

Schwangerschaften mit Blastozysten von irregulär fertilisierten Oozyten mit OPN, 1PN oder 3PN

HINTERGRUND

Nach IVF und ICSI werden diejenigen Zygoten, die erfolgreich den zweiten Polkörper (PK) ausschleusen und zwei gleichmäßig große Vorkerne (2PN) aufweisen, als "normal befruchtete" Eizellen bezeichnet. Diese regulären PN-Stadien werden weiterkultiviert und ein diploider Embryo entsteht.

Etwa 10% aller befruchteten Eizellen fertilisieren irregulär (abnormally fertilized oocytes „AFO“, Capalbo et al. 2017) und weisen nur einen (1PN), drei (z.B. 3 gleich große, oder 2 gleich große und ein Mikronukleus; 3PN) oder mehr als drei Vorkerne auf. Zwar sind diese irregulären Vorkernstadien durchaus zu einer normalen in-vitro-Entwicklung fähig, werden aber normalerweise verworfen, weil sie ein höheres Risiko für Haploidie, Triploidie oder sogar Tetraploidie aufweisen. Vorkernstadien mit nur einem PN können entstehen, wenn z.B. die Eizelle parthenogenetisch aktiviert wird oder die zwei Genome in einer Kernhülle eingeschlossen werden, oder die Ausbildung der Kernhülle eines der beiden parentalen Genome fehlschlägt. Bei Embryonen, die aus befruchteten Eizellen mit $\geq 3PN$ entstehen, wird davon ausgegangen, dass sie eine polyploide chromosomale Konstitution aufweisen, und der Transfer bei Verwendung dieser Embryonen das Risiko für Fehlgeburten erhöht.

Es kommt auch vor, dass zum Zeitpunkt des PN-Checks, trotz Vorhandenseins von zwei PK, die beiden Vorkerne nicht sichtbar sind; dies führt üblicherweise dazu, dass solche OPN/2PK Stadien zum Zeitpunkt des PN Checks von der Weiterkultur ausgeschlossen werden, obwohl sie möglicherweise einen diploiden Chromosomensatz aufweisen.

Schon vor über 20 Jahren zeigten Gras und Trounson, dass eine unauffällige Schwangerschaft und die Geburt eines Kindes nach Transfer eines 1PN Embryos möglich ist (Gras and Trounson, 1999). Es wurden auch Geburten aus OPN Embryonen dokumentiert, vor allem in Zyklen, in denen nur OPN Stadien zur Verfügung standen (z.B. Yin et al., 2016). Nun mehren sich in den letzten Jahren Publikationen über die Geburt gesunder Kinder aus solchen, nicht regulär befruchteten Blastozysten (z.B. Itoi et al. 2015). Neue genetische Untersuchungsmethoden ermöglichen es zudem, die chromosomale Konstitution eines Embryos genauer zu bestimmen (Capalbo et al. 2017) und führen so dazu, dass diploide Blastozysten aus AFO oder OPN Stadien identifiziert werden können und auch für den Transfer, vor allem bei Nichtvorhandensein von euploiden 2PN Embryonen, verwendet werden.

Auch wenn die internationale Diskussion um den Transfer solcher Embryonen eine Aneuploidietestung (PGT-A) miteinschließt und dieses Vorgehen nicht auf die deutsche Situation übertragbar ist, soll dieses wichtige Thema doch Inhalt dieses DGGEF Newsletters sein.

Auf dem diesjährigen Treffen der ESHRE wurde diskutiert, ob man Eizellen ohne Vorkern (OPN/2PK), einem Vorkern (1PN/2PK) oder drei Vorkernen (3PN/2PK), wenn sie das Blastozystenstadium erreichen, auch transferieren sollte. Antonio Capalbo, der auch Erstauteur des oben genannten, publizierten Papers in Fertility and Sterility (2017) war, berichtete, dass sich in ihrer Studie nur sehr wenige vitale (!) Blastozysten aus 1PN Stadien (6,5%) entwickelten, die meisten arretierten schon im 1-2 Zellstadium. Die 3PN Gruppe, die ausschließlich aus 2 normal großen plus einem Mikronukleus (als 2.1PN bezeichnet) bestand, erreichte dagegen zu 51,9% das Blastozystenstadium (zum Vergleich, die reguläre 2PN Gruppe führte zu 44,8% Blastozysten). Von den wenigen 1PN Blastozysten waren immerhin 69% (9/13) diploid und nur 23% (3/13) haploid; dagegen waren sogar mehr als 85% (12/14) der Blastozysten aus 2.1PN Stadien diploid. Er berichtete aber nur von 3 Lebendgeburten aus AFO-Blastozysten, zwei aus 2.1 diploiden Embryonen und eine aus einem 1PN diploiden Embryo.

Zusätzlich zur Nutzung der Embryonen aus AFO Stadien wurde ebenfalls diskutiert, wie sinnvoll es ist, OPN/2PK Stadien weiter zu kultivieren. Auch hier gibt es schon alte FISH-Studien, die zeigen, dass Embryonen, die sich aus OPN/2PK Stadien entwickeln, zu ca. 60% euploid sind (Lim et al. 2000). Die Entwicklungsrate ist derjenigen von 1PN Stadien ähnlich (16% zu 11%,) und etwa die Hälfte der Embryonen war nach Genanalyse euploid (Destouni et al. 2018).

