

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

MONTAG M, VAN DER VEN H, VAN DER VEN K
*Erste klinische Erfahrungen mit der Polkörperdiagnostik in
Deutschland*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (4) (Ausgabe
für Schweiz), 4-8*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (4) (Ausgabe
für Österreich), 7-12*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

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

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

Unsere Räucherkegel fertigen wir aus den feinsten **Kräutern** und **Hölzern**, vermischt mit dem wohlriechenden **Harz** der **Schwarzföhre**, ihrem »Pech«. Vieles sammeln wir wild in den Wiesen und Wäldern unseres **Bio-Bauernhofes** am Fuß der Hohen Wand, manches bauen wir eigens an. Für unsere Räucherkegel verwenden wir reine **Holzkohle** aus traditioneller österreichischer Köhlerlei.

»Eure Räucherkegel sind einfach wunderbar.
Bessere Räucherkegel als Eure sind mir nicht bekannt.«
– Wolf-Dieter Storl

synthetische
OHNE
Zusätze

Waldweihrauch

»Feines Räucherwerk
aus dem *Schneeberg*«
L A N D



www.waldweihrauch.at

ERSTE KLINISCHE ERFAHRUNGEN MIT DER POLKÖRPERDIAGNOSTIK IN DEUTSCHLAND

ERSTE KLINISCHE
ERFAHRUNGEN
MIT DER
POLKÖRPER-
DIAGNOSTIK IN
DEUTSCHLAND

Summary

In countries with legal restrictions in regard to embryo biopsy, polar body diagnosis is the only option for the investigation of chromosomal aneuploidy in oocytes. Following a long research period, we have started in mai 2001 to offer polar body diagnosis for aneuploidy screening of chromosomes 13, 16, 18, 21 and 22 to patients with advanced maternal age. Our data show, that experimentally acquired experience helps to reduce the rate of loss of polar bodies. This is further supported by the use of a laser system for opening of the zona pellucida prior to polar body removal. Among our group of patients with a mean

maternal age of $38,7 \pm 3,9$ years, we found a high rate of oocytes with chromosomal aneuploidies (166 / 360, 46.1 %), mainly trisomies. Based on 50 treatment cycles we can conclude, that at least 6–8 oocytes should be available for intracytoplasmic sperm injection and polar body diagnosis in order to enable the transfer of 2 euploid embryos. So far we achieved a clinical pregnancy rate of 30.9 % in the above mentioned patient cohort. The implantation rate was 18.5 % and the first live birth following polar body diagnosis in Germany was recently reported by our group.

körperchen und in der Eizelle gleich sein. Durch das Eindringen eines Spermiums in die Eizelle wird die zweite meiotische Reifeteilung ausgelöst. Bei der zweiten meiotischen Reifeteilung verbleibt von den gepaarten Chromatiden der Chromosomen ein Chromatidensatz in der Eizelle, während der zweite Chromatidensatz in den zweiten Polkörper ausgeschleust wird. Entsprechend der ersten meiotischen Reifeteilung gilt bei der zweiten Reifeteilung, daß die Anzahl der Chromatiden im zweiten Polkörperchen und in der Eizelle gleich sind. Der erste und zweite Polkörper verhalten sich zur Eizelle wie Bild und Spiegelbild. Wenn daher ein Chromosom bzw. eine Chromatide im jeweiligen Polkörperchen fehlt, muß es bei der vorausgegangenen Reifeteilung in der Eizelle verblieben sein, so daß diese folglich für das entsprechende Chromosom nach der Befruchtung durch das Spermium eine Trisomie aufweist. Entsprechend liegt in der befruchteten Eizelle eine Monosomie vor, wenn in den Polkörperchen ein Chromosom bzw. eine Chromatide zuviel angetroffen wird. Diese sogenannten Aneuploidie-Untersuchungen werden insbesondere bei Frauen über 35 Jahren angeboten, da ab diesem Alter das Risiko für eine Chromosomen-Fehlverteilung in der Eizelle nachweislich ansteigt [1].

