

Vorteile und Risiken der ungestörten Embryonenkultur

Martin Greuner

IVF-SAAR Saarbrücken -Kaiserslautern

In den letzten 40 Jahren wurden zahlreiche Fortschritte in der ART erzielt, die darauf abzielen, das Potential der Zellen zu bewahren und zu erkennen. Die Herausnahme der Zellen aus dem Inkubator zur Beurteilung der Embryonenqualität oder dem Medienwechsel führt zu Veränderungen der Kulturbedingungen, welche für die Zellen Stress und nicht ideale Bedingungen darstellen. Ein Ziel sollte daher die ungestörte Embryonenkultur sein, die mittels Time-Lapse Inkubatoren die gleichzeitige Beurteilung der Embryonenqualität möglich macht.

Swain J.E. 2019 geht in seiner Veröffentlichung auf die Vorteile und Risiken ein, die mit dieser Technologie verbunden sind. Single Step Medien, Osmolarität, flüchtige organische Verbindungen und Mineralöl werden dabei erörtert.

Einfluss der ungestörten Kultur

Jede Technologie bietet Vor- und Nachteile, und so ist es nicht verwunderlich, dass kein klarer Konsens bezüglich der ungestörten Kultur besteht (Costa-Borges, N. et al. 2016). Die Vorteile sind zwar offenkundig, jedoch steckt wie immer die Problematik im Detail.

Die ungestörte Kultur ohne Herausnahme der Zellen aus dem Inkubator ermöglicht konstante Bedingungen bezüglich der Temperatur, der CO₂ Gaskonzentration und damit verbunden des pH-Wertes. Die Reduzierung des Umgebungsstress auf die Zellen führt zu einer verbesserten Embryonenqualität und Blastocystenbildungsrate (Zhang, J.Q et al. 2010). Hierdurch wird zudem das Risiko von Zellschädigung sowie Verlust durch das Hantieren, Pipettieren und Transportieren für die Zellen vermieden. Ein optimierter Workflow mit reduzierten Kosten und Arbeitszeit ist die Folge. Dieser ausbleibende Mediumwechsel ermöglicht die Anhäufung von paracrinen und autocrinen Faktoren, die die Teilung und Kultur der Embryonen positiv beeinflussen kann (Smith,G.D. et al. 2012). Dieser Effekt wird besonders deutlich, indem die

Gruppenkultur von menschlichen Zygoten Vorteile gegenüber der Einzelkultur in Bezug auf die Blastulations-, Implantations- und Lebendgeburtenrate zeigt (Ebner, T. et al. 2010).

Eine Grundvoraussetzung für diese ungestörte Kultur sind Single Step Kulturmedien, die keinen Mediumwechsel beinhalten. Ein Risiko entsteht, indem Substratabbauprodukte wie Ammonium (Kleijkers, S et al. 2016) anfallen können. Das verwendete Mineralöl zur Übersichtung der Kultur birgt ebenso die Gefahr von anfallenden, unberechenbaren, organischen Substraten und zudem die toxische Peroxidation des Öls (Otsuki, J. et al. 2009).

Vorteile	Risiken
Verminderte Herausnahme von Kulturplatten aus dem Inkubator, stabilere Kulturbedingungen (Gas, Temperatur)	Dissoziation von Mediumbestandteilen (Ammoniumbildung, Substratabbau)
Vermindertes Hantieren mit Zellen, vermindertes Risiko von Zellschädigung oder Verlust	Keine morphologische Beurteilung der Embryonalentwicklung (ohne Time Lapse)
Anhäufung von auto- und paracrinen Faktoren	Anhäufung von leicht flüchtigen organischen Substanzen (VOC) in Öl oder Medium
Kompatibel mit Time Lapse Inkubatoren zur Beurteilung der Embryonalentwicklung	Medium-Verdunstung kann bei Trockeninkubation zum Anstieg der Osmolarität und des pH Wertes führen
Verbesserter Workflow, weniger Arbeitszeit, ev. Kostensenkung	Mineralöl-Abbau (Peroxidation)

Tab.1: Potentielle Vorteile und Risiken einer ungestörten Embryonenkultur Swain J. 2019

Die in Tabelle 1 aufgeführten möglichen Risiken, die einer ungestörten Kultur entgegenstehen, sind mit Time Lapse Imaging zur Embryonenbeurteilung und durch optimierte Kulturbedingungen behebbar.

