

Embryoqualität

Never judge a book by its cover?

R. Campo¹, M. Binda, G. Van Kerkhoven, S. Gordts

In vitro-Embryonen sind während ihrer wenige Tage dauernden Kultur außerhalb des Mutterleibes einem mehr oder weniger großen Stress ausgesetzt, der sich negativ auf Physiologie, Genexpression und weitere Entwicklung auswirken kann (1). Speziell dem Kulturmedium kommt besondere Bedeutung hinsichtlich seiner Interaktion mit den Gameten und deren weiterer Embryonalentwicklung zu (2).

Komposition von Kulturmedien

Heutzutage verwenden die meisten IVF-Institute kommerziell erhältliche Kulturmedien, deren genaue Zusammensetzung leider oft im Unklaren bleibt. Prinzipiell basieren alle im IVF verwendeten Kulturmedien auf 2 Strategien, entweder dem „back to nature“-Ansatz (3) oder der „let the embryo choose“-Philosophie (4). Ersterer Ansatz bezieht sich auf den Versuch, die unterschiedlichen biochemischen Milieus, der die befruchtete Eizelle in vivo ausgesetzt ist, nachzuahmen, sodass der Präembryo zu jeder Zeit optimal versorgt ist. Da die Zygote während der ersten Entwicklungstage vom Ovidukt in den Uterus transportiert wird, und sich diese beiden Milieus in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, bestehen „back to nature“-Medien immer aus 2 sequentiellen Medien. Im Gegensatz dazu bietet ein „let the embryo choose“-Medium dem sich entwickelnden Embryo die volle Palette an Substraten an, sodass er die jeweils benötigten Metaboliten – je nach Bedarf – bevorzugt verstoffwechseln kann. In solchen Fällen reicht ein universelles (=globales)

Medium aus, um den Embryo bestmöglich in seinem Wachstum zu unterstützen.

Wissenschaftlich gesehen, gibt es keinen Hinweis, dass eine der beiden Hypothesen der anderen überlegen wäre (5). So demonstrierten Biggers und Racowsky (6) die Effektivität eines globalen Mediums (KSOMAA) hinsichtlich der Blastozystenentwicklung. In weiteren Arbeiten zeigten sich sowohl bei Verwendung eines sequentiellen als auch eines globalen Mediums identische Implantations- und Schwangerschaftsraten (7, 8). Eine rezente Studie fand unter Verwendung eines globalen Produktes sogar deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich Überleben und Vitalität der Embryonen am Tag 5 der Entwicklung (9).

Ein relativ neues Kulturmedium auf dem Sektor der globalen Medien ist GM501 (Gynemed, Lensahn, Deutschland). Dieses an KSOMAA angelehnte Bicarbonat-gepufferte Nährmedium ist für die In-vitro-Kultivierung menschlicher Eizellen und Embryonen bis hin zur Blastozyste geeignet. Im Gegensatz zu manchen anderen globalen und sequentiellen Medien ist

GM501 Gentamycin als Antibiotikum beigefügt, welches eine längere Halbwertszeit aufweist als der sonst übliche Penicillin/Streptomycin-Zusatz. Zudem bedient sich GM501 einer stabileren Form der Aminosäure Glutamin (Na-Alanyl-Glutamin), um so einer embryotoxischen Akkumulation von Ammoniumionen vorzubeugen.

Prospektiv randomisierte Beobachtung im LIFE Institut, Leuven, Belgien

Diese innovativen Verbesserungen ermutigten uns GM501 (Studiengruppe) mit unserem routinemäßig verwendeten sequentiellen Medium (Kontrollgruppe, ISM1, MediCult, Jyllinge, Dänemark) in einem prospektiv randomisierten Beobachtungsmodell hinsichtlich Embryoqualität und Schwangerschaftsoutcome zu vergleichen.

Insgesamt wurden 320 Patienten randomisiert, wovon 235 Patienten (mit insgesamt 2003 Eizellen) die Einschlusskriterien erfüllten (keine TESE, PID und Blastozystenkultur). Tab. 1 zeigt, dass sich die Befruchtungsraten der Studiengruppe nicht von der der Kontrollgruppe unterschieden ($P > 0,05$). Und obwohl es auf den ersten Blick auch den Anschein hatte, als wären auch die Schwangerschaftsraten nichtsignifikant unterschiedlich ($P > 0,05$), führte eine erhöhte Abortrate in der sequentiellen Kontrollgruppe jedoch zu einer signifikant erhöhten klinischen Schwangerschafts- ($P = 0,037$) und Geburtenrate ($P = 0,018$) unter der Verwendung von GM501. Dieses Phänomen deckt sich mit Beobachtungen anderer Autoren (10).