Die Entnahme des ersten und zweiten Polkörperchens beim Menschen mit anschließender Polkörperdiagnostik zum Nachweis von Chromosomen-Fehlverteilungen wurde bereits 1990 von der Arbeitsgruppe um Yuri Verlinsky propagiert und in Folge realisiert [2, 3]. Es muß allerdings festgehalten werden, daß im internationalen Vergleich nur diese Arbeitsgruppe Aneuploidie-Untersuchungen mittels der Polkörperdiagnostik durchführt, während die allermeisten Gruppen diese Untersuchungen am Embryonen nach Biopsie von 1–2 Blastomeren vornehmen [4–6]. Diese Art der Präimplantationsdiagnostik ist aus rechtlichen Gründen insbe-

ZUSAMMENFASSUNG

In Länder, in denen aufgrund gesetzlicher Bestimmungen eine Präimplantationsdiagnostik am Embryo nicht durchgeführt werden kann, stellt die Polkörperdiagnostik die einzige Möglichkeit zur Untersuchung chromosomaler Fehlverteilungen in Eizellen dar. Nach umfangreichen tierexperimentellen Vorarbeiten und einem Ethikvotum bieten wir seit Mai 2001 Patientinnen mit fortgeschrittenem Alter die Polkörperdiagnostik zur Untersuchung chromosomaler Fehlverteilungen der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 an. Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine im Vorfeld erarbeitete experimentelle Erfahrung die Rate an nicht auffindbaren Polkörpern auf ein Minimum reduziert. Dies wird durch die Anwendung eines Diodenlaser-Systems für die Eröffnung der Zona pellucida zur Entnahme des Polkörpers unterstützt. In unserem Patientenkollektiv mit einem mittleren Alter von $38,7 \pm 3,9$ Jahren fanden wir eine hohe Raten von Eizellen mit Chromosomen-Fehlverteilungen (166 / 360, 46,1 %), wobei insbesondere Trisomien sehr häufig auftraten.

Nach bisher 50 Behandlungszyklen kommen wir zu dem Schluß, daß mindestens 6–8 Eizellen für die intrazytoplasmatische Spermieninjektion mit nachfolgender Polkörperdiagnostik vorhanden sein sollten, um zu gewährleisten, daß für den Transfer 2 euploide Embryonen zur Verfügung stehen. Bisher erzielten wir eine klinische Schwangerschaftsrate von 30,9 % in einem Patientenkollektiv mit einem mittleren mütterlichen Alter von 38,7 Jahren. Die Implantationsrate lag bei 18,5 % und die erste Geburt nach Polkörperdiagnostik in Deutschland wurde kürzlich von uns publiziert.

EINLEITUNG

Bei der Reifung der Eizelle wird zunächst der diploide Chromosomensatz der Eizelle auf einen haploiden Chromosomensatz reduziert (1. Reifeteilung). Ein Chromosomensatz verbleibt in der Eizelle, während der zweite Chromosomensatz unter Bildung des ersten Polkörperchens ausgeschleust wird. Nach der ersten Reifeteilung sollte daher die Anzahl der Chromosomen im ersten Pol-

sondere in Österreich, der Schweiz und in Deutschland nicht möglich. In Deutschland steht die Polkörperdiagnostik hingegen nicht im Widerspruch zu den geltenden rechtlichen Bestimmungen. Es muß allerdings gewährleistet werden, daß die Diagnostik noch vor der Erreichung des Embryonalstadiums, definiert als die Verschmelzung der beiden Vorkerne, abgeschlossen ist (vgl. hierzu [7]). In diesem Zusammenhang wird die Polkörperdiagnostik auch als Präfertilisationsdiagnostik bezeichnet. Es sind diese zeitlich engen Vorgaben des Embryonenschutzgesetzes, die für eine Durchführung der Polkörperdiagnostik ein optimiertes Vorgehen erforderlich machen.

An der Frauenklinik der Universität Bonn beschäftigen wir uns seit 1997 mit der Optimierung der Polkörperdiagnostik. Dies beinhaltet sowohl die Erprobung neuer Verfahren zur Entnahme der Polkörper unter Zuhilfenahme eines Diodenlasers [8], als auch die schnelle Durchführung der eigentlichen Aneuploidie-Diagnostik mittels der Primed-in-situ-Hybridisierungstechnik (PRINS) [9]. Auch wenn letztere in einzelnen Studien zum Einsatz kommt, wurde die breite Anwendung der PRINS-Technik durch die Verfügbarkeit kommerzieller

Multi-color-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Sonden (FISH) in den Hintergrund gedrängt. Nach umfangreichen tierexperimentellen Vorarbeiten und einem Ethikvotum wurden an der Frauenklinik Bonn die ersten klinischen Fälle ab Mai 2001 bearbeitet.

