



# **SGRM Forschungspreis 2012**

---

# **Prix de la recherche SSMR 2012**

## ***ABSTRACTBOOK***

# Program

Friday, January 20, 2012

11.30 - 12.30 hours followed by the prize presentation  
Auditoire Charlotte Olivier, Rue du Bugnon 46, CHUV, Lausanne

\*\*\*\*\*

11.30 - 11.45 incl. Discussion

De l'infertilité à la parentalité. Une étude longitudinale des couples FIV.

*From infertility to parenthood: A longitudinal study of IVF couples*

Darwiche Joelle

11.45 - 12.00 incl. Discussion

GPR30/GPER-Expression in Endometriose: Neue Aspekte in der hormonellen Regulation

*Expression of GPR30/GPER: New insights in the hormonal regulation of Endometriosis?*

Samartzis Eleftherios

12.00 - 12.15 incl. Discussion

Concentration plasmatique maternelle de LIF et de sIL-2R le jour du transfert d'embryons:  
marqueurs predictifs d'une fausse couche precoce

*Maternal plasma LIF and sIL-2R concentrations of IVF patients on the day of embryo transfer:  
predictive markers of early pregnancy loss*

Gerber Stefan

12.15 - 12.30 incl. Discussion

Die Herstellung von embryonalen Stammzellenlinien aus überzähligen Embryonen, welche für die  
Stammzellenforschung gespendet wurden, sowie die sich daraus ergebenden Entwicklung der  
Reproduktionstoxikologie

*Derivation of human embryonic stem cells from supernumerary human embryos donated for  
research and development of a programme for reproductive toxicology*

A.-C. Feutz

---

## Prize Jury

\* Professor Siladitya Bhattacharya, Aberdeen - Scotland

\* Dr. Pasquale Florio, Siena + Empoli - Italy

\* Professor François Pralong, Lausanne - Switzerland

## INHALTSVERZEICHNIS / TABLE DES MATIÈRES

1.	<p>Concentration plasmatique maternelle de LIF et de sIL-2R le jour du transfert d'embryons: marqueurs predictifs d'une fausse couche precoce <i>Maternal plasma LIF and sIL-2R concentrations of IVF patients on the day of embryo transfer: predictive markers of early pregnancy loss</i></p>	Gerber S. et al
2.	<p>Der Plasmaspiegel von hochmolekularem Adiponektin, einem vasoprotektiven Protein sinkt unter Kurzzeittherapie mit Implanon® <i>Implanon Use lowers plasma concentrations of high-molecular-weight adiponectin</i></p>	Merki G.
3.	<p>Genexpressionanalyse von Zellen im Brustdrüsengewebe, entnommen von gesunden postmenopausalen Frauen nach Behandlung mit unterschiedlichen Präparate zur Hormonsubstitution <i>Whole genome analysis of breast tissue of healthy postmenopausal women as induced by hormone replacement therapy</i></p>	De Geyter Ch. et al
4.	<p>Die Herstellung von embryonalen Stammzellenlinien aus überzähligen Embryonen, welche für die Stammzellenforschung gespendet wurden, sowie die sich daraus ergebende Entwicklung der Reproduktionstoxikologie <i>Derivation of human embryonic stem cells from supernumerary human embryos donated for research and development of a programme for reproductive toxicology</i></p>	Feutz A.-C. et al
5.	<p>Die weibliche Fertilität wird durch das CC-Allel des PvuII-Polymorphismus im Intron 1 des <math>\alpha</math>-Östrogenrezeptorgens beeinflusst. <i>Female fertility is negatively modulated by the CC-allele of the PvuII polymorphic variant in intron 1 of the <math>\alpha</math>-oestrogen receptor gene</i></p>	M'Rabet N.
6.	<p>De l'infertilité à la parentalité. Une étude longitudinale des couples FIV. <i>From infertility to parenthood: A longitudinal study of IVF couples</i></p>	Darwiche J. et al
7.	<p>Inhibierung der Transkription, Expression und Sekretion von VEGF mittels dem Histondeazytylasehemmer Romidepsin in epithelialen Endometriosezellen. <i>Inhibition of transcription, expression, and secretion of the vascular epithelial growth factor (VEGF) in epithelial endometriotic cells by Romidepsin.</i></p>	Imesch P. et al
8.	<p>Geburt nach Autotransplantation von kryokonserviertem Ovargewebe <i>Live birth after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue</i></p>	Fahy-Deshe M. et al
9.	<p>Impacts de la stimulation ovarienne contrôlée et du syndrome d'hyperstimulation ovarienne sur la fonction thyroïdienne <i>Impact of controlled ovarian hyperstimulation and ovarian hyperstimulation syndrome on thyroid function</i></p>	Bellavia M. et al
10.	<p>Fécondation in vivo en utilisant une technologie d'encapsulation: effets sur la morphologie du zygote humain <i>In vivo fertilisation using an encapsulation technology: effects on the human zygote morphology</i></p>	Urner F. et al
11.	<p>Etude national sur la qualité du sperme en Suisse <i>National study on sperm quality in Switzerland</i></p>	Vargas J. et al
12.	<p>GPR30/GPER-Expression in Endometriose: Neue Aspekte in der hormonellen Regulation <i>Expression of GPR30/GPER: New insights in the hormonal regulation of Endometriosis?</i></p>	Samartzis E. et al
13.	<p>Erhöhte endometrial Placenta growth factor (PLGF) Genexpression in Frauen mit erfolgreicher Implantation <i>Increased endometrial placenta growth factor (PLGF) Genexpression in women with successful implantation</i></p>	Santi A. et al
14.	<p>Genexpressionsmuster in der Brust in Abhängigkeit von hormonell definierten Lebensphasen <i>Life stage differences in mammary gland gene expression profile in non-human primates</i></p>	Stute P. et al

👍 Die 4 besten Arbeiten / Les 4 meilleures travaux

# **CONCENTRATION PLASMATIQUE MATERNELLE DE LIF ET DE sIL-2R LE JOUR DU TRANSFERT D'EMBRYONS : MARQUEURS PREDICTIFS D'UNE FAUSSE COUCHE PRECOCE**

Gerber S.1), Chanson A.2), Urner F.2), Senn A.2) Reymondin D.1), Damnon F.1), Witkin SS.3)  
Germond M.2), Gremlich S.1).

- 1) Département de Gynécologie - Obstétrique, CHUV Lausanne
- 2) Centre de Procréation médicalement assistée, CPMA, Lausanne
- 3) Weill Medical College of Cornell University, New York

## Introduction :

Le succès de l'implantation reste une étape limitante lors des FIVET. Nous posons l'hypothèse que la concentration plasmatique maternelle de cytokines au jour du transfert d'embryons peut être un marqueur du succès d'une implantation ou non.

## Matériel et méthodes :

Etude prospective, monocentrique, validée par la commission d'éthique de la Faculté de Lausanne. 160 patientes suivies pour FIVET, soit en cycle naturel soit en cycle stimulé, sont incluses dans le protocole et subissent au jour du transfert d'embryons (ET0) et 14 jours plus tard (ET+14), un dosage plasmatique de cytokines : sIL-2R, IL-6, LIF et MMP2. Toutes les mesures de cytokines sont effectuées par ELISA. Les patientes sont réparties dans quatre groupes en fonction du pronostic de la FIVET : échec de grossesse, grossesse biochimique, fausse couche précoce et grossesse à terme.

## Résultats :

Les 4 groupes présentent les mêmes caractéristiques avec un âge moyen de 34 ans ; 119 en échec de grossesse, 8 avec une grossesse biochimique, 4 avec une fausse couche précoce et 29 ont accouché à terme.

La concentration plasmatique de sIL-2R à ET0 est 3 fois plus élevée chez les femmes qui développent une grossesse biochimique par rapport à un échec de grossesse ( $p=0.004$ ) ou à une grossesse à terme ( $p=0.030$ ). Les courbes ROC montrent une très bonne valeur prédictive de sIL-2R pour une grossesse biochimique (AUC=0.9) conduisant un risque de 17,6 fois supérieur avec une valeur seuil de 115.95 pg/ml. Inversement, la concentration du LIF est 3 fois plus basse dans les grossesses biochimiques et lors des fausses couches précoces comparées à un échec de grossesse ( $p=0.028$ ). Les analyses ROC offrent une bonne valeur prédictive pour ces groupes (AUC=0.7), conduisant à un risque augmenté de 5,6 fois de grossesses biochimiques et de fausses couches précoces avec une valeur seuil de 33.4 pg/ml. Lors de cycles normaux uniquement, la concentration de sIL-2R a une bonne valeur prédictive pour aboutir à une grossesse à terme (AUC=0.8) avec une chance augmentée de 8,5 fois par rapport à un échec de grossesse ( $p=0.006$ ), pour une valeur seuil de 34.75 pg/ml. Les valeurs de IL-6 à ET0 présentent des valeurs 2 fois plus élevée lors de grossesses à terme par rapport à celles d'un échec de grossesse ( $p=0.023$ ). Par contre les analyses ROC ne démontrent pas de bonnes valeurs prédictives. Les valeurs de MMP2 à ET0 et à ET+14 ne sont pas statistiquement différentes entre les 4 groupes. Les valeurs à ET+14 n'apportent pas de résultats significatifs.

## Conclusion :

Des valeurs élevées de sIL-2R et des valeurs trop basses de LIF dans le plasma maternel lors du transfert d'embryons sont associées à un risque augmenté de grossesses biochimiques et de fausses couches précoces. Ces résultats confirment la nécessité d'une certaine inflammation pour une bonne implantation, mais ni trop intense ni trop faible. La diminution du sIL-2R ou l'augmentation du LIF peuvent apparaître comme des nouveaux moyens thérapeutiques alternatifs, pour les femmes qui présentent des profils de cytokines défavorables, lors de FIVET. L'intérêt va se porter sur la possibilité de moduler ce profil pour le jour du transfert afin d'augmenter le taux de succès de l'implantation.

# **MATERNAL PLASMA LIF AND sIL-2R CONCENTRATIONS OF IVF PATIENTS ON THE DAY OF EMBRYO TRANSFER: PREDICTIVE MARKERS OF EARLY PREGNANCY LOSS**

Maternal cytokines as predictive factors in IVF

Gerber S.1), Chanson A.2), Urner F.2), Senn A.2) Reymondin D.1), Damnon F.1), Witkin SS.3) Germond M.2), Gremlich S.1).

- 1) Département de Gynécologie - Obstétrique, CHUV Lausanne
- 2) Centre de Procréation médicalement assistée, CPMA, Lausanne
- 3) Weill Medical College of Cornell University, New York

## Abstract:

Successful implantation is the rate limiting step in IVF. We hypothesized that concentration of certain maternal plasma cytokines on the morning of the embryo transfer day are indicators of the likelihood of successful embryo implantation.

sIL-2R, IL-6, LIF and MMP2 concentrations were measured in blood samples from 160 IVF patients (natural and stimulated-IVF cycles) on the morning of the embryo transfer day (ET0) and 14 days later (ET+14). Plasma sIL-2R concentrations at ET0 were three-fold higher in women who subsequently had a biochemical pregnancy than in those with a pregnancy failure ( $P=0.004$ ) or a normal term delivery ( $P=0.030$ ). Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis showed a very good predictive value of sIL-2R measurement for biochemical pregnancy (AUC=0.9) leading to a 17.6-fold higher risk of biochemical pregnancy for concentrations above a cutoff value of 115.95 pg/ml.

