

# **Und was kommt nach der Routine? Zusatzbehandlungen bei der künstlichen Befruchtung**

**Dr. rer. nat. Jens Hirchenhain**

**DNRa-Treffen  
05. September 2009  
Düsseldorf**

# Zusatzbehandlungen

- Assisted hatching
- Polkörperdiagnostik
  - Spindle view
- Zona Imaging
  - IMSI

# Assisted hatching

## „erleichtertes Schlüpfen“

## Assisted Hatching

- “Hatching” (schlüpfen) des Blastozysten aus der Zona Pellucida ist ein natürlicher Vorgang um die embryonale Implantation zu ermöglichen
- Verhärtung der Zona Pellucida, durch
  - > in vitro Kultur
  - > Kryokonservierung
- AH erleichtert es dem Embryo, aus der Zona zu schlüpfen

# Zona Pellucida



- Wird bereits bei der Bildung der Primordialfollikel angelegt (Rankin et al, 2000, Zhao et al, 2002)
- Zonaproteine werden von Oozyte und Granulosazellen sezerniert (Sinowatz 2001, Bogner 2004)



# Funktionen der Zona Pellucida

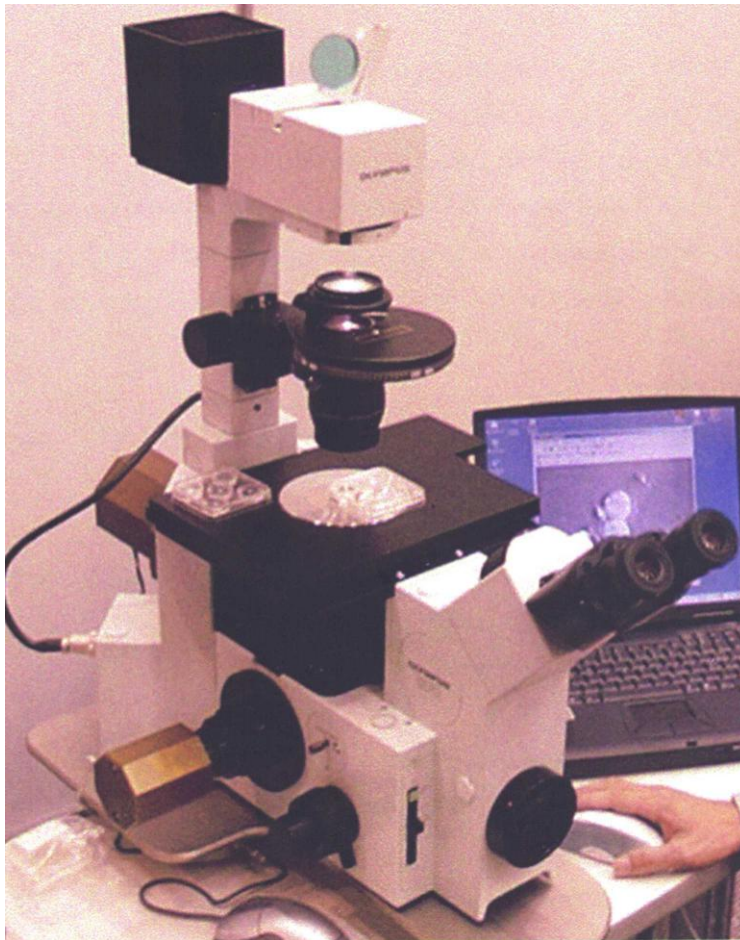


- Physikalische Barriere
- Verhinderung der Polyspermie
- Schutz vor mechanischem Stress bis zur Implantation
- Schutz des Präimplantations-embryos vor Immunabwehr

## Assisted hatching: Methoden

- Chemisch: Acid Tyrode
  - Nachteile: embryotoxisch, Mikromanipulation
- Mechanisch: Partial Zona Dissection (PZD)
  - Nachteile: schwer reproduzierbar, Mikromanipulation
- Laser
  - Vorteile: schnell, kontaktfrei, definierte Lochgröße





## Octax Laser Shot

- 1,48  $\mu\text{m}$  Diodenlaser
- Computer-gesteuert
- EyeWare™ Imaging Software
  - “Live”-Video-Bild
  - Abmessungen
  - Bilder- bzw. Patienten-Datenbank



## Assisted hatching: (vorläufige) Indikationen

- Maternales Alter > 37 Jahre
- auffällig verdickte Zona Pellucida ( > 17  $\mu\text{m}$ )
- basal erhöhter FSH-Wert
- mind. 2 erfolglose IVF-Versuche (trotz guter Embryo-Qualität)
- ET nach Kryokonservierung

## Assisted hatching: Lochgrößen

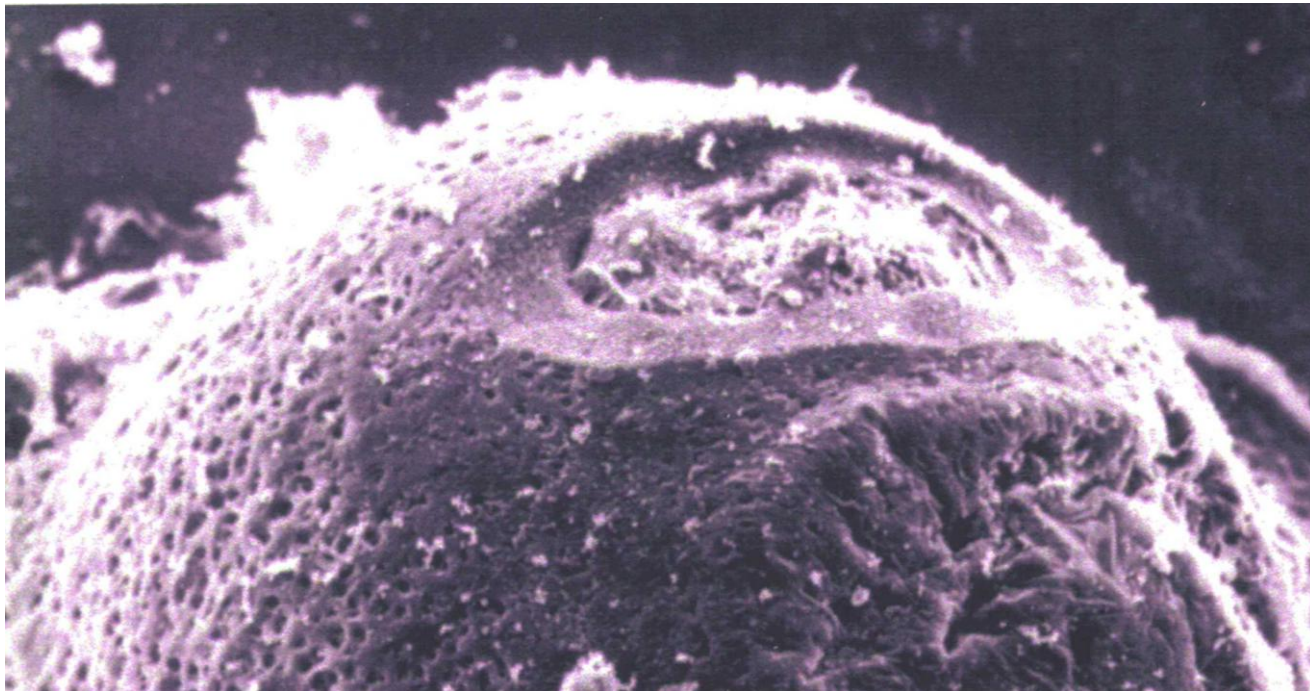


Zona 16µm  
Lochgröße 26µm

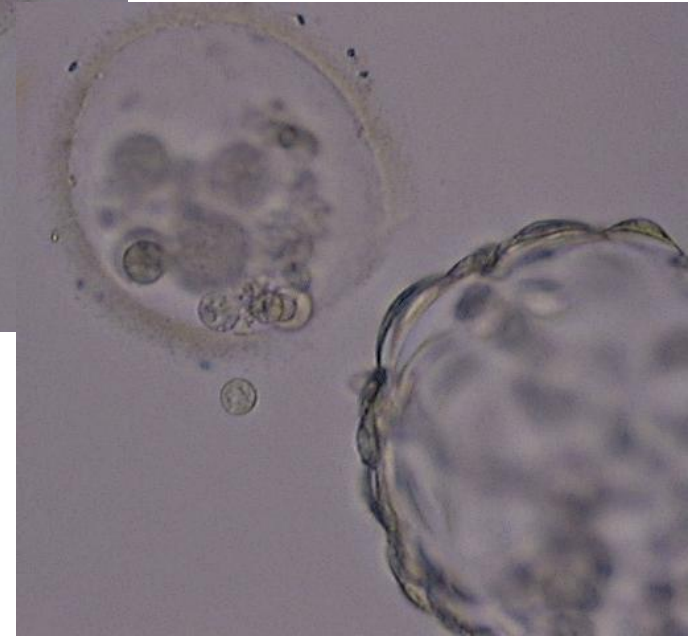
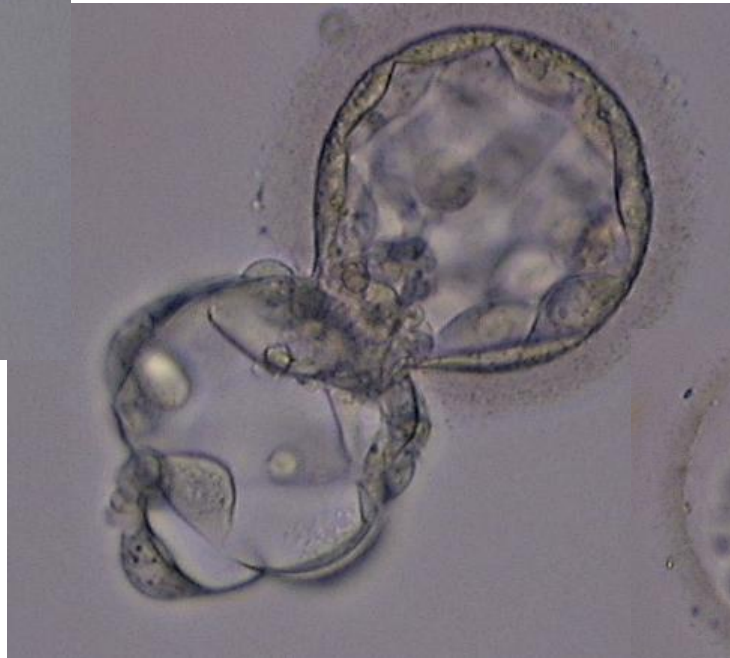


Zona 15µm  
Lochgröße 21µm

## Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Laser-induzierten Zona P. Öffnung



## “schlüpfende” Blastozysten



# Polkörperdiagnostik



# Präimplantationsdiagnostik

---

- Durch Diagnostik einzelner Zellen oder Zellbestandteile von Embryonen kann gezielt ein nicht betroffener Embryo transferiert werden
- Spätere Schwangerschaftsabbrüche und die damit verbundenen körperlichen und seelischen Belastungen können vermieden werden
- Erhöhung der Einnistungsraten und der "baby-take-home-rate"



## Blastomerenbiopsie

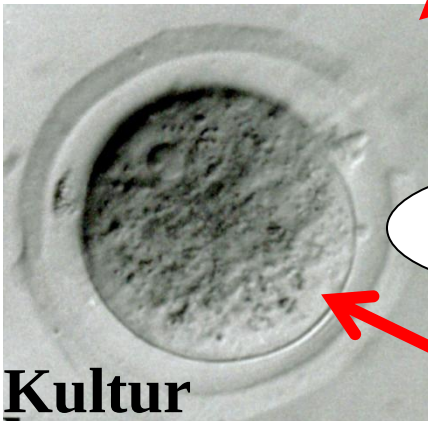
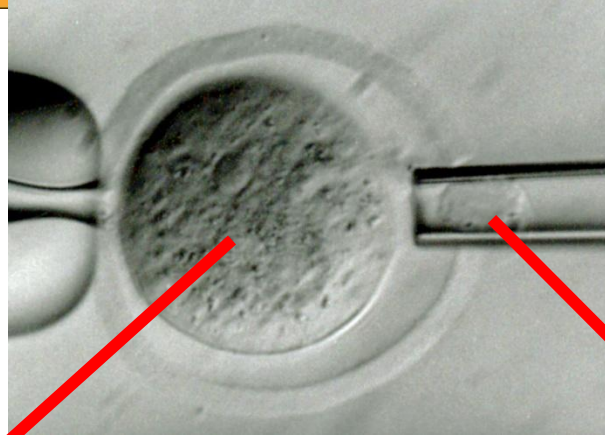