Vor dem Hintergrund der ersten Geburt nach Polkörperdiagnostik in Deutschland [10] teilen wir in diesem Beitrag unsere Erfahrungen nach Behandlung der ersten 50 Patienten mit der Polkörperdiagnostik mit.

PATIENTEN UND METHODEN

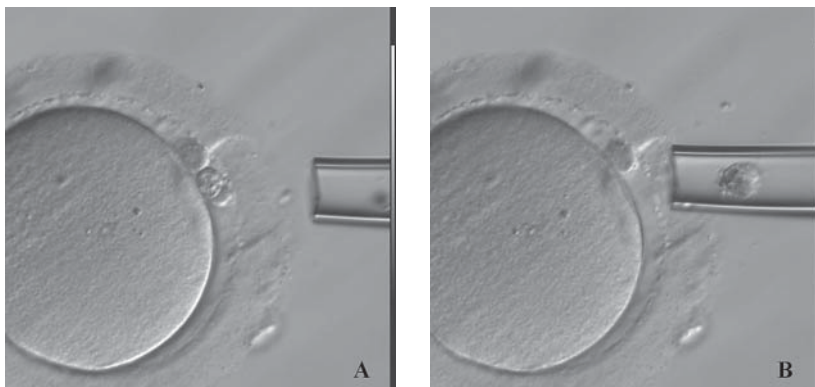
Die Durchführung der Polkörperdiagnostik wurde als Studie bei der zuständigen Ethik-Kommission der Universität Bonn vorgelegt und bewilligt. Es wurden nur Patientinnen rekrutiert, bei denen eine human-genetische Untersuchung im Vorfeld der Behandlung durchgeführt wurde. Obwohl grundsätzlich der Transfer von 3 Embryonen möglich wäre, haben wir ausschließlich maximal 2 Embryonen transferiert. Stimulation der Patientinnen, Eizellentnahme, Kultur, Transfer und Lutealphasenunterstützung erfolgten wie beschrieben

[10]. Die Eizellen wurden mittels der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) zwischen 12:30 und 13:00 Uhr injiziert. Die Entnahme der Polkörper erfolgte zwischen 15:30 und 16:30 Uhr. Dabei wurde zur Eröffnung der Zona pellucida ein Diodenlasersystem eingesetzt ([8], Fertilase oder Octax, MTC, Deutschland). Die Polkörper wurden mit einer stumpfen Biopsienadel entnommen und für 5 min in einer hypotonen Lösung inkubiert. Die Fixierung auf dem Objektträger erfolgte entsprechend dem Protokoll des Hybridisierungskits (Multivision PB™, Vysis, Bergisch Gladbach). Die Hybridisierung wurde innerhalb der optimalen Hybridisierungszeit von 4–8 Stunden in einem Hybridisierungsöfen (Hybrite™, Vysis) mit den Proben für Chromosom 13, 16, 18, 21 und 22 (PB Kit, Vysis) durchgeführt und anschließend gewaschen. Die Beurteilung erfolgte an einem inversen Mikroskop (DMIRB™, Leica, Bensheim) mit Fluoreszenzausstattung und einem digitalen Bildaufnahme- und Analysesystem (Aquacosmos™, Hamamatsu, Herrsching). Für die Analyse der 5 unterschiedlichen Fluorophore wurden speziell adaptierte Filtersätze verwendet (Vysis). Bei regelgerechter Chromosomenverteilung zeigt der erste Polkörper zwei Signale für jedes untersuchte Chromosom (ein Signal je Chromatide), der zweite Polkörper ein Signal.