Einfluss des Kultur-Mediums

In den letzten Jahren wurden kontroverse Diskussionen bezüglich der Bedürfnisse des Embryos an das Kulturmedium geführt. Schon vor ca. 150 Jahren entwickelte Ringer S. 1882 die ersten einfachen Kulturmedien als Salzlösungen auf der Basis von Serum und Blutplasma. 1958 wurde von McLaren und Biggers die erste erfolgreiche Embryonenkultur von Mäusen mit dessen Geburt berichtet. Dies war ein wichtiger Schritt zu den ersten Single Step Medien, die letztendlich auch die Geburt des ersten In Vitro Kindes, Louise Brown, durch Steptoe und Edwards 1978 ermöglichte. Diese Single Step Medien gehen von der Annahme aus, der Embryo nimmt sich, was er braucht.

Mit der Erforschung der menschlichen Follikelflüssigkeit, des Eileiters und der Gebärmutter wurden die unterschiedlichen Bedingungen, die eine Eizelle auf dem Weg zur Blastocyste durchlaufen, erkannt. Dies führte zur Entwicklung des Prinzips "Back to the Nature", indem mittels Mediumwechsel sequentielle Medien versuchen, die Ansprüche an jedes Entwicklungsstadium anzupassen. Somit entstanden zwei Philosophien von Medien. Sequenzielle: "Back to the Nature" und Single Step "The Embryo takes what he needs"

Beide Medienlinien wurden weiter entwickelt und konnten mit der herkömmlichen Kulturweise, bei der die Zellen zur Beurteilung und ev. dann auch zum Mediumwechsel aus den Kulturbedingungen (dem Inkubator) genommen werden, keine Überlegenheit aufzeigen. Sfontouris et al. (2016) belegte in einer Metaanalyse, dass Single Step Medien eine erhöhte Blastocystenbildungsrate aufwiesen, jedoch waren die klinischen Schwangerschaftsraten nicht signifikant höher, und der Evidenz ist umstritten (Dieamant et al. 2017).

Mit der Einführung der Time Lapse Technologie erhalten die Single Step Medien eine neue Bedeutung und sind Grundvoraussetzung für eine ungestörte Kultur. Die genaue Betrachtung der Vorteile und Risiken, wie in Tabelle 1 aufgeführt, sind somit essentiell.

Einfluss der Verdunstung

Kulturmedien werden von vielen Faktoren beeinflusst. Neben der Zusammensetzung sind Aspekte wie Temperatur, Gaskonzentrationen und Luftfeuchtigkeit, Mediumvolumen und Oberfläche von Bedeutung (Swain et al. 2012). Eine gewisse Verdunstung findet immer statt, nur ist die Dosis (*Dosis sola venenum facit* "Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift sei.") - Paracelsus, dritte defensio, 1538.) das Entscheidende. Dies führt zu Veränderungen des pH-Wertes (Swain et al. 2015) in einem Inkubator mit 45% Luftfeuchtigkeit besonders, wenn die Kultur nicht mit Öl überschichtet wird.

