

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Neue Aspekte der Zygotenevaluierung

Ebner T, Moser M, Tews G

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2004; 1 (2), 71-76

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Neue Aspekte der Zygotenevaluierung

Th. Ebner, M. Moser, G. Tews

Um die hohe Anzahl an Mehrlingsschwangerschaften im IVF zu reduzieren, gilt es, nichtinvasive Selektionskriterien zu entwickeln, die es ermöglichen, jene Embryonen herauszufiltern, welche ein besonders hohes Implantationspotential besitzen. In letzter Zeit entwickelte sich das Stadium der Zygote (Tag 1 nach der Punktation der Oozyten) immer mehr zum bevorzugten Zeitpunkt der morphologischen Evaluierung. Bereits anhand der Anordnung der Vorkerne (18–20 Stunden nach Insemination) lassen sich erste prognostische Rückschlüsse über die weitere Entwicklung des Embryos ziehen, wobei sich zeigte, daß die optimale Situation jene ist, in der beide annähernd gleich großen Pronuklei zentral im Ooplasma zu liegen kommen und gegen die beiden Polkörper hin ausgerichtet sind. Es stellte sich weiters heraus, daß der Synchronität der Vorkerne hinsichtlich der Anordnung ihrer Nukleoli sowie dem zytoplasmatischen Erscheinungsbild (Halo-Effekt) die größte prognostische Bedeutung zukommt. Zusätzlich scheint eine relativ frühe erste Zellteilung (23–27 Stunden nach Insemination) von Vorteil zu sein. In letzter Zeit wird vermehrt ein Zusammenhang zwischen Vorkernmuster und genetischer Konstitution des Embryos vermutet. Idealerweise sollte man diese morphologischen Merkmale am Tag 1 mit jenen anderer Entwicklungsstadien kombinieren, um so am Transfertag aus einer Vielzahl von Kandidaten jenen Embryo mit dem höchsten Implantationspotential herauszufinden.

Schlüsselwörter: Zygote, Vorkernanordnung, Vorkernmuster, Nukleoli, Halo-Effekt, frühe erste Zellteilung

Morphological Evaluation at Zygote Stage. In order to reduce the high rate of multiple pregnancies after IVF-treatment non-invasive criteria of selection have to be developed, which help to identify those embryos showing a high implantation potential. Currently, zygote stage (day 1 after oocyte collection) turned out to be the time of choice for morphological evaluation. Formation of pronuclei should be central within the ooplasm and both pronuclei (of approximately the same size) should arrange with the two polar bodies to form a new polar axis. Synchronization of the two pronuclei in terms of nucleoli arrangement as well as cytoplasmic appearance of the zygote were shown to be mostly related to further outcome. In addition, first cleavage at 23–27 hours (after insemination) seems to be advantageous. Recently, a correlation between pronuclear pattern and genetic constitution of the embryo was published. All morphological characteristics of day 1 should be combined with the information gathered on other developmental stages in order to filter out the right embryo out of a pool of candidates on transfer day. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2004; 1 (2): 71–6.**

Key words: zygote, pronuclear formation, pronuclear pattern, nucleoli, halo-effect, early cleavage

Eines der größten Probleme im Zusammenhang mit der Assistierte Reproduktion ist jenes der außerordentlich hohen Mehrlingsraten, welche Resultat einer zu hohen Anzahl an rücktransferierten Embryonen sind [1]. Es gilt, Strategien zu entwickeln, um zumindest höhergradige Mehrlingsschwangerschaften zu verhindern, ohne jedoch die Implantationsrate bzw. die allgemeine Geburtenrate entscheidend zu beeinträchtigen [2]. Optimalerweise sollte durch nichtinvasive Methoden jener Embryo *in vitro* identifiziert werden, der bevorzugt implantiert [3]. Sieht man von biochemischen Untersuchungen des embryonalen Metabolismus ab, basieren solche Selektionen ausschließlich auf morphologischen Parametern, die während der ersten fünf Tage in Kultur erhoben werden. Klassischerweise sind es die ersten Teilungsstadien am Tag 2 bzw. 3 der Entwicklung, und hier besonders Form und Anzahl der Blastomeren sowie der Grad an Fragmentierung [4, 5], die als Anhaltspunkte dienen. Leider zeigte sich in jüngster Vergangenheit, daß die Morphologie am Tag 3 nur eine bedingte Aussage über Blastozystenformation und -qualität zuläßt [6, 7], weshalb zusehends morphologische Kriterien anderer Entwicklungsstadien herangezogen werden, um den optimalen „Kandidaten“ für einen Transfer herauszufiltern. Eine erste Vorselektion kann, zumindest in der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), bereits am Tag 0 an der Eizelle [8, 9] durchgeführt werden. In letzter Zeit avancierte jedoch mehr und mehr das Zygotenstadium (Tag 1) zum Favoriten unter den Embryologen, wobei alle Publikationen mehr oder weniger auf die Richtlinien von Scott und Smith [10] bzw. Tesarik und Greco [11] zurückgreifen.

