



Der Mittelwert der Licht-Retardance durch die Spindel menschlicher Eizellen korreliert positiv mit dem Pronuclear Score nach ICSI



EP 09

Shen Y^{1,2}, StafT¹, Mehnert C¹, Timmeberg H-R¹ and Eichenlaub-Ritter U²

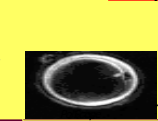
¹Centre für In-Vitro-Fertilisation (CIV) in der Justus-Liebig-Universität Giessen, 35392 Giessen, ²Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, Gentechnologie/Mikrobiologie, 33501 Bielefeld

Einleitung:

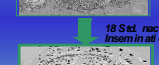
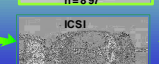
Der Spindel-Apparat ist für die geregelte Verteilung der Chromosomen während der Oogenese verantwortlich. Störungen in Spindelaufbau und -funktion können zu Fehlern in der Chromosomenverteilung und zu Aneuploidie führen. Dementsprechend scheinen Oozyten, die eine doppelbrechende Spindel besitzen, ein besseres Entwicklungspotenzial im Vergleich zu solchen ohne Spindel zu besitzen^[1]. Die Doppelbrechung (Retardance) des Lichtes im Polarisationsmikroskop korreliert linear mit der Anzahl und Anordnung von Mikrotubuli^[2]. Deshalb könnte eine hohe Retardance und die relative Länge der Spindel prädiktiven Wert für die chromosomale Konstitution und Qualität und Entwicklungsfähigkeit einer Eizelle haben. Eine relativ niedrige Doppelbrechung könnte dagegen auf Grund weniger, ungeordneter Spindelfasern eher das Risiko für Fehlverteilung von Chromosomen in Eizellen erhöhen und zu verminderter Entwicklungskapazität des Embryos beitragen. Zur Prüfung dieser These wurden Spindeln in lebenden menschlichen Eizellen nicht-invasiv und quantitativ mittels PolScope Mikroskopie in der aktuellen Studie im IVF-Zentrum der Universität Giessen analysiert, bevor sie durch intrazytoplasmische Spermieinjektion (ICSI) befruchtet wurden. Die Befruchtung und die Qualität der Pre-Embryonen (PN-Score) wurden retrospektiv mit dem Vorhandensein, der Lage und der Länge der Spindel und der durchschnittlichen Doppelbrechung des Spindelapparats verglichen.

Material & Methoden:

Analytierte Parameter:
✓ Anwesenheit und Lokalisation der Spindel;
✓ Entwicklung der Pre-Embryonen aus Eizellen mit und ohne Spindel;
✓ Pol-zu-Pol-Länge der Spindel;
✓ Die Mittelwerte der Retardance von Spindeln entlang eines Linescans von Pol-zu-Pol.



Punktion der Eizellen



Analyse der biochemischen Schwangerschaftsrate

897 Oozyten wurden in 103 ICSI Zyklen mit informierter Zustimmung der Patienten (n=104) und Zustimmung der Ethikkommission ausgewertet. Stimulation und Handhabung der Eizellen sowie Analyse mittels PolScope waren wie bereits früher beschrieben [4,8].

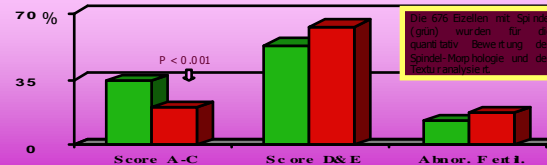
I. Qualitative Analyse der Entwicklung von Eizellen mit und ohne doppelbrechende Spindel

Fertilisationsrate der Eizellen mit und ohne Spindel



Expression einer doppelbrechenden MII Spindel in lebenden Eizellen korreliert mit einer hohen Fertilisationsrate (91,5% in den Eizellen mit Spindel vs. 73,4% in den Eizellen ohne Spindel, $P < 0,0001$)

Entwicklung der Eizellen mit und ohne Spindel: PN-Score der Pre-Embryone n



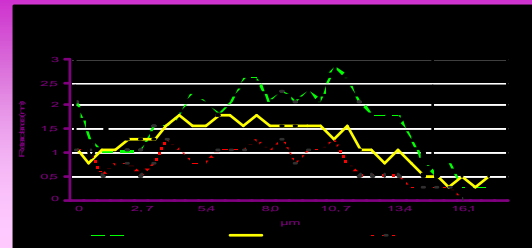
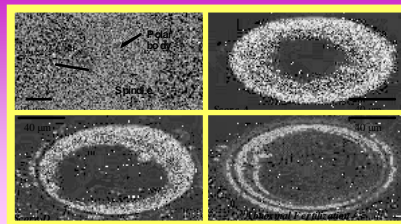
Oozyten, die eine doppelbrechende Spindel besitzen (grün, n = 676), entwickeln sich signifikant häufiger zu Pre-Embryonen mit gutem PN-Score als solche ohne Spindel (rot, n = 116) ($P < 0,001$).

