versucht in einer Prematuration Culture (24h) vor *in vitro* Maturation (IVM) die EZ im GV-Stadium zu arretieren, damit sie cytoplasmatisch reifen kann. Wahrscheinlich findet in dieser Cokultur eine bidirektionale Kommunikation wie *in vivo* statt, was zu höheren Fertilisierungsraten und einer besseren Embryomorphologie vgl. mit konventioneller IVM führt (Johnson et al., Fertil Steril 2008, Vanhoutte et al., Human Reproduction 2009).

Der positive Effekt einer Cokultur zeigt sich auch in der Kultivierung von Embryonen. Für die Cokultivierung werden autologe Endometrium- oder Tubenzellen, endometriale bzw. tubare Zelllinien von Mensch und Tier, sog. Verozellen (immortalisierte Nierenzellen vom Affen) und CZ verwendet. Der vermutete Mechanismus derartiger Cokulturen auf die Embryoentwicklung ist die Sekretion von embryotrophen Faktoren und die Detoxifizierung des Kulturmediums. Die Technik der Cokultur ist noch nicht ausgereift, um in der Routine-IVF eingesetzt zu werden. Allerdings könnte eine deutliche

Verbesserung der Schwangerschaftsrate bei Patienten nach mehreren IVF-Fehlversuchen oder einem Alter von über 40 Jahren durch die *in vitro* Kultivierung mit somatischen Zellen nachgewiesen werden. (Desai et al., BioMed 2008, Kattal et al., Fertil Steril 2008). Zusätzlich kann durch das Studium der Interaktionen zwischen EZ bzw. Embryo und umgebenden somatischen Zellen in einer Cokultur der Nährstoff- und Energiebedarf der EZ bzw. des Embryos besser analysiert werden, was zur Optimierung der Kulturmedien für die *in vitro* Reifung bzw. die *in vitro* Kultivierung beitragen kann.

### **Freie Radikale *in vitro***

[Irmhild Gruber, Landesklinikum, St. Pölten](#)

Freie Radikale sind instabile Atome oder Moleküle mit freien Außenelektronen. Dadurch sind sie hochreaktiv, da solche freien Elektronen immer bestrebt sind, in eine stabile, gepaarte Form überzugehen. Durch die Paarung der Elektronen wird anderen Molekülen ein Elektron entrissen, wodurch eine Kettenreaktion ausgelöst wird. Solche Reaktionen laufen ständig in aeroben biologischen Systemen ab, wobei es unter Umständen auch zur Schädigung von Biomolekülen kommen kann. Es wird diskutiert, ob die Embryokulturen unter Öl (Mineralöl, Paraffin liquid) durch die Lipidperoxidation des Öles und die daraus resultierenden freien Radikale die Entwicklung der Embryonen beeinträchtigen. Humanes Serumalbumin (HSA) in den Embryokulturmedien soll dabei eine vermittelnde Rolle spielen. Es wird vermutet, dass die Oxidationsprodukte der Lipidperoxidation vermittelt durch HSA durch die „Zona pellucida“ geschleust werden, und es dabei zu der oben beschriebenen Kettenreaktion von freien Radikalen kommt, welche zu einer Schädigung der Embryonen führt. Als Radikalfänger im Medium dienen antioxidative Enzyme und nicht-enzymatische Substanzen wie Vitamine oder Glutathion.

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass v.a. die ungesättigten Fettsäuren im Paraffinöl nach der Öffnung

oxidieren. Diese Lipidperoxidation wird durch UV-Licht gefördert. Daher ist es ratsam die Ölfäschchen in der Verpackung zu belassen und bei 4°C zu lagern, was eine zusätzliche Stabilität des Öls bewirkt. Leider zeigte sich auch, dass es zu chargenabhängigen Veränderungen in der Zusammensetzung des Paraffinöls durch Lipidoxidation schon vor der Öffnung des Fläschchens kommen konnte. Diesem Einfluss können wir im Labor nicht entgegenwirken, da wir über die genaue Zusammensetzung nicht Bescheid wissen. Nun ist uns aber diese Tatsache bewusst und könnte uns vielleicht in Zukunft bei der Optimierung der Kultivierungsbedingungen nützlich sein.

Peroxidation of mineral oil in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development. Otsuki et al., FS 2007. Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its association with albumin in culture. Otsuki et al., FS 2009.



Alles ist vor nichts sicher.  
Nichts ist vor allem sicher.  
Vor allem ist nichts sicher.

© Erhard Blanck (\*1942)

## ANKÜNDIGUNGEN

**19. EFA-Treffen** voraussichtlich  
am 27.03.2010 in Velden

Besucht unsere neue Homepage

[www.embryologenforum.at](http://www.embryologenforum.at)

Digitale Fotos von euch schickt bitte  
an Thomas Ebner

## NEWS

Lucy Sarah Steiner (Innsbruck) hat dieses Jahr  
in Amsterdam als einzige Österreicherin die  
Prüfung zum Klinischen Embryologen  
erfolgreich absolviert. Gratulation!

## STELLENAUSSCHREIBUNG

Die Kontaktaufnahme für die Stellenangebote  
und Stellengesuche erfolgt über:

**Dr. Marianne Moser**

Tel. 050 554 63-24600 oder 0664/4505741.

[marianne.moser@gespag.at](mailto:marianne.moser@gespag.at)

Biologin wird gesucht für

Vorarlberg

Dr. Norbert Loacker

Tel.: 0043 5522 303 4675

[kinderwunsch@lkhf.at](mailto:kinderwunsch@lkhf.at)

## IMPRESSUM

*Herausgeber:* EFA-Vorstand

*Redaktion & Layout:* Alexandra Maier