Vorkernbildung und -anordnung

Anhand von Videosequenzen, die von Payne et al. [12] im Zeitraffer aufgezeichnet wurden, lassen sich die Vorgänge während der Fertilisation nach ICSI anschaulich darstel-

len. Nach erfolgter Injektion des immotilen Spermiums zeigen sich periodische Rotationen des Ooplasmas innerhalb des Oolemmas. Diese zytoplasmatischen Wellen (meistens im Uhrzeigersinn) umfassen den Zeitraum der Dekondensation des Spermienkopfes und des Sichtbarwerdens der Metaphasenplatte und enden erst mit Abschnürung des 2. Polkörperchens. Zentral wird der männliche Vorkern sichtbar, mehr oder weniger simultan begleitet von der Bildung eines weiblichen Vorkerns. Beide Kerne zeigen schon erste Nukleoli (Vorstufen sind „nucleolar precursor bodies“). Mit Hilfe der Mikrotubuli wird der randständige weibliche Pronukleus Richtung männlichem Pendant gezogen, um schließlich in einer Aneinanderlagerung beider Vorkerne zu enden. In der Mehrzahl der Fälle (> 90 %) kommt der weibliche Pronukleus in unmittelbarer Nähe des 2. Polkörperchens zu liegen [12, 13].

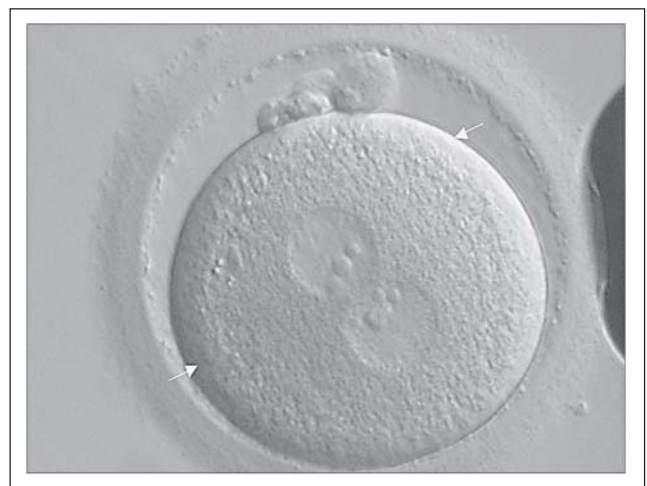


Abbildung 1: Zygote mit Vorkernmuster 0B und konzentrischem Halo (Pfeile); beide Polkörper liegen in unmittelbarer Nähe der gedachten Polarachse

Aus der Landes-Frauen- und Kinderklinik, IVF-Institut, Linz

Korrespondenzadresse: Univ.-Doz. Mag. Dr. Thomas Ebner, Landes-Frauen- und Kinderklinik Linz, IVF Institut, A-4020 Linz, Lederergasse 47;

E-Mail: thomas.ebner@gespag.at

Die anschließende Phase ist gekennzeichnet von einem Größenwachstum der Vorkerne sowie der mikrotubuligesteuerten Dislokation verschiedenster Zellorganellen, v. a. der Mitochondrien, von der Peripherie hin zum Zentrum der Zygote, wodurch das randständige Plasma lichtdurchlässiger erscheint (Halo-Effekt).

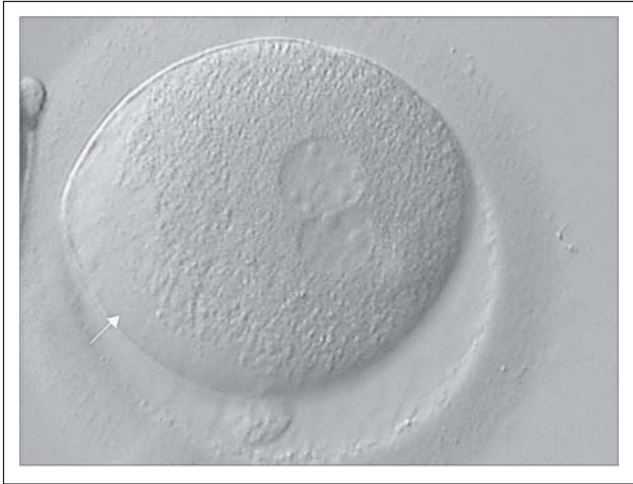


Abbildung 2: Dezentrale Anordnung der Vorkerne (Vorkernmuster 5); der Pfeil markiert den polaren Halo



Abbildung 3: Fehlende Aneinanderlagerung der beiden Vorkerne mit Vorkernmuster 3; es zeigt sich kein Halo

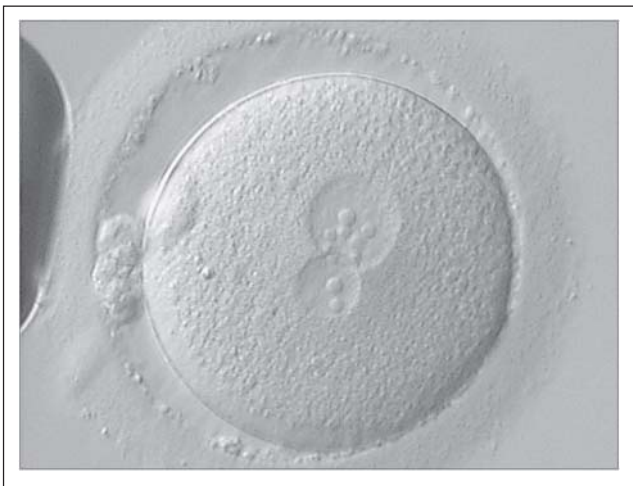


Abbildung 4: Zygote mit ungleich großen (25,4 μm bzw. 17,8 μm) Vorkernen (Vorkernmuster 5); der polare Halo befindet sich links

