

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

ZECH H, STECHER A, VANDERZWALMEN P, ZECH N
*Neue Techniken in der Reproduktionsmedizin: Effekt des Transfers
von Metaphase II-Zytoplasma in Germinal-Vesikel-Oozyten*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 1999; 9 (3) (Ausgabe für
Österreich), 12-15*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



NEUE TECHNIKEN IN DER REPRODUKTIONS-MEDIZIN: EFFEKT DES TRANSFERS VON METAPHASE II-ZYTOPLASMA IN GERMINAL-VESIKEL-OOZYTEN

EINLEITUNG

Seit der ersten erfolgreichen Anwendung der *In vitro* Fertilisierung vor 20 Jahren hat sich die Assistierte Reproduktion rapide entwickelt (Tab. 1, Abb. 1). Neben den hier nicht erwähnten klinischen Neuentwicklungen im Rahmen der Follikelstimulation, Follikelpunktion und der Corpus luteum-Substitution soll in diesem Artikel vorwiegend auf die labor-spezifischen Maßnahmen eingegangen werden. Techniken wie die Intrazytoplasmische Spermajektion (ICSI) mit Spermatozoen aus dem Ejakulat, Nebenhoden und Hoden sowie verbesserte Kryokonservierungsverfahren haben sich etabliert.

In der letzten Zeit hat sich vor allem auf dem Gebiet der Zellkultur einiges verändert, so daß vermehrt dazu übergegangen wird, Embryonen länger in Kultur zu halten, um diese allenfalls im Blastozystenstadium am Tag 5 transferieren zu können [1]. Die

Kultivierung unreifer Eizellen und Spermatozoen-Vorstufen befindet sich noch im Anfangsstadium. Mit der Verbesserung dieser Techniken und der ebenfalls möglichen Asservation ovariellen und gonadalen Gewebes für einen späteren Einsatz eröffnen sich in Zukunft neue Perspektiven.

Die Präimplantations-Gen-Diagnostik (PGD) zur Feststellung von Mutationen und Aneuploidien hat

sich bereits in vielen Ländern etabliert; in Österreich, Deutschland und einigen anderen europäischen Ländern ist diese Methode derzeit nicht erlaubt, der medizinisch-wissenschaftliche Druck auf die Gesetzgeber nimmt jedoch zu, so daß hier sicherlich in den nächsten Jahren ein Überdenken eintreten wird.

In der Literatur finden sich vermehrt Hinweise über Manipula-

Tabelle 1: Neues in der Reproduktionsmedizin

- Wachstum von Embryonen während der gesamten Präimplantationsperiode
- Identifikation von entwicklungs-kompetenten Embryonen (genetisch und morphologisch)
- *In vitro* Maturation (PCO)
- Vitrifikation (Embryonen, Eizellen)
- Kryokonservierung von Ovargewebe
- Xenotransplantation
- Zytoplasma-Transfer (Verbesserung der Embryonalentwicklung, Prävention von Aneuploidie)
- Kern-Transfer, mitochondriale DNA-Erkrankung: „Retten“ von Entwicklungsblock; „Produktion“ von mehreren Embryonen
- Generation von haploiden Eizellen aus Kernen somatischer Zellen (→ artifizielle Gameten zur Korrektur von genetischen Erkrankungen der Germinalzellen)
- Produktion von echten, regenerativen Stammzellen von somatischen Zellen durch De-Differenzierungs-Faktoren, welche in reifen Eizellen vorhanden sind

Abbildung 1: Entwicklung der In vitro Fertilisierung

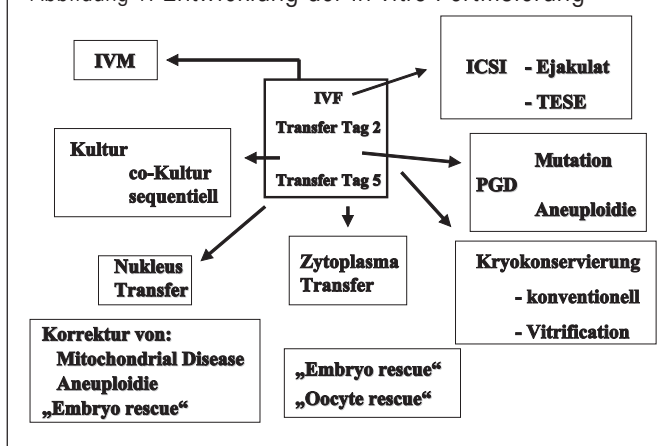
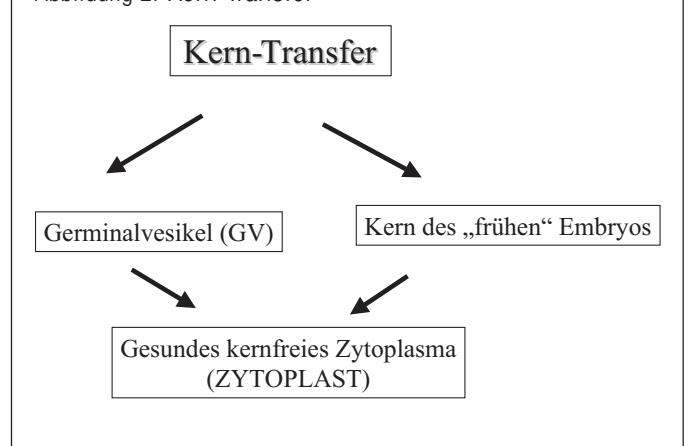