ERGEBNISSE

Die erfolgreiche Durchführung der Polkörperdiagnostik in der klinischen Anwendung bedingt eine umfangreiche Einarbeitung in die Methode der Polkörperbiopsie, inklusive der Überführung und Fixierung der Polkörper auf einem Objektträger für die anschließende FISH-Diagnostik. Die Entnahme der Polkörper nach Eröffnung der Zona pellucida im Bereich des 1. Polkörpers ist in Abbildung 1 dargestellt. Während die Biopsie des 1. Polkörpers für den Geübten problemlos ist, hat es sich in der Praxis

Abbildung 1: Zur Entnahme des 1. Polkörpers wird die Zona pellucida einer menschlichen Eizelle mit einem Diodenlaser direkt über dem 1. Polkörper eröffnet (Abb. 1A). Der Polkörper wird in eine stumpfe, feuerpolierte Biopsienadel aspiriert und steht für weitere Untersuchungen zur Verfügung (Abb. 1B).



gezeigt, daß eine Entnahme des 2. Polkörpers in der Mehrzahl der Fälle nicht praktikabel ist, da dieser in der Regel über die noch bestehende Spindel und eine ausgeprägte Zytoplasmabrücke eine starke Anbindung an das Ooplasma zeigt. Eine gewaltsame Entnahme birgt immer das Risiko, daß an der Spindel fixierte Chromatiden aus dem Ooplasma der Eizelle versehentlich entnommen werden. Dies ist immer dann der Fall, wenn bei der Biopsie die Abschürfung eines Ooplasma-Tropfens beobachtet werden kann.

Unsere Erfahrungen zeigen, daß nach intensiver Vorbereitung die Rate der Polkörper, die während der Biopsie verloren gehen, auf 1–2 %

beschränkt bleibt (Abbildung 2). Hingegen zeigt sich bei der Beurteilung der FISH-Ergebnisse, daß die zunehmende Routine zu einer verbesserten Diagnose führt und der prozentuelle Anteil der nicht beurteilbaren Polkörper konstant abnimmt. Dies liegt insbesondere daran, daß Hybridisierungsartefakte als Folge der Isolation und Fixation der Polkörper seltener auftreten.

In dem von uns untersuchten Kollektiv konnten bei Frauen mit 36–40 Jahren in 41,2% der untersuchten Eizellen eine Chromosomen-Fehlverteilung nachgewiesen werden, bei Frauen über 40 Jahren bereits in 55,0% der Eizellen. Mehrheitlich wurden Trisomien diagnostiziert (87

von 166 aneuploiden Eizellen; 52%), wobei Trisomie 21 in 36 der untersuchten Eizellen als häufigste Fehlverteilung auftrat. Daneben beobachteten wir Monosomien (30 / 166; 18%) und Kombinationen, wenn mehr als ein Chromosom eine Fehlverteilung aufwies (49 / 166; 29%) (Abbildung 3).

Die Anzahl der nach Polkörperdiagnostik zur Verfügung stehenden befruchteten Eizellen für den späteren Embryotransfer, bzw. die Möglichkeit, zusätzlich Eizellen im Vorkernstadium der Kryokonservierung zuzuführen, ist direkt abhängig von der Anzahl der Eizellen, die zur ICSI vorhanden sind (Abbildung 4). Daraus ergibt sich, daß eine ausreichende Anzahl von Eizellen zur ICSI benötigt wird ($7,8 \pm 2,9$), damit mit hoher Wahrscheinlichkeit letztlich 1–2 Embryonen ohne chromosomale Fehlverteilung bzgl. der untersuchten Chromosomen für den Transfer zur Verfügung stehen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die ersten 50 durchgeführten Behandlungszyklen. In 42 Zyklen mit anschließendem Transfer konnten 13 klinisch manifeste Schwangerschaften erzielt werden (30,9%), bei einer Implantationsrate von 18,5%. Dies ist für das angeführte Patientenkollektiv mit einem Altersdurchschnitt von $38,7 \pm 3,9$ Jahren eine beachtliche Erfolgsrate, insbesondere unter

Abbildung 2: Lernkurve nach Polkörperdiagnostik in Abhängigkeit der Anzahl durchgeführter Zyklen