Blastomere

embryos



## Polkörperbiopsie



**Kultur**

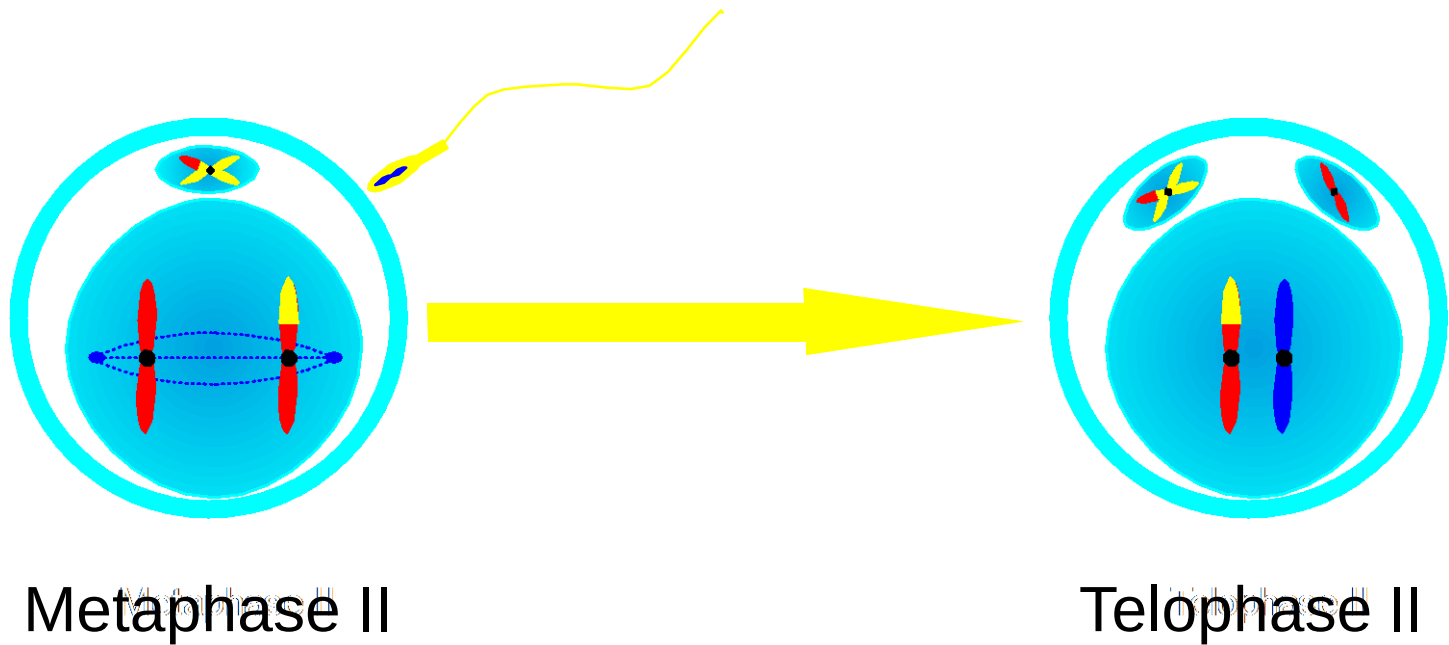
**FISH  
PCR**



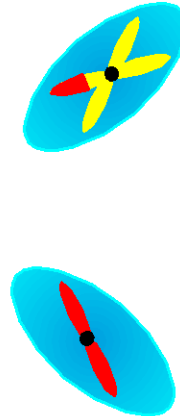
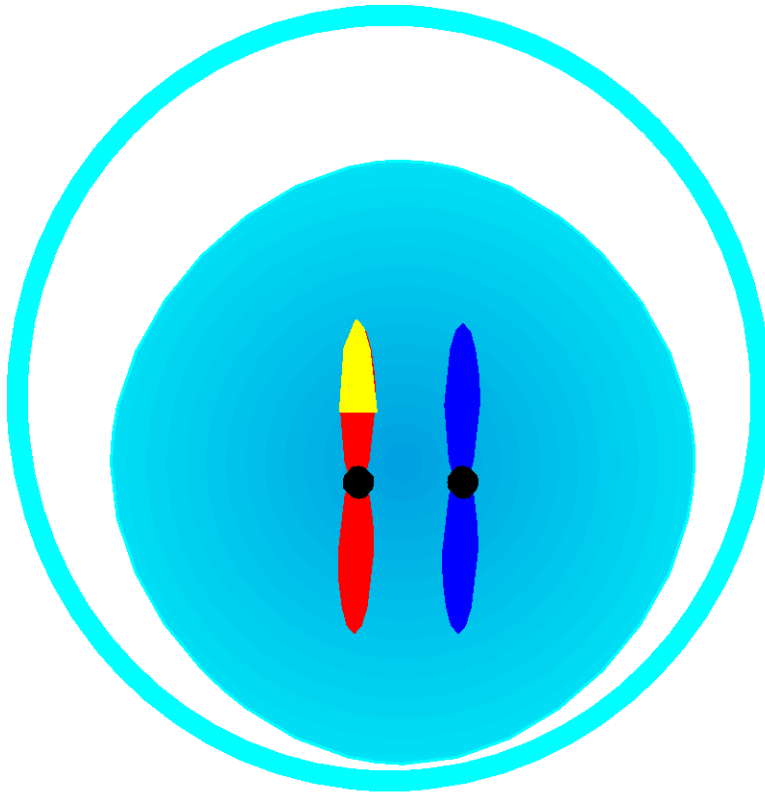
Polkörper = „Spiegelbild“ der Eizelle

**Indirekte  
Diagnose**

# Polkörperbiopsie



# Polkörperbiopsie



## Polkörperdiagnostik: Indikationen

- Alter (> 35/38/40 Jahre)
- Habituelle Aborte
- Implantationsversager
- Maternale Translokationen
- (Monogenetische Erkrankungen)



## Polkörperdiagnostik: Indikationen

- Alter (> 35/38/40 Jahre)
- Habituelle Aborte
- Implantationsversager

### ➤ Aneuploidie-Screening:

Sind die Chromosomen richtig verteilt?

Chr. 13, 16, 18, 21, 22, X

# Aneuploidiescreening

- Die Schwangerschaftsrate bei der IVF-Therapie nimmt mit zunehmendem Alter der Frau deutlich ab, die Abortrate nimmt zu
- Mögliche Ursache hierfür:  
erhöhte Rate an Trisomien maternalen Ursprungs, bzw. erhöhte Rate an Aneuploidien in Oozyten und in Präimplantationsembryonen

Fisher et al. 1995, Am. J. Hum. Genet. 56, 669-675; Hassold et al. 1985, Hum. Genet. 70, 11-17

Dailey et al. 1996, Am. J. Hum. Genet. 59, 176-184

Munne et al. 1995, Fertil. Steril. 64, 382-391

# Aneuploidiescreening

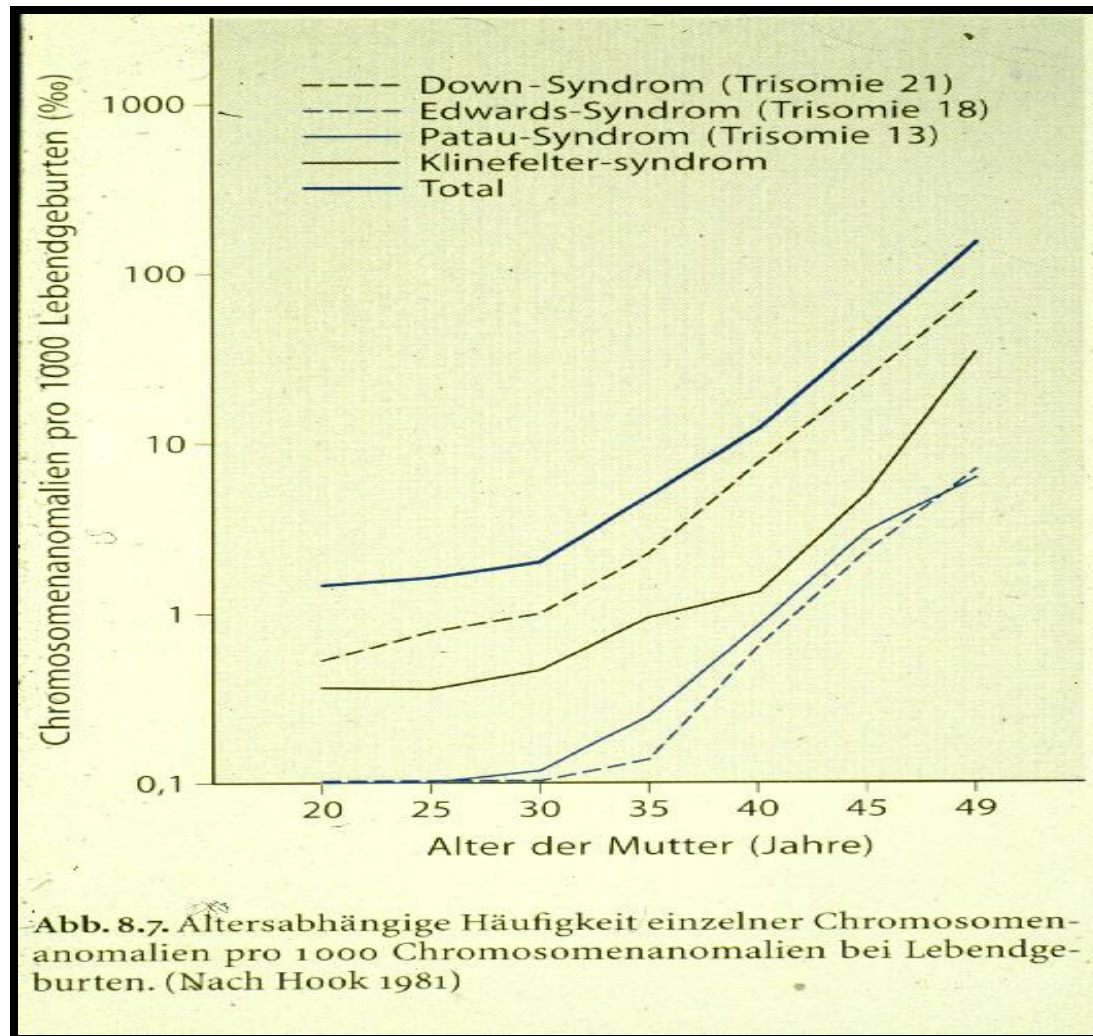
**Frauen, die älter als 40 Jahre sind:**

Haben im Fall einer Schwangerschaft ein Abortrisiko  
von  
**40-50%**

Dieses reduziert sich durch Polkörperdiagnostik für  
Chromosomenfehlverteilungen auf  
**15%**

# Alters-abhängige Zunahme der Chromosomen Aberrationen

PD Dr. Montag  
UFK Bonn



## 39 jährige Frau:

Hatte mehrere erfolglose Vorversuche  
(Dtl / Brüssel + PGD)

- 1. Versuch PKD, 7 EZ, viele unreif / aneuploid, kein Embryotransfer
- 2. Versuch PKD, 20 EZ, 18 reif
  - nach 1. FISH Runde (13,16,18,21,22,X) und
  - nach 2. FISH Runde (4,14,15,17): 2 ok für Transfer
  - Geminischwangerschaft
  - 1 Fruchthöhle ohne Herzaktion
  - Abort in der 10. Woche
  - Ursache: Trisomie 20

## **28 jährige Frau:**

- Wurde 6 x spontan schwanger
- Hatte 6 x spontane Aborte in der 6.-9. Woche

### 1. Versuch mit Polkörperdiagnostik ergab:

- überdurchschnittlich hohe Aneuploidierate
- nach Transfer von 2 Embryonen: Gemini



# Polkörperdiagnostik: Indikationen

- Maternale Translokationen:
  - spezifischer Nachweis der beteiligten Chromosomen

## Reziproke Translokationen

- Chromosomenaustausch zwischen 2 Chromosomen

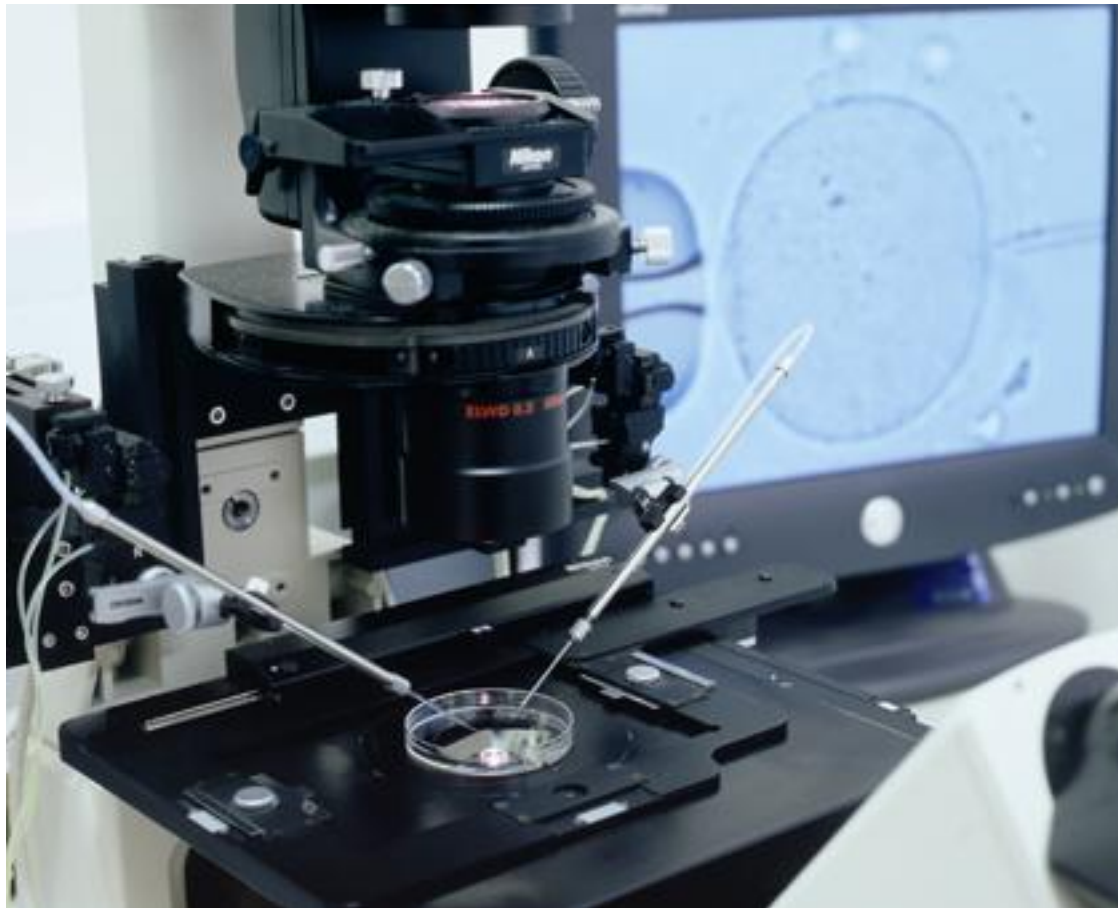
## Robertsonsche Translokation

- Fusion der langen Arme von 2 Chromosomen

# Polkörperdiagnostik: Indikationen

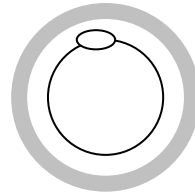
- Monogenetische Erkrankungen (maternal vererbt)
  - PCR Nachweis der spezifischen Mutation vererbbar durch die Frau