Conversely, LIF concentrations were three-fold reduced in biochemical pregnancies/first-trimester miscarriages as compared to pregnancy failures ( $P=0.028$ ). ROC curve analysis showed a fair predictive value of LIF measurement for biochemical pregnancy/first-trimester miscarriage (AUC=0.7) leading to a 5.6 higher risk of biochemical pregnancy/first trimester miscarriage for concentrations below a cutoff value of 33.4 pg/ml.

For natural cycles only, sIL-2R concentrations also had a good predictive value for normal term delivery (AUC=0.8) with an 8.5-fold higher chance of normal term delivery above a cutoff value of 34.75 pg/ml.

We suggest that too high sIL-2R and too low LIF maternal plasma concentrations on the morning of the embryo transfer day are associated with biochemical pregnancy/first trimester miscarriage, and could therefore be used as a tool in IVF patients management. Decreasing sIL2R or increasing LIF concentrations could even constitute a potential therapeutic alternative for those women with abnormal cytokine profiles at the time of embryo transfer.

## **DER PLASMASPIEGEL VON HOCHMOLEKULAREM ADIPONEKTIN, EINEM VASOPROTEKTIVEN PROTEIN SINKT UNTER KURZZEIT THERAPIE MIT IMPLANON®**

Merki-Feld G.S. 1) Klinik für Reproduktions-Endokrinologie, Universitätsspital Zürich

Einführung: Gestagenmethoden zur Verhütung werden meist solchen Frauen verschrieben, die wegen kardiovaskulärer Risiken keine kombinierten hormonalen Verhütungsmittel einnehmen dürfen. Epidemiologische Langzeitdaten zum arteriellen Risiko unter reiner Gestagenverhütung liegen bisher nicht vor. Surrogatmarker für entzündliche arterielle Prozesse sind deshalb eine wichtige Hilfe, um das Langzeitrisiko dieser Gruppe von Verhütungsmethoden abschätzen zu können. Implanon® ist ein etonogestrel freisetzendes Verhütungsimplantat. Bisher fanden wir keinen negativen Einfluss des Implantates auf verschiedene arterielle Risikoparameter (Triglyceride, LDL, HDL/Cholesterin Quotient, CRP, Endothelin-1, TGF-beta, Nitrate/Nitrite, Interleukin-6). Adipokine sind hormonähnliche Substanzen, die im Fettgewebe gebildet werden und protektiv an der Gefässwand wirken. Wir haben bei gesunden Frauen beobachtet, dass eine negative Assoziation zwischen Gesamtheadiponektin (TA) beziehungsweise seiner Subfraktion hochmolekularem Adiponektin (HMW) und dem Oestrogenspiegel, sowie dem Testosteronspiegel besteht. TA und noch mehr HMW und der Quotient HMW/TA sind anerkannte wichtige Prädiktoren für Diabetes und koronare Herzkrankheit. Da Implanon® die weiblichen Androgen – und Östrogenspiegel beeinflusst, stellten wir uns die Frage, ob das Implantat Veränderungen dieser wichtigen protektiven Biomarker induzieren könnte.

Material und Methoden: Eingeschlossen wurden 40 Frauen (n=20 Kontrollen; n=20 Frauen mit Wunsch nach Implanon®). Die erste Blutentnahme erfolgte während der frühen Follikelphase des Menstruationszyklus, die zweite Blutentnahme erfolgte 12 Wochen nach Implanoneinlage (Kontrollgruppe: Frühe Follikelphase des Zyklus 4). Untersucht wurden Adiponektin und HMW, sowie Hormone und Risikomarker, die mit der Adiponektinregulierung zusammenhängen könnten.

Ergebnisse: Vor Implanoneinlage bestanden signifikante Korrelationen sowohl zwischen TA und HDL, als auch zwischen TA und C-reaktivem Protein (CRP), einem Marker für entzündliche Veränderungen an der arteriellen Gefässwand. Implanonanwendung induzierte einen signifikanten Abfall von HMW und dem HMW/TA Quotienten. Plasmaspiegel für Lipide (Cholesterin, HDL, LDL), SHBG, und Testosteron fielen signifikant.

Schlussfolgerung: Implanon® führte nach 3 Anwendungsmonaten zu einer signifikanten Reduktion des protektiven Adipokins HMW. Dies, obwohl die Mehrzahl der bisher untersuchten Risikoparameter nicht ungünstig durch Implanon® beeinflusst werden. Die klinische Interpretation dieses Resultates ist schwierig, da man nicht vorhersagen kann, inwieweit sich Anstieg günstiger Parameter und Abfall von HMW in der Summe auf die Gefässwand auswirken. Da die Etonogestrelspiegel in den ersten Monaten nach der Einlage am höchsten sind, könnten sich die HMW –Spiegel im bei längerer Anwendung von Implanon® normalisieren.

## **IMPLANON USE LOWERS PLASMA CONCENTRATIONS OF HIGH-MOLECULAR-WEIGHT ADIPONECTIN**

Merki-Feld G.S. 1) Klinik für Reproduktions-Endokrinologie, Universitätsspital Zürich

Objective: Progestagen-only contraceptives (POP) are preferentially prescribed to women with an increased risk for cardiovascular events. There are only few epidemiologic data which justify this clinical procedure. In addition the effect of POP on important arterial risk parameters is only partially investigated. Implanon® is an etonogestrel-releasing contraceptive implant. In previous studies we did not observe a negative effect of this implant on parameters associated with an increase in cardiovascular events (Triglyceride, LDL, HDL/Cholesterin ratio, CRP, Endothelin-1, TGF-beta, Nitrate/Nitrite, Interleukin-6). TA and its subfractions HMW, medium-molecular weight adiponectin (MMW) and low-molecular weight adiponectin (LMW) are proteins released from adipose tissue. In healthy premenopausal women we found a negative association between HMW and estradiol and between the HMW/TA ratio and testosterone. HMW and the HMW/TA ratio are important predictors for coronary heart disease and diabetes. Implanon® induces changes in estradiol and testosterone plasma levels. With the present study we aimed to investigate an potential effect of Implanon ® on the protective adiponectin and its isomer HMW.

Material and methods: This prospective study was performed in the division for Reproductive Endocrinology of the University Hospital of Zürich. 40 healthy women with regular cycles were included (n=20 controls; n=20 cases with Implanon®).

Blood samples for the measurements of TA, HMW, CRP, SHBG, sexual hormones and plasma lipids were taken in the early follicular phase of the cycle in both groups. A second sample was taken 12 weeks after Implanon® insertion or in the control group during the early follicular phase of cycle four.

Results: At baseline there was a significant negative correlation between TA and the parameters HDL and CRP. Implanon® treatment caused a significant decrease in HMW and the HMW/TA ratio. Additionally plasma lipids (cholesterol, HDL, LDL), SHBG and testosterone levels decreased significantly.

Conclusion: Short-term Implanon® use was associated with a decrease in the cardioprotective adiponectin isomer HMW. Considering the failing negative effect of the implant on previously studied arterial risk markers the present results are unexpected. Because of the combination of positive and negative effects on risk markers, the potential clinical consequences of the data are difficult to predict. It remains to be investigated levels if HMW levels rise with longer use of the implant, when etonogestrel levels fall.

# **GENEXPRESSIONANALYSE VON ZELLEN IM BRUSTDRÜSENGEWEBE, ENTNOMMEN VON GESUNDEN POSTMENOPAUSALEN FRAUEN NACH BEHANDLUNG MIT UNTERSCHIEDLICHEN PRÄPARATE ZUR HORMONSUBSTITUTION**

Christian De Geyter

Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universität Basel

Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit A. Sieuwerts, J.W.M. Martens und J.A. Foekens von der Abteilung für Medizinische Onkologie, Josephine Nefkens Institut and Cancer Genomics Centre, Erasmus MC Rotterdam, Niederlande, durchgeführt.

## Einleitung:

Die Beurteilung des Brustkrebsrisikos bei der postmenopausalen Frau wird heute überwiegend auf der Grundlage eines klinischen Skoresystems und anhand der mammographischen Dichte der Brustdrüse vorgenommen. Die unterschiedliche Auswirkung verschiedener Hormonsubstitutionspräparate kann möglicherweise für die Bestimmung von Genexpressionsprofilen verwendet werden, anhand dessen neue Methoden für die Erstellung einer genaueren Vorhersage des Brustkrebsrisikos etabliert werden können.

## Methoden:

Bei insgesamt 33 gesunden postmenopausalen Frauen wurden vor und nach einer sechsmonatigen Behandlung mit 2 mg mikronisiertes Östradiol, oder mit 2 mg Östradiol zusammen mit 1 mg Norethisteronazetat (NETA), mit 2.5 mg Tibolon oder ohne Hormonbehandlung Stanzbiopsien der linken Brustdrüse durchgeführt. Die Studie wurde prospektiv randomisiert durchgeführt. Für die Verabreichung des Östradiols wurden lediglich Frauen nach Hysterektomie selektioniert. In einer ersten Pilotphase wurde die Expression von 102 Genen und 46 mikroRNA's, deren Verbindung mit der Entstehung von Brustkrebs bereits bekannt war, gemessen. In einer zweiten Phase wurde das gesamte Genom der entnommenen Brustzellen anhand der Illumina RNAseq-Methode analysiert. Für die Analyse standen die Proben von 5 Frauen vor und nach Behandlung mit Östradiol und NETA, von 5 Frauen vor und nach Behandlung mit Östradiol, von 6 Frauen vor und nach Behandlung mit Tibolone sowie von 6 Frauen ohne Hormonbehandlung zur Verfügung.

## Resultate:

Eine ausreichende Menge RNA konnte lediglich aus 22 Biopsaten extrahiert werden (66.7%). Die Behandlung mit Östradiol und NETA übte die stärkste Auswirkung auf die Brustkrebs-assoziierten Gene und MikroRNA's aus (16.2%), gefolgt von Östradiol (10.1%) und Tibolone (4.7%). Die Ganzgenomanalyse ergab, dass Östradiol und NETA die Expression von 509 Genen signifikant (1.5-fach) veränderte, während die Expression von lediglich 99 Genen durch Östradiol sowie 59 Gene durch Tibolone modifiziert wurde. Drei neue Signalketten, welche bislang nicht in Verbindung mit der hormonellen Regulierung von Brustkrebs gebracht wurden, wurden identifiziert.

## Schlussfolgerung:

Ähnlich wie bei der mammographischen Dichte hat die Verabreichung von Östradiol in Kombination mit NETA die grösste Auswirkung auf die Genexpression in den Zellen der Brustdrüse. Hierbei wird die Stimulation der Steroidgenese von einer Unterdrückung der Steroidrezeptordichte vergesellschaftet. Die Genom-Analyse ermöglichte die Identifikation von drei neuen Signalketten, welche bislang nicht mit der Auswirkung von Hormonen auf die Brustdrüse in Verbindung gebracht wurden. Diese Ergebnisse werden derzeit mit Zelllinien experimentell validiert.



# **WHOLE GENOME ANALYSIS OF BREAST TISSUE OF HEALTHY POSTMENOPAUSAL WOMEN AS INDUCED BY HORMONE REPLACEMENT THERAPY**

Christian De Geyter

Clinic of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University of Basel

This work was performed in close collaboration with A. Sieuwerts, J.W.M. Martens and J.A. Foekens of the Department of Medical Oncology, Josephine Nefkens Institute and Cancer Genomics Centre, Erasmus MC Rotterdam, the Netherlands.

## Introduction:

Risk assessment of future breast cancer risk through exposure to sex steroids currently relies on clinical scorings such as mammographic density. The differential effects of estradiol, estradiol administered together with gestagens, or tibolone on gene expression in normal breast tissue samples taken from postmenopausal women may be used to identify novel gene expression profiles associated with a higher breast cancer risk.