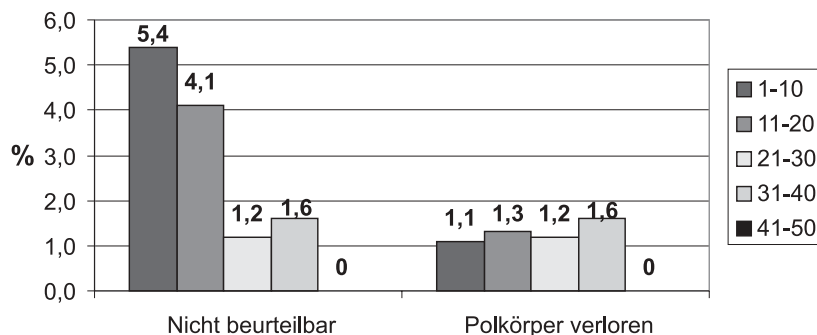


Abbildung 3: Chromosomen-Fehlverteilungen in Eizellen älterer Patientinnen nach Untersuchung der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22

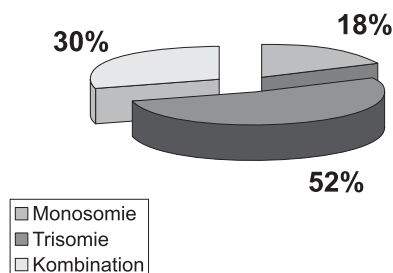
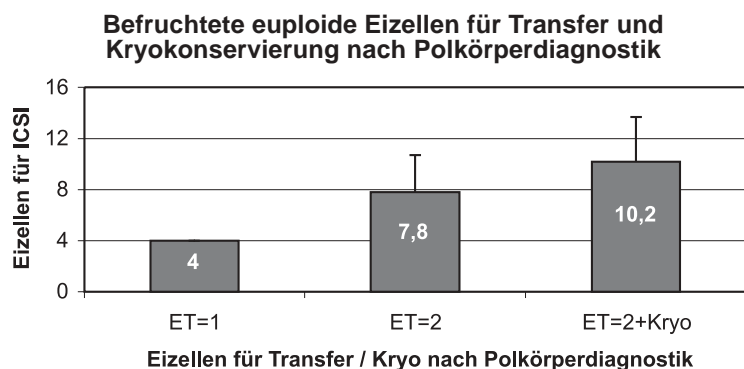


Abbildung 4: Einfluß der Zahl der Eizellen bei der Polkörperdiagnostik



Berücksichtigung der Tatsache, daß maximal 2 Embryonen transferiert werden. Bisher wurde nach Polkörperbiopsie und anschließendem Transfer von 2 Embryonen erst eine Gemini-Gravidität erzielt. Werden die Schwangerschaftsraten nach Zeiträumen ausgewertet, so wird eine Zunahme der Erfolgsrate mit steigender Erfahrung erkennbar (Abb. 5).

DISKUSSION

Die vorliegenden Daten und Erfahrungsberichte zeigen, daß die Polkörperdiagnostik eine sehr gute Möglichkeit zur Untersuchung chromosomaler Fehlverteilungen bei älteren Patientinnen darstellt. Dies gilt insbesondere für Länder, in denen aufgrund gesetzlicher Bestimmungen eine Präimplantationsdiagnostik am Embryo nicht durchgeführt werden kann. Daß es sich bei der Polkörperdiagnostik um eine indirekte Untersuchung der Eizelle handelt, fällt bei den hauptsächlich von weiblicher

Seite resultierenden chromosomalen Fehlverteilungen [1] nicht so sehr ins Gewicht. Es muß aber ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß mit der Polkörperdiagnostik männliche genetische Faktoren nicht untersucht werden können. Dies ist sicherlich ein großer Nachteil gegenüber der Embryobiopsie.

Eine weitere Einschränkung erfährt die Polkörperdiagnostik bei der Untersuchung monogener Erkrankungen. Durch die in der Meiose stattfindende Neukombination der mütterlichen Allele unter Anwendung des sogenannten Crossing over ist eine exakte Diagnose der Vererbung monogener Erkrankungen sehr schwierig. Zudem muß bei einer solchen Untersuchung auch der sogenannte Allel-Dropout berücksichtigt werden, der dann vorliegt, wenn ein Allel zwar vorhanden ist, aber bei der Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in der Reaktion nicht erkannt wird [11]. Diese Komplikation ist im Falle der Analyse von Einzelzellen – wie

beispielsweise dem Polkörper – von entscheidender Bedeutung für die korrekte Diagnosestellung.