Wie in Tab. 2 angedeutet, kristallisieren sich die Unterschiede in der klinischen

Tab.1 Vergleich von Studien- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Behandlungsausganges.

	GM501f	ISM1
Randomisierte Zyklen	160	160
Inkludierte Zyklen	122	113
Anzahl der Eizellen	1038	965
Befruchtungsrate	696/1038 (67,1)	642/965 (66,5)
Anzahl der Embryotransfers	116/122 (95,1)	106/113 (93,8)
Positives β -hCG	42 (36,2)	34 (32,1)
Implantationsrate	42/181 (36,2)	27/176 (15,3)
Klinische Schwangerschaftsrate	36 (31,0) ^a	20 (18,9) ^a
Fehlgeburten	9/42 (21,4)	16/34 (47,1)
Anzahl Entbindungen	33 (28,5) ^b	17 (16,0) ^b
Anzahl der geborenen Kinder	36	19

Werte in Klammern sind Prozentsätze.

^{a,b} $P < 0,05$

Tab.2 Vergleich des Behandlungsausgangs in Abhängigkeit des Transfertages.

	Tag 2		Tag 3	
	GM501	ISM1	GM501	ISM1
Anzahl der Embryotransfers	65	59	51	47
Positives β -hCG	20 (30,8)	19 (32,2)	22 (43,1)	15 (31,9)
Klinische Schwangerschaftsrate	15 (23,1)	12 (20,3)	18 (35,3) ^a	6 (12,8) ^a
Anzahl Fehlgeburten	5 (25,0)	7 (36,8)	4 (18,2) ^b	9 (60,0) ^b

Werte in Klammern sind Prozentsätze.

^{a,b} $P < 0,01$

Schwangerschafts- und Abortrate mit zunehmender Dauer der in vitro-Kultur heraus. Sind die Ergebnisse nach einem Transfer am 2. Tag noch vergleichbar, schlägt mit Fortdauer der Kultivierungsperiode (Tag 3), zumindest in dieser prospektiven Beobachtung, das Pendel zugunsten dieses neuen Mediums aus ($P < 0,01$). Da beim humanen Embryo eben in dieser kritischen Phase zwischen 4- und 8-Zellstadium das embryonale Genom exprimiert wird, lässt dies den Schluss zu, dass in der Kontrollgruppe dieser Prozess negativ beeinflusst wurde, ohne das die Embryoqualität oder die Anzahl der Schwangerschaften dies vermuten ließen. Auffallend war, dass die Embryonen, welche im routinemäßig verwendeten Medium kultiviert wurden, eher eine bessere Morphologie aufwiesen, als die Embryonen der Studiengruppe.

Einfluss der Kulturbedingungen auf die Embryoqualität

Da sich beide Patientenkollektive hinsichtlich ihrer demographischen Daten, Indikationen, den Details der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation sowie dem Embryotransfer nicht voneinander unterscheiden, liegt ein Einfluss der in vitro-Kultur auf die Häufigkeit von Fehlgeburten nahe. Ein solcher negativer Aspekt unterschiedlicher Kulturbedingungen auf das Implantationsverhalten wird schon länger vermutet (11).

Zudem wurde beschrieben, dass die unterschiedliche Komposition verschiedener Kulturmedien die Qualität der Embryonen verändern kann (12–14). Im konkreten Fall waren die beiden wesentlichen Unterschiede zwischen GM501 und ISM1 in ihrer Aminosäurekonstellation bzw. der Art des verwendeten Antibiotikums zu suchen. Da das stabile Na-Alanyl-Glutamin die Konzentration von embryoschädlichen Zerfallsprodukten in GM501 minimiert, erklärt sich zwar die bessere klini-

sche Schwangerschaftsrate, nicht jedoch die schlechtere Morphologie der Embryonen. Ebenso fällt es schwer, Gentamycin als Verursacher festzumachen, ist doch die Verwendung von Streptomycin alleine oder einer Kombination von Streptomycin und Penicillin (ISM1) kritisch betrachtet worden (15, 16).