## Methods:

Breast tissue samples were taken from 33 healthy postmenopausal women before and after a six month treatment with either 2 mg micronized estradiol, 2 mg micronized estradiol and 1 mg norethisterone acetate (NETA), 2.5 mg tibolone or no HRT. Except for estradiol only, which was only given to women after hysterectomy, the allocation to each of the three groups was randomized. In a first experimental phase, the expression of 102 mRNAs and 46 microRNAs putatively involved in breast cancer were prospectively determined in the biopsies of 6 women receiving no HRT, 5 women receiving estradiol only, 5 women receiving the combined estradiol and NETA, and 6 receiving tibolone. In a second experimental phase, RNA extracted from the small biopsies was hybridized with the Illumina gene expression array method, with which 48'000 genes were measured simultaneously.

## Results:

Sufficient good quality RNA was extracted from 22 biopsies (66.7%). Six month treatment of postmenopausal women with estradiol and NETA resulted in the highest number of differentially ( $p < 0.05$ ) regulated genes linked to breast cancer (16.2%) as compared to baseline, followed by estradiol only (10.1%) and tibolone (4.7%). Whole genome analysis allowed the identification of genes previously not linked to breast cancer and similarly revealed that 509 genes were differentially ( $> 1.5$  fold) regulated by estradiol and NETA, whereas only 99 genes were differentially expressed by estradiol only and 59 genes by tibolone. Three novel signalling pathways, previously not associated with breast cancer nor with HRT, were identified.

## Conclusions:

In this prospective study, prolonged administration of estradiol and NETA and to a lesser extent of estradiol but not of tibolone was associated in otherwise healthy breast tissue with a change in the expression of genes putatively involved in breast cancer. Our data suggest that normal mammary cells triggered by estradiol together with NETA adjust for steroidogenic up-regulation through down-regulation of the estrogen-receptor pathway. Whole genome analysis revealed three novel signalling pathways previously not linked to HRT and breast cancer and these are now being validated using breast tissue and breast cancer cell lines.

# **DIE HERSTELLUNG VON EMBRYONALEN STAMMZELLENLINIEN AUS ÜBERZÄHLIGEN EMBRYONEN, WELCHE FÜR DIE STAMMZELLENFORSCHUNG GESPENDET WURDEN, SOWIE DIE SICH DAR AUS ERGEBENDEN ENTWICKLUNG DER REPRODUKTIONSTOXIKOLOGIE**

A.-C. Feutz, O. Sterthaus, Ch. De Geyter

Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universität Basel

Swiss Center for Applied Human Toxicology (SCAHT)

## Einleitung:

In Übereinstimmung mit den Richtlinien des Stammzellenforschungsgesetzes (StFG) wurden inzwischen aus überzähligen und für die Forschung gespendeten Blastozysten fünf neue Stammzellenlinien (hESC) produziert und charakterisiert. Diese Linien können jetzt für den Aufbau eines Testsystems verwendet werden, in dem die Teratogenizität neuer Substanzen auf der Organogenese evaluiert werden kann.

## Methoden:

Teratogene Substanzen werden durch ihr Potential definiert, die normale Entwicklung eines Embryos oder Feten zu beeinträchtigen. Diese führt zum Abort oder zum intrauterinen Fruchttod oder zur Entwicklung kongenitaler Fehlbildungen. Die potentielle teratogene Wirkung neuer Substanzen wird üblicherweise an schwangeren Tieren getestet, welche mit verschiedenen Dosierungen der Testsubstanz in Kontakt gebracht werden. Die Ergebnisse solcher Testungen werden dann auf das humane System übertragen. Die Testung neuer Substanzen mit potentieller teratogener Wirkung kann stattdessen auch mit differenzierenden hESC evaluiert und quantifiziert werden. Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden hESC neuronal differenziert und in Verbindung mit verschiedenen Substanzen mit bekannter neuronaler teratogener Wirkung gebracht.

## Ergebnisse:

Die Auswirkung von fünf Substanzen auf die neuronale Differenzierung von hESC wurde evaluiert: Nikotin, Cyclopramid, Valproinsäure und Quecksilber. Die Ergebnisse demonstrieren eindeutig, dass die neuronale Differenzierung von hESC in der Lage ist, sowohl eine akute Toxizität (die Substanz verbleibt in der Nährlösung) oder persistierende Toxizität (die Substanz wurde nach kurzer Zeit entfernt, jedoch bleibt der Effekt langfristig messbar) nachzuweisen. Die Ergebnisse stimmen gut mit den bekannten Beobachtungen in vivo überein.

## Schlussfolgerung:

Die kontrollierte Differenzierung von hECS ermöglicht den Nachweis der teratogenen Wirkung von Substanzen und schliesst somit die Lücke zwischen der pädiatrischen Toxikologie und der Reproduktionstoxikologie.

# **DERIVATION OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS FROM SUPERNUMERARY HUMAN EMBRYOS DONATED FOR RESEARCH AND DEVELOPMENT OF A PROGRAMME FOR REPRODUCTIVE TOXICOLOGY**

A.-C. Feutz, O. Sterthaus, Ch. De Geyter

Clinic for Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University of Basel,  
Swiss Center for Applied Human Toxicology (SCAHT)

## Introduction:

In accordance with the Swiss legislation on Stem Cell Research (StFG) five new human embryonic stem cell (hESC) lines were derived from supernumerary blastocyst embryos donated for research since 2008. These cell lines were fully characterized and can now be used for the assessment of toxic effects on embryonic development of compounds with known or unknown teratogenicity.

## Methods:

Teratogenic agents are defined as chemicals which have the potential to disturb the normal development of an embryo or a foetus, leading to pregnancy loss or to the development of congenital malformations. Teratogenicity testing is usually carried out in pregnant animals, which are brought in contact with various dosages of compounds to be evaluated. The findings in the animal model are transposed to the human. Human embryonic stem cells or cells with induced pluripotency provide a unique and unlimited cell reservoir, from which uniform populations of differentiated cells can be produced both consistently and reproducibly. Teratogenicity testing may be carried out in differentiation hESC lines to substitute the animal model. In order to establish proof of concept, we have developed the differentiation of hESC into the neuronal lineage and have evaluated the effect of several compounds with known neurodevelopmental toxicity on the neuronal differentiation process.

## Results:

Five compounds were evaluated: nicotine, cyclopramid, valproic acid and methylmercury. Our results demonstrate that our method is able to reveal both acute (when the toxicant is present during the event) and persistent toxic effects (abnormal cell behavior, still visible several weeks after removal of the toxicant). Furthermore, all results, both positive (enhancement of neural differentiation) and negative (reduction, delay or arrest of neural differentiation), are consistent with in vivo data observed with similar toxicants.

## Conclusions:

Our research project has the potential to fill the gap between conventional pharmacology in infant and adult organs and the teratogenic effects during embryogenesis.

# **DIE WEIBLICHE FERTILITÄT WIRD DURCH DAS CC-ALLEL DES PVUII-POLYMORPHISMUS IM INTRON 1 DES A-ÖSTROGENREZEPTORGENS BEEINFLUSST.**

N. M'Rabet, R. Moffat, Ch. De Geyter  
Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universität Basel

## Einleitung:

Die derzeit verwendeten Methoden für die Bestimmung der Ovarialreserve, wie die basale FSH-Konzentration, die antrale Follikelzahl und AMH, beschreiben lediglich den aktuellen Zustand der Ovarialreserve, jedoch nicht deren langfristige Entwicklung. Derzeit steht uns noch kein Testverfahren für die frühzeitige Vorhersage einer späteren vorzeitigen Ovarialinsuffizienz zur Verfügung. Angesichts des zunehmenden Trends zur verspäteten Realisierung des Kinderwunsches wäre eine solche langfristige Vorhersagemöglichkeit wünschenswert. Eine genetische Ursache für die frühzeitige Entwicklung einer Ovarialinsuffizienz wird als wahrscheinlich erachtet. Mehrere Polymorphismen wurden bislang mit einer verminderten Ansprechbarkeit der Ovarien auf eine Gonadotropinstimulation als Surrogatparameter für die Fertilitätsreserve in Verbindung gebracht. Eine direkte Korrelationsstudie einer dieser Polymorphismen mit der weiblichen Fertilität liegt bislang nicht vor.

## Methoden:

Zweihundert fertile Frauen, welche innerhalb von drei Monaten konzipierten, sowie 348 menstruierende Frauen mit Infertilität sowie 48 Frauen mit Klimakterium praecox wurden für die Teilnahme an dieser Studie gewonnen. Elf verschiedene Polymorphismen von Hormonen und Hormonrezeptoren sowie von einem Bindungsprotein wurden basierend auf frühere Studien bezüglich ihrer Korrelation mit der Ovarialreserve analysiert. Die Verteilung der verschiedenen Allele dieser Polymorphismen wurde unter den drei Populationen verglichen.

## Resultate:

Eine altersbereinigte logistische Regressionsanalyse ergab, dass das *CC*-Allel des *PvuII*-Polymorphismus des  $\alpha$ -Östrogenrezeptorgens doppelt so prävalent war bei Frauen mit Infertilität als bei nachweislich fertilen Frauen ( $p < 0.0001$ ). Umgekehrt waren die *CT*- und *TT*-Allele häufiger bei fertilen Frauen vorhanden. Darüber hinaus ergab eine Subanalyse der heterozygoten Trägerinnen des *CT*-Allels des *PvuII*-Polymorphismus, dass das *GG*-Allel des *RsaI*-Polymorphismus des  $\beta$ -Östrogenrezeptorgens signifikant häufiger bei fertilen Frauen aufgefunden wurde ( $p < 0.03$ ) und dass das *GG*-Allel eines LH/HCG-Rezeptorgens (*LHCGR312*) signifikant häufiger bei infertilen Frauen vorkommt ( $p < 0.03$ ).

## Schlussfolgerung:

Der *PvuII*-Polymorphismus im  $\alpha$ -Östrogenrezeptorgen eignet sich potentiell für die frühzeitige Vorhersage weiblicher Infertilität aufgrund einer frühzeitigen Abnahme der Ovarialreserve.

## **FEMALE FERTILITY IS NEGATIVELY MODULATED BY THE *CC*-ALLELE OF THE *PvuII* POLYMORPHIC VARIANT IN INTRON 1 OF THE A-OESTROGEN RECEPTOR GENE**

N. M'Rabet, R. Moffat, Ch. De Geyter  
Clinic of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University of Basel

### Introduction:

Early prediction of premature ovarian ageing or premature ovarian failure (POF) is still not possible. A genetic background is considered probable but has not yet been identified. Several polymorphic alleles have been demonstrated to be distinctively distributed in the presence of surrogate parameters of ovarian function, but their association with differences in fertility rates resulting from differences in ovarian functionality is lacking.

### Methods:

Two hundred fertile women, who reported to have conceived within three months, 348 women with ongoing menstrual cycles suffering of infertility and 48 infertile women diagnosed with POF were recruited. Eleven polymorphisms of genes of hormones, of hormone receptors and of one binding protein, all with known associations with surrogate parameters of female ovarian function, were analyzed. The distributions of the allelic variants were compared with the fertility status of the recruited 596 women.

### Results:

Using age-adjusted logistic regression analysis the *CC*-allele of the *PvuII*-polymorphic variant in intron 1 of the *ESR1*-gene was double as prevalent among women suffering of infertility as compared to fertile women ( $p < 0.0001$ ). In contrast, both the *CT*- and the *TT*-alleles were more prevalent among fertile women. A sub-analysis of heterozygous carriers of the *CT*-allele of *PvuII* also demonstrated a preponderance of the *GG*-allele of the *RsaI* polymorphic variant in the *ESR2*-gene among fertile women ( $p < 0.03$ ) and of the *GG*-allele of the polymorphic variant at position 312 of the LH-receptor gene (*LHCGR312*) among women with infertility ( $p < 0.03$ ).