Verschiedene Autoren [14, 15] vermuten, daß die Eizelle durch Eigenrotation des Zytoplasmas versucht, eine suboptimale Konstellation zwischen Vorkernen und 2. Polkörperchen auszugleichen, sodaß sich eine neue Polarachse formiert, wobei im optimalen Fall (Abb. 1) beide Polkörperchen in Verlängerung der gedachten Vorkernachse liegen [16]. Mit zunehmender Entfernung eines Polkörpers von dieser Achse erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß sich aus der Zygote ein Embryo von eingeschränkter Qualität entwickelt, signifikant [16, 17]. Dem widerspricht jedoch eine Arbeit jüngerer Datums [18].

Besonderheiten

Formieren sich beide Pronuklei dezentral, also eher randständig (Abb. 2), ist die Prognose hinsichtlich der weiteren Entwicklung denkbar schlecht, nur bei weniger als der Hälfte aller Zygoten kommt es zu einer Teilung [16]. Weiters scheint es einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer randständigen Vorkernanordnung und der unregelmäßigen Größe der Blastomeren in den ersten Teilungsstadien zu geben [16]. Die Tatsache, daß bei IVF eine dezentrale Lage der Vorkerne häufiger zu beobachten ist [16] als bei ICSI (11,8 % vs. 3,3 %), ist wohl auf die unterschiedlichen Eintrittsstellen der Spermien bei der herkömmlichen *In-vitro*-Fertilisation zurückzuführen, wobei ein spindelnahe Eintritt die Chance auf dieses suboptimale Arrangement der Vorkerne erhöhen sollte [19].

Ein weiteres Problem, das während des Befruchtungsvorgangs auftreten kann, ist eine verzögerte oder sogar fehlende Aneinanderlagerung (Abb. 3) des männlichen und des weiblichen Pronukleus [10, 11]. Dieses seltene Phänomen (ca. 1 % aller Zygoten) führt in der Regel zu einem Einstellen jeglicher Teilungsaktivität [20] bzw. zu einem baldigen Entwicklungsstopp [11] und ist in den meisten Fällen auf einen Defekt des Spermienzentrums bzw. der daraus hervorgehenden Mikrotubuli zurückzuführen [21].

Obwohl der weibliche Vorkern in der Regel etwas kleiner ist [12], kann in 2–14 % aller Fälle [22, 23] ein wesentlich deutlicherer Größenunterschied beider Kerne (Abb. 4) festgestellt werden (ca. 7–10 μm). Dies ist am ehesten auf einen Fehler bei der Bildung des männlichen Vorkerns zurückzuführen [24]. In weiterer Folge zeigte sich, daß über 80 % jener Embryonen, die aus ICSI-Zygoten mit ungleich großen Vorkernen hervorgegangen waren, chromosomale Aberrationen aufweisen, im IVF-Kollektiv hingegen waren nur 50 % betroffen [23].

In seltenen Fällen (1 %) kann man trotz des Vorhandenseins zweier Polkörper keine Vorkerne sehen. Manor et al. [25] empfehlen, daraus entstehende Embryonen nur dann zu transferieren, wenn keine geeigneten 2Pn-Zygoten vorhanden sind, denn schließlich war nur knapp die Hälfte dieser „undokumentierten“ Zygoten genetisch unauffällig. Oft sind die Vorkerne aufgrund einer abnormalen Entwicklungsgeschwindigkeit nicht zu beobachten, oder eine zu starke Granulierung des Ooplasmas verhindert deren Auffinden [26].

Vorkernmuster

Normalerweise lassen sich jedoch die beiden Pronuklei 18–20 Stunden nach erfolgter Insemination deutlich im Lichtmikroskop darstellen. Beide Kerne sollten zum Zeitpunkt der Beobachtung zentral im Ooplasma aneinandergelagert sein, wobei der kleinere, weibliche Vorkern in der Regel weniger Nukleoli zeigt. Nukleoli können passiv im Nukleoplasma der Vorkerne fluktuieren [12], sie haben die

Tendenz zu fusionieren [27] und sollten sich im Zuge der weiteren Entwicklung polar an der gemeinsamen Bindungsstelle der Pronuklei arrangieren. Da die polare Anordnung der Nukleoli zeitabhängig ist [12, 27, 28], stellen sich dem Embryologen zum Zeitpunkt der Zygotenevaluation verschiedene Vorkernmuster dar, welche sich als Entscheidungshilfe für eine nichtinvasive Selektion anbieten. Tatsächlich waren es Scott und Smith [10], die sich, basierend auf der ursprünglichen Arbeit von Wright et al. [28], intensiv mit der prognostischen Aussagekraft von polaren Vorkernmustern auf die klinische Schwangerschaftsrate beschäftigten. Leider war in dieser Arbeit das jeweilige Vorkernmuster nur *ein* Bestandteil eines relativ komplexen Zygotenscores, sodaß der eigentliche Einfluß der Pronukleimuster etwas im unklaren blieb.