Grundsätzlich wird die Qualität eines Embryos während der frühen Teilungsstadien anhand der Zellzahl und seines Grads an Fragmentierung bestimmt. Im Detail sollte ein Embryo bester Prognose am 2. Tag der Entwicklung 4 Blastomeren haben, und am 3. Tag 8 Zellen, wobei die nicht mehr als 20% des Embryos fragmentiert sein sollten. Angesichts dieses Beurteilungsschemas bleibt zu bemerken, dass hinsichtlich einer Prognose über die Chancen einer Implantation die Zellzahl über den Grad an Fragmentierung zu stellen ist.

Gordts et al. (17) unterstrichen die Wichtigkeit der Laborerfahrung hinsichtlich der Embryonenselektion unter der Restriktion des belgischen Embryonenschutzgesetzes. Diese Autoren konnten zeigen, dass trotz einer Zunahme der Anzahl der „Single Embryo-Transfers“ (von 14% auf 49%) konstant gute Schwangerschaftsraten erzielt werden konnten (36% bzw. 37%).

Es sind aber auch Studien bekannt, wo im Vergleich zweier Medien ein Medium hinsichtlich der Embryoqualität deutlich besser abschnitt, und trotzdem keine höheren Implantationsraten beobachtet wurden (8). Umso interessanter erscheint es, dass in der vorliegenden Studie Embryonen vermeintlich schlechterer Qualität (hinsichtlich ihres Grads an Fragmentierung) nicht nur gleich hohe Schwangerschaftsraten erzielen konnten, sondern sogar eine geringere Rate an Fehlgeburten aufwiesen. Dies führte letztendlich dazu, dass die klinische Schwangerschaftsrate mit GM501 signifikant höher war, als die des Vergleichsproduktes, obwohl in dieser

Gruppe vermehrt „bessere“ Embryonen transferiert wurden. Da der Unterschied in der Embryoqualität am Tag 2 der Entwicklung minimal war und erst am 3. Tag offenkundig wurde, stimmen wohl Beobachtungen, dass die Qualität von Tag 3 Embryonen nicht mit der weiteren Entwicklung hin zur Blastozyste korrelieren (18, 19). Zudem muss man sich vor Augen halten, dass Fragmente des Embryos durchaus eine Momentaufnahme sein können, ist doch ihre spontane Lysis oder Wiederintegration in den Zellverband gut dokumentiert (20, 21).

Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das belgische Embryonenschutzgesetz mit seiner restriktiven Transferpolitik nicht zwingendermaßen zu schlechteren Schwangerschaftsraten führen muss (17). Dies lässt den Schluss zu, dass die herkömmlichen morphologischen und biologischen Kriterien anscheinend ausreichen, das Entwicklungspotential der Embryonen zu prognostizieren. Und da in dieser Studie die Transfers am 2. und 3. Tag der Entwicklung stattfanden, ist eine routinemäßige Weiterkultur zum Blastozystenstadium offensichtlich nicht zwingend notwendig.

Obwohl ein Zusammenhang zwischen Embryomorphologie und Vitalität hinreichend beschrieben ist, zeigte diese prospektiv randomisierte Studie des LIFE Instituts einmal mehr die Subjektivität solcher morphologischer Begutachtungen auf. Denn obwohl im Lichtmikroskop keinerlei Unterschiede in der Morphologie der Embryonen zu sehen waren, kam es in der Kontrollgruppe zu deutlich mehr Schwangerschaftsabbrüchen. Offensichtlich sollten außer der lichtmikroskopischen Beurteilung andere nicht-invasive Selektionsmethoden zur Vitalitätsbestimmung herangezogen werden.

Kürzlich wurde eine Vielzahl solcher nicht-invasiven Techniken beschrieben, darunter die Messung des Verbrauchs oder der Produktion verschiedenster Stoffwechselmetaboliten, die respiratorische Tätigkeit des Embryos sowie die Kinetischen Ereignisse während der ersten Teilungsschritte (22–25).

Bis zur routinemäßigen Anwendung solcher neuer Technologien wird zwar noch einige Zeit vergehen, jedoch lässt sich an-

hand der vorliegenden Daten jetzt schon behaupten, dass man ein Buch, sprich den Embryo, weniger nach seinem Einband (Morphologie) als vielmehr nach seinem Inhalt beurteilen sollte.

Literatur

- 1 Gardner DK, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M. Quality control in human in vitro fertilization. *Sem Reprod Med* 2005; 23: 319–324
- 2 Gardner DK, Lane M Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367–382
- 3 Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 3): 148–159

Ausführliche Literaturliste beim Korrespondenzautor erhältlich.

Korrespondenzautor :

R. Campo, MD

Leuven Institute of Fertility and Embryology (LIFE), Leuven, Belgium

E-Mail: Rudi.Campo@lifeleuven.be