# Polkörperbiopsie am ICSI-Mikroskop



# Zeitlicher Ablauf der PKD

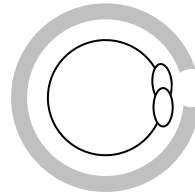
Tag 1:  
ICSI



**Aneuploidie/Translokation**

Tag 1  
17:00-18:00

6-12 h nach ICSI:  
Biopsie



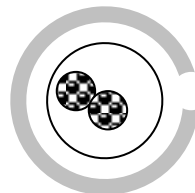
Tag 2  
ab 6:00

Sofort nach Biopsie:  
Beurteilung der Polkörper,  
Vorbereitung, Durchführung  
und Analyse der FISH



Sofort nach Biopsie:  
(Transport)/Diagnostik

Tag 2, 20-22 h nach ICSI:  
Analyse der Verteilungsmuster  
der NVK in den Vorkernen der  
befruchteten Eizellen  
Information der Patientin und  
Entscheidung



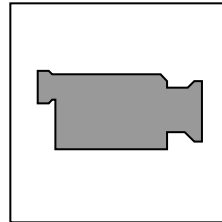
Tag 2  
12:00 – 15:00 Ergebnis

Weitere Kultur  
und Transfer

Kryokonservierung

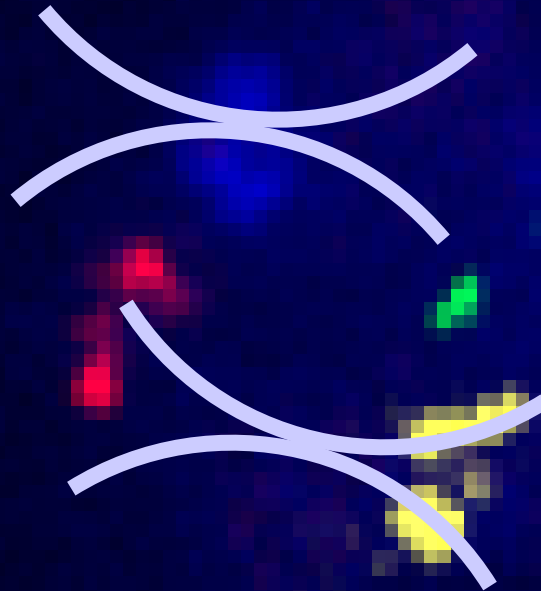
Keine weitere Kultur

# Polkörperbiopsie



# Chromosomen: 13 16 18 21 22

CEP: Centromer Proben

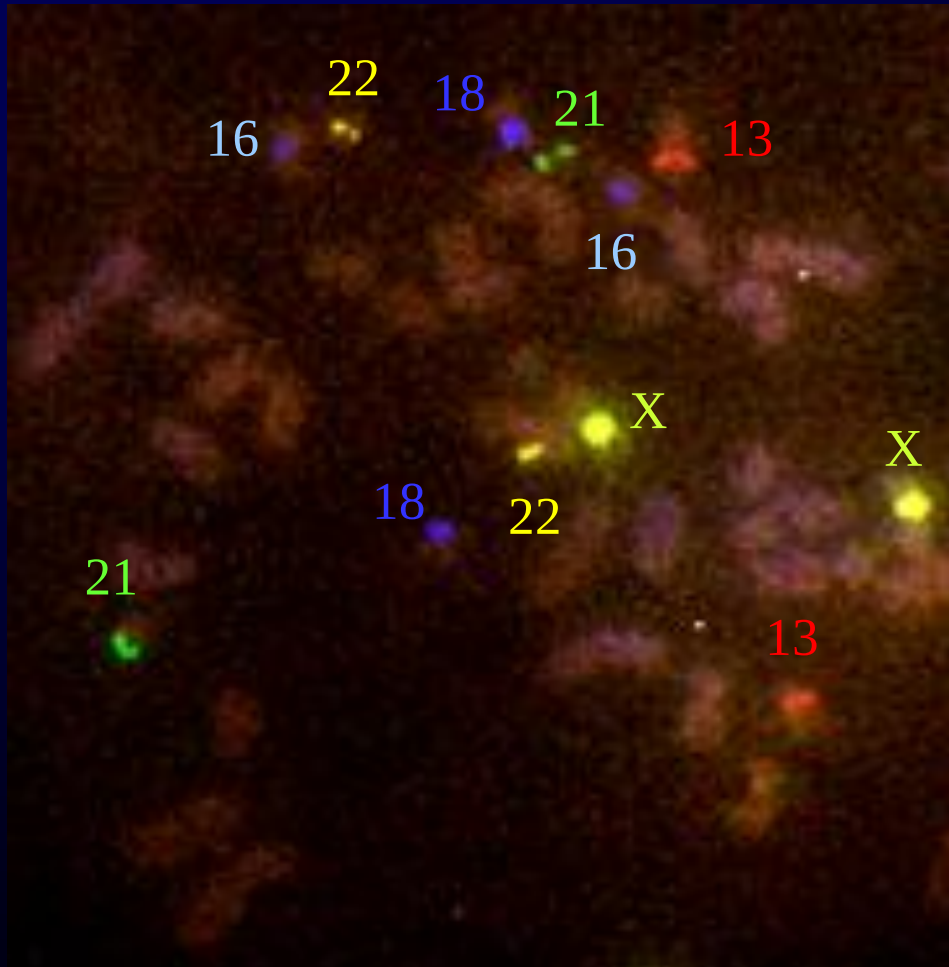


LSI: Locus spezifische Proben

PD Dr. Montag  
UFK Bonn



# Modifizierte 6 Sonden FISH Probe



- Abbott MultiVysion PB  
(5 color FISH Probe)
- Zugabe von  
CEP X green  
CEP X orange
- simultane FISH  
(1 Hybridisierungsrunde)

## PKD: Schlussfolgerung

- Die Polkörperbiopsie ist in Deutschland rechtlich möglich und eine akzeptierte Methode der „Präimplantations“- Diagnostik
- Einsetzbar zur Detektion von chromosomalen Fehlverteilungen
- Immer indiziert bei maternalen Translokationen
- Bleibt vorerst ein Einzelfall-Entscheid bei monogenetischen Erkrankungen

# Polarisationsmikroskopie

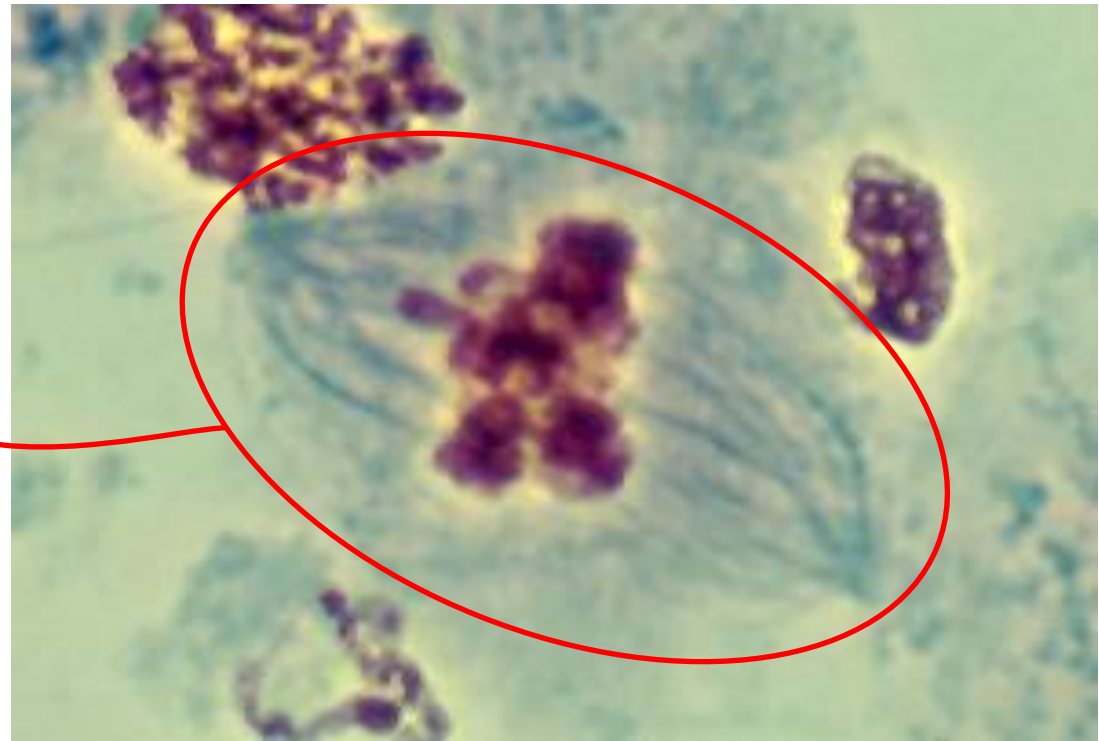
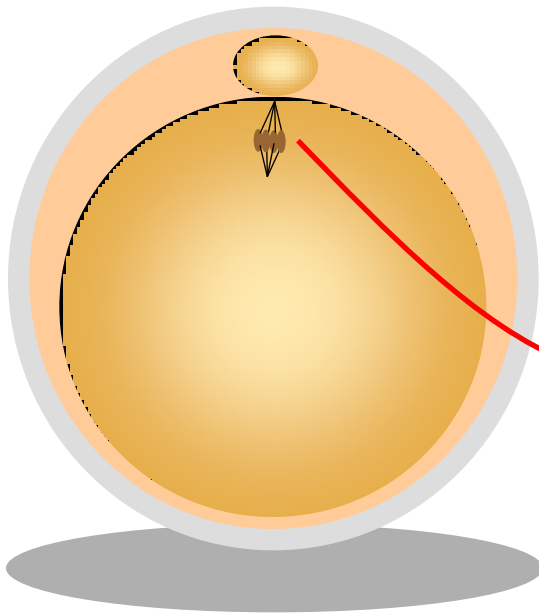
## Polarisationsmikroskopie

- Ermöglicht die nicht-invasive, hochauflösende Darstellung kontrastarmer, birefringenter (doppelbrechender) Strukturen, wie z. B. der Spindel, die mit herkömmlichen mikroskopischen Kontrastierungsverfahren, wie Hoffmann-, DIC- oder Reliefkontrast, nicht erfassbar sind.
- Glasboden-Schälchen
- Temperaturstabiler Mikroskop-Heiztisch
- Hochwertiges Mikroskop

**„Spindle view“**

**Darstellung der Meiose-Spindel**

## Was ist die meiotische Spindel?



***Struktur des Cytoskelett aufgebaut aus thermolabilen Proteinen (Mikrotubuli). Die Spindel vermittelt die reguläre Anordnung der Chromosomen und ihre gleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen***

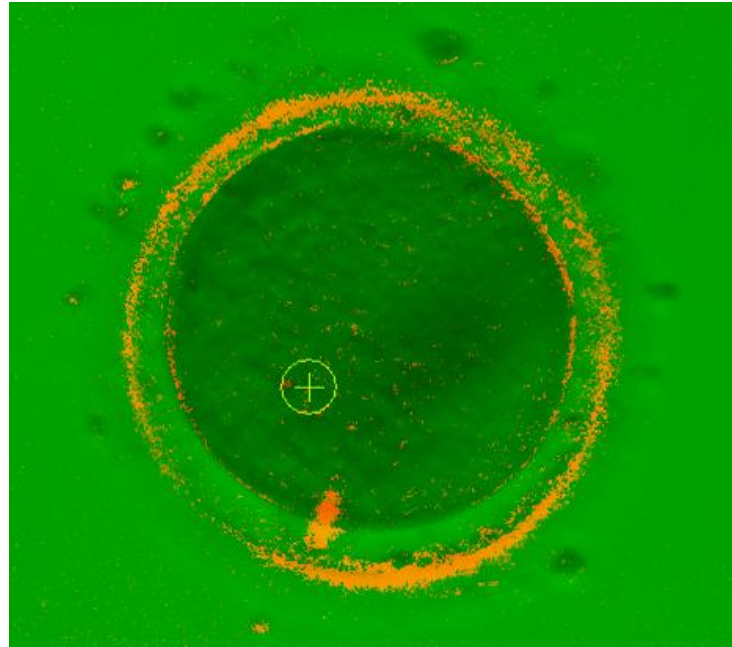
## Spindel Charakteristika (1)