Tesarik und Greco [11] schufen dem Abhilfe, indem sie sich ausschließlich auf die Vorkernmuster konzentrierten. Anhand einer retrospektiven Analyse jener Zygoten, die nachgewiesenermaßen implantierten, konnten sie ein optimales Vorkernmuster 0 herausfiltern (Abb. 1 und 5). Es zeigte sich, daß die Synchronie zwischen der Anordnung der Nukleoli in beiden Vorkernen wichtiger zu sein schien, als die teilweise polare Anordnung der Kernkörperchen an der Bindungsstelle. Immerhin wurde die Hälfte jener Patientinnen schwanger, welche zumindest einen Embryo mit einem früheren Vorkernmuster 0 transferiert erhielten, wohingegen nicht einmal bei 10 % eine Schwangerschaft erzielt werden konnte, wenn ausschließlich Vorkernmuster 1–5 (interpronukleäre Asynchronie in Zahl, Größe und Polarität der Nukleoli) zurückgegeben wurden (Abb. 2 und 4). In weiterer Folge beschäftigten sich zahlreiche Arbeiten mit dieser Thematik [29–33] und bestätigten im großen und ganzen die Ergebnisse dieser Pilotstudie [11] (Tab. 1).

Zwei Publikation erscheinen in diesem Kontext besonders erwähnenswert. Einerseits ist das die deutsche Multi-center-Studie von Montag und van der Ven [32], die erstmalig das optimale Vorkernmuster 0 [11] weiter unterteilt, je nachdem, ob die Nukleoli über das Karyoplasma verstreut sind (Muster 0A) oder an der Kontaktstelle der Vorkerne zu größeren Einheiten fusionieren (Muster 0B). Eine Implantationsrate von 20,5 % und eine Schwangerschaftsrate von 37,9 % in Zyklen mit Transfer von zumindest einem Vorkernmuster 0B verdeutlichen die besondere prognostische Bedeutung dieses Musters. Ähnlich gute Ergebnisse (23,4 % bzw. 36,4 %) wurden für das Vorkernmuster 3 (Abb. 3 und 6) beschrieben (polare Anordnung

kleinerer Nukleoli ohne Fusion), das wohl als Vorstufe des Musters 0B angesehen werden kann. Die Zahl der 0B-Muster zeigte sich im ICSI-Kollektiv gegenüber der IVF-Klientel signifikant erhöht [32]. Dieses Phänomen wurde mit dem beschleunigten zeitlichen Ablauf in der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (verglichen mit der herkömmlichen IVF) in Zusammenhang gebracht [34].

Die zweite Arbeit, die hier explizit erwähnt werden soll, ist die von Salumets et al. [35]. Da hier ausschließlich Transfers einzelner Embryonen ausgewertet wurden, und so das eigentliche Implantationspotential des betreffenden Embryos relativ genau abgeschätzt werden konnte, kommt ihr besondere Bedeutung zu. Es fand sich zwar eine deutlich verringerte Teilungsrate (38,9 % aller Embryonen hatten ≥ 3 Blastomere am Tag 2), wenn keiner der beiden Vorkerne polarisierte Nukleoli zeigte, doch manifestierte sich die raschere Teilung von Zygoten mit zumindest einem (54 % ≥ 3 Blastomere) oder zwei polaren Vorkernen (57,3 %) nicht in erhöhten Schwangerschaftsraten. Bei der Interpretation der Daten darf man jedoch nicht außer acht lassen, daß in vielen Fällen der transferierte Embryo der einzig verfügbare war, sodaß es sich zumindest teilweise um eine Klientel mit schlechter Prognose handelte. Nichtsdestotrotz scheint die alleinige Verwendung des Vorkernmusters nicht zielführend zu sein.

Zytoplasma

Ein gewisser Nachteil der Zygotenklassifikation nach Tesarik und Greco [11] scheint es zu sein, daß das zytoplasmatische Erscheinungsbild völlig außer acht gelassen wird. Scott und Smith [10] hingegen erkannten eine ge-

Tabelle 1: Prognostische Bedeutung des Vorkernmusters hinsichtlich des Behandlungsausganges bei Klassifizierung nach Tesarik und Greco [11]

Autoren	Methode	Transfer-tag	Transfer		
			Nur Muster 0	Mind. 1 Muster 0	Kein Muster 0
Tesarik et al. [29]	ICSI	2	44,9 ^a	23,6	22,1 ^a
Wittemer et al. [30]	IVF/ICSI	3	42,2 ^{b, c}	35,6 ^b	19,7 ^c
Balaban et al. [31]	ICSI	5	86,6 ^{d, e}	52,7 ^{e, f}	18,7 ^{d, f}
Montag et al. [32]	IVF/ICSI	2–5	kD	35,9 ^g	26,0 ^g
Ebner et al. [33]	IVF/ICSI	3–5	50,0 ^h	41,4	28,3 ^h
Salumets et al. [35]	IVF/ICSI	2, 3	28,6	kD	26,1

kD: keine Daten; klinische Schwangerschaftsraten sind als Prozentsätze angegeben (Tabelle modifiziert nach Ebner et al. [3])