Abbildung 2: Kern-Transfer



tionstechniken wie Transfer von Zellkernen, um einerseits Aneuploidien zu korrigieren, mitochondriale Erkrankungen zu vermeiden und sich langsam entwickelnde Embryonen zu „retten“. Auch ein Transfer des Zytoplasmas ist versucht worden, um das wiederholte Auftreten von Embryonen mit schlechter Qualität zu vermeiden [2]. Sowohl der nukleäre Transfer wie auch Zytoplasma-Transfer zwischen unterschiedlichen Patienten ist nach ethisch-moralischen Grundsätzen genau zu analysieren und wird aus diesen Gründen sicherlich nicht allgemein anerkannt werden [3]. Der Transfer von einer kleinen Menge Zytoplasma von einer reifen Metaphase II-Eizelle einer Patientin auf eine unreife Germinal-Vesikel-Eizelle der gleichen Patientin als eine Methode zur Erhöhung der Anzahl entwicklungscompetenter Eizellen stellt einen Versuch dar, Erfahrungen von der ICSI mit dem Aspirieren einer kleinen Menge von Zytoplasma ohne negativen Einfluß auf die aspirierte Eizelle zum Nutzen der Patientin therapeutisch einzusetzen.

1. KERNTTRANSFER (ABB. 2)

- Germinal-Vesikel (GV)-Transfer in ein gesundes, kernfreies Zytoplasma (Zytoplast)
- Kern des „frühen“ Embryos in ein gesundes, kernfreies Zytoplasma (Zytoplast)

Ad a) Rekonstruieren einer Eizelle nach Germinal-Vesikel-Transfer

Mit zunehmendem Alter der Frau über 38 Jahre nimmt die Schwangerschaftsrate ab, die Abortursrate und die Aneuploidie der Eizellen deutlich zu (Abb. 3).

Die Dysfunktion der ersten oder zweiten meiotischen Teilung führt häufig zur Zunahme der Aneuploidie. Diese Zunahme ist vielfach nicht nur auf die Chromosomen zurückzuführen, sondern auf eine pathologische „Maschinerie“. Zytoplasma-Faktoren injizieren und organisieren die Konstruktion der meiotischen Spindel aus den Mikrotubuli. Welche Nukleus-Zytoplasma-Interaktionen sind hier im Spiel? Verschiedene Publikationen haben einen mögli-

cherweise negativen Einfluß des Zytoplasmas auf diese Maschinerie [4–7] gezeigt, so daß versucht wird, Germinal-Vesikel einer unreifen Eizelle in das kernfreie Zytoplasma einer präovulatorischen Eizelle zu transferieren (Abb. 4).

Die „rekonstruierten“ Eizellen reifen bis zum Metaphase II Stadium. Nach Bestimmung der Chromosomenzahl zeigten die „rekonstruierten“ Metaphase II Eizellen in 80% ein normales zweites meiotisches Metaphase-Komplement. Dies bedeutet, daß der GV-Transfer eine attraktive Alternative zur konventionellen Eizell-Spende darstellen kann.

Ad b) Kern-Transfer [8, 9]

- Zur Korrektur der mitochondrialen DNA-Krankheit (Mitochondrial DNA Disease, MDD) (Abb. 5): Mitochondriale DNA Mutationen werden von der Mutter vererbt. Dies führt häufig zu Letalität, bzw. starker Beeinträchtigung der Nachkommen (Enzephalomyopathien, Leber'sche hereditäre Optikus-Neuropathie, myoklonische Epilepsie).