Die Spindel ist unsichtbar  
im normalen Lichtmikroskop



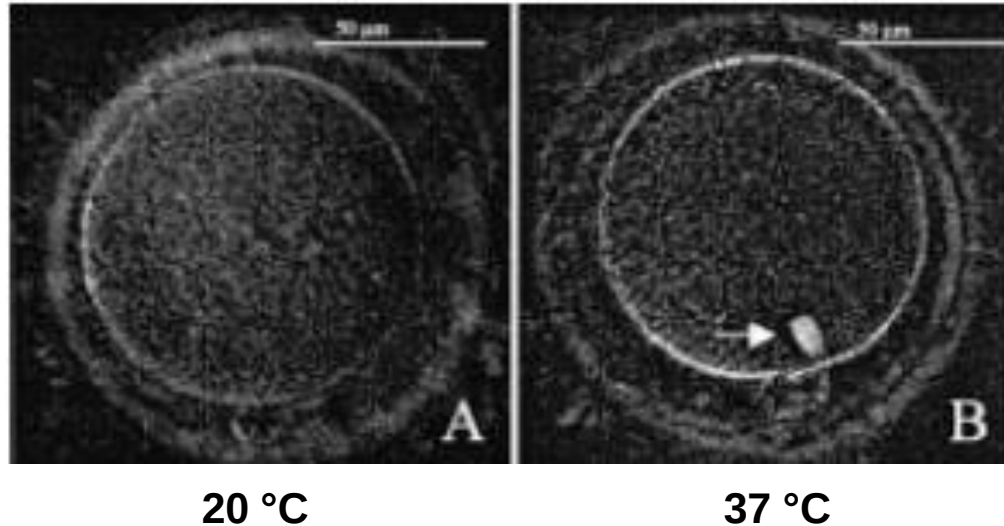
## Spindel Charakteristika (2)



***Wegen ihrer spezifischen Ultrastruktur hat die Spindel doppelbrechende Eigenschaften und wird dadurch in der Polarisationsmikroskopie sichtbar***

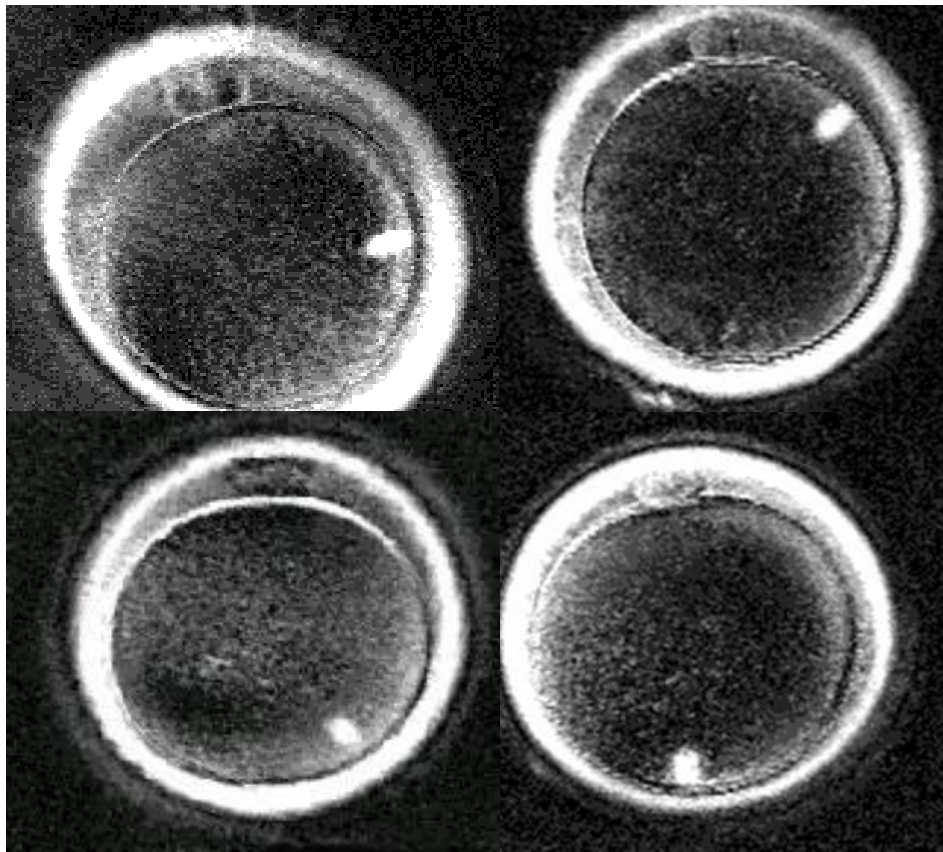
## Spindel Charakteristika (4)

***Die Spindel ist sehr empfindlich bei Abweichungen der Temperatur oder des pH-Wertes***



## Spindel Charakteristika (5)

***Position der Spindel ist in mehr als 30% der Eizellen  
nicht verlässlich durch den 1. Polkörper markiert***



- Mehrere Arbeiten untersuchten die Bedeutung der Präsenz einer Spindel in Eizellen im Rahmen der ART Behandlung
- Einige Autoren berichteten von geringeren Befruchtungsraten in Eizellen ohne Spindel (Wang et al. 2001; Cohen et al. 2004), andere nicht (Moon et al. 2003)
- Einige fanden eine verbesserte Embryoqualität in Eizellen mit Spindel (Wang et al. 2001; Moon et al. 2003), andere nicht (Cohen et al. 2004)

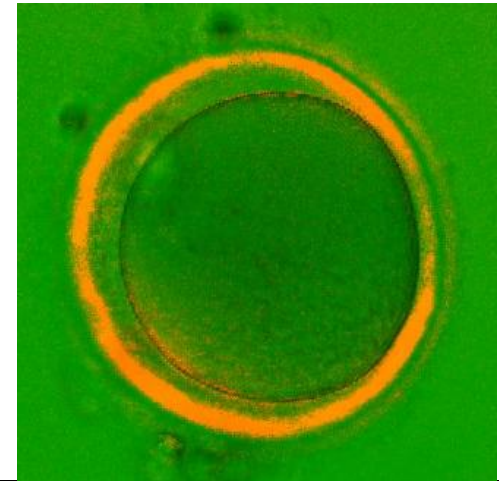
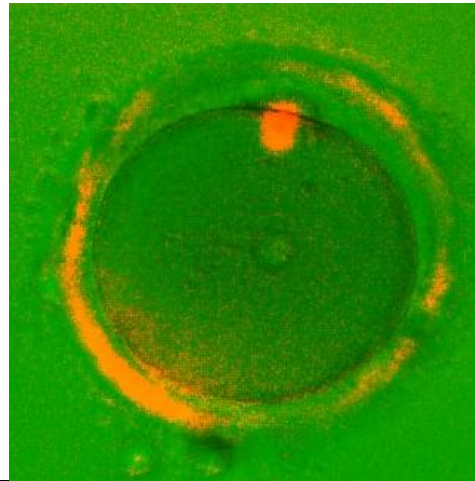
## Petersen et al. (2009) RBM online 18 (2), 235

### Metaanalyse zu Spindle view und ICSI-Ergebnissen

Wang *et al* 2001  
Moon *et al* 2003  
Rienzi *et al* 2003  
Cohen *et al* 2004  
Chamayou *et al* 2006  
Shen *et al* 2006  
Taylor *et al* 2006  
Fang *et al* 2007  
Rama Raju *et al* 2007  
Madaschi *et al* 2008

Petersen et al. (2009) RBM online 18 (2), 235

Metaanalyse zu Spindle view  
und ICSI-Ergebnissen



|                   | Mit Spindel          | Ohne Spindel         |
|-------------------|----------------------|----------------------|
| Befruchtungsrates | 75,6%<br>3543 / 4684 | 61,5 %<br>777 / 1264 |

$P < 0,0001$

Petersen et al. (2009) RBM online 18 (2), 235

Metaanalyse zu Spindle view und ICSI-Ergebnissen

## Signifikante Unterschiede

- Befruchtungsrate
- PN-Stadien mit guter Morphologie
- Tag3 Top Embryo
- Blastozystenentwicklung

## Kein Unterschied

- Schwangerschaftsrate
- Implantationsrate

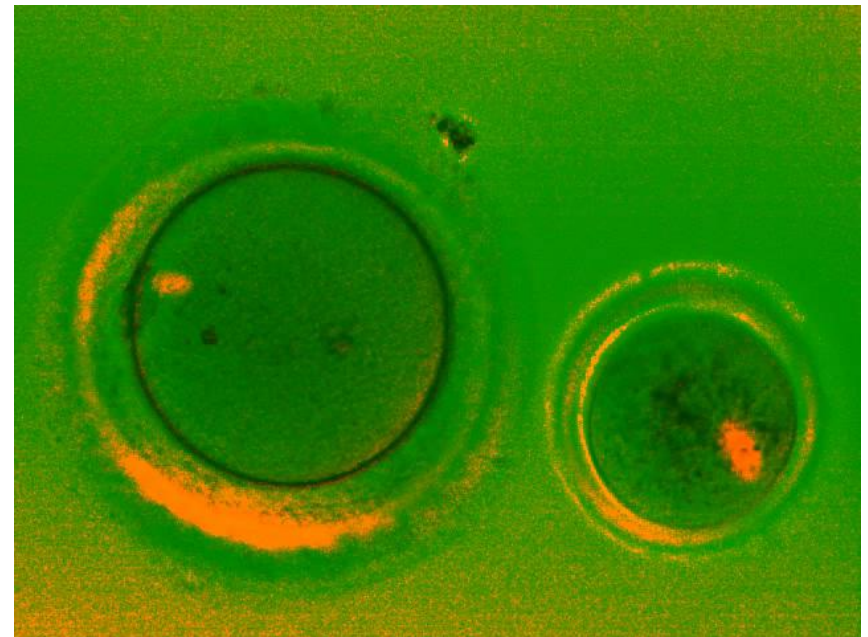


# Externe Faktoren = Laborparameter

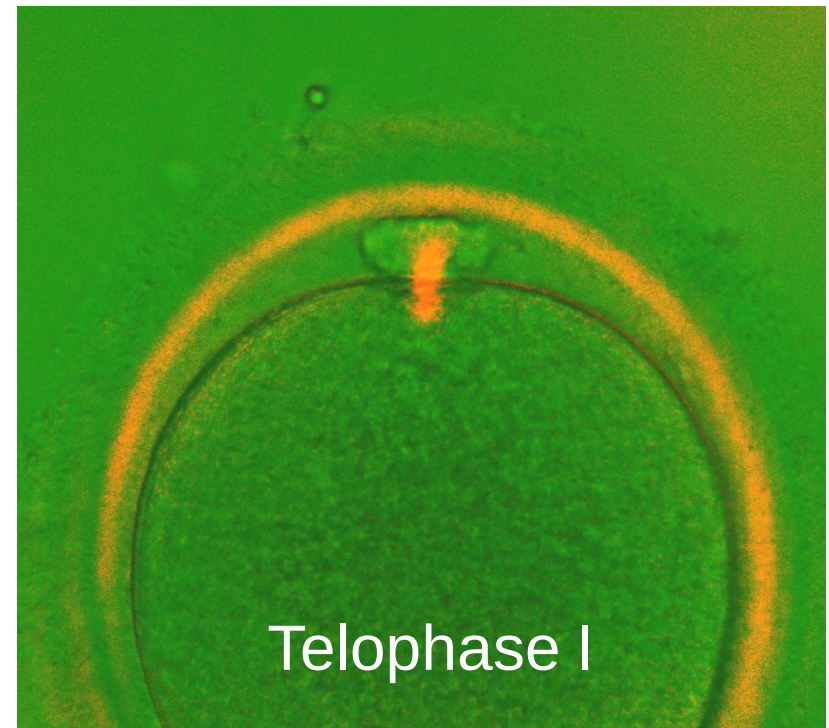
## Temperatur

- Kritische Temperatur:  
33°C
- Kulturmedium
- Heiztische
  - Stereomikroskop
  - Injektionsmikroskop
- Inkubator

