REPRODUKTIONSMEDIZIN

Embryonalentwicklung mit Time Lapse abschätzen

Martin Greuner

Seit der Geburt von Louise Brown am 25. Juli 1978, dem ersten in vitro gezeugten Menschen, ist die Reproduktionsmedizin für Kinderwunschpaare eine Erfolgsgeschichte. Weltweit sind mit dieser Methode mehr als 5 Millionen Kinder zur Welt gekommen. Die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer ist allerdings relativ gering, daher ist es wichtig, Methoden zu entwickeln, um das Entwicklungspotenzial des Embryos abzuschätzen. Hierbei können Time-Lapse-Systeme eine wichtige Rolle spielen.

Das Deutsche IVF-Register (1) registriert alle IVF/ICSI-Behandlungen und zeigte 2013 eine Schwangerschaftsrate von 31 % pro Embryotransfer. Hierbei wurden durchschnittlich 1,9 Embryonen pro Transfer zurückgesetzt. Dies zeigt, dass leider viele Embryonen nicht implantieren. In der Routine erfolgt meist eine mikroskopisch-morphologische Beurteilung der Zellen, um deren Potenzial abzuschätzen. Die Zellteilung der Embryonen ist aber ein dynamischer, kontinuierlicher Prozess. Eine einmalige Beurteilung pro Tag zeigt immer nur eine kurze Momentaufnahme und gibt dem Embryologen relativ wenige Informationen über das wahre Entwicklungspotenzial des Embryos.

Mehrlingsproblematik

Der Transfer von meist zwei Embryonen, um möglichst hohe Schwangerschaftsraten zu erzielen, bringt es mit sich, dass es bei 23,18 % der erfolgreichen Therapien zu Mehrlingen kam (DIR 2013). Diese Mehrlingsrate im Vergleich zur natürlichen Mehrlingsrate von 1,81 % in Deutschland 2013 zeigt deutlich die Problematik des Transfers von mehr als einem Embryo. Mehrlingsschwangerschaften sind mit Fehl- und Frühgeburten, geringem Geburtsgewicht und erhöhtem prä- und perinatalem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko verbunden.

Die Reproduktionsmedizin steht damit in einem Spannungsfeld zwischen dem Erzielen hoher Schwangerschaftsraten einerseits und der Vermeidung riskanter Mehrlingsschwangerschaften andererseits. Es ist daher von großer Bedeutung, Verfahren zu entwickeln, um das Entwicklungspotenzial der Embryonen abzuschätzen, um den Single-Embryo-Transfer (SET) mit hohen Schwangerschaftsraten zu ermöglichen und nur den „richtigen" Embryo zu transferieren.

Time-Lapse-Systeme

Time-Lapse-Systeme sind Systeme, die die Embryonalentwicklung jedes Embryos aufzeichnen. Damit wird der dynamische Prozess dokumentiert, und es ist neben der reinen Morphologie möglich, die Kinetik der Zellteilungen zu erfassen. Man erkennt, wann ein Embryonalstadium erreicht ist und wie lange es andauert.

Time-Lapse-Systeme arbeiten nach zwei verschiedenen Prinzipien. Zum einen sind es Inkubatoren, in die eine oder mehrere Kameras eingebaut werden, die die Embryonalentwicklung dokumentieren. Beispiele hierfür sind das *Embryoscope,* der *Geri* und der *Miri*.

Bei dem System *Geri* gibt es beispielsweise sechs kleine Inkubatoren, wobei in jede Inkubationskammer eine Kamera eingebaut ist. Jede Patientin erhält damit einen eigenen separaten Brutschrank. Somit können mit einem Gerät die Zellen von sechs Patientinnen separat individuell kultiviert werden. Die Zellen werden einmalig in die Kammer gestellt und man muss diese bis zum Embryotransfer nicht mehr öffnen. Die Kulturbedingungen bleiben dabei stabil und durch die Kamera kann die Embryonalentwicklung kontinuierlich verfolgt werden (s. Abb. 1, S. XXX).

Beim zweiten System wird die Kamera in einen ausreichend großen Inkubator gestellt. Damit wird kein neues Inkubationssystem aufgebaut, sondern die Kamera in das bestehende System integriert. Die Dokumentation der Embryonalentwicklung ist dabei ähnlich wie bei dem anderen System. Beispiele hierfür sind die Systeme *Primo Vision* und *Eeva* (s. Abb. 2, S. XXX).

Das Entscheidende ist, dass beide Systeme es ermöglichen, die Dynamik der Zellteilungen zu erfassen, ohne die Zellen aus dem Brutschrank herausnehmen zu müssen. Damit bleiben die Kulturbedingungen bezüglich der Temperatur und der Gasverhältnisse während der gesamten Inkubation konstant. Störende Einflüsse werden minimiert, und es entfällt die tägliche Fotodokumentation, was eine erhebliche Arbeitserleichterung bedeutet.

Auswertungen im Kinderwunschzentrum IVF-Saar Saarbrücken-Kaiserslautern von Dr. Lars Happel zeigen, dass nicht jede Zelle, nicht jeder Embryo entwicklungsfähig ist. Bei den Kinderwunschpatientinnen dieser Praxis, die 2014 im Durchschnitt etwa 35 Jahre alt waren, führte nur jeder 5.–6. Embryo zu einer Schwangerschaft