### Conclusions:

The *ESR1-PvuII* polymorphism emerges as a potential candidate for the early prediction of infertility due to premature ovarian ageing.

## DE L'INFERTILITE A LA PARENTALITE: UNE ETUDE LONGITUDINALE DES COUPLES FIV

Darwiche J. 1), 2), Germond M. 2), Favez N. 3), Guex P. 1), de Roten Y. 1) Despland J.-N. 1)

- 1) Département de Psychiatrie – CHUV, Lausanne
- 2) Centre de Procréation Médicalement Assistée et Fondation F.A.B.E.R, Lausanne
- 3) Faculté de Psychologie et des Sciences de l'Education, Genève

Introduction: Cette étude longitudinale évalue la transition de l'infertilité à la parentalité des couples qui obtiennent une grossesse suite à une Fécondation In Vitro (FIV). Plusieurs études se sont intéressées aux répercussions émotionnelles de l'infertilité. Par contre, il a été plus rarement étudié si les difficultés liées au passage par l'infertilité et ses traitements persistent une fois la grossesse obtenue. Cette étude est originale du fait qu'elle englobe trois périodes clés : avant le traitement FIV, pendant la grossesse et après la naissance. De plus, elle examine les interactions au sein de la triade familiale (père, mère, bébé), un aspect non encore exploré chez les familles FIV.

Matériel et méthode: Un échantillon de 86 couples ont participé à un interview semi-structuré filmé (Marvin & Pianta, 1996) avant leur première FIV, afin d'évaluer leur acceptation du diagnostic d'infertilité. Les couples ayant obtenu une grossesse (N = 34) ont été rencontrés au 5ème mois de grossesse puis avec leur bébé de 9 mois (N = 31). Lors de la grossesse et du postpartum, les couples ont participé à une situation validée d'observation des interactions (Fivaz-Depeursinge & Corboz-Warnery, 1999) afin d'évaluer l'alliance coparentale prénatale et l'alliance entre père-mère-bébé. La satisfaction conjugale, l'attachement au fœtus/bébé et l'ajustement de la mère à la grossesse et à la maternité ont été évalués par questionnaires. Les hypothèses sont: 1) l'acceptation du diagnostic d'infertilité et le niveau de satisfaction conjugale prédisent la qualité de l'adaptation à la parentalité; l'alliance coparentale prénatale prédit l'alliance familiale postnatale. Les données des partenaires ont été analysées selon un modèle multi-niveaux (HLM 6 software, Raudenbush, Bryk, Cheong, & Congdon, 2004).

Résultats: Les analyses préliminaires n'indiquent pas d'influence des données médicales périnatales, ni de la durée ou de l'origine de l'infertilité sur les variables étudiées. Les résultats principaux montrent que : 1) l'acceptation par les hommes du diagnostic d'infertilité prédit leur attachement au fœtus ( $\text{Exp}(B) = 4.61, p < .05$ ) et au bébé ( $\text{Exp}(B) = 5.75, p < .05$ ); 2) le niveau de satisfaction conjugale des femmes prédit leur attachement au fœtus ( $B = .26, p < .05$ ) et au bébé ( $B = .13, p < .05$ ), de même que l'ajustement à la grossesse ( $B = -.63, p < .05$ ) et à la maternité ( $B = -1.19, p < .05$ ); 3) l'alliance coparentale prénatale ne diffère pas de celle d'un échantillon de référence ( $t(70) = 0.33, ns$ ). Par contre, l'alliance familiale postnatale des parents FIV est inférieure à celle d'un échantillon de référence ( $t(59) = 5.60, p < .05$ ).

Conclusion: Ces résultats indiquent que les hommes qui acceptent le diagnostic d'infertilité développent ensuite un attachement plus élevé avec leur bébé. Pour les femmes, c'est le niveau de satisfaction conjugale avant la FIV qui prédit leur capacité à s'adapter à la parentalité. Le résultat concernant l'alliance familiale peut être lié au fait que l'un des effets connus du passage par l'infertilité est un style parental « centré sur l'enfant » (tendance à surprotéger l'enfant et difficulté à poser des limites). Une telle attitude empêcherait la fluidité et la coordination des interactions père-mère-bébé, et pourrait résulter en un score inférieur d'alliance. Ces résultats donnent des pistes pour détecter les couples à risque déjà avant la FIV. Un counselling devrait être proposé à ces couples qui sont encore trop souvent considérés comme ne nécessitant pas d'aide psychologique, le traitement médical ayant été couronné de succès.

## **FROM INFERTILITY TO PARENTHOOD: A LONGITUDINAL STUDY OF IVF COUPLES**

Darwiche J. 1), 2), Germond M. 2), Favez N. 3), Guex P. 1), de Roten Y. 1) Despland J.-N. 1)

1) Département de Psychiatrie – CHUV, Lausanne

2) Centre de Procréation Médicalement Assistée et Fondation F.A.B.E.R, Lausanne

3) Faculté de Psychologie et des Sciences de l'Éducation, Genève

Introduction: This longitudinal study evaluates couples' transition from infertility to parenthood when pregnancy follows in vitro fertilization (IVF). Many studies have focused on the emotional repercussions of infertility and its treatment, but less is known about how infertility affects psychological adjustment during pregnancy and the early postnatal period. This study is innovative in that it includes three key measurement points: pre-IVF, during pregnancy and postnatal. In addition, it explores interactions within the family triad (father, mother, baby), which has not yet been investigated in IVF families.

Material and methods: A sample of 86 couples took part in a videotaped, semi-structured interview (Reaction to Diagnosis Interview, Marvin & Pianta, 1996) before beginning IVF to evaluate their acceptance or non-acceptance of the infertility diagnosis. Couples whose treatment was successful (N = 34) participated in a validated observational situation (Fivaz-Depeursinge & Corboz-Warnery, 1999) at the 5<sup>th</sup> month of pregnancy and with their 9-month-old baby (N = 31) to assess the prenatal coparenting alliance and the postnatal father-mother-baby alliance. Questionnaires were used pre- and postnatally to investigate marital satisfaction, attachment to the fetus/baby and maternal adjustment to pregnancy and motherhood. The hypotheses were: 1) pre-IVF levels of marital satisfaction and emotional acceptance of the infertility diagnosis predict the ability to adapt to parenthood; and 2) the prenatal coparenting alliance predicts the postnatal family alliance. Data were analyzed with hierarchical linear modeling (HLM 6) software (Raudenbush, Bryk, Cheong, & Congdon, 2004).

Results: Preliminary analyses revealed that neither the pregnancy and birth data nor the duration and source of infertility had any significant effect on the study variables. Results indicated that: 1) infertility diagnosis acceptance predicts the father's attachment to the fetus ( $\text{Exp}(B) = 4.61, p < .05$ ) and the baby ( $\text{Exp}(B) = 5.75, p < .05$ ); 2) marital satisfaction predicts the mother's attachment to the fetus ( $B = .26, p < .05$ ) and the baby ( $B = .13, p < .05$ ) and the mother's adjustment to pregnancy ( $B = -.63, p < .05$ ) and motherhood ( $B = -1.19, p < .05$ ); and 3) the IVF couples' prenatal family alliance did not differ from that of the reference sample ( $t(70) = 0.33, ns$ ), but the postnatal family alliance was lower ( $t(59) = 5.60, p < .05$ ).

Conclusion: Results indicate that men who accept the infertility diagnosis are more attached to their baby. Women's ability to adapt to parenthood is best predicted by their level of marital satisfaction before IVF. We know that one lingering effect of the struggle to conceive is a child-centered parenting style, i.e., overprotecting the baby and avoiding setting appropriate limits. This child-centered attitude could impede the fluidity and coordination of father-mother-child interactions, resulting in family alliance scores below those in the reference sample, as was observed in our sample. The results of this study provide clues for detecting at-risk couples before IVF. Counselling should be offered to these couples, who all too often are not believed to need psychological help because their treatment was successful.

# **INHIBIERUNG DER TRANSKRIPTION, EXPRESSION UND SEKRETION VON VEGF MITTELS DEM HISTONDEAZETYLASEHEMMER ROMIDEPSIN IN EPITHELIALEN ENDOMETRIOSEZELLEN**

Imesch P. 1), Samartzis E.P. 1), Schneider M. 1), Fink D. 1), Fedier A. 1)

1) UniversitätsSpital Zürich, Klinik für Gynäkologie

## Einführung:

Angiogenese spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Endometriose. Der „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) stellt dabei erwiesenermassen einen wichtigen proangiogenen Faktor dar. VEGF wird stark von endometriotischen Läsionen und speziell von den epithelialen Zellen exprimiert und sezerniert. VEGF lässt sich dabei auch in erhöhter Menge in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose messen. Die Beeinflussung der VEGF-Expression/Sekretion bietet somit ein mögliches Ziel für neue medikamentöse Therapieansätze zur Behandlung der Endometriose.

Zunehmend werden epigenetische Veränderungen wie z.B. Azetylierung von Histonen als möglicher Pathomechanismus der Endometriose diskutiert. Mit Histondeazetylase-Inhibitoren (HDACi) steht eine heterogene Substanzklasse zur Verfügung, welche durch Veränderungen der Chromatinstruktur das Genexpressionsmuster verändern können und somit epigenetisch regulierend wirken. Man geht davon aus, dass 2-5% des Genoms durch HDACi beeinflusst werden können. In der Arbeit von Imesch et al konnte nun gezeigt werden, dass mit HDACi (Romidepsin) eine deutliche Reduktion der VEGF-Produktion und Sekretion in Endometriosezellen erzielt werden kann. Neuartig dabei ist, dass VEGF nicht erst nach Proteinbildung gehemmt wird, beispielsweise durch monoklonale Anti-VEGF-Antikörper, sondern direkt Einfluss auf die Transkription genommen wird.

## Material und Methoden:

Die Studie wurde an immortalisierten, epithelialen Endometriosezellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Histondeazetylasehemmer Romidepsin in unterschiedlicher Dosierung behandelt. Mit Hilfe von Western-blot-Analysen, RT-PCR und ELISA-Methoden konnte die Expression und Sekretion von VEGF gemessen werden.

## Ergebnisse:

Die Behandlung der epithelialen Endometriosezellen mit Romidepsin führt zur Inhibierung der VEGF-Transkription sowie der nachfolgenden Reduktion der VEGF-Proteinexpression ins Kulturmedium. Der HDACi Romidepsin verminderte zudem die Expression von HIF-1alpha, einem wichtigen VEGF-Transkriptionsfaktor. Da Histondeazetylasen einen stabilisierenden Effekt auf den Transkriptionsfaktor HIF-1alpha haben, scheint es möglich, dass die Inhibierung der Histondeacetylasen zu einer Destabilisierung von HIF-1alpha führt und dadurch die Transkription von VEGF als Sekundäreffekt deutlich gemindert wird. Dass die Wirkung von Romidepsin zudem in einem subapoptischen, nanomolaren Konzentrationsbereich erzielt werden konnte, ist speziell im Falle der Endometriose von grösster Bedeutung.

## Schlussfolgerung:

Neuartig im Vergleich zu bisher bekannten Angiogensehemmern ist, dass die Transkription von VEGF direkt beeinflusst und nicht die Funktion oder Wirkung von bereits produziertem und sekretiertem VEGF gehemmt wird. Histondeazetylase-Inhibitoren stellen somit möglicherweise einen neuen, epigenetisch wirkenden Therapieansatz in der Behandlung der Endometriose dar. Wie unlängst gezeigt werden konnte, unterscheidet sich zudem der Azetylierungsstatus vom eutopen zum ektopen Endometrium signifikant, was die mögliche Bedeutung der Histondeazetylasehemmern unterstreicht.