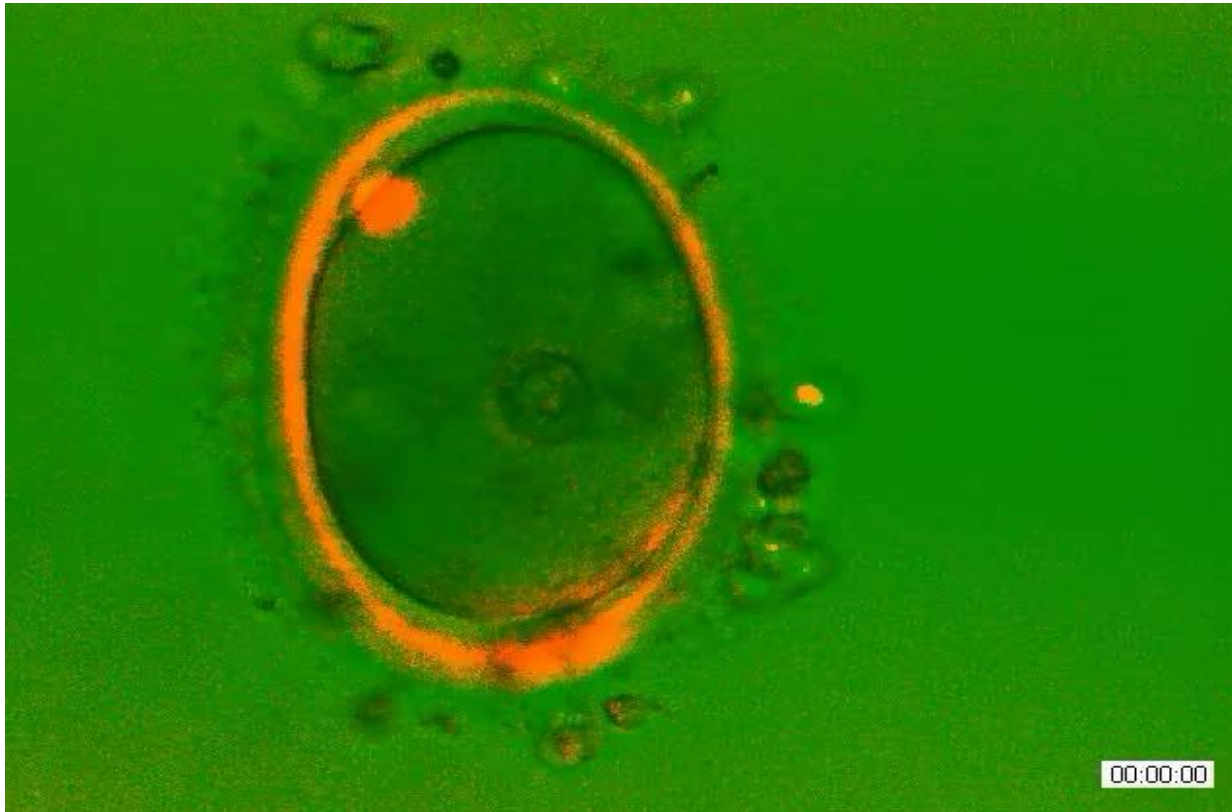
## pH-Wert des Mediums



# 1. Polkörper vorhanden = Metaphase II Eizelle?



# Zeitlauf des Meiose-Zyklus



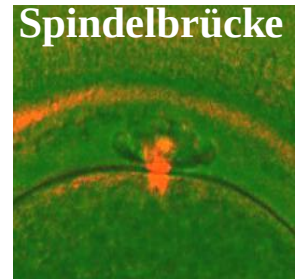
**Montag, Schimming, van der Ven; RBM Online 2006**

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Montag, UFK-Bonn

# Verlauf des meiotischen Zellzyklus

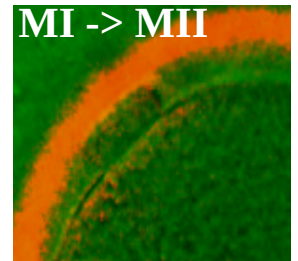
Nach der Bildung des 1. Polkörpers:

- Ist eine Spindelbrücke zwischen dem 1. PK und der Eizelle für 75 – 90 min sichtbar



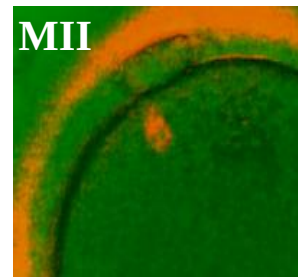
gefolgt von:

- Einer Zeitspanne von 40 – 60 min in der keine Spindel vorhanden ist



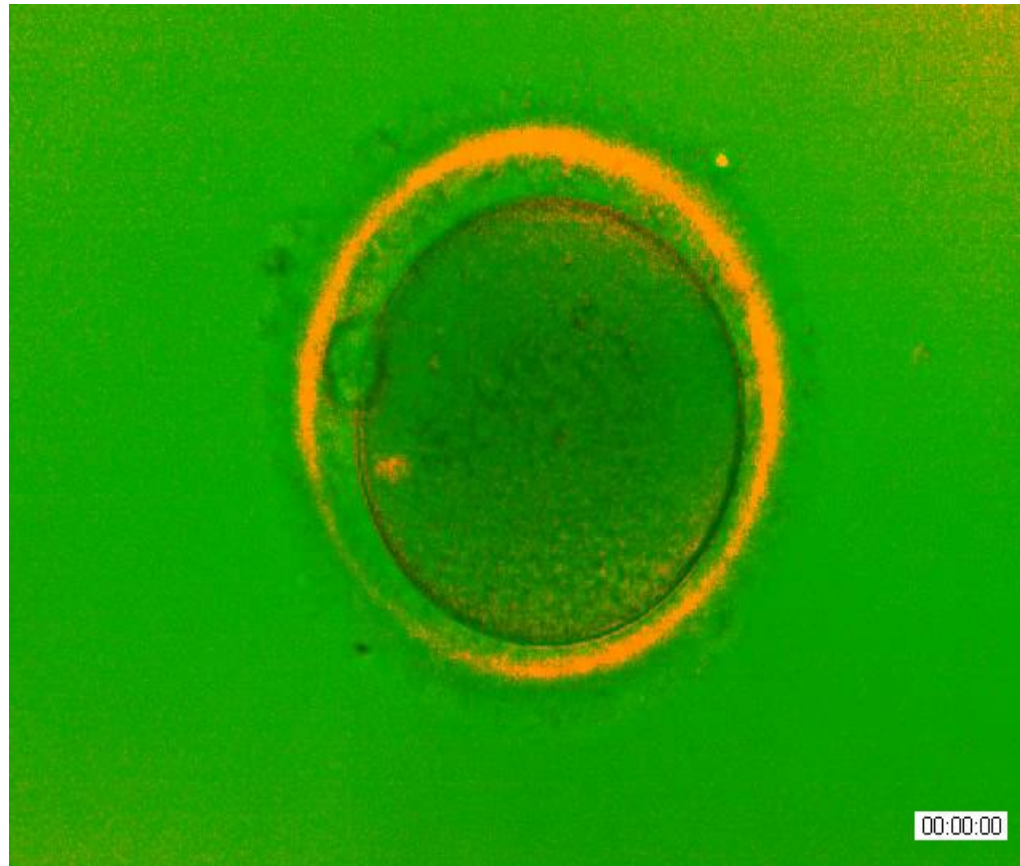
was bedeutet, dass:

- Das Durchlaufen des meiotischen Zellzyklus und die Bildung einer regulären MII Eizelle ist erst 115 – 150 min nach Bildung des 1.PK abgeschlossen





# Bildung des 2. Polkörpers



freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Montag, UFK-Bonn

# Bedeutung für die Praxis

- Spindeldetektion ist für viele (alle?) ICSI Patienten von Vorteil:
  - Zur Bestimmung der Eizellreife
  - Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der ICSI
- Verbesserung der Polkörperbiopsie (??)
- Wichtigste neue Erkenntnis:

Die Präsenz eines 1<sup>ten</sup> Polkörpers erlaubt nicht automatisch den Rückschluss, dass die dazu gehörige Eizelle sich in Metaphase II befindet

# Kann die Spindelbeobachtung die Schwangerschaftsraten verbessern?

- *Jein!!?*
- indirekt über Optimierung der Kultur / Handling
- evtl. bei „low response“

# Zona Imaging



# Zona Pellucida

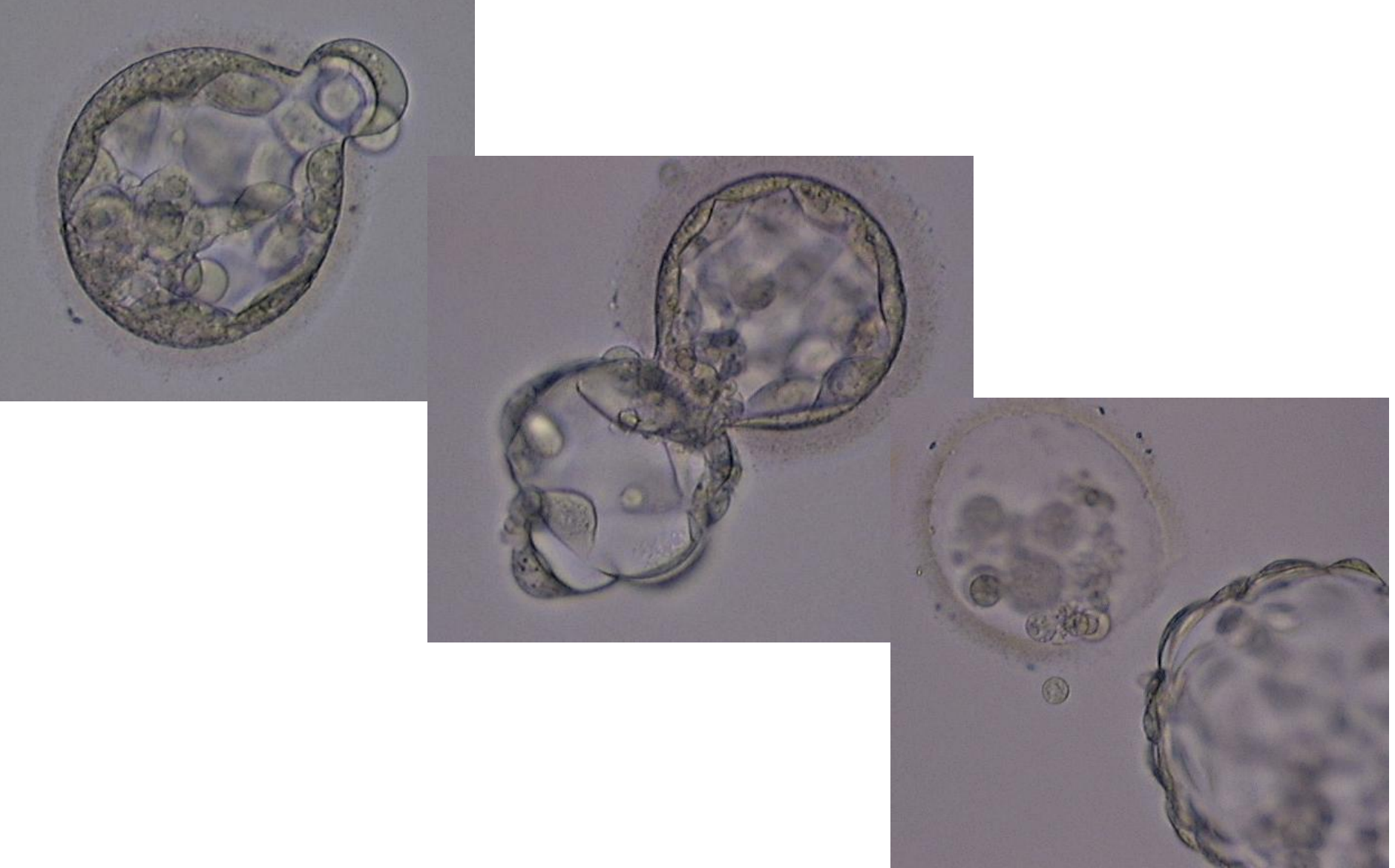


- Wird bereits bei der Bildung der Primordialfollikel angelegt (Rankin et al, 2000, Zhao et al, 2002)
- Zonaproteine werden von Oocyte und Granulosazellen sezerniert (Sinowatz 2001, Bogner 2004)
- Während des Reifungsprozesses der Oocyte verändert sich die Zona P. charakteristisch (Eppig 2001)

# Funktionen der Zona Pellucida

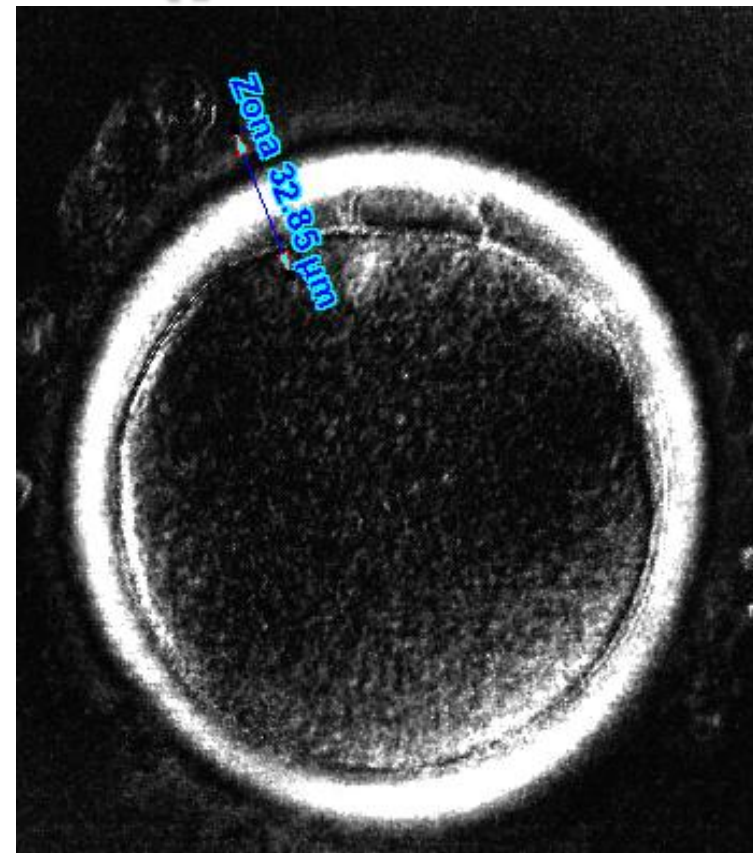


- Physikalische Barriere
- Verhinderung der Polyspermie
- Schutz vor mechanischem Stress bis zur Implantation
- Schutz des Präimplantations-embryos vor Immunabwehr