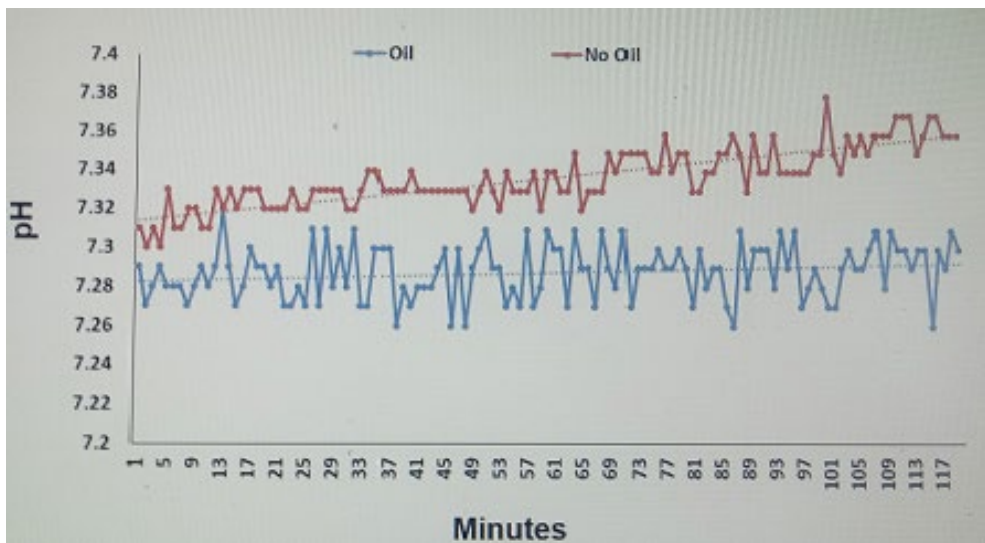


Abb.1: Verdunstung während der Embryokultur führt zu einem pH Anstieg im Medium, selbst in einem Inkubator mit 45% Luftfeuchtigkeit. Ölüberschichtung wirkt dem Effekt des pH Anstiegs entgegen (Swain et al. 2015, Swain J. 2019).

Die CO_2 Konzentration sollte im Inkubator konstant sein. Jedes Öffnen der Inkubatortür führt aber zur Absenkung des CO_2 Wertes und damit zum Anstieg des pH-Wertes.

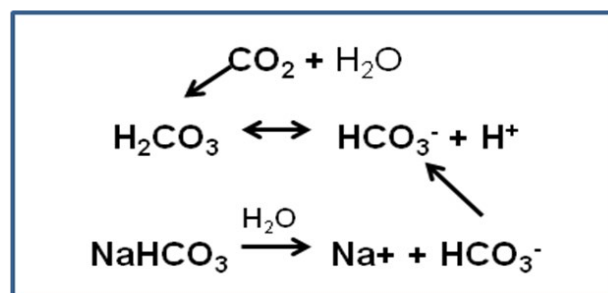


Abb.2: Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem des Mediums im Inkubator zur Regelung und Pufferung des pH-Wertes durch Zufuhr von CO_2

Die Verdunstung wirkt unmittelbar auf die Osmolarität des Mediums und bewirkt bei gleichbleibender CO₂ Konzentration ebenfalls einen pH-Anstieg. Als Osmolarität bezeichnet man die Stoffmengenkonzentration der osmotisch aktiven Teilchen einer Lösung. Mit der Verdunstung nimmt dieser Wert zu. Osmolaritäten > 310 mOsm/kg zeigen einen negativen Effekt auf die Maus Embryonalentwicklung (Wang et al. 2011).

Viele moderne Inkubatoren reduzieren das Kammervolumen, um schnellere Erholzeiten für die Temperatur und Gaskonzentrationen (Swain, J. 2014) zu erzielen. Dies ist auch bei den meisten Time Lapse Systemen der Fall. Damit verbunden ist meist der Verzicht auf hohe Luftfeuchtigkeit, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Diese trockene Inkubation hat Auswirkungen auf die Medienbedingungen. Ölüberschichtung wirkt diesem Phänomen bezüglich des pH-Wertes und der Osmolarität entgegen wie in Abb.1 zu sehen ist.

Untersuchungen der Osmolarität im Verlauf der Zeit zeigen sehr deutlich, dass mit zunehmender Inkubationszeit auch unter Öl bei der Trockeninkubation im Gegensatz zur Feuchtinkubation ein deutlicher Anstieg der Osmolalität stattfindet. Die Abb.2 zeigt dabei ein Medium mit relativ geringem Anfangs-osmolaritätswert. Ist dieser Wert höher, ist auch das Risiko für die Zelle höher. Es ist zu bedenken, dass die Kulturschalen zur besseren Äquilibration des pH-Wertes am Vortag der Kultur angesetzt werden und eine 5 Tage Blastocystenkultur für das Medium 144 Stunden Inkubation bedeutet.