# **INHIBITION OF TRANSCRIPTION, EXPRESSION, AND SECRETION OF THE VASCULAR EPITHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) IN EPITHELIAL ENDOMETRIOTIC CELLS BY ROMIDEPSIN**

Imesch P. 1), Samartzis E.P. 1), Schneider M. 1), Fink D. 1), Fedier A. 1)

1) UniversitätsSpital Zürich, Klinik für Gynäkologie

## Introduction:

Angiogenesis is pivotal for the survival of endometriotic tissue. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is considered probably the most important proangiogenic factor. VEGF is strongly expressed in endometriotic lesions and therefore provides a suitable target in the (medical) treatment of endometriosis. We postulate that Romidepsin, a histone deacetylase (HDAC)-inhibitor, inhibits VEGF expression and VEGF secretion in an immortalized epithelial endometriotic cell line (11z).

## Material and methods:

The immortalized epithelial endometriotic cell line (11z) was treated with Romidepsin. We used Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction to evaluate VEGF gene expression, immunoblot analysis to evaluate protein expression, and enzyme-linked immunosorbent assay to evaluate VEGF protein secretion into the culture medium.

## Results:

We report that treatment of 11z cells with Romidepsin resulted in the inhibition of *VEGF* gene transcription and in the reduction of VEGF protein expression in the cells and VEGF protein secretion into the culture medium, as demonstrated by real-time RT-PCR, immunoblot analysis, and ELISA, respectively. Romidepsin also reduced the expression of the hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha), a factor implicated in the transcription of the *VEGF* gene, in cobalt chloride-treated (mimics hypoxic conditions) 11z cultures. Our results indicate that Romidepsin targets VEGF already at the transcriptional level, eventually leading to the reduction of secreted VEGF, the "active" form of VEGF.

## Conclusion:

These results, together with the recently reported proliferation inhibition and apoptosis activation by Romidepsin in 11z cells (Imesch et al., 2010), suggest Romidepsin as a potential candidate compound to encounter endometriosis.

## **GEBURT NACH AUTOTRANSPLANTATION VON KRYOKONSERVIERTEM OVARGEWEBE**

Fahy-Deshe M; Van den Bergh, M; Hohl, M.K; Urech-Ruh, C. Kinderwunsch Zentrum, Kantonsspital Baden, CH-5404 Baden

### Einführung:

2004 beschrieb Donnez die erste Geburt nach erfolgreicher Autotransplantation von kryokonserviertem Ovargewebe. Wir berichten über das erste Kind in der Schweiz.

Grosse Fortschritte in der Therapie von Malignomen haben die Überlebensrate von jungen Patientinnen massiv verbessert. Viele Chemo- und Radiotherapien haben ein hohes Risiko für eine vorzeitige Ovarialinsuffizienz mit Infertilität. Dieses ist abhängig vom Zytostatika-Typ, der Dosis und der Therapiedauer. Alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid und Isofamid schädigen die Gonaden permanent durch eine chemische Interaktion mit der DNA. Damit wächst das Bedürfnis nach fertilitätserhaltenden Massnahmen vor Therapiebeginn. Optionen sind die Kryokonservierung von Embryonen, Oozyten oder Ovargewebe.

### Material und Methode:

2004 kam eine 27-jährige Patientin in unser Zentrum wegen einer primären Sterilität seit drei Jahren. Die Abklärungen zeigten Normalbefunde ausser Spätovulationen mit basalem FSH von 9.7 mU/ml, und Verdacht auf Lutealinsuffizienz. Nach der 5. hormonellen Stimulation wurde die Patientin schwanger. Kurz darauf wurde die Diagnose eines diffusen, grosszelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms Stadium IV E A gestellt mit Infiltration des Knochenmarks und Befall des Skeletts, inklusive Schädelkalotte mit Infiltration der Dura und Epidura. Vor Beginn der Chemotherapie erfolgte der Schwangerschaftsabbruch in der 6. Woche mit gleichzeitiger Kryokonservierung des linken Ovar.

13 Cortextreifen (10x5x2mm) wurden mit der slow-freezing Methode kryokonserviert (Donnez et al 2004), histologisch keine Malignität. Die Patientin erhielt 6 Zyklen Cyclophosphamid und Isofamid, gefolgt von autologer Stammzell-Transplantation. Die Therapie führte zu einer kompletten Remission.

2008 wurde bei Anovulation (FSH 18.3mU/ml, AMH 0.2 µg/l) erneut therapiert: 10 Stimulationen mit inadäquatem Follikelwachstum, ein hochdosiertes IVF-Zyklus mit einer Eizelle, Fertilisierung, ohne Schwangerschaft.

2010 entschied sich die Patientin zur Reimplantation des Ovargewebes. 6 von 13 Gewebestücken wurden aufgetaut mit einem Equibrationsprotokoll (Andersen et al., 2008). Mit mikrochirurgischer Technik, unter Vermeidung von elektrochirurgischer Energie, wurden an der antimesenterialen Grenze des Ovars drei V-förmige Inzisionen angebracht. Die Gewebestreifen wurden sorgfältig in jeweils eine Öffnung eingesetzt, wobei der Cortex in die Ovaroberfläche präzise eingeebnet wurde. Die Inzisionen wurden mit 8.0 Nylon unter dem Operationsmikroskop verschlossen. Die restlichen Gewebestreifen wurden im Peritoneum der rechten Fossa ovarica eingenäht.

Nach vier Wochen zeigte sich sonographisch ein Follikel von 16 mm, zwei Wochen später war das HCG 295 U/l. Nach problemloser Schwangerschaft gebar die Patientin am 15.01.2011 einen gesunden Knaben. Drei Monate postpartal etablierte sich ein ovulatorischer Zyklus mit adäquater Lutealphase,, FSH 9.7 mU/ml und AMH 0.2 µg/l..

### Diskussion:

Menschliches Ovargewebe kann nach Kryokonservierung überleben und die Funktion wieder aufnehmen (Donnez et al., 2006, 2011). Der Verlust an Follikeln in kortikalen Streifen hängt ab von der Hypoxiedauer und vom Zeitfenster bis zur Revaskularisierung (Van Eyck et al, 2009, 2010). Unsere Patientin ovulierte bereits einen Monat nach der Reimplantation, was als ununterbrochene Fortsetzung der Follikulogenese im transplantierten Gewebe interpretiert werden kann. Für eine Revaskularisierung und dauerhafte Funktion des reimplantierten Ovargewebes spricht, dass auch nach einem Jahr noch sonographisch Ovulationen nachweisbar sind. Der FSH-Wert sank wieder auf einen hoch normalen Wert. Die rasche Erholung der ovariellen Funktion ist wahrscheinlich der speziellen Technik des mikrochirurgischen Einnähens der Gewebestreifen im Ovar zu verdanken.

## **LIVE BIRTH AFTER AUTOTRANSPLANTATION OF CRYOPRESERVED OVARIAN TISSUE**

Fahy-Deshe M., Van den Bergh, M., Hohl, M.K., Urech-Ruh C. Kinderwunsch Zentrum, Kantonsspital Baden, CH-5404 Baden

### Introduction:

In 2004 Donnez et al reported the first live birth after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. Here we report the first Swiss live birth.

New advances in cancer treatment have greatly increased the survival rates of young patients. However, many treatments that are administered for cancers carry a substantial risk for premature ovarian failure and infertility. The type, duration and dose of the drugs also determine the likelihood of POF. Alkylating agents such as cyclophosphamide and ifosfamide permanently damage gonadal tissue by interacting chemically with DNA.

As such the reproductive consequences of exposure to chemotherapeutic agents become a significant concern. Several options are currently available to preserve fertility in cancer patients including, embryo cryopreservation, oocyte cryopreservation and ovarian tissue cryopreservation.

### Materials and Methods:

In 2004 a 27-year old patient presented at our clinic with primary infertility of three year duration. Clinical assessment revealed that her day-three FSH was 9.7 mU/ml with late ovulation and luteal insufficiency. After five stimulation cycles the patient became pregnant. However, shortly afterwards she was diagnosed with diffuse large- cell B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma, stage IV E A. The disease manifested itself with infiltration of the bone marrow and multiple skeletal sites including the skull with infiltration of the dura and epidura. Prior to beginning chemotherapy the patient underwent a medical abortion and removal of her left ovary for cryopreservation.

Thirteen pieces of ovarian cortex (10x5x2 mm) were cryopreserved by slow-freezing (Donnez et al 2004). Histological analysis of one aliquot showed absence of malignancy.

The patient received six cycles of chemotherapy, which included cyclophosphamide and ifosfamide, followed by autologous stem cell transplantation. The treatments lead to a complete remission.

In 2008 the patient, then anovulatory (FSH 18.3 mU/ml, AMH 0.2 ug/L), returned to our clinic. We carried out 10 stimulation cycles, which ended mostly in inadequate follicle development. An IVF-cycle yielded one oocyte which fertilized without a pregnancy.

In 2010 the patient decided to undergo an ovarian tissue reimplantation. Six pieces of tissue were thawed using a three step equilibration procedure (Andersen et al., 2008) and brought immediately to the operating room. Three V-shaped incisions were made at the beginning of the antimesenterial border of the right ovary, using a microsurgical technique without electrosurgical energy. The tissue pieces were carefully inserted into the openings, keeping the cortex flush with the surrounding ovarian surface. The incisions were closed with 8.0 nylon sutures on each side using the operating microscope. The remaining three pieces of tissue were stitched incisions in the right ovarian fossa of the Peritoneum.

After four weeks we detected a 16 mm ovarian follicle by ultrasound. Two weeks later the patient had a positive blood o -HCG of 295 U/L. She had uneventful pregnancy and on the 15.01.2011 delivered a baby boy (2.93 kg). Three months postpartum the menstrual cycle resumed (FSH 9.7 mU/ml, AMH 0.2 µg/L) with an adequate luteal phase.

### Discussion:

Human ovarian tissue can survive well and retain function after cryopreservation (Donnez et al., 2006, 2011). However, loss of follicles can occur in cases of non-vascular grafting of cortical strips, related to the period of hypoxia and the time frame before the grafted tissue becomes revascularized (Van Eyck et al, 2009, 2010). Our patient ovulated rapidly, one month, after ovarian tissue transplantation suggesting an uninterrupted continuation of folliculogenesis within the grafted tissue. Due to the revascularization and continuous function of the grafted tissue our patient showed sonographic evidence of ovulation one year after transplantation. Her day three FSH had also sunk to a high normal value. This recovery of function we attribute to the special technique of microsurgically stitching the tissue pieces into the existing ovary.

# **IMPACTS DE LA STIMULATION OVARIENNE CONTROLÉE ET DU SYNDROME D'HYPERSTIMULATION OVARIENNE SUR LA FONCTION THYROÏDIENNE**

Bellavia M. 1), Pesant MH. 1), Wirthner D. 2), de Ziegler D. 3), Wunder D. 1)

1) Unité de Médecine de la Reproduction, CHUV, Lausanne, Suisse

2) Centre de Procréation Médicalement Assisté (CPMA), Lausanne, Suisse

3) Centre de Médecine de la Reproduction, Université Paris Descartes – Hôpital Cochin, Paris, France.