^{a, e, f, h} $p < 0,05$; ^{b, c, d, g} $p < 0,01$

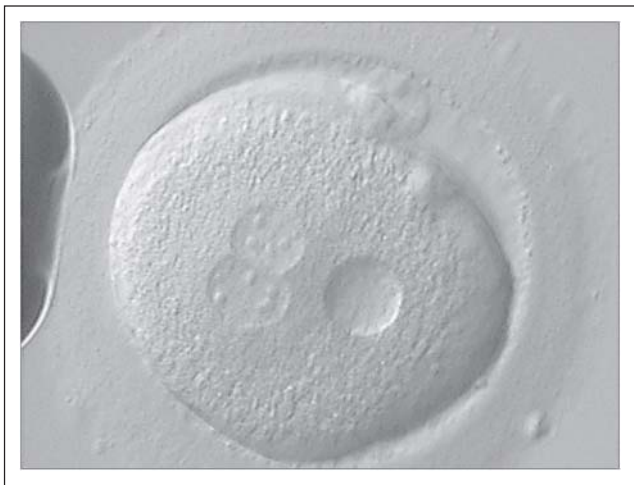


Abbildung 5: Zygote mit Vorkernmuster 0A und einer großen Vakuole (23,3 µm) im Ooplasma

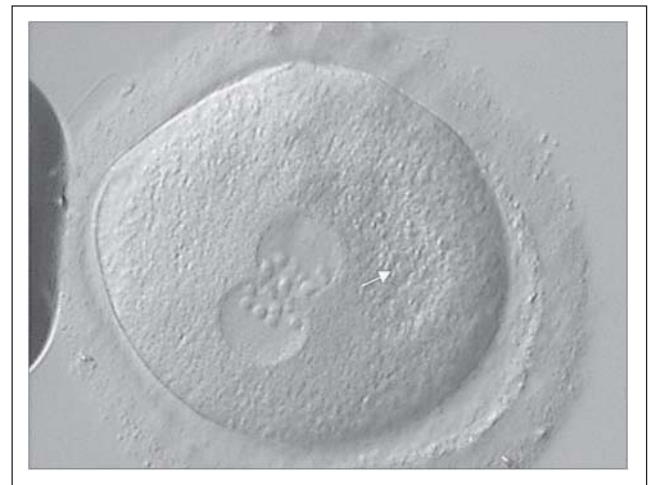


Abbildung 6: Zygote mit Vorkernmuster 3 und dichter zentraler Granulierung des Ooplasmas (Pfeil)

wisse prognostische Aussagekraft des zytoplasmatischen Halo-Effekts hinsichtlich des Eintretens einer Gravidität. Allerdings wurde neben dem Vorkernmuster und dem Zytoplasma auch die frühe erste Teilung (24–26 Stunden nach Insemination) in Betracht gezogen, wodurch der eigentliche Einfluß des Halo-Effekts etwas im unklaren blieb.

Einige deutsche Arbeiten wendeten den Scott & Smith-Score sogar mit Erfolg an [36, 37], obwohl sie aufgrund der gesetzlichen Bestimmungen die frühe Teilung der Zygote nicht in ihre Entscheidungsfindung mit einfließen lassen durften. Die beobachtete Korrelation zwischen dem Erscheinungsbild des Zytoplasmas und der Blastozystenbildung [37] bzw. der Implantation [36] hebt den prognostischen Stellenwert ebenso hervor, wie der beobachtete Zusammenhang mit der Embryoqualität [35] oder Schwangerschaftsrate [38]. So wurden 44 % jener Patientinnen schwanger, die zumindest einen halo-positiven Embryo transferiert bekamen, jedoch nur 31 %, wenn dies nicht der Fall war [38]. Alle Arbeiten, die sich bis dato mit dem Halo-Effekt auseinandergesetzt haben, wendeten einen relativ komplizierten Score an und waren sich über das Erscheinungsbild des Halos uneinig. So akzeptierten z. B. einige Arbeiten sowohl polare (einseitige) als auch symmetrische (konzentrische) Halos [10, 35], während andere das Vorhandensein konzentrischer [38] oder extremer Halos [37] als abnormal betrachteten. Die Tatsache, daß

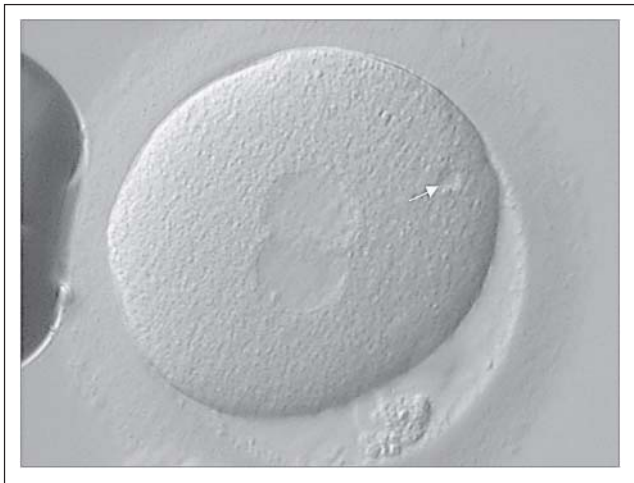


Abbildung 7: Zygote im Stadium der Auflösung der pronukleären Membran; der Pfeil markiert eine kleine Vakuole (6,4 µm)