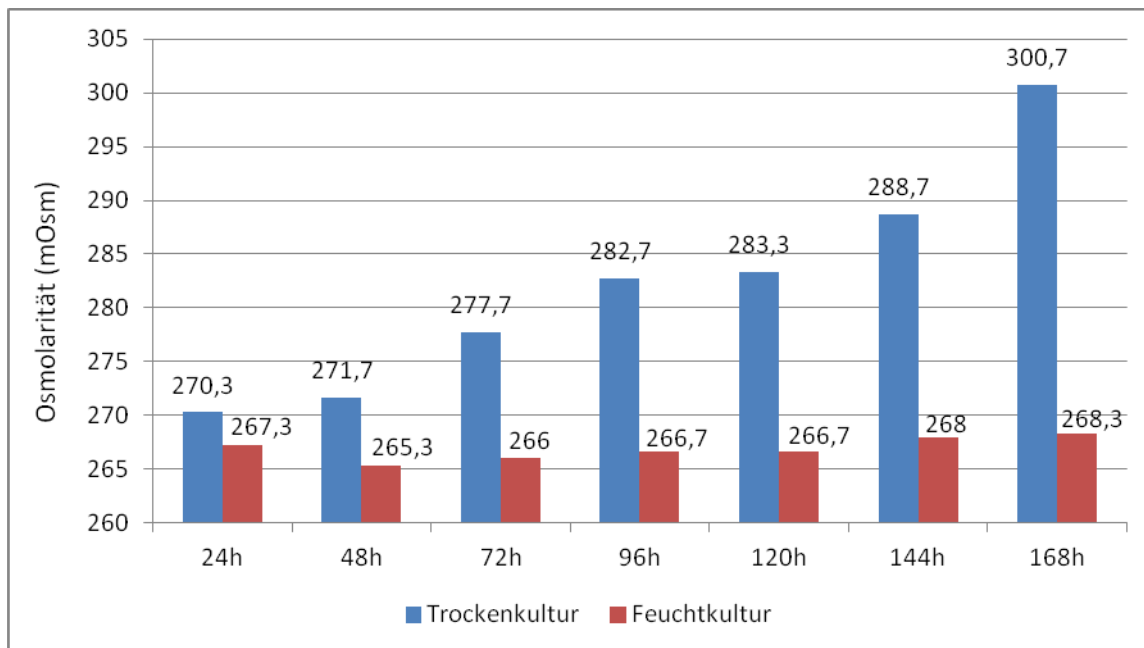


Abb.3: Osmolarität im zeitlichen Verlauf der Inkubation unter Öl (Swain et al. 2016) im Vergleich von Trocken- zu Feuchtinkubation.

Kulturmedien verdunsten auch unter Öl, was zu einem Anstieg der Osmolarität führt (Swain et al. 2016) und bei der Trockeninkubation verschärft der Fall ist.

Diesen Effekt hat Georgia Carpenter (Carpenter et al. 2018) genauer untersucht in Bezug auf unterschiedliche Time Lapse Schalen für unterschiedliche Time Lapse Systeme.

Miri-TL Culture coin (Miri TL);

Vitrolife EmbryoSlide (Embryoscope),

Primovision dish (Primovision);

Geri dish (Geri).

Als Kontrolle diente ein Microdroplet dish.

Der Miri TL ist in der Lage, mit Trockenkultur alle diese Schalen zu kultivieren. Die Ausgangs-osmolarität betrug 258 mOsm und stieg in allen Schalen an (zwischen 33,2 mOsm bis zu 57,3 mOsm). Diese stetige Veränderung bei der Trockenkultur stellt eine fortlaufende Veränderung der Kulturbedingungen dar und ermöglicht keine konstante, ungestörte Kultur.