## Introduction:

Les hormones thyroïdiennes maternelles sont d'importance fondamentale pour la grossesse et le développement fœtal. Le diagnostic de hypothyroïdisme est importante pour la prévention des complications de la grossesse telles que le fausse-couche, l'accouchement pré-terme et l'altération du développement physique et mental de l'enfant. L'hyperstimulation ovarienne contrôlée (COH) utilisé dans la procréation médicalement assistée (PMA) cause un stress additionnel sur la thyroïde maternelle, en partie en raison de l'augmentation de l'œstradiol. Depuis que le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO), une complication de la PMA, est provoqué par une réponse forte à la COH avec des taux plus élevés d'œstradiol, il pourrait exercer un impact encore plus élevé sur la fonction thyroïdienne. Le but de notre étude est de comparer l'impact de l'SHO et de la COH sur la fonction thyroïdienne.

## Matériel et méthodes:

Trente-quatre femmes, 12 SHO et 22 COH sans complications ont été analysés.

TSH et FT4 ont été évalués avant la COH pour toutes les patientes et pendant l'SHO dans le groupe SHO ou 14 jours après le transfert d'embryons dans le groupe de contrôle.

## Résultats:

Pendant le traitement, la TSH moyen est augmenté dans les deux groupes, mais l'augmentation est significative seulement dans le groupe SHO ( $p = 0.03$ ). FT4 est normal pour toutes les patientes pendant le traitement.

## Conclusions:

Les résultats de notre étude démontrent clairement que le SHO porte à un effort additionnel sur la fonction thyroïdienne. En effet, la TSH atteint souvent des niveaux anormaux pendant le SHO, lié probablement aux niveaux d'œstrogènes et aux modifications de la grossesse ou aussi à la fuite des hormones thyroïdiennes dans les liquides du troisième espace. En conclusion, notre étude montre que l'hypothyroïdisme subclinique est une conséquence de l'SHO. C'est une conclusion importante avec des conséquences cliniques potentielles pour l'embryon/fœtus dans le cas de grossesse après PMA-SHO.

## **IMPACT OF CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION AND OVARIAN HYPERSTIMULATION SYNDROME ON THYROID FUNCTION**

Bellavia M. 1), Pesant MH. 1), Wirthner D. 2), de Ziegler D. 3), Wunder D. 1)

1) Unité de Médecine de la Reproduction, CHUV, Lausanne, Suisse

2) Centre de Procréation Médicalement Assisté (CPMA), Lausanne, Suisse

3) Centre de Médecine de la Reproduction, Université Paris Descartes – Hôpital Cochin, Paris, France.

### Introduction:

To compare the impact of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) and uncomplicated controlled ovarian hyperstimulation (COH) on thyroid function.

### Methods:

A case control study that includes thirty-four IVF patients of the University infertility center CHUV, Lausanne. Thyroid stimulating hormone (TSH) and free thyroxine (FT4) levels were evaluated before COH in all patients and during OHSS in the OHSS group or 14 days after embryo transfer in the control group.

### Results:

During treatment, mean TSH increased in both groups, but significance was reached only in the OHSS group ( $P=0.03$ ). FT4 levels remained normal for all patients during treatment.

### Conclusions:

The results of our study show, for the first time, that subclinical hypothyroidism is frequently a consequence of OHSS. Indeed, TSH often reaches abnormal levels during OHSS, probably related to the elevated estrogen levels. TSH should be tested for each patient with OHSS to evaluate in each case if a thyroid supplementation is required.

# **FECONDATION IN VIVO EN UTILISANT UNE TECHNOLOGIE D'ENCAPSULATION: EFFETS SUR LA MORPHOLOGIE DU ZYGOTE HUMAIN**

Urner F. 1), Wirthner D. 1), Murisier F. 1), Mock P. 2), Germond M 1).

1) Centre de Procréation Médicalement Assistée (CPMA) et Fondation F.A.B.E.R, Lausanne

2) Centre de Procréation Médicalement Assistée de la Clinique des Grangettes, Genève

## Introduction:

En reproduction assistée, la culture in vitro est susceptible d'affecter certains processus du développement de l'embryon dès la fécondation. La fécondation comprend une série d'étapes cruciales débutant par la fusion des gamètes et s'achevant par la formation d'un zygote diploïde. Le but de cette étude est de comparer la morphologie de zygotes (au stade de 2PN) issus d'une fécondation se déroulant in vivo ou in vitro, après une injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Afin de réaliser une fécondation en conditions naturelles « in vivo », des ovocytes injectés ont été placés dans une capsule spécifiquement conçue pour la culture dans un environnement intra-utérin.

## Matériel et méthodes:

Après avoir donné leur consentement écrit, 16 patientes (âge  $32.9 \pm 3.4$ ,  $\geq 7$  ovocytes MII) ont été incluses dans l'étude. Une à deux heures après l'ICSI, la moitié des ovocytes ont été maintenus in vitro et les autres ont été placés dans une capsule de silicone micro-perforée (Anecova, Lausanne, Suisse) qui permet un échange bidirectionnel de molécules-clés (facteurs de croissance, cytokines, nutriments), tout en assurant le maintien de conditions bio-physiques optimales (température, pH, concentration des gaz dissous). Après sa fermeture, la capsule a été immédiatement introduite dans la cavité utérine. Environ 16 heures plus tard, la capsule a été retirée et les ovocytes récupérés. Les zygotes-2PN, obtenus in vivo et in vitro, ont été photographiés en vue de leur analyse morphologique. Un à deux zygotes provenant de la capsule ont été mis en culture jusqu'au transfert d'embryons à jour 2 ou 3. Tous les zygotes surnuméraires ont été cryo-conservés au stade de 2PN. La morphologie des zygotes-2PN a été évaluée subjectivement par l'attribution de scores et objectivement par un système d'analyse d'image. Les paramètres analysés étaient : le centrage, la proximité, l'orientation des PN, le nombre et la polarisation des précurseurs nucléolaires (NPB), la taille du halo cytoplasmique. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons statistiques.

## Résultats:

105 ovocytes ont été placés après l'ICSI dans la capsule et 111 sont restés in vitro. Les taux de fécondation étaient similaires. Des différences morphologiques ont été notées concernant la polarisation des NPB et la taille du halo cytoplasmique. Les NPB étaient significativement ( $p=0.0001$ ) moins polarisés in vivo : la distance moyenne entre les NPB et la ligne de jonction des PN était plus grande après incubation in vivo (in vivo :  $14.98 \pm 0.4 \mu\text{m}$  ; in vitro :  $13.03 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ). Le halo cytoplasmique était significativement ( $p=0.0001$ ) plus petit in vivo (in vivo : 12% ; in vitro 17 % du cytoplasme). L'évaluation subjective a conduit aux mêmes résultats. Au total 29 embryons, provenant tous de la capsule, ont été transférés à J2 ou J3 chez les 16 patientes ( $1.81 \pm 0.4$  embryons par transfert). 75% de ces embryons avaient atteint le stade de 4 cellules à J2 ou 8 cellules à J3. Les taux de grossesse et d'implantation étaient de 37.5% (6/16) et 31% (9/29) respectivement. Des 6 grossesses obtenues, 7 enfants sont nés (3 couples de jumeaux et 1 enfant unique) et 2 grossesses se sont terminées en fausses couches.

## Conclusions:

Le recours à une technologie d'encapsulation permet de procéder à certaines étapes de la reproduction assistée dans des conditions plus naturelles. Après exposition des ovocytes dans un environnement intra-utérin, le taux de clivage obtenu s'est révélé excellent tout comme les taux d'implantation et de grossesse. Des paramètres-clés de la formation du zygote, la polarisation des NPB et le halo cytoplasmique, ont été clairement influencés par l'environnement intra-utérin. La conséquence de ces modifications sur le potentiel d'implantation de l'embryon doit encore être évaluée.

# **IN VIVO FERTILISATION USING AN ENCAPSULATION TECHNOLOGY: EFFECTS ON THE HUMAN ZYGOTE MORPHOLOGY**

Urner F.<sup>1</sup>, Wirthner D.<sup>1</sup>, Murisier F.<sup>1</sup>, Mock P.<sup>2</sup>, Germond M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Procréation Médicalement Assistée, Fondation F.A.B.E.R, Lausanne

<sup>2</sup>Assisted Reproductive Technology Center, Clinique des Grangettes, Geneva

## Introduction:

In assisted reproduction, in vitro culture may compromise embryo development by affecting the fertilisation process. Fertilisation is described as a sequence of crucial events beginning with gamete fusion and resulting in the formation of a diploid zygote. The aim of this study was to compare the morphology of zygotes (at the 2PN stage) when the fertilisation process occurred in vitro or in vivo, following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). To expose oocytes to an in vivo natural environment during fertilisation, sperm-injected oocytes were encapsulated in a specially designed device and placed overnight in the uterine cavity.

## Materials and Methods:

Sixteen ICSI patients (mean age  $32.9 \pm 3.4$ ,  $\geq 7$  MII oocytes) were included in this study, after written consent was signed. One to two hours after ICSI, half of the injected oocytes were cultured in vitro and the others were loaded into a microperforated silicone device (Anecova, Lausanne, Switzerland) that allows bidirectional exchanges of key- molecules (growth factors, cytokines and nutrients) and maintains optimum bio-physical conditions (temperature, pH, gas concentration). The device was then immediately closed and introduced into the uterine cavity. About 16 hours later, the device was removed and flushed to recover the oocytes. The 2PN-zygotes, from both the in vivo and in vitro culture, were photographed for the subsequent analysis of their morphology. One or two 2PN-zygotes were selected from the in vivo group and developed in vitro until transfer on Day 2 or 3. All the remaining zygotes were cryopreserved at the 2PN-stage. The 2PN-zygote morphology was assessed by using subjective scoring and a computer-assisted method. The parameters analysed were: centring, proximity and orientation of the pronuclei (PN), number and polarisation of the nucleolar precursor bodies (NPB), the size of the cytoplasmic halo. The non-parametric Mann-Whitney test was used for statistical comparisons.

## Results:

A total of 105 injected-oocytes were incubated in the uterine device and 111 in vitro. Fertilization rates were similar under both conditions. The morphology of the 2PN-zygotes was not different except for NPB polarisation and the size of the cytoplasmic halo. NPB were significantly ( $p=0.0001$ ) less polarised after in vivo exposure: the mean distance between NPB and the border separating the pronuclei was higher after in vivo incubation (in vivo:  $14.98 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ; in vitro:  $13.03 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ). The cytoplasmic halo was significantly ( $p=0.0001$ ) smaller in vivo (in vivo: 12%; in vitro: 17 % of the cytoplasm). The same differences were observed after subjective scoring of the 2PN-zygotes. A total of 29 embryos originating exclusively from the uterine device were transferred on day 2 or day 3 in the 16 patients ( $1.81 \pm 0.4$  embryos per transfer). 75% of these embryos reached the 4-cell stage on day 2 or the 8-cell stage on day 3. The pregnancy and implantation rates were 37.5% (6/16) and 31% (9/29) respectively. From the 6 pregnancies, 7 children were born (3 pairs of twins, 1 single) and 2 pregnancies ended in miscarriages.

## Conclusions:

The use of an encapsulation technology allows to perform steps of assisted reproduction in physiological conditions closer to what happens in natural reproduction.

Following exposure of injected-oocytes to a uterine environment, cleavage rate of the embryos was excellent as well as the pregnancy and implantation rates. Key parameters of the 2PN-zygotes, NPB polarisation and cytoplasmic halo, were clearly influenced by the uterine environment. The consequence of this influence remains to be investigated.