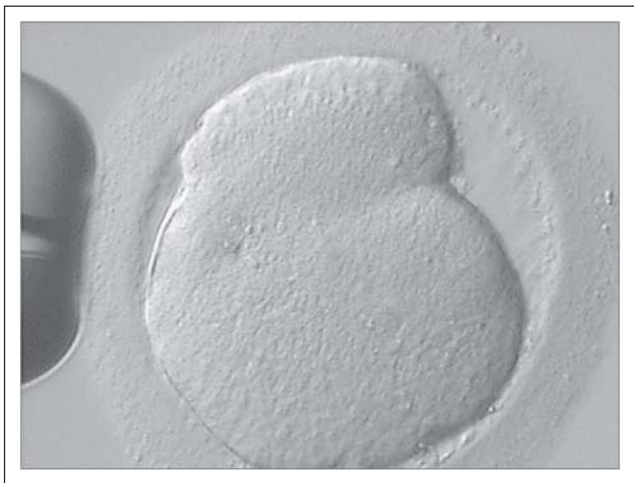


Abbildung 8: Beginnende erste Zellteilung 24 Stunden nach erfolgreichem ICSI

das Auftreten eines Halos ein relativ häufiges Phänomen ist – die Literatur gibt Werte zwischen 67 und 89 % an [35, 38–40] –, erschwert die Einschätzung der Bedeutung des Halo-Effekts zusätzlich, zumal dieser mit den unterschiedlichsten Vorkernmustern auftritt. Ebner et al. [41] versuchten, etwas Licht in diese Angelegenheit zu bringen, indem sie erstens den Halo-Effekt als selbständiges Merkmal betrachteten und ihn zweitens in polare (Abb. 2 und 4) und konzentrische Halos (Abb. 1) unterteilten. Zusätzlich wurde die Ausdehnung dieses morphologischen Merkmals exakt vermessen. Es zeigte sich, daß alle Halo-Typen, ungeachtet ihrer Ausdehnung, dieselbe positive Aussagekraft besitzen, lediglich das völlige Fehlen eines Halos (Abb. 3) war mit einer geringeren Blastozystenqualität einhergehend (16,1 %), verglichen mit der Rate bei Auftreten irgendeines Halo-Typs (56,2 %). Zusätzlich fand sich eine deutlich erhöhte Schwangerschaftsrate bei ausschließlicher Gabe von halo-positiven Embryonen (42,0 %), während beim völligen Fehlen solcher lediglich eine Schwangerschaftsrate von 14,3 % erzielt werden konnte.

Neben dem Ausbleiben des Halo-Effekts sind es vor allem zytoplasmatische Anomalien, die man schon vom Stadium der Eizelle kennt, die sich negativ auf die weitere Entwicklung *in vitro* auswirken können. Im besonderen sei hier das Auftreten von Vakuolen (Abb. 5 und 7) und dichter zentraler Granula (Abb. 6) erwähnt, welche die Entwicklung von der Zygote zur Blastozyste negativ beeinflussen. Im Detail zeigte sich, daß die Blastulationsrate von solchermaßen beeinträchtigten Zygoten 29 % [37] bis 34 % [41] nicht überschreitet.

Frühe erste Zellteilung

Eigene Arbeiten [42] haben gezeigt, daß bereits 24 Stunden nach erfolgter Injektion nur mehr in zwei Drittel aller Zygoten die Vorkerne deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Bei 20,7 % aller Zellen zeigten, in Vorbereitung auf die Syngamie, die Nukleoli und in weiterer Folge die Kernmembranen bereits erste Auflösungserscheinungen (Abb. 7). Einige wenige (12,6 %) hatten sogar schon die erste Zellteilung absolviert (Abb. 8). Verlegt man den Beobachtungszeitpunkt auf 25–27 Stunden nach Insemination, erhöht sich naturgemäß die Zahl der Zweizeller pro Patient, was die Auswahl der zu transferierenden Embryonen zusehends erleichtert. Zusätzlich erhöht sich die Zahl jener Patienten, welche zumindest eine Zygote mit vorzeitiger erster Teilung ihr eigen nennen können. Immerhin scheinen 18,7 % aller IVF-Patienten von diesem besonderen Merkmal zu profitieren [43]. In der Gruppe der ICSI-Patienten waren es sogar 61,4 % der Zyklen [44].