Dieses Experiment wurde mit dem Geri dish in unserem Labor IVF-SAAR Saarbrücken-Kaiserslautern mit dem Geri Time Lapse System reproduziert, wobei der Geri in der Lage ist, Feucht- oder Trockeninkubation zu wählen. In dem Experiment wurde über 15 Tage in Feuchtinkubation die Kulturschale inkubiert.

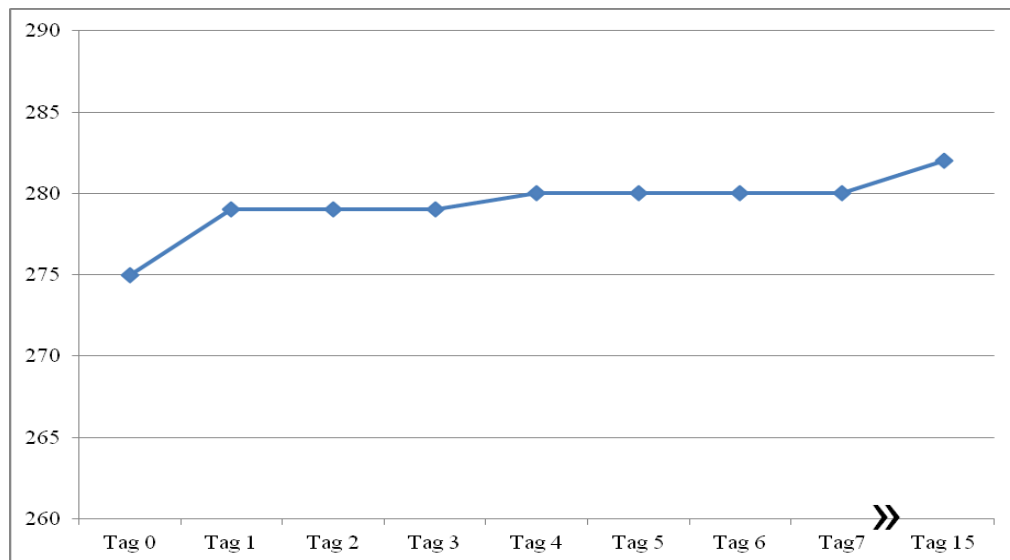


Abb.4: Messung der Osmolarität in mOsm in ungestörter Kultur unter Öl in Feuchtinkubation im Geri Time Lapse System (unveröffentlichte Daten IVF-SAAR Saarbrücken-Kaiserslautern) über 15 Tage.

Die Osmolaritätsänderung bei der Feuchtinkubation im Geri Time Lapse System betrug innerhalb der ersten 7 Tage nur 5 mOsm. Selbst nach 15 Tagen betrug dieser Wert nur 7 mOsm.

In Abb.4 ist deutlich zu erkennen und zu begründen, wie konstant die Bedingungen sind und warum eine ungestörte Kultur mit Feuchtinkubation verbunden sein sollte.

Die Auswirkungen der Trocken- und Feuchtinkubation auf die Embryonalentwicklung und letztendlich auf die Schwangerschaft und Implantationsraten konnte Fawzy et al. 2017 aufzeigen. Es wurden Embryokulturen in einem Benchtop Inkubator (G185 K-System) entweder in Trocken- oder Feuchtkultur durchgeführt.

Ergebnis Rate	Trockeninkubation (n=147)	Feuchtinkubation (n=150)	Odds ratio (95%CI)	P- Wert
Implantationsrate	69/257 (27%)	93/258 (36%)	0.65 (0,45-0,95)	0,025
Biochemische Schwangerschaftsrate	72/147 (49%)	91/150 (61%)	0.62 (0,39-0,99)	0,043
Klinische Schwangerschaftsrate	63/147 (43%)	85/150 (57%)	0.57 (0,36-0,91)	0,017
Fortlaufende Schwangerschaftsrate	54/147 (37%)	78/150 (52%)	0.54 (0,34-0,85)	0,008
Fehlgeburtenrate	18/147 (12%)	13/150 (9%)	1.47 (0,69-3,12)	0,31

Tab.2: Klinischer Ausgang der Studie beim Vergleich von Trockeninkubation gegenüber Feuchtinkubation (Fawzy et al. 2017).