Entwicklung der Eizellen mit Spindel: Lokalisation der Spindel



Oozyten, die eine Spindel in der Nähe zum 1.PB besitzen (grün), entwickeln sich signifikant häufiger zu Pre-Embryonen mit 2PN als solche mit Spindeln $> 40^\circ$ entfernt vom 1.PB (rot) ($* P < 0,01$).

II. Quantitative Analyse der doppelbrechenden Spindel in lebenden Eizellen (n = 676) und PN-Score der Pre-Embryonen



Der durchschnittliche Wert der Doppelbrechung der Spindel korreliert positiv mit dem Pronuclear Score der Pre-Embryonen.

Oozyten mit kurzer Spindel entwickeln sich häufig zu Embryonen mit niedrigem PN-Score.

Gruppe	n	Mittelwert des Maternalen Alters / Eizelle (Jahr)	Mittelwert der Retardance (µm)	Mittelwert der Pole-zu-Pole Länge der Spindel (µm)
Gruppe 1: Score A,B	180	31,9 ± 4,2	1,72 ± 0,43	12,7 ± 1,8
Gruppe 2: Score C	51	32,0 ± 3,8	1,53 ± 0,40 ^a	12,5 ± 1,6
Gruppe 3: Score D	324	32,2 ± 4,0	1,52 ± 0,44 ^a	12,6 ± 1,7
Gruppe 4: Score E und Abnormales	121	31,2 ± 4,3	1,39 ± 0,46 ^b	11,7 ± 1,7 ^{c,d}
Transferierte Eizellen	254		1,66 ± 0,43	
Nicht transferierte Eizellen	422		1,49 ± 0,44	

^a P < 0,05; ^b P < 0,001; ^c P < 0,001; ^d P < 0,005.

Schlussfolgerung:

Die Daten von 676 quantitativ ausgewerteten Eizellen aus 103 ICSI Zyklen im IVF-Zentrum in Giessen zeigen, dass sich Eizellen, die eine hohe durchschnittliche Doppelbrechung der Spindel besitzen, signifikant häufiger zu Pre-Embryonen mit einem guten PN-Score entwickeln, als Eizellen ohne Spindel oder solche mit Spindeln von niedriger Doppelbrechung. Diese Beobachtung konnte durch eine prospektive Studie mit einer kleinen Kohorte von Eizellen in einem IVF-Zentrum in Milano bestätigt werden^[3]. Niedrige PN-Scores wurden in mehreren Studien mit dem gehäuftem Auftreten von Aneuploidie korreliert^[5-7]. Da weitere Studien darauf hinweisen, dass besonders Transfers von Embryonen, die von Oozyten mit hoher Spindel-doppelbrechung nach ICSI resultieren, hohe Wahrscheinlichkeit von Implantation haben^[8], scheint die Analyse der durchschnittlichen Retardance der Spindel in Oozyten von ähnlichem prädiktivem Wert für die Beurteilung und Selektion von Oozyten in ART vor ICSI wie das PN-Scoring der Pre-Embryonen nach ICSI. Vor allem, wenn die Beurteilung des PN-Scores für die Embryoselektion wegen ethischer Bedenken und gesetzlicher Vorschriften nicht verwendet werden kann, sollte die quantitative Analyse der Doppelbrechung der Spindel neue Möglichkeiten eröffnen, Eizellen mit einem hohen Entwicklungspotential zu identifizieren und in Verbindung mit anderen morphologischen und quantitativen, nicht-invasiven Analysen (z.B. der Untersuchung der doppelbrechenden Eigenschaft der Zona Pellucida) zu einer Optimierung der Selektion von Oozyten aus einer Kohorte, aber auch der Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für erfolgreiche ART innerhalb eines Zyklus und optimierter individueller Beratung und Behandlung von Patienten beitragen.

Referenzen:
1. Wang WH et al. (2001) Hum. Reprod. 16, 1464-1468.
2. Oldenbourg R (1996) Nature 381, 81-812.
3. Scott LA, Smith S. (1998) Hum. Reprod. 13, 1003-1012.
4. Shen Y et al. (2006) RBM Online 12(6), 737-751.
5. Balaban B et al. (2004) RBM Online 8, 695-700.
6. Eitner-Grethe WR et al. (2005) Reprod. Fert. 17, 529-534.
7. Gamard L et al. (2003) Fertil. Steril. 80, 341-349.
8. Shen Y et al. (2005) Hum. Reprod. 20, 1596-1606.