Abbildung 3: GV-Transfer

GV - TRANSFER (I)

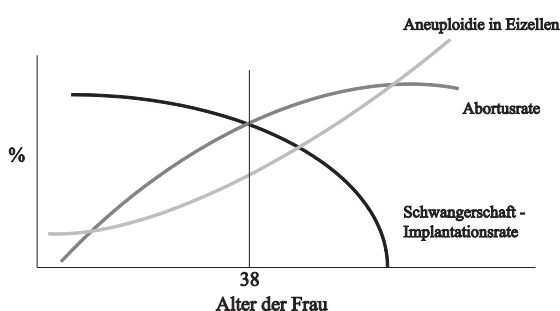
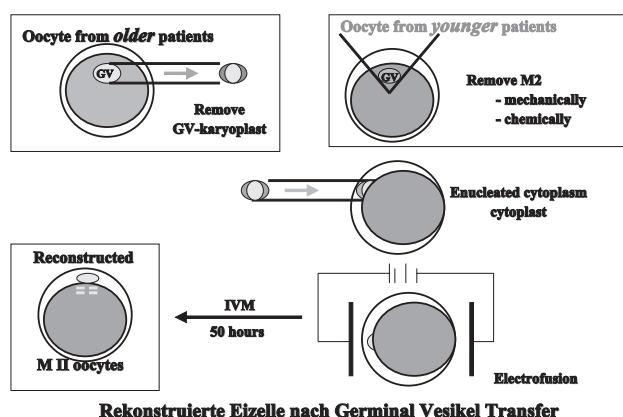


Abbildung 4: GV-Transfer zur Korrektur von Aneuploidie



- 2) Kerntransfer zum „Retten“ eines Embryos mit blockierter oder langsamer Teilung (Abb. 6): Dabei wird der Kern nach Entfernen aus dessen zytoplasmischem Umfeld in einen entwicklungscompetenten Donor Zytoplasten transferiert [10].

2. ZYTOPLASMATRANSFER

Ein defektes Eizellenzytoplasma kann Infertilität verursachen. Die meiotische Ausreifung, Fertilisierung und die ersten drei Teilungszyklen sind nur abhängig von den in der Eizellen gespeicherten Signalen (Tab. 2). In Eizellen kann folgendes beobachtet werden:

- Abnorme Proteinsynthese
- Abnahme der mRNA-Produktion
- Störung im Zytoskelett
- Mitochondrien mit Defekten oder metabolischen Unzulänglichkeiten

Patienten, die in verschiedenen Versuchen immer wieder folgende Embryoqualitäten aufwiesen, profitierten vom Zytoplasma-Transfer:

- Hohe Rate an Fragmentationen

- Langsame Zellteilung
- Multinukleation
- Kontraktiertes Zytoplasma

Cohen et al. [3] berichteten von Erfolgen, wenn Zytoplasma aus entwicklungscompetenten Eizellen einer anderen Patientin transferiert wurde (Abb. 7).

Circa 15% aller Eizellen im Rahmen der *In vitro* Fertilisierung sind immatur. Im allgemeinen werden diese Eizellen im Diploten-Stadium der Prophase I der Meiose (GV-Stadium) nicht zur Befruchtung herangezogen. Trotz des Vorkommens von Kernausreifung *in vitro*, Fertilisation und normaler Zellteilung solcher Embryonen führen diese sehr selten zu intakten Schwangerschaften (Abb. 8).