In der Studie zeigte sich, dass die Embryonen aus der Feuchtinkubation am Tag 3 eine signifikant bessere Embryonalentwicklung zeigen. Am Tag 5 war die Blastocystenbildungsrate signifikant geringer bei der Trockeninkubation. Dies spiegelt sich wie in Tab.2 zu sehen in den Schwangerschafts- und Implantationsraten wider. Die Feuchtinkubation zeigt mit 52% fortlaufende Schwangerschaftsrate eine signifikant höhere Rate gegenüber der Trockeninkubation (37%), die zudem eine signifikant geringere Implantationsrate (27% gegenüber 36%) aufweist.

Ein zu beachtender Faktor bei der Verdunstung ist die Kulturtropfengröße (Iwata et al., 2016) und die Menge an überschichtetem Öl (Olds et al., 2015; Swain et al., 2018). Größere Volumina an Medium sowie eine dickere Schicht Öl über dem Medium wirken sich positiv aus.

Mineral Öl-Abbau (Peroxidation)

Mineralöl schützt die Kultur vor Verdunstung, Temperaturschwankungen, pH Änderungen - wie auch Kontaminationen. Es birgt aber auch das Risiko des Abbaus und der Peroxidation. Der Mineralölabbau und die Peroxidation sind zeit- und temperaturabhängig. Daher ist die Wahl und Handhabung des Öles bei der verlängerten Kultur sehr wichtig. Der Ausgangsperoxidlevel ist eine Komponente, jedoch sind Lagerung bei 2-8°C (Otsuki et al. 2009) und nicht bei Raumtemperatur im Dunkeln wichtige Faktoren, um der Peroxidation entgegen zu wirken. Schon das

Öffnen einer Flasche Öl kann nach mehreren Wochen einen Unterschied zu einer nicht geöffneten bezüglich der Peroxidation (Otsuki et al. 2007) ausmachen.

Die Wahl des Öls und damit verbunden der VOC und Peroxidlevel- (Martinez et al. 2017a) sowie die Überwachung durch die Produzenten kommt bei der ungestörten, verlängerten Kultur eine besondere Bedeutung zu (Ainsworth et al. 2017).

Ebenso wie das Mineralöl Abbauprozessen unterliegen kann, ist dies beim Medium der Fall.

Medium-Abbau

Sequentielle Medien haben den Vorteil, dass Abbauprodukte des Mediums durch den Wechsel entfernt werden. Aminosäuren können zerfallen, und besonders Glutamin kann zur Bildung von Ammonium führen, welches die Embryonalentwicklung hemmt (Lane und Gardner 2003). Wichtig ist, dass Single Step Medien Glutamin in Form des stabileren Dipeptid aufweisen und dadurch zum Teil geringe Mengen an Ammonium aufweisen als sequentielle Medien (Hardarson et al. 2015). Die Proteinquelle des Mediums ist ein weiterer Bestandteil, der zur Ammoniumbildung führen kann (Kleijkers et al. 2016). Mit der ungestörten, verlängerten Kultur erfahren die Überwachungsprotokolle der Medienhersteller eine größere Bedeutung. Veröffentlichungen zu Abbauprozessen des Mediums, möglichst mit den Ammoniumkonzentrationen, sind ein wichtiger Bestandteil bei der richtigen Wahl des Kulturmediums.

Leicht flüchtige Kohlenwasserstoffe (VOC (volatile organic compounds))

Eine verlängerte Kultur ohne Wechsel des Mediums kann dazu führen, dass leicht flüchtige Kohlenwasserstoffe (VOC) sich anhäufen. Diese organischen Verbindungen verdampfen bei Raum- oder höheren Temperaturen, gehen in die Gasphase über und können über die Raumluft oder die zuführenden Gase (Hall et al. 1998) in den Inkubator gelangen. Über die Ölschicht gelangen sie in das Kulturmedium und hemmen dort die Embryonalentwicklung (Martinez et al. 2017b). Besonders bei der verlängerten, ungestörten Kultur ist darauf zu achten, dass im Labor und insbesondere im Inkubator geringe VOC-Level herrschen (Mortimer et al. 2018). Reinräume mit integrierten VOC-Filtern sowie in die Gasleitungen und den Inkubator integrierten VOC-Filter sind zu empfehlen.