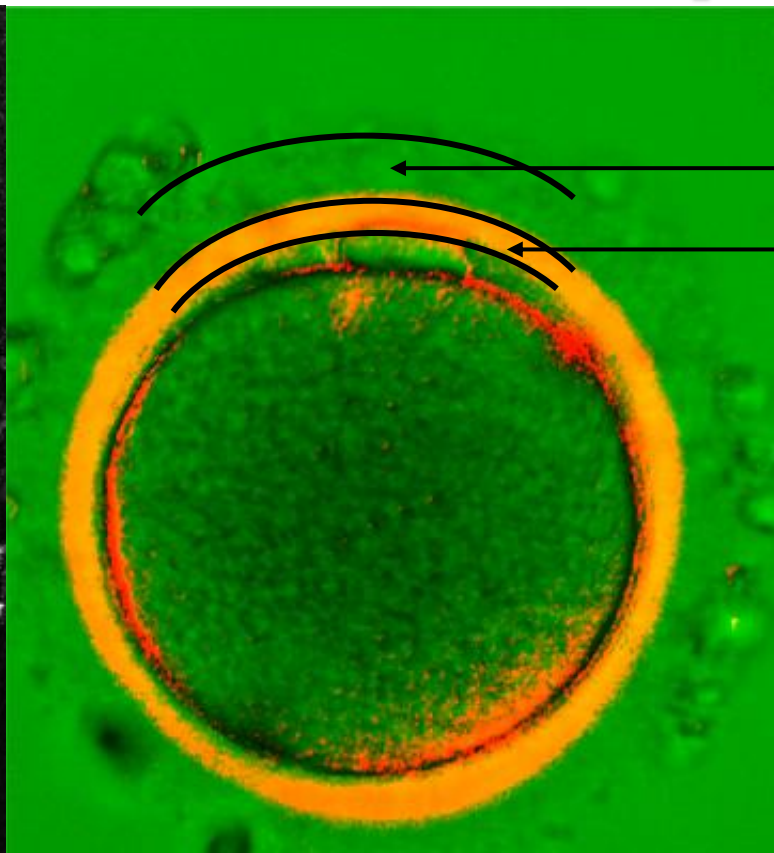




# Lichtbrechung der Zona pellucida (polarisationsmikroskopisch)



Polscope



Octax ICSI Guard

**Original-Artikel:**  
**RBM online 16, No 2, February 2008**

Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic  
implantation potential in ICSI cycles

M Montag, T Schimming, M Köster, C Zhou, C Dorn, B Rösing, H van der Ven, K van der Ven

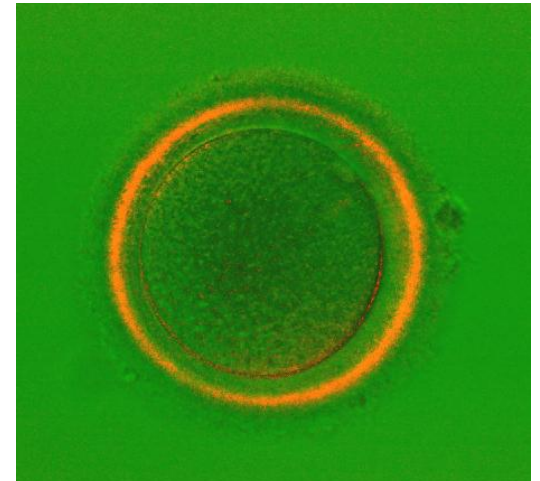
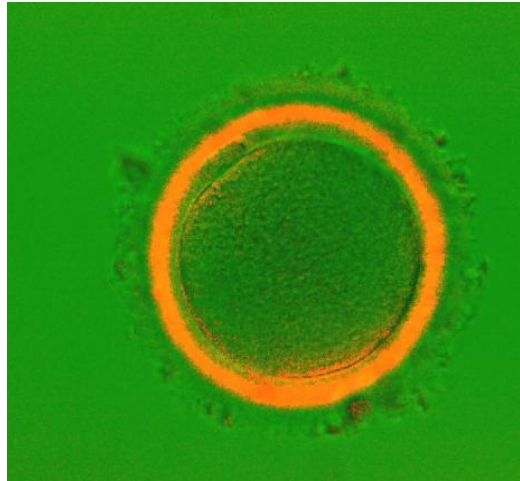
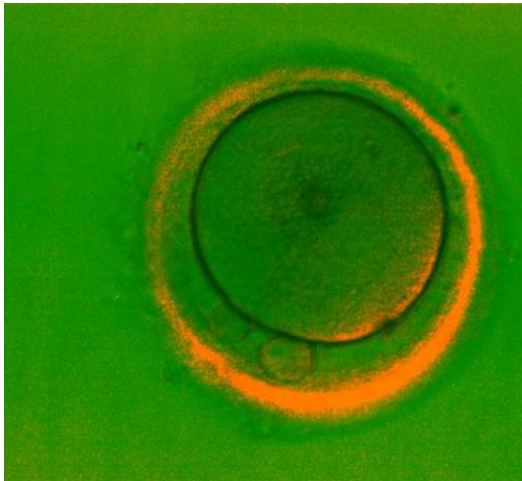
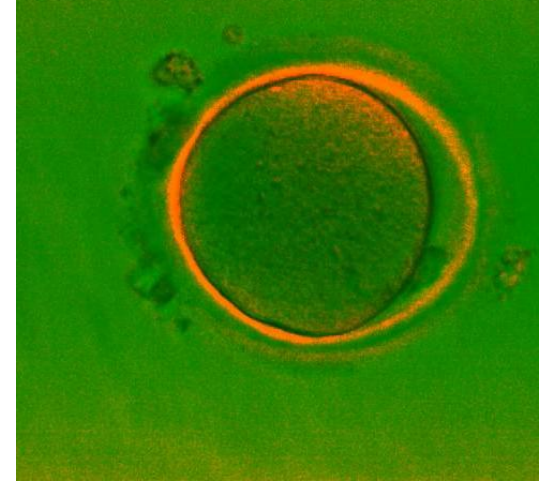
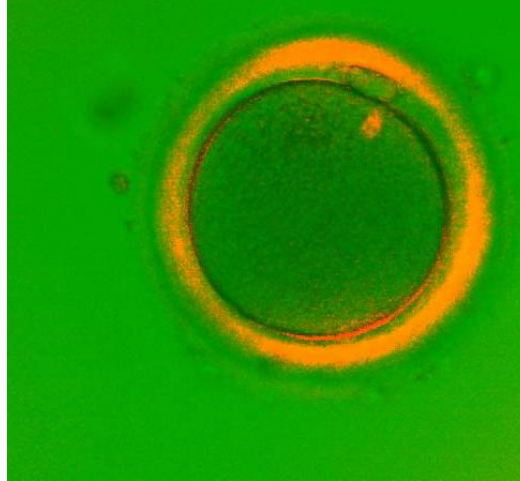
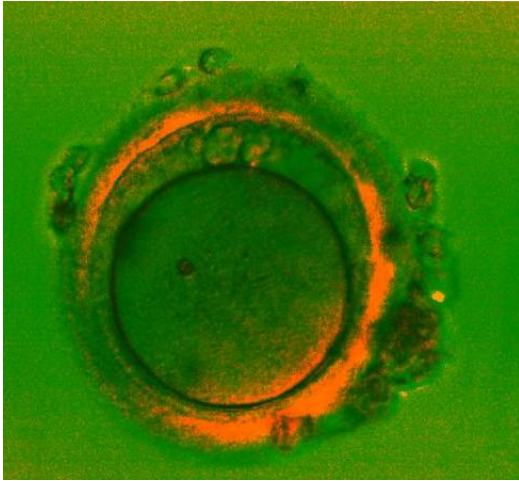
# Eizellen-TÜV steigert Chance auf Kinder

- 07.02.2008

**Hoffnung für kinderlose Paare: Deutsche Forscher haben einen Eizellen-Test entwickelt, der die Erfolgsquote künstlicher Befruchtungen deutlich steigert. Das Verfahren klingt verblüffend einfach: ... mehr...**



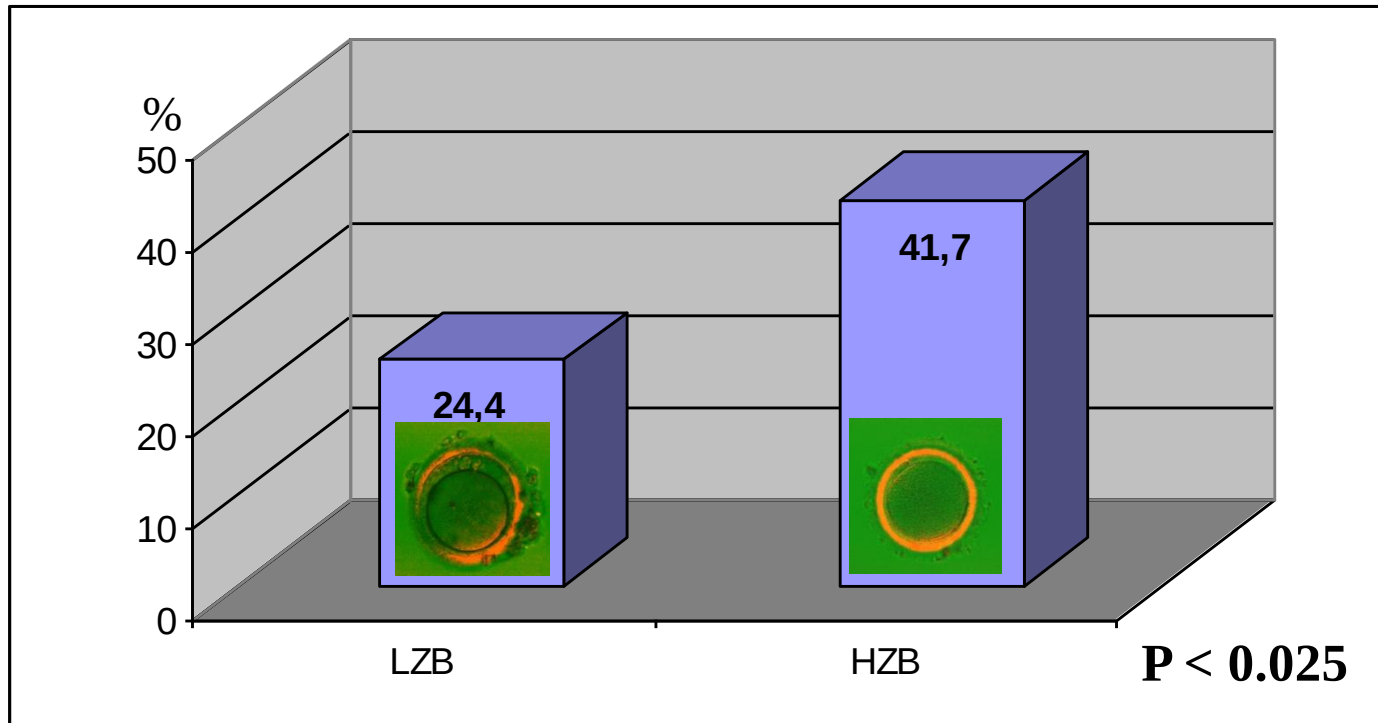
# Subjektive Routine-Auswertung in $< 2$ min