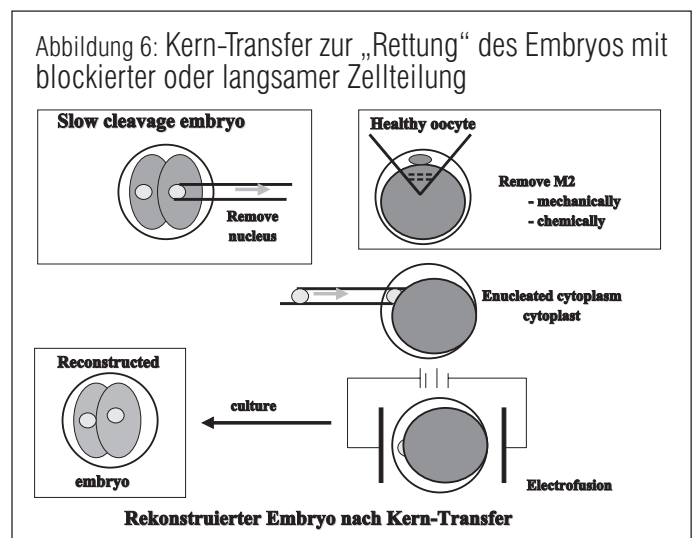
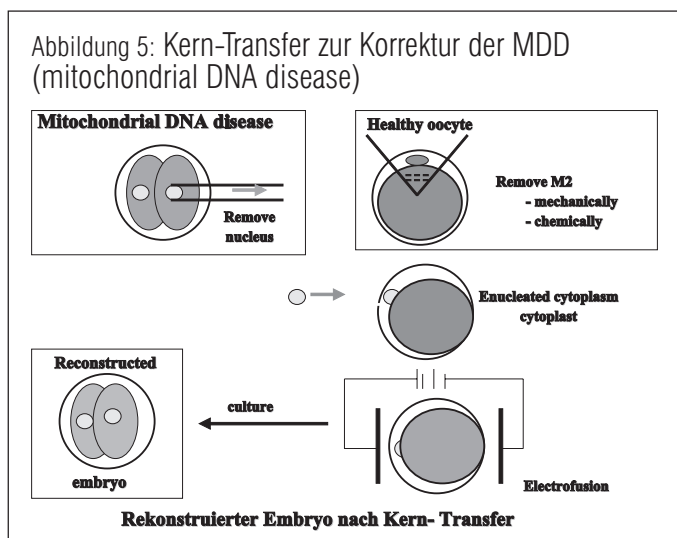
Anstrengungen, solche GV-Oozyten *in vitro* nachreifen zu lassen, haben nicht dazu beigetragen, das Entwicklungspotential zu verbessern. Wenn das Ausstoßen des ersten Polkörperchens die Kernausreifung anzeigt, heißt dies noch lange nicht, daß die Zytoplasma-Ausreifung ebenfalls abgeschlossen ist. Folgende Fragen stellen sich daher:

- Warum sind einige Oozyten auf der Stufe der Prophase I (GV-Stadium) blockiert?
- Wie können wir ihre Ausreifung verbessern?
- Warum ist das Entwicklungspotential von Embryonen, welche von solchen immaturen und nachgereiften Eizellen abstammen, so gering?

Aus diesen Überlegungen heraus wurden verschiedene experimentelle Untersuchungen im Tiermodell vorgenommen, um den Effekt

Tabelle 2: Komponenten in der Eizelle

Meiotische Ausreifung Fertilisierung Erste 3 Teilungszyklen	} nur abhängig von den in der Eizelle gespeicherten Signalen
– 500 pg RNA – 20–25 pg Protein – 150 pg Glykogen – 100.000 Mitochondrien – 1.000.000 Ribosomen – 250 pg Tubulin – 100 pg Aktin – Hohe Level an Enzymen – 800 pmol ATP	



von zytoplasmischen Faktoren auf die nukleäre Ausreifung und auf die Fertilisierungskapazität zu untersuchen [11–15]. Es wird postuliert, daß verschiedenste Zytoplasma-Faktoren, wie Mitochondrien, mRNA, oder der Meiose Promoting Factor (MPF) die Eizell-Ausreifung auf verschiedenen Ebenen steuern. Es konnte gezeigt werden, daß nach Injektion einer kleinen Menge Zytoplasma von Metaphase II Eizellen in GV-Eizellen die Ausreifung der GV-Eizellen wesentlich im Vergleich zur Nicht-Zytoplasma-Injektionskontrolle verbessert war. Das Aspirieren einer kleinen Menge von Zytoplasma aus einer Metaphase II-Donor-Eizelle hat keinen negativen Einfluß auf diese.

Nach Etablieren einer guten Transfertechnik, um Zytoplasma von reifen auf unreife Eizellen innerhalb der gleichen Patientin zu transferieren, kann dies eine gute Alternative zur herkömmlichen IVF / ICSI für die Punktion von unreifen Eizellen bei Patienten mit Hyperstimulation oder sogar in einem nicht stimulierten Zyklus darstellen. Die nächsten Schritte müßten folgende sein:

- Eine Verbesserung der Transfer-



Univ.-Prof. Dr. Herbert Zech

Geboren 1948 in Nenzing, Vorarlberg. 1975 Promotion an der Medizinischen Fakultät der Universität Innsbruck. Von 1975 bis 1978 Turnus, Jus practicandi in Feldkirch. Von 1978 bis 1982 Facharztausbildung in Gynäkologie und Geburtshilfe an den Universitätskliniken Graz und Innsbruck. 1982 bis 1983 Senior Research Fellow am Department of Obstetrics and Gynecology und Hormone Receptor Laboratory der University of Louisville, USA. Von 1982 bis 1985 Oberarzt an der Universitätsfrauenklinik Innsbruck. 1985 Niederlassung als Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe in Bregenz, 1988 Gründung des Institutes für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, ärztlicher Leiter. 1994 Habilitation an der Universität Innsbruck. Seit 1994 wissenschaftliche Zusammenarbeit mit der Schoysman Infertility Management Foundation (SIMAF) in Brüssel. 1999 Ernennung zum a.o. Professor an der Universität Innsbruck.