Ausblick

Die ungestörte, verlängerte Kultur ermöglicht es, die Chancen der Time Lapse Systeme auszunutzen, um klinische Entscheidungen zu treffen. Es werden viele Informationen über die Embryonalentwicklung zugänglich. Erfolgchancen werden abschätzbarer und erfolgreicher. Die Beachtung der Risiken und die Auswahl der Kulturbedingungen (Tab. 3) ist dabei entscheidend, um eine optimale Entwicklung zu ermöglichen.

Laborüberlegungen zur ungestörten Kultur	Vorschläge zur optimierten, ungestörten Kultur
Wahl des Ölvolumen und der Qualität	Öl mit hoher Qualität und geringem Peroxidlevel und großem Überschichtungsvolumen
Wahl des Mediumvolumen und Types	Medium mit einer Osmolarität zwischen 255-270 mOsm und Glutamin in Dipeptidform
Gas und Luftqualität	VOC-Filter für die Inkubatoren, Gasleitungen und Raumluft
Inkubator und Raumfeuchtigkeit	Inkubation mit hoher Luftfeuchtigkeit und Messung einer konstanten Raumfeuchtigkeit (30-50%)
Proteinquelle	Proteinquelle mit geringer oder keiner Ammoniumkonzentration
	Messung der Mediencharakteristika pH, Osmolarität und ggf. Abbauprodukte des Mediums und Öls.

Tab.3: Laborüberlegungen und Vorschläge zur Optimierung der ungestörten, verlängerten Kultur

Erkennung und Wahrung des Potentials der Gameten wird durch die Optimierung der Kulturbedingungen, der ungestörten Kultur mit Time Lapse Systemen einen Schritt weitergebracht, um möglichst hohe Schwangerschaftsraten zu erzielen.

Literaturverzeichnis

- Ainsworth, A., Fredrickson, J., Morbeck, D. Improved detection of mineral oil toxicity using an extended mouse embryo assay. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2017: 34: 391-397
- Costa-Borges, N., Belles, M., Meseguer, M., Galliano, D., Ballesteros, A., Calderon, G. Blastocyst development in single medium with or without renewal on day 3: a prospective cohort study on sibling donor oocytes in a time-lapse incubator. *Fertil. Steril* 2016:105:703-713
- Carpenter, G., Hammond, E., Peek, J. Morbeck, D.E. The impact of dry incubation on osmolality of media intime-lapse culture dishes. *Hum. Reprod.* 2018: 33:i61
- Diemant, F., Petersen, C., Mauri, A., Comar, V., Mattila, M., Vagnini, L., Renzi, A., Petersen, C., Ricci, J., Oliveira, J., Baruffi, R., Franco, J. Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assisted Reproduction* 2017:21:240-246
- Ebner,T., Shebl, O., Moser, M., Mayer, RB., Arzt, W., Tews, G. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *RBMO* 2010:21:762-768
- Fawzy. M., AbdelRahman, M., Zidan, M., Hafez, A., Abdelghafar, H. Al-Inany, H., Bedaiwy, M. Humid versus dry incubator: a prospective, randomized, controlled trial *Fertil. Steril.* 2017:108:277-283
- Hall, J., Gilligan, A., Schimmel, T., Cecchi, M., Cohen, J. The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. *Hum. Reprod.* 1998: 13: 146-155
- Hardarson, T., Bungum, M., Conaghan,J., Meintjes, M., Chantilis, S., Molnar, L., Gunnarsson, K., Wikland, M. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil. Steril.* 2015: 104: 6: 1452-1459
- Iwata, K., Yumoto, K., Mio, Y. Unstable osmotic pressure in microdrops cultured under mineral oil in non-humidified incubators. *Fertil. Steril.* 2016: 106: e355
- Kleijkers, S., van Montfoort, A.,Bekers, O., Coonen, E., Derhaag, J. Evers, J., Dumoulin, J. Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2–8°C and during incubation at 37°C. *Hum. Reprod.* 2016:31:6:1192-1199
- Lane, M. and Gardner, D. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol. Reprod.* 2003: 69: 1109-1117
- Martinez, C.A., Nohalez, A., Ceron,J.J., Rubio, C. P., Roca, J., Cuello, C., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., Gil, M. A. Peroxidized mineral oil increases the oxidant status of culture media and inhibits in vitro porcine embryo development. *Theriogenology* 2017a: 103: 17-23
- Martinez, C.A., Nohalez, A., Parrilla, I., Motas, M., Roca, J., Romero, I., Garcia-Gonzalez, D., Cuello, C., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., Gil, M. A. The overlaying oil type influences in vitro