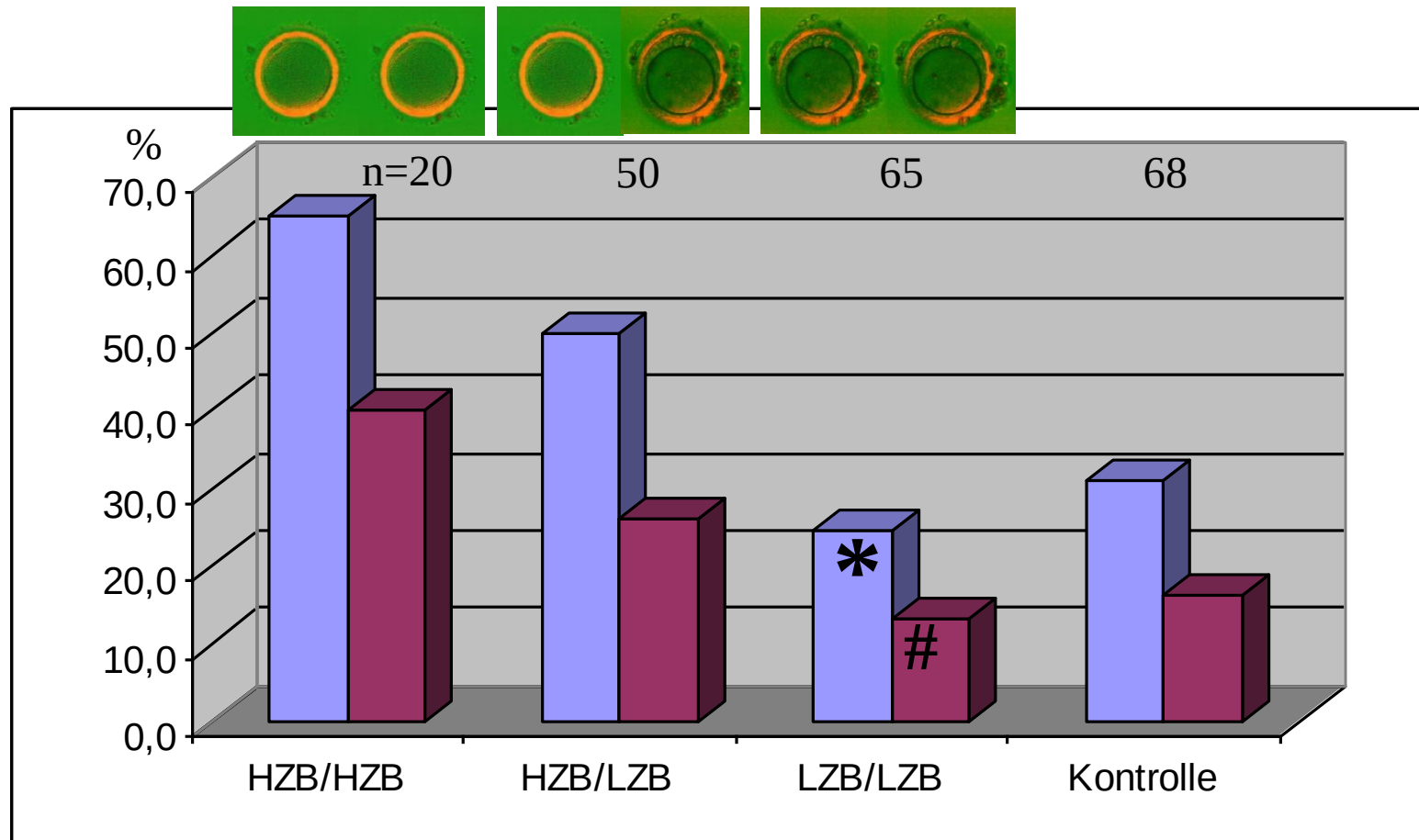


Oocyte zona birefringence intensity is associated  
with embryonic implantation potential in ICSI cycles  
Montag et al 2008

## Anteil $\geq$ 8-Zellembryo Grad A am Tag 3



# Ergebnisse – SS/Implantationsrate



LZB/LZB versus HZB/LZB bzw. HZB/HZB

\*  $P < 0.005$

#  $P < 0.025$

Schwangerschaftsrate

Implantationsrate

# **Warum ist die Zona pellucida ein mögliches Kriterium für Eizell-Qualität?**

- Die Zona pellucida wird von der Eizelle im Follikel gebildet
- Eine optimale Follikelreifung gewährleistet am ehesten die Bildung einer optimalen Zona
- d.h. eine gute Zona ist ein indirektes Kriterium für eine Eizelle mit guter Follikelreifung

**Wieviele „gute“ (HZB) Eizellen  
haben die Patientinnen  
???**

**Mittelwert der MII-Eizellen: 7.6**

**Mittelwert „guter“ Eizellen: 1.5**

# Schlussfolgerung I

- Die Zonaqualität ist ein Ausdruck der zytoplasmatischen Reife und nicht der Kernreife!
- Die Zona Lichtbrechung ist nicht vom mütterlichen Alter abhängig
- Eine gute Zona Qualität ist ein indirekter Marker für eine optimale Ernährung und Reifung der entsprechenden Eizelle während der Follikelphase

# Schlussfolgerung II

- Die Beurteilung der Zona Qualität ermöglicht es, Eizellen zu identifizieren, die sich zu Embryonen mit hohem Implantationspotenzial entwickeln können
- Der selektive Transfer von Embryonen, die sich aus solchen Eizellen entwickeln, führt zu hohen Implantations- und Schwangerschaftsraten



# Kann Zona Imaging die Schwangerschaftsraten verbessern?

*Vielleicht !!*

Einschränkung:  
Pilotstudie mit kleinen Fallzahlen

Prognose:  
Wird sich parallel zum Vorkern-Scoring etablieren,  
typisch „deutsche“ Anwendung

# IMSI

I  
M  
S  
I  
ntrazytoplasmatische  
Morphologisch selektierte  
Spermium  
Injektion

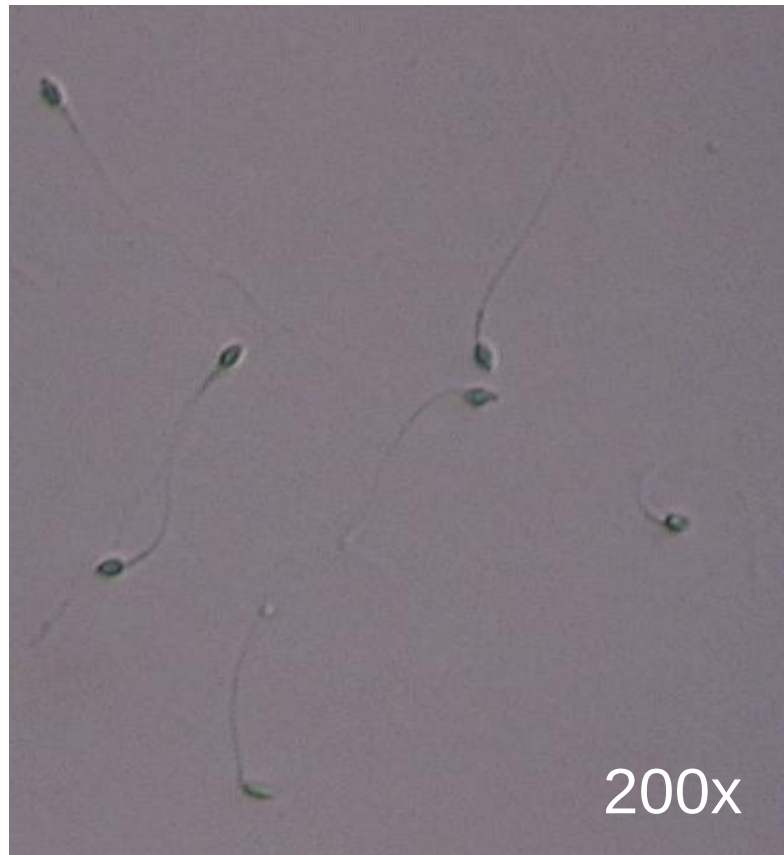
## ICSI

- Vergrößerung 200x bis 400x
- Nur grobe Beurteilung möglich
- schnell

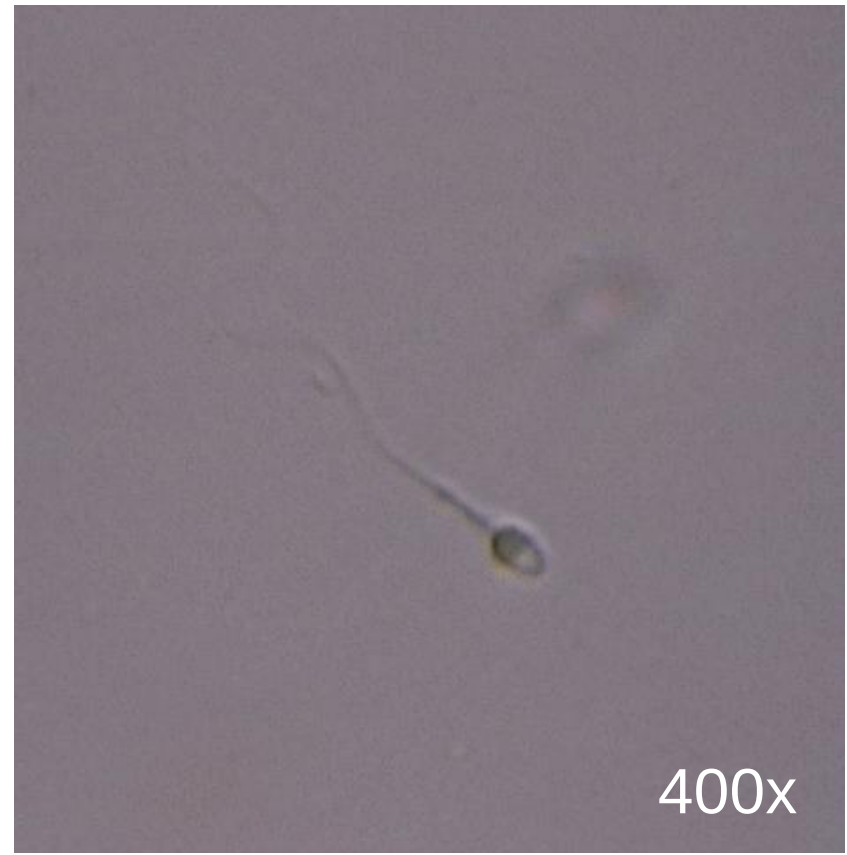
## IMSI

- Vergrößerung 600x bis zu 7200x (digital)
- Morphologische Details sichtbar – **MSOME** (motile sperm organellar morphology examination)
- Zeitbedarf 30-120 min
- Zusätzliche Optik und Software benötigt
- Glasboden-Schale