Korrespondenzadresse:

Univ.-Prof. Dr. med. Herbert Zech
Institut für Reproduktionsmedizin und Embryotransfer
A-6900 Bregenz, Römerstraße 2

technik von Zytoplasma, um die Anzahl der degenerierten Eizellen zu vermindern.

- Vergleich der Entwicklungskapazität von GV-Eizellen nach Aspiration mit und ohne Zytoplasma-Injektion
- Vergleich mit anderen *In Vitro*

Maturations-Techniken (Follikelflüssigkeit, FSH-Zusatz, Co-Kulturen mit Kumulus-Zellen)

Literatur:

1. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. Hum Reprod 1998; 13: 169–77.
2. Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after ►

Abbildung 7: Zytoplasma-Transfer zur Korrektur immer wieder auftretender pathologischer Embryonalentwicklungen

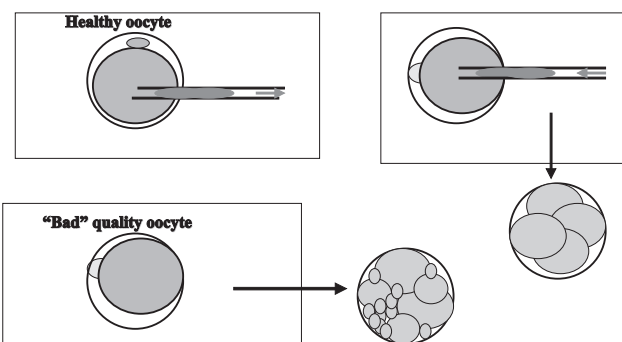
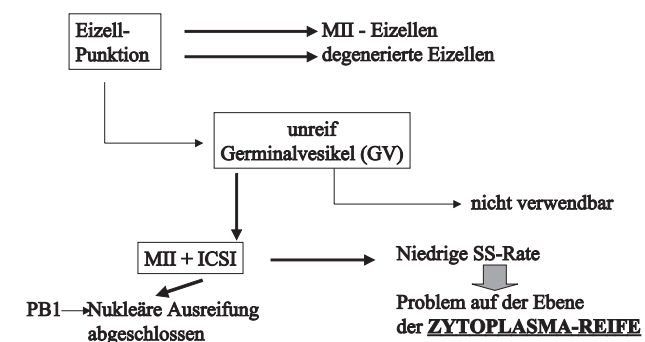


Abbildung 8: Eizell-Qualitäten nach Follikel-Aspiration



transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997; 350.

3. Shenfield F, Sureau C. Ethical Dilemmas in Assisted Reproduction. In: *Studies in Profertility Series*. Parthenon Publ, 1998; Vol. 7.

4. Tarin JJ. Aetiology of age-associated aneuploidy: a mechanism based on the „free radical theory of ageing“. *Mol Hum Reprod* 1995; 10: 1563–5.

5. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996; 11: 2217–22.

6. Plachot M, Crozet N. Fertilization abnormalities in human in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1992; 7: 89–94.

7. Zhang J, Chia-Woei Wang, Krey Lewis, Hui Liu, Meng Li, Blaszyk A, Adler A, Grifo J. In Vitro maturation (IVM) of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle (GV) transfer. *Fertil Steril* 1999; 71: 4.

8. Kono T. Nuclear transfer and reprogramming. *Rev Reprod* 1997; 2: 74–80.

9. Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod* 1998; 13: 2857–68.

10. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10: 415–24.

11. Balakier H. Induction of maturation

in small oocytes from sexually immature mice by fusion with meiotic or mitotic cells. *Exper Cell Res* 1978; 112: 137–41.

12. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 177: 129–46.

13. Balakier H, Czulowska R. Cytoplasmic control of nuclear maturation. *Exper Cell Res* 1977; 110: 466–71.

14. Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson L. Cytoplasmic control of preimplantation development in-vitro in the mouse. *Nature* 1982; 299: 460–1.

15. Flood JT, Chilik CF, Van Uem JFM, Irtani A, Hodgen GD. Ooplasmic transfusion: prophase germinal vesicle oocytes made developmentally competent by microinjection of metaphase II egg cytoplasm. *Fertil Steril* 1990; 53: 6.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

☒ [Bilddatenbank](#)

☒ [Artikeldatenbank](#)

☒ [Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ [Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)