embryo production: differences in composition and compound transfer into incubation medium between oils. *Sci. Rep.* 2017b: 7: 10505: 1-11

McLaren, A., Biggers, J.D. Successful Development and Birth of Mice cultivated in vitro as Early Embryos. *Nature* 1958: 182:877-878

Mortimer, D., Cohen, J., Mortimer, ST., Fawzy, M., McCulloh, D.H., Morbeck, D.E., Pollet-Villard, X., Mansour, R.T., Brison, D.R., Doshi, A., Harper, J.C., Swain, J.E., Gilligan, A.V. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *RBMO* 2018: 36: 658-674

Olds, S., Stemm, K., Wachter, K., Wiemer, K. Analysis of embryo culture media pH changes during incubator use and media evaporation under oil using a continuous pH monitoring system. *Fertil. Steril.* 2015: 104: e318-e319

Otsuki J., Nagai, Y., Chiba, K. Peroxidation of mineral oil used in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development. *Fertil. Steril.* 2007: 88: 741–743

Otsuki J., Nagai, Y., Chiba, K. Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its association with albumin in culture. *Fertil. Steril.* 2009: 91: 5: 1745-1749

Ringer, S. Concerning the Influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J Physiol.* 1882: 3:380-392

Sfontouris, I., Martins, W., Natri, C., Viana, I., Navarro, P., Raine-Fenning, N., Poel, S., Rienz, L., Racowsky, C. Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016: 33: 1261-1272

Smith, G.D., Takayama, S., Swain, J. E., Rethinking In Vitro Embryo Culture: New Developments in Culture Platforms and Potential to Improve Assisted Reproductive Technologies. *Bio. Reprod.* 2012:86:62:1-10

Steptoe P.C, Edwards R.G. Purdy J.M. Human blastocysts grown in culture. *Nature.* 1971; 29(5280):132-3.

Swain, J., Cabrera, L., Xu, X., Smith, G. Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development *RBMO* 2012: 24: 142-147

Swain, J.E. Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators. *RBMO* 2014: 28: 535-547

Swain, J. E., Kan, M., Moayori, S., Schoolcraft, W. Real-Time Assessment of pH Stability Within an IVF Isolette. *Fertil. Steril.* 2015: 03: e37

Swain, J.E., Schoolcraft, W., Bossert, N., Batcheller, A.E. Media osmolality changes over 7 days following culture in a non-humidified benchtop incubator. *Fertil. Steril.* 2016: 106: e362

Swain, J.E., Graham, C., Kile, R., Schoolcraft, W.B., Krisher, R.L. Media evaporation in a dry culture incubator; effect of dish, drop size and oil on media osmolality. *Fertil. Steril.* 2018: 110: e363-e364

Swain, J. E. Controversies in ART: considerations and risks for uninterrupted embryo culture. RBMO 2019: 39:1:19-25

Wang, F., Kooistra, M., Lee, M., Liu, L., Baltz, J. Mouse embryos stressed by physiological levels of osmolarity become arrested in the late 2-cell stage before entry into M phase. Biol of Rep. 2011: 85: 702–713

Zhang, J.Q., Li, X.L., Peng, P., Guo, X., Heng, B.C., Tong, G.Q. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. RBMO: 2010: 20: 510–515