Zudem muß zur Diagnose der Vererbung einer monogenen Erkrankung oder Prädisposition der 2. Polkörper zwingend mit untersucht werden. Dies sind die Gründe dafür, daß diese Untersuchungen in Zukunft sicherlich nur in spezialisierten Einheiten mit dem entsprechenden Know-how durchführbar sind. Wir arbeiten derzeit an der Optimierung dieser Methode, ebenso wie an einer Ausweitung der bei der FISH-Untersuchung verwendeten Anzahl an chromosomalen Sonden.

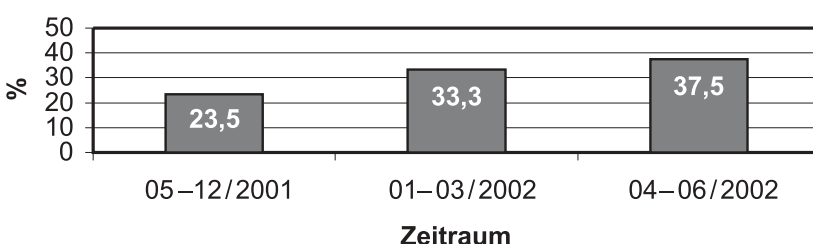
Literatur:

1. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985; 70: 11–7.
2. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: Preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990; 5: 826–9.
3. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first and second polar body FISH analysis. *J Ass Reprod Genetics* 1998; 15: 284–8.
4. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 244: 768–70.
5. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 2185–91.
6. Magli M, Gianaroli L, Munné S, Ferraretti AP. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J Ass Reprod Genetics* 1998; 15: 297–301.
7. Montag M, van der Ven H. Grundlagen der In-vitro-Fertilisation und Embryonenkultivierung. *Reproduktionsmedizin* 2002; 18: 147–52.

Tabelle 1: Erfolgsraten der Polkörperdiagnostik

Behandlungszyklen	50
Alter der Patientinnen	38,7 ± 3,9
Anzahl der gewonnenen Eizellen	523
Anzahl der injizierten Eizellen	405
Anzahl der diagnostizierten Eizellen	360
Anzahl der aneuploiden Eizellen	166 / 360 (46,1 %)
Behandlungszyklen mit Embryotransfer	42 (84 %)
Anzahl Embryonen / Transfer	1,9 ± 0,5
Schwangerschaften / Transfer (serologisch)	15 / 42 (35,7 %)
Schwangerschaften / Transfer (klinisch)	13 / 42 (30,9 %)
Implantationsrate / transferiertem Embryo	15 / 81 (18,5 %)

Abbildung 5: Klinische Schwangerschaftsrate nach Polkörperdiagnostik



8. Montag M, van der Ven K, Delacrétaz G, Rink K, van der Ven H. Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril* 1998; 69: 539–42.
9. Montag M, van der Ven K, Delacrétaz G, Rink K, van der Ven H. Efficient preimplantation genetic diagnosis using laser assisted microdissection of the zona pellucida for polar body biopsy followed by primed in situ labelling (PRINS). *J Ass Reprod Genetics* 1997; 14: 455–6.
10. van der Ven H., Montag M, van der Ven K. Schwangerschaft nach Polkörperbiopsie und Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22. *Geb Frau* 2002; 62: 585–8.
11. Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukhareno V, Kuliev A, Verlinsky Y. Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Ass Reprod Genetics* 1998; 15: 253–7.



PD Dr. rer. nat. Markus Montag

Geboren 1960 in Mannheim. Studium der Biologie von 1981–1986 in Heidelberg, Diplom (1987) und Promotion (1991) am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg. 1991–1992 Forschungsaufenthalt in Singapur (NUH, Prof. S.C. Ng), 1993–1995 Laborleiter einer privaten IVF-Praxis in Würzburg, seit 1995 Laborleiter für IVF an der Frauenklinik des

Universitätsklinikums Bonn, Abt. Gyn. Endokrinologie & Reproduktionsmedizin. Habilitation und Erteilung der Venia legendi für das Lehrgebiet Experimentelle Reproduktionsmedizin, 2000.

Forschungsschwerpunkte: Lasereinsatz in der ART, Polkörperdiagnostik, Eizell-Aktivierung, Testikuläre Autoimmun-Antikörper bei Sterilitätspatienten.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. rer. nat. Markus Montag
Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin,
Universitätsklinikum Bonn
D-53105 Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25
E-mail: m.montag@uni-bonn.de

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](#)