ICSI



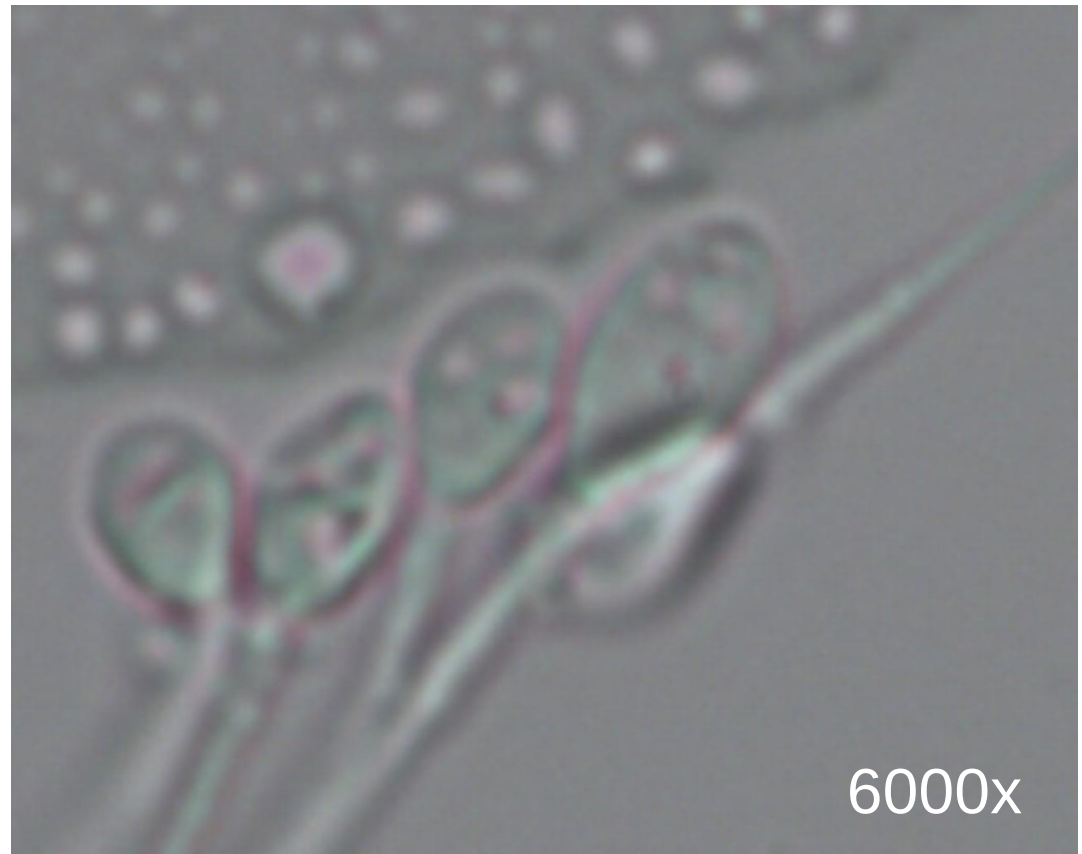
ICSI



# ICSI



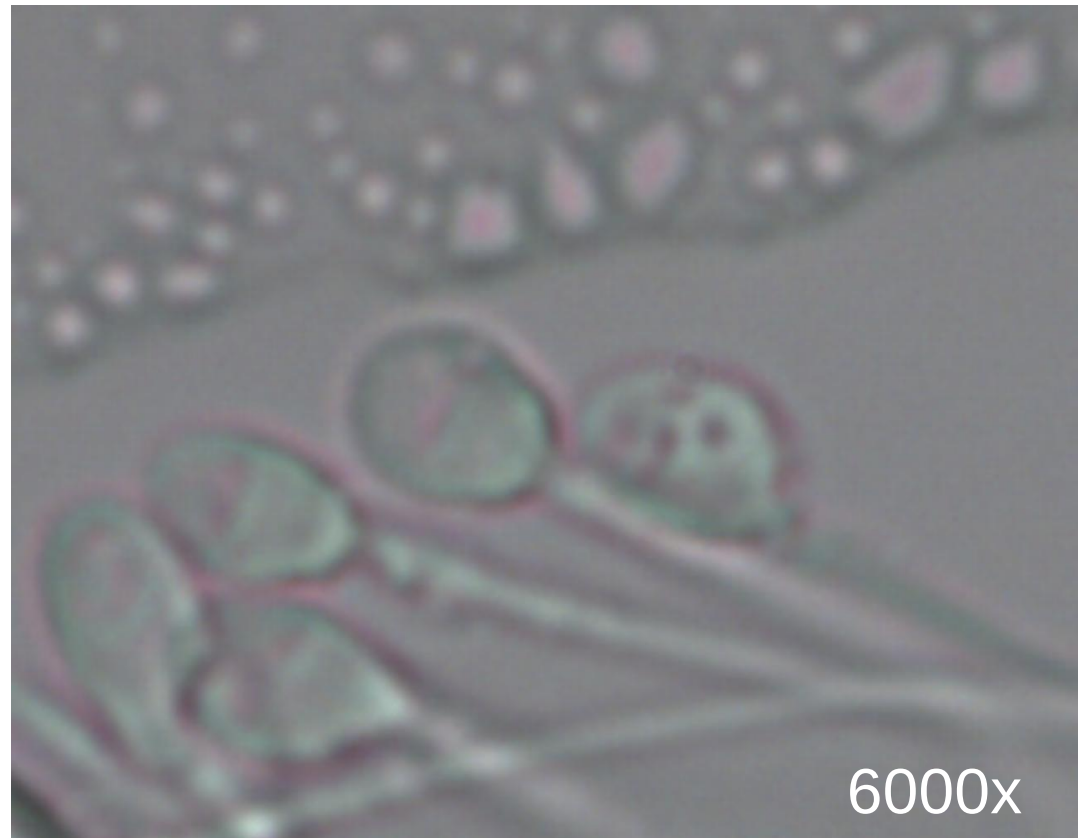
# IMSI



# ICSI



# IMSI



# Sind Spermien denn wichtig?

- Paternales Genom!!
- Und sonst?
- Centriolen
- Ca. 3000 versch. mRNA (Ainsworth, Nature 2005)
  - teilweise wichtig für die frühe Embryonalentwicklung
  - teilweise nicht in der Oozyte vorhanden



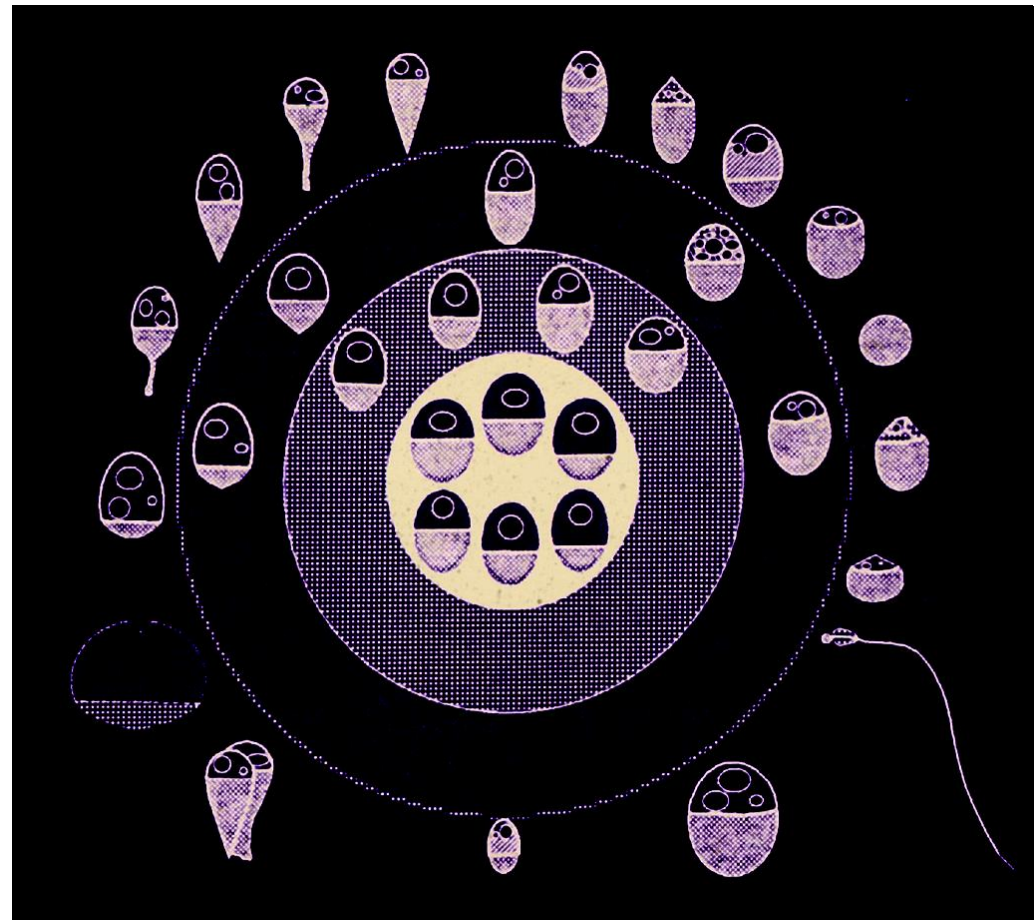
# Und die Morphologie?

Grenzwert für  
Normozoospermie –

WHO Handbuch:  
30% Normalformen

Düsseldorfer „strikte  
Kriterien“

5% Normalformen

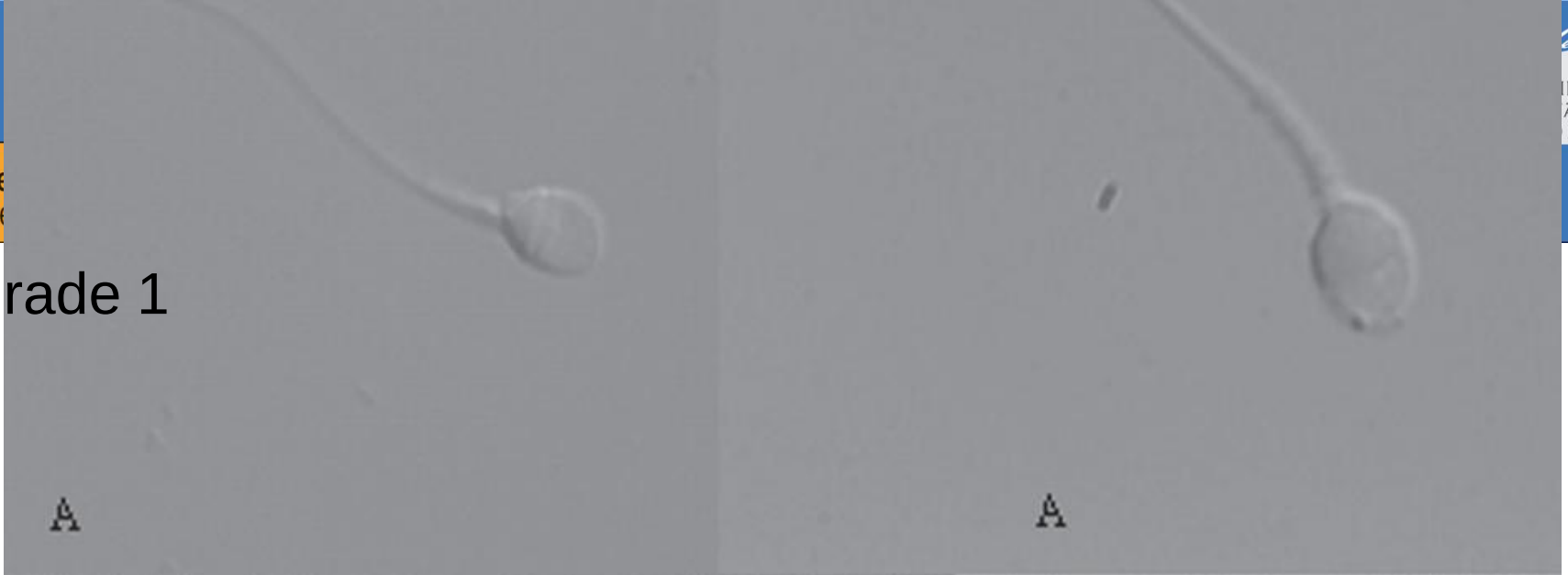


# Indikationen für IMSI

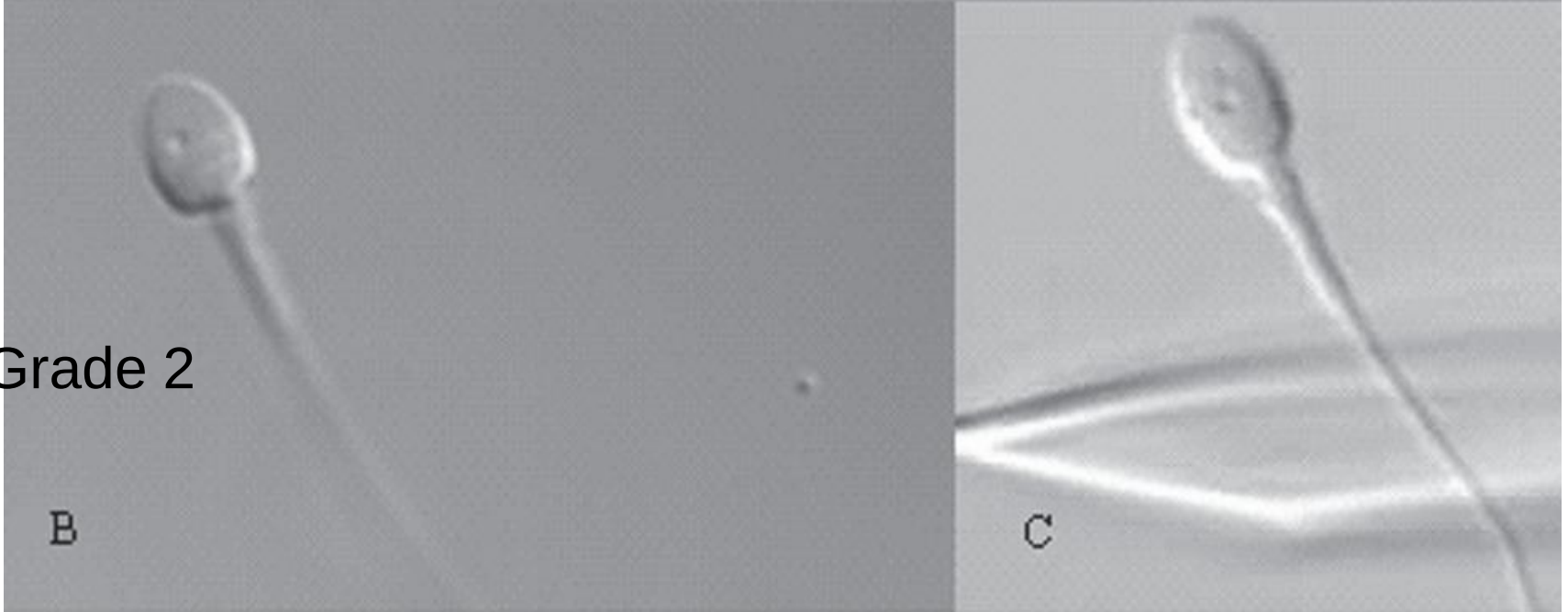
- Fehlende oder schlechte Befruchtung in vorangegangenen ICSI Versuchen
- Implantationsversager (idiopathisch)
- Teratozoospermie (??)
- Hoher Grad an DNA Fragmentation der Spermien

Blastocyst development after sperm selection  
at high magnification is associated with  
size and number of nuclear vacuoles  
Vanderzwalmen et al (2008) RBM online 17, 617

## Grade 1



## Grade 2



aus: Vanderzwalmen et al (2008) RBM online 17, 617

Grade 3

D

D

Grade 4

E

E

F

aus: Vanderzwalmen et al (2008) RBM online 17, 617

## Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles

Vanderzwalmen et al (2008) RBM online 17, 617

- 67 Patientinnen
- 442 IMSI selektierte Spermien

|         | Spermien (n) |
|---------|--------------|
| Grade 1 | 31           |
| Grade 2 | 264          |
| Grade 3 | 90           |
| Grade 4 | 57           |

Blastocyst development after sperm selection  
at high magnification is associated with  
size and number of nuclear vacuoles  
Vanderzwalmen et al (2008) RBM online 17, 617

## Schlussfolgerung:

Vakuolen im Spermienkopf haben einen  
negativen Effekt auf

- Die Blastozystenentwicklung
- Die Schwangerschaftsrate
- Abortrate



# Warum sind Vakuolen nachteilig?

*Garolla et al 2008:*

Negative Korrelation mit

- Mitochondrialer Funktion
- Chromatin Status
- Aneuploidie Rate

*Franco et al 2008:*

Korrelation mit DNA Schäden

- Denaturierung
- Strangbrüche

# Kann IMSI die Schwangerschaftsraten verbessern?

????

Bisher zu kleine Fallzahlen

Noch keine prospektiv-randomisierten Studien

Für welche Indikation?



**Vielen Dank!**