## **ETUDE NATIONALE SUR LA QUALITE DU SPERME EN SUISSE**

Vargas J. 1), Parapanov R. 1), Mendiola J. 2), Stettler E. 3), Senn A. 1), Germond M. 1)

1) Fondation F.A.B.E.R., Lausanne

2) Division de médecine préventive et de santé publique, Université de Murcia

3) Département médical de l'armée suisse, Ittigen

### Introduction:

Depuis plus de dix ans, plusieurs études ont décrit une baisse de la qualité du sperme dans les pays industrialisés. Les explications à ce déclin pointent sur des facteurs environnementaux qui pourraient agir sur les hommes mais également sur les animaux avant et durant leur vie reproductive. Plus récemment, l'hypothèse du rôle de perturbateurs endocriniens agissant durant le développement fœtal a également été émise. Fort de ce constat, nous avons mis en place, une étude nationale afin de vérifier si ce phénomène opérait en Suisse. Celle-ci a débuté en 2005 et devrait couvrir l'ensemble du territoire helvétique dans les deux prochaines années.

### Matériel et méthodes:

Un mois avant le recrutement militaire, tous les conscrits sont informés de notre étude. S'il souhaite participer à l'étude, le volontaire envoie le formulaire de consentement ainsi que deux questionnaires (personnel et parental) au médecin de l'armée en charge de la supervision de l'étude. Quatre centres de recrutement (Lausanne, Rütli, Windisch et Monte Ceneri) sont actifs dans le recensement des volontaires pour l'étude. A la fin de la période de recrutement, les jeunes hommes, âgés de 18-20 ans, sont invités dans un laboratoire proche du centre de recrutement pour effectuer les investigations biologiques. Les échantillons de sperme sont analysés selon les recommandations de l'OMS (2010). Les paramètres suivants sont analysés par un système informatisé (CASA, SCA Microptic, Espagne): concentration en spermatozoïdes, mobilité et morphologie. Les procédures d'analyse sont les mêmes pour les quatre laboratoires. Toutes les données de l'analyse, de l'anamnèse et du stockage des échantillons sont regroupées dans une base de données centralisée (FileMaker Pro) à partir de laquelle celles-ci peuvent être exportées pour l'analyse statistique (SPSS, Somers NY, USA).

### Résultats:

Les résultats ont été regroupés selon une répartition géographique qui dépend du lieu d'habitation du volontaire : 1) Plateau ouest et centre, 2) Jura, 3) Alpes et 4) Plateau nord et est. Les médianes et les percentiles p25 et p75 des paramètres du sperme ont été calculés pour l'ensemble de la population étudiée (N=1768). Les valeurs médianes de tous les paramètres du sperme sont en dessus des normes de l'OMS (2010). Les p25 sont proches des normes de l'OMS, ce qui signifie qu'environ 25% de la population étudiée se situe en dessous des valeurs de référence. Les médianes calculées pour les 4 régions géographiques décrites montrent des différences significatives pour la concentration, la mobilité et la morphologie. Ainsi, des valeurs plus basses ont été mesurées dans les régions 3 et 4.

### Conclusion:

Ces résultats suggèrent que l'étude doit se poursuivre et recouvrir l'ensemble du territoire suisse. De plus, les causes de ces différences doivent être investiguées. Un biomonitoring est ainsi en cours afin d'identifier la présence de perturbateurs endocriniens dans le sérum et les urines collectés chez les volontaires.



## **NATIONAL STUDY ON SPERM QUALITY IN SWITZERLAND**

Vargas J. 1), Parapanov R. 1), Mendiola J. 2), Stettler E. 3), Senn A. 1), Germond M. 1)

1) FABER Foundation, Lausanne

2) Division of Preventive Medicine and Public Health, University of Murcia

3) Swiss Army Medical Services, Ittigen

### Introduction:

For decades, numerous studies have reported a decline in sperm quality among industrialised countries. Explanations for this decline point toward environmental factors acting on animals and humans before and during their reproductive life. More recently, the detrimental role of endocrine disruptors during foetal development has also been hypothesised. In order to test whether these effects are operating in Switzerland, a survey study among Swiss young men was initiated in 2005 and will cover within the next two years the entire country.

### Material and Methods:

One month before recruitment, all conscripts are informed about the study. When interested, the volunteers send a consent form and two questionnaires (personal and parental) to the Swiss army physician in charge of supervising the study. Four recruiting centres (Lausanne, Rütli, Windisch, Monte Ceneri) are actively involved in the sample collection phase. At the end of their recruiting camp, volunteers, aged between 18-20, are invited in a nearby laboratory for biological investigations. Sperm samples are analysed according to WHO recommendations (2010) and the following parameters are recorded: sperm concentration, motility and morphology using a computerised system (CASA, SCA Microptic, Spain). Identical procedures are used in all four laboratories. Medical, anamnestic and biological data are stored in a centralised database (FileMaker Pro), from which data can be extracted for further statistical analysis (SPSS, Somers NY, USA).

### Results:

Results are grouped according to a geographic stratification of Switzerland and depending on place of living of the conscript: 1) Plateau west and center, 2) Jura, 3) Alps, 4) Plateau north and east. The median, p25 and p75 values of the sperm parameters were computed for the entire studied population (N=1768). Results indicate that the median values are above the WHO reference for all parameters. The p25 values are close to these references for all parameters indicating that about 25% of the samples are below the WHO thresholds (2010). The median value of sperm parameters were calculated for the 4 described regions. A significant lower sperm concentration, motility and morphology were detected in regions 3 and 4.

### Conclusion:

This finding is currently further investigated by enlarging the cohort and identifying the causes of such differences. A human biomonitoring is underway in order to identify the presence of various endocrine disruptors in serum and urine samples collected from the volunteers.

## **GPR30/GPER-EXPRESSION IN ENDOMETRIOSE: NEUE ASPEKTE IN DER HORMONELLEN REGULATION**

Samartzis E.P. 1), Samartzis N. 1), Noske A. 2), Fedier A. 1), Dedes K.J. 1), Caduff R. 2), Fink D. 1), Imesch P. 1)

Klinik für Gynäkologie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz

Institut für klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz

### Einführung:

Der kürzlich entdeckte, siebenfach-transmembranäre G-protein gekoppelte Rezeptor 30 (GPR30 oder GPER) gilt als Teil der nicht-genombedingten Antwort auf Oestrogen, welche im Gegensatz zur genomischen Wirkungsart von Oestrogen rasch innerhalb von Minuten eintritt. Die GPR30 bedingte Oestrogenwirkung ist in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert, wie beispielsweise in der proliferativen Wirkung von Oestrogen und Tamoxifen im Endometriumkarzinom. Die Wirkung von Oestrogen besitzt eine Schlüsselrolle in der Endometriose. Wie in anderen Geweben könnte die Wirkung von Oestrogen über den GPR30 auch in der Endometriose eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und -migration darstellen.

### Material und Methoden:

Die Expression des GPR30, des Oestrogenrezeptors-alpha, des Oestrogenrezeptors-beta sowie des Progesteronrezeptors wurden immunhistochemisch auf einem Tissue Microarray analysiert, welcher 74 endometriotische Gewebeproben von prämenopausalen Frauen mit folgenden Lokalisationen enthielt: 27 ovarielle, 19 peritoneale und 28 tief-infiltrierende Läsionen. Als Kontrollen dienten 30 Proben normalen Endometriums in demselben Tissue Microarray.

### Resultate:

Hohe Konzentrationen von zytoplasmatischer GPR30 Expression wurden in 50% (n=30/60) der epithelialen Endometriosezellen beobachtet, jedoch nicht im normalen Endometrium (n=0/30, p<0.001). Darüber hinaus wurde eine signifikant höhere zytoplasmatische GPR30 Expression in Endometriomen (n=14/20, 70%) im Vergleich zu peritonealen (n=9/18, 50%) und tief-infiltrierenden Endometriose-Läsionen (n=7/22, 31.8%) festgestellt (p=0.01). Die nukleäre GPR30 Expressionsrate war in Endometriose und im normalen Endometrium vergleichbar.

### Schlussfolgerungen:

Unsere Daten weisen ein unterschiedliches Expressionsmuster des GPR30 in Endometriose im Vergleich zum normalen Endometrium auf. Die signifikant verstärkte zytoplasmatische GPR30 Expression in Endometriose, vor allem in Endometriomen, und die unterschiedliche Expressionsrate in den verschiedenen Endometrioseentitäten deuten auf eine mögliche Rolle des GPR30 in der hormonellen Regulation der Endometriose hin. Dies könnte für zukünftige hormonell-therapeutische Strategien in der Endometriose ausgenutzt werden.

## **EXPRESSION OF GPR30/GPER: NEW INSIGHTS IN THE HORMONAL REGULATION OF ENDOMETRIOSIS?**

Samartzis E.P. 1), Samartzis N. 1), Noske A. 2), Fedier A. 1), Dedes K.J. 1), Caduff R. 2), Fink D. 1), Imesch P. 1)

Department of Gynecology, University Hospital Zurich, Switzerland  
Department of Pathology, University Hospital Zurich, Switzerland

### Introduction:

The G-protein coupled receptor 30 (GPR30) is a seven-transmembrane receptor suggested to be part of non-genomic estrogen responses that can, in contrast to the classic or genomic mode of estrogen action, occur rapidly within minutes. GPR30 mediated estrogen action is involved in multiple physiological processes, as well as pathological processes, as for example the proliferative effects of estrogen and tamoxifen in endometrial cancer cells. Since estrogen action plays a key role in endometriosis and is partly mediated by GPR30 in a various number of physiological and pathological processes, the investigation of the GPR30 expression in endometriosis could be of particular interest.

### Material and Methods:

A tissue microarray including 74 samples of different endometriosis types (27 ovarian, 19 peritoneal and 28 deep-infiltrating) and 30 samples of normal endometrium was used to compare the expression levels of GPR30, estrogen-receptor-alpha, estrogen-receptor-beta and progesterone-receptor by immunohistochemistry.

### Results:

High levels of cytoplasmic GPR30 expression were observed in 50% (n=30/60) of endometriotic epithelial cells, but in none (0/30) of the normal endometrium ( $p < 0.001$ ). Furthermore, cytoplasmic GPR30 expression levels were higher in endometriomas (14/20, 70%;  $p = 0.01$ ) compared to peritoneal (9/18, 50%) and deep-infiltrating endometriotic lesions (7/22, 31.8%). Nuclear GPR30 expression did not differ significantly between endometriosis and endometrium.

### Conclusions:

The present data demonstrate a different expression pattern of GPR30 in endometriosis compared to normal endometrium. The significantly higher cytoplasmic expression rate of GPR30 in endometriotic lesions compared to normal endometrium, especially in endometriomas, as well as the different expression patterns depending on the type of endometriosis indicate a possible role of GPR30 in the hormonal regulation of endometriosis. Hence, future hormonal treatment strategies could consider GPR30 as a therapeutic target in endometriosis.

# **ERHÖHTE ENDOMETRIAL PLACENTA GROWTH FACTOR (PLGF) GENEXPRESSION IN FRAUEN MIT ERFOLGREICHER IMPLANTATION**

Santi A. 1), Rohner S. 1), Felser R.S. 1), Mueller M.D. 1), Wunder D.M. 2), McKinnon B. 1), Bersinger N.A. 1)

- 1) Klinik und Polikliniken für Frauenheilkunde, Inselspital, Universitätsspital Bern
- 2) Unité de Médecine de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne

## Einführung:

Ziel der vorliegenden prospektiven Arbeit war, das Durchblutungsmuster des Endometriums in vivo anlässlich einer Hysteroskopie zu untersuchen und eine mögliche Korrelation mit angiogenetischen Faktoren und der Implantationsrate zu analysieren.