KOMMENTAR

Kritisch bewerten muss man in der Capalbo-Studie den ausschließlichen Einschluss der sogenannten 2.1PN Stadien und nicht weiterer unterschiedlicher 3PN Entitäten; deren Einschluss würde sicherlich die hier dargestellte Euploidierate beeinflussen. Während 3PN Stadien z.B. durch den fehlenden Ausschluss des 2. Polkörper (3PN/1PK) oder durch Fertilisation mit einem diploiden Gameten (und somit in beiden Fällen sicher triploid sind) entstehen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei 2.1PN Stadien um einen diploiden Chromosomensatz handelt, sehr viel größer. Mikronuklei können sogenannte „lagging chromosomes“ enthalten. Diese Chromosomen sind langsamer und konnten eventuell nicht regulär in ihren Vorkern integriert werden (Mogessie und Schuh 2017), daher überrascht die hohe Euploidierate im Fall der 2.1PN also nicht. Der generelle Ausschluss von anderen, „echten“ 3PN Stadien zeigt sehr deutlich, dass diese auf jeden Fall von der Weiterkultur ausgeschlossen werden sollten. Wichtig ist, dass in der Capalbo-Studie nur bei einem kleinen Teil der Eizellen ein Time lapse Verfahren verwendet wurde. Zwar wurden 1PN Stadien durchaus 4 Stunden nach regulärem PN-Check reevaluiert, aber nur 2 von 151 1PN Stadien zeigten nach der zweiten Sichtung einen zweiten Vorkern.

Die Anwendung von Time-lapse Verfahren ist bei der genauen Identifizierung solcher irregulären Stadien sehr hilfreich. So haben Coticchio und Kollegen mittels Time-lapse Verfahren den Verlauf der Fertilisation an 500 Eizellen exakt beschrieben. Es zeigte sich, dass männlicher und weiblicher Vorkern praktisch zeitgleich ausgebildet werden. Die Auflösung der beiden Vorkerne erfolgt ebenfalls sehr konsistent, nur der genaue Zeitpunkt hängt wesentlich von der ursprünglichen Position des männlichen Vorkerns in der neu entstehenden, befruchteten Eizelle ab. Alle Abweichungen in der gut getimten Fertilisationskaskade sind daher mit Vorsicht zu sehen.

Bei der Verwendung von 0PN/2PK Stadien kann das Time-lapse Verfahren genauer evaluieren, wann der zweite Polkörper ausgeschleust wird, oder ob er nur fragmentiert und somit fälschlicherweise als zweiter Polkörper beschrieben wird; ebenso kann das Verfahren sichtbar machen, ob die Vorkerne nie, oder nur kurz, oder erst später sichtbar sind. Und auch das Erscheinen des sogenannten Halos bei befruchteten Eizellen könnte hier hilfreich sein. Jedoch sollte die Auswahl dieser 0PN Stadien ohne Time-lapse Analyseverfahren sicherlich eher zurückhaltend gesehen werden.

Positiv ist sicherlich, dass vermehrte Fehlbildungen nach Transfer von Blastozysten aus AFO bis dato nicht berichtet wurden (z.B. Hirata et al. 2020).

Zusammenfassend stellen sich die internationalen Empfehlungen wie folgt dar, auch wenn sie auf die deutsche Situation nicht eins zu eins übertragbar sind:

- Nach internationaler Auffassung sollen Blastozysten von 2PN-Eizellen vorzugsweise für den Embryotransfer genutzt werden.
- Sollten AFO berücksichtigt werden, ist eine PGT-A essentiell, um die Euploidie zu bestätigen (dies ist in Deutschland jedoch so nicht umsetzbar).
- Embryonen aus befruchteten Eizellen mit drei oder mehr ähnlich großen PN ($\geq 3PN$) sollen nicht transferiert werden.
- Blastozystenkulturen und Embryotransfer von 1PN und 0PN Stadien sind möglich. Eine genetische Beratung zuvor ist wesentlich.

Somit zeigt sich, dass nicht nur die genetische Beurteilung des Embryos durch PGT-A zunehmend kritisch in seiner Aussagekraft gesehen wird, sondern auch die morphologische Vorkerndiagnostik nicht mehr unbedingt als eindeutiger Vorhersageparameter eingestuft werden kann.

REFERENZEN

Capalbo A, Traff N, Cimadomo D et al.

Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles.

Fertil Steril (2017) 108:1007-1015

Coticchio G, Mignini Renzini M, Novara PV et al.

Focused time-lapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability.

Hum Reprod (2018) 33:23-31

Gras L und Trounson A.

Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization.

Hum Reprod (2019) 14:1869-1871

Hirata K, Goto S, Izumi Y et al.

Chromosome analysis of blastocysts derived from single pronuclear zygotes by array CGH and clinical outcomes by the transfer of single pronuclear zygotes.

J assist Reprod Genet (2020) 37:1645-1652

Itoi F, Asano Y, Shimizu M, Honma H, Murata Y.

Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes.

J assist Reprod Genet (2015) 32:1401-1407

Lim AS, Goh VH, Su CL, Yu SL.

Microscopic assessment of pronuclear embryos is not definitive.

Hum Genet 2000;107:62–68.

Mogessie B, Schuh M.

Actin protects mammalian eggs against chromosome segregation errors.

Science. 2017 Aug 25;357(6353):eaal1647.

Yin BL, Hao HY, Zhang YN, Wei D, Zhang CL.

Good quality blastocyst from non-/mono-pronuclear zygote may be used for transfer during IVF.

Syst Biol Reprod Med 2016;62:139–145.

AUTOREN | KONTAKT

Prof. Dr. med. Thomas Strowitzki

Abt. für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen, Frauenklinik, Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 440, 69121 Heidelberg | E-Mail: thomas_strowitzki@med.uni-heidelberg.de

Privat-Dozentin Dr. rer. nat. Verena Nordhoff

Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude D11, 48149 Münster | E-Mail: verena.nordhoff@ukmuenster.de