Diesen erhöhten Prozentsatz an frühen Teilungen im ICSI-Kollektiv erklären Sakkas et al. [45] nicht mit unterschiedlichen Befruchtungszeiten, daß also ICSI-Oozyten aufgrund des direkten Einbringens eines Spermiums einen zeitlichen Vorteil hätten, sondern vielmehr mit eizellspezifischen Faktoren. Um tatsächlich vergleichbare Resultate zu erzielen, muß man entweder die IVF-Oozyten früher inseminieren oder entsprechend später evaluieren [46]. Der kritische Zeitpunkt der Beobachtung ist auf jeden Fall bis auf 29 Stunden *post inseminationem* ausdehnbar [47].

Der Grund, warum Transfers von früh geteilten Embryonen zu besseren Schwangerschaftsraten führen (Tab. 2), ist nach wie vor unbekannt, möglicherweise aber ist dieses morphologische Merkmal Ausdruck einer Synchronie von Zytoplasma- und Kernreifung [46]. Außerdem kristallisieren sich offenbar zu einem gewissen Prozentsatz euploide

Embryonen heraus [48], zeigt sich doch die Rate an frühen Teilungen von dreikernigen Zygoten (12,0 %) im Vergleich zu zweikernigen (26,9 %) deutlich erniedrigt [46].

Genetik

Überhaupt scheint es zwischen den verschiedenen Vorkernanordnungen und -mustern und dem jeweiligen chromosomalen Status Korrelationen zu geben [54, 55]. Besonders benachteiligt sind demnach Zygoten, deren Vorkerne sich nicht aneinandergelagert haben, und Zygoten mit unterschiedlich großen [56] oder zerfallenen Pronuklei, da kaum ein Embryo aus dieser Gruppe einen normalen Chromosomensatz aufwies [54], wohingegen sich der Prozentsatz der euploiden Embryonen in Zygoten mit aneinandergelagerten Vorkernen, seien sie jetzt zentral oder peripher gelegen, zwischen 32 % und 41 % befand. Eine größere Abweichung der Polkörper zur Pronukleipolkörper-Achse war mit einer erhöhten Rate an Aneuploidien einhergehend (93 % vs. 64 %).

Überraschenderweise stellte sich bei den Untersuchungen von Gianaroli et al. [54] das Vorkernmuster 1 als jenes mit den meisten Aneuploidien heraus (87 %), während die übrigen Muster um die 40 % normale Embryonen hatten, so ist z. B. die Euploidierate bei Frauen unter 37 Jahren für das Pronukleusmuster 0B knapp 50 % [56]. Coskun et al. [55] unterteilten die Zygoten anhand der nukleolären Polarität ihrer Vorkerne, wobei sich 47 % der polaren Muster (0B, 3) euploid darstellten, aber nur 19 % der „verstreuten“ Muster (0A, 1) bzw. 22 % des unpolaren Vorkernmusters 5. Das Auftreten eines Halos hingegen war ebenso wie die Zahl der Nukleoli nicht mit einem schlechteren chromosomalen Status verbunden.

Ausblick

Da positive prognostische Kriterien im Stadium der Eizelle kaum vorhanden sind, ist das Zygotenstadium das Entwicklungsstadium der Wahl, zumal in einigen Ländern (Deutschland, Schweiz und neuerdings auch Italien) eine restriktive Gesetzgebung die möglichen Entscheidungshilfen der Embryologen auf ein Minimum reduziert. Aufgrund seiner Einfachheit ist heutzutage sicherlich der Tesarik & Greco-Score [11] über den Scott & Smith-Score [10] zu stellen, zumal letzterer auch mehrere Kontrollen erfordert. Allerdings sprechen sowohl Aneuploidieraten [55] als auch Schwangerschaftsraten [32] für eine zusätzliche Unterteilung des Vorkernmusters 0 in einen polaren

Tabelle 2: Prognostische Bedeutung einer frühen ersten Zellteilung hinsichtlich des Eintretens einer Graviddität

Autoren	Methode	Zeitpunkt (h) nach IVF (ICSI)	Transfer-tag	Transfer	
				Frühe Teilung	Keine Teilung
Shoukir et al. [43]	IVF	25	2	33,3 ^a	14,7 ^a
Sakkas et al. [44]	ICSI	27	2	25,9 ^a	3,2 ^a
Sakkas et al. [45]	IVF/ICSI	23–27	2	45,0 ^b	23,8 ^b
Lundin et al. [46]	IVF/ICSI	25–27	2, 3	40,5 ^c	31,3 ^c
Bos-Mikich et al. [47]	IVF/ICSI	25–29	3	54,8 ^a	25,0 ^a
Lundqvist et al. [49]	IVF/ICSI	26	2, 3	45	40,3
Fenwick et al. [50]	IVF	25	2	31,3 ^a	10,5 ^a
Salumets et al. [51]	IVF/ICSI	25–27	2	50,0 ^c	26,4 ^c
Bahceci et al. [52]	ICSI	25–27	3	61,5	45,8
Wharf et al. [53]	IVF/ICSI	25–27	2	43,2 ^b	17,2 ^b

Klinische Schwangerschaftsraten sind als Prozentsätze angegeben.

^a p < 0,05; ^b p < 0,001; ^c p < 0,01

(0B) und einen unpolaren (0A) Typ, wobei ersteres das optimale Muster zu sein scheint. Idealerweise sollte man zu jedem Entwicklungsstadium möglichst viele morphologische Informationen sammeln, um so am Transfer tag aus einer Vielzahl von Kandidaten jenen Embryo mit dem höchsten Implantationspotential herauszufinden. Erste vielversprechende Ansätze wurden bereits publiziert [17, 57–59].