## Material und Methoden:

Patientinnen mit geplanter Hysteroskopie und Laparoskopie zur Abklärung bei unerfülltem Kinderwunsch wurden für die Studie rekrutiert. Das Studienprotokoll war vom lokalen Ethikkomitee genehmigt worden. Bei allen Patientinnen wurde präoperativ eine Vaginalsonographie durchgeführt. Um die Durchblutung des Endometriums zu beurteilen, wurde der Eingriff in der zweiten Zyklushälfte durchgeführt. Der Operateur war verblindet bezüglich der Ultraschallergebnisse. Die Qualität des Endometriums wurde nach den optischen Kriterien von Sakumoto-Masamoto beurteilt („gut“ versus „schlecht“), und eine Endometriumbiopsie wurde entnommen. Die RNA wurde extrahiert und die Expression von angiogenetischen und implantationsrelevanten Faktoren unter Verwendung einer quantitativen polymerase chain reaction bestimmt. Die Daten wurden untersucht, um einen möglichen Zusammenhang aufzudecken zwischen dem Durchblutungsmuster des Endometriums, der Expression von angiogenetischen Faktoren und der Schwangerschaftsrate (spontane Schwangerschaft, homologe intrauterine Insemination und IVF). Für die Statistik wurde der Fisher exact test verwendet.

## Ergebnisse:

Gute RNA Quantität/Qualität wurde in 63 Patientinnen mit unerfülltem Kinderwunsch nachgewiesen. Frauen mit einem „guten“ Endometrium, die nach dem Eingriff schwanger wurden, hatten eine höhere Expression von placenta growth factor (PLGF,  $p=0.0165$ , OR = 2.43, CI = 1.17–5.05) im Vergleich zu Frauen mit einem „schlechten“ Endometrium, die nach der Hysteroskopie nicht schwanger wurden. Nicht-schwangere Frauen mit einem „guten“ Endometrium hatten ein intermediäres Resultat gezeigt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede für verschiedene andere Gene nachgewiesen, aber die Tendenz war ähnlich.

## Schlussfolgerungen:

Diese Studie bestätigt zum ersten Mal, dass die PLGF-Expression im Endometrium mit dem hysteroskopischen Erscheinungsbild der Vaskularisation korreliert. PLGF könnte deshalb ein wichtiger prognostischer Faktor in der Klinik sein, um die Erfolgsrate einer Fertilitätstherapie abzuschätzen.

## **INCREASED ENDOMETRIAL PLACENTA GROWTH FACTOR (PLGF) GENE EXPRESSION IN WOMEN WITH SUCCESSFUL IMPLANTATION**

Santi A. 1), Rohner S. 1), Felser R.S. 1), Mueller M.D. 1), Wunder D.M. 2), McKinnon B. 1), Bersinger N.A. 1)

1) Klinik und Polikliniken für Frauenheilkunde, Inselspital, Universitätsspital Bern

2) Unité de Médecine de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne

### Introduction:

The aim of this study was to analyze the in vivo vascularization of the endometrium via hysteroscopy and to assess its correlation with angiogenic factor gene expression and embryo implantation rate.

### Materials/Method:

Consecutive infertile patients with a planned hysteroscopic and laparoscopic evaluation for infertility were asked to participate in the study. The study protocol was approved by the local ethical committee. All patients had a preoperative transvaginal sonography (TVS). To evaluate the vascularisation of the endometrium at hysteroscopy the procedure was performed in the second part of the menstrual cycle. The surgeon was blinded to the TVS-findings. The endometrium quality was evaluated according to the Sakumoto-Masamoto grading ("good" vs. "poor") at the time of hysteroscopy and an endometrium biopsy was taken at the end of the procedure. The RNA extraction, reverse transcription, and determination of gene expression of angiogenesis- and implantation-relevant factors using quantitative polymerase chain reaction was performed. The data were analyzed in order to find a possible relationship between the vascularisation of the endometrium, the expression of the angiogenic factor gene and the pregnancy rate (spontaneous pregnancy, intrauterine insemination by husband and IVF/embryo transfer). For statistical purpose a Fisher exact test was used.

### Results:

Good quantity/quality RNA with infertility history was obtained from 63 participating women. Those with a "good" endometrium and subsequent pregnancy showed increased gene expression for placenta growth factor (PLGF,  $p=0.0165$ , OR = 2.43, CI = 1.17–5.05) when compared with patients with a "bad" endometrium and who did not succeed with pregnancy to date. Nonpregnant women with a "good" endometrium presented an intermediate result. No significant differences were observed for several other genes tested, but trends in the same direction were observed.

### Conclusions:

This study demonstrates for the first time that endometrial PLGF expression corresponds to the hysteroscopic appearance of the endometrium, and therefore has potential as a clinically relevant prognosticator for infertility treatment success.

# GENEXPRESSIONSMUSTER IN DER BRUST IN ABHÄNGIGKEIT VON HORMONELL DEFINIERTEN LEBENSPHASEN

Stute P. 1), Sielker S. 2), Wood C.E. 3), Register T.C. 3) Lees C.J. 3), Dewi F.N. 3), Williams J.K. 3), Wagner J.D. 3), Stefenelli U. 4) Cline J.M. 3)

1) Frauenklinik, Inselspital Bern 2) Arrows Biomedical Deutschland GmbH, Münster 3) Pathologie, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem 4) Services-In-Statistics, Würzburg

## Einführung:

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Da es in Folge einer Dysregulation physiologischer Prozesse entsteht, ist das Wissen um die Prozesse der normalen Brustentwicklung für das Verständnis der Mammakarzinogenese essentiell. Das Ziel der Studie ist die Untersuchung des Einflusses hormonell definierter Lebensphasen auf das Genexpressionsmuster in der Brust im Primatenmodell.

## Material und Methoden:

Das Brustgewebe von 28 nicht-hormonell vorbehandelten Affen (*Macaca fascicularis*) wurde in folgenden Reproduktionsstadien untersucht: Präpubertät (n=5), Adoleszenz (n=4), Prämenopausale Lutealphase (n=5), Schwangerschaft (n=6), Laktation (n=3) und Postmenopause (n=5). Das Genexpressionsmuster jeder Brustbiopsie wurde mittels Affymetrix GeneChip® Rhesus Macaque Genome Array ermittelt. Statistik: ANOVA mit adjustierten p-Werten (Benjamini & Hochberg) und Clusteranalyse.

## Ergebnisse:

Die hierarchische Clusteranalyse zeigte eine differenzierte Auftrennung der Reproduktionsstadien. Es wurden über 2225 unterschiedlich exprimierte mRNAs identifiziert. Die Gene folgender Genfamilien oder -expressionspfade wiesen starke Veränderungen während der verschiedenen Reproduktionsphasen auf: Östrogene und androgene Wirkung (ESR1, PGR, TFF1, GREB1, AR, 17HSD2, 17HSD7, STS, HSD11B1, AKR1C4), Prolaktin (PRLR, ELF5, STAT5, CSN1S1), Insulin-like growth factor (IGF1, IGFBP1, IGFBP5), Extrazelluläre Matrix (POSTN, TGFB1, COL5A2, COL12A1, FOXC1, LAMC1, PDGFRA, TGFB2) und Differenzierung (CD24, CD29, CD44, CD61, ALDH1, BRCA1, FOXA1, POSTN, DICER1, LIG4, KLF4, NOTCH2, RIF1, BMP1A, TGFB2). Die mammären Genexpressionsprofile während Schwangerschaft und Laktation unterschieden sich deutlich von denen anderer Reproduktionsstadien. ESR1 und IGF1 wurden signifikant stärker während der Adoleszenz im Vergleich zu adulten Lebensphasen exprimiert, wohingegen die Signalwege der Differenzierung stärker in adultem und schwangerschaftsassoziertem Brustgewebe exprimiert wurden. Nur wenige in der Postmenopause exprimierte Gene waren verschieden von denen der früheren Reproduktionsstadien.

## Schlussfolgerung:

Die Genexpressionsmuster der Brust sind spezifisch für die jeweilige Lebensphase. Einige der während der Pubertät aktivierten Genexpressionsmuster wurden mit der Karzinogenese in der Brust und Metastasierung in Verbindung gesetzt. Möglicherweise finden weitere Entwicklungsmarker Anwendung als Biomarker für Brustkrebs.

## **LIFE STAGE DIFFERENCES IN MAMMARY GLAND GENE EXPRESSION PROFILE IN NON-HUMAN PRIMATES**

Stute P. 1), Sielker S. 2), Wood C.E. 3), Register T.C. 3) Lees C.J. 3), Dewi F.N. 3), Williams J.K. 3), Wagner J.D. 3), Stefenelli U. 4) Cline J.M. 3)

1) Department of Gynecologic Endocrinology and Reproductive Medicine, University Women's Hospital, Berne 2) Arrows Biomedical Deutschland GmbH, Münster 3) Department of Pathology, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem 4) Services-In-Statistics, Würzburg

### Objective:

Breast cancer (BC) is the most common malignancy of women in the developed world. To better understand its pathogenesis, knowledge of normal breast development is crucial, as BC is the result of dysregulation of physiologic processes. The aim of this study was to investigate the impact of reproductive life stages on the transcriptional profile of the mammary gland in a primate model.

### Methods:

Comparative transcriptomic analyses were carried out using breast tissues from 28 female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) at the following life stages: Prepubertal (n=5), Adolescent (n=4), Adult Luteal (n=5), Pregnant (n=6), Lactating (n=3), and Postmenopausal (n=5). Mammary gland RNA was hybridized to Affymetrix GeneChip® Rhesus Macaque Genome Arrays. Differential gene expression was analyzed using ANOVA and cluster analysis.

### Results:

Hierarchical cluster analysis revealed distinct separation of life stage groups. Over 2225 differentially expressed mRNAs were identified. Gene families or pathways that changed across life stages included those related to estrogen and androgen (ESR1, PGR, TFF1, GREB1, AR, 17HSD2, 17HSD7, STS, HSD11B1, AKR1C4), prolactin (PRLR, ELF5, STAT5, CSN1S1), insulin-like growth factor signaling (IGF1, IGFBP1, IGFBP5), extracellular matrix (POSTN, TGFB1, COL5A2, COL12A1, FOXC1, LAMC1, PDGFRA, TGFB2), and differentiation (CD24, CD29, CD44, CD61, ALDH1, BRCA1, FOXA1, POSTN, DICER1, LIG4, KLF4, NOTCH2, RIF1, BMP1A, TGFB2). Pregnancy and lactation displayed distinct patterns of gene expression. ESR1 and IGF1 were significantly higher in the adolescent compared to the adult animals whereas differentiation pathways were overrepresented in adult animals and pregnancy associated life stages. Few individual genes were distinctly different in postmenopausal animals.

### Conclusions:

Our data demonstrate characteristic patterns of gene expression during breast development. Several of the pathways activated during pubertal development have been implicated in cancer development and metastasis, supporting the idea that other developmental markers may have application as biomarkers for BC.

Schweizerische Gesellschaft für Reproduktionsmedizin SGRM  
Société Suisse de Médecine de la Reproduction SSMR  
Società Svizzera di Medicina della Riproduzione SSMR

Präsident: G. de Candolle, Genève - Vize-Präsident: G. Merki, Zürich - Sekretär: M. De Geyter, Basel - Kassier: E. Berger, Bern  
FertiForum: M. Emery, Lausanne - FIVNAT: Ch. De Geyter, Basel - SWICE: F. Urner, Lausanne  
Vorstand: B. Bourrit, Genève - R. Draths, Luzern - Marcus Horstmann, Winterthur - Alexander Müller, Zürich

Administration SGRM  
Frau M. Weder, Postfach 754, CH-3076 Worb  
Tel. +41 (0)31-819-76-02 / Fax. +41(0)31-819-89-20  
E-mail: [administration.sgrm@bluewin.ch](mailto:administration.sgrm@bluewin.ch)  
Website: [www.sgrm.org](http://www.sgrm.org)