Literatur

- Hu Y, Maxson WS, Hoffman DI, Ory SJ, Eager S, Dupre J, Lu C. Maximizing pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality. *Fertil Steril* 1998; 69: 650–7.
- Strandell A, Bergh C, Lundin K. Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates. *Hum Reprod* 2000; 15: 2520–5.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 3: 251–62.
- Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992; 7: 117–9.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meersche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14: 2345–9.
- Graham J, Han T, Porter R, Levy M, Stillman R, Tucker J. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril* 2000; 74: 495–7.
- Rijnders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 2869–73.
- Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective embryo transfer selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril* 1999; 72: 599–603.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 2002; 17: 2415–8.
- Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003–13.
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318–23.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Mathews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997; 12: 532–41.
- Tang YX, Munne S, Reig A, Schattmann G, Grifo J, Cohen J. The parental origin of the distal pronucleus in dispermic human zygotes. *Zygote* 1994; 2: 79–85.
- Edwards RG, Beard KH. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 863–905.
- Fulka J, Karnikova L, Moor RM. Oocyte polarity: ICSI, cloning and related techniques. *Hum Reprod* 1998; 13: 3303–5.
- Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 2588–95.
- Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003; 18: 1307–12.
- Kattera S, Chen C. Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum Reprod* 2004; 19: 294–9.
- Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organisation during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 429–61.
- Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Technique* 1990; 16: 324–46.

21. Asch R, Simerly C, Ord T, Schatten G. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosomal configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod* 1995; 10: 1897–906.
22. Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 1998; 6: 137–41.
23. Manor D, Drugan A, Stein D, Pillar M, Itskovitz-Eldor J. Unequal pronuclear size – a powerful predictor of embryonic chromosome anomalies. *J Assist Reprod Genetics* 1999; 16: 385–9.
24. Goud P, Goud A, Van Oostveldt P, Van der Elst J, Dhont M. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte post maturity. *Fertil Steril* 1999; 72: 245–52.
25. Manor D, Kol S, Lewit N, Lightman A, Stein D, Pillar M, Itskovitz-Eldor J. Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum Reprod* 1996; 11: 2502–6.
26. Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 842–55.
27. Tesarik J, Kopecny V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* 1989; 24: 135–49.
28. Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, Toledo A, Cohen J. Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990; 5: 109–15.
29. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000; 15: 1396–9.
30. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongjeres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000; 15: 2591–7.
31. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357–61.
32. Montag M, Van der Ven H. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Reprod* 2001; 16: 2384–9.
33. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryo is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394–403.
34. Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen R, Van de Velde H, Van Steirteghem AC. Timing of oocyte activation, pronucleus formation, and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 1606–12.
35. Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001; 16: 2177–81.
36. Ludwig M, Schöpfer B, Al-Hasani S, Dietrich K. Clinical use of a PN stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* 2000; 15: 325–9.
37. Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002; 17: 1327–33.
38. Stalf T, Herrero J, Mehnert C, Manolopoulos K, Lenhard A, Gips H. Influence of polarization effects and pronuclei on embryo quality and implantation in an IVF program. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 355–62.
39. Demirel LC, Evirgen O, Aydos K, Ünlü C. The impact of the source of spermatozoa used for ICSI on pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2001; 16: 2327–32.
40. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 2003; 18: 1294–8.
41. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence of a cytoplasmic halo at zygote stage but not type and extension of the same has a significant influence on preimplantation development and implantation behavior. *Hum Reprod* 2003; 18: 2406–12.
42. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Hartl J, Tews G. Laser assisted immobilization of spermatozoa prior to intracytoplasmic sperm injection in human. *Hum Reprod* 2001; 16: 2628–31.
43. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997; 12: 1531–6.
44. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998; 13: 182–7.
45. Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001; 76: 1150–6.
46. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 2652–7.
47. Bos-Mikich A, Mattos ALG, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2658–61.
48. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313–8.
49. Lundqvist M, Johansson U, Lundkvist Ö, Milton K, Westin C, Simberg N. Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential? *Reprod Biomed Online* 2001; 2: 12–6.
50. Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002; 17: 407–12.
51. Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003; 18: 821–5.
52. Bahceci M, Ciray N, Ulug U. Transfer of early-cleaved embryos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 219–23.
53. Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Bio Med Online* 2004; 8: 212–8.
54. Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 2003; 80: 341–9.
55. Coskun S, Hellani A, Jaroudi K, Al-Mayman H, Al-Kabra M, Qeba M. Nucleolar precursor distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reprod Biomed Online* 2003; 1: 86–90.
56. Gámiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simón C, Remohí J, Pellicer A. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 2413–9.
57. De Placido G, Wilding M, Strina J, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* 2002; 17: 2402–9.
58. Nagy ZP, Dozortsev D, Diamond M, Rienzi L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril* 2003; 80: 67–74.
59. Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Hsieh AH, Huang HW, Tan PH, Chang SY. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. *Hum Reprod* 2003; 18: 1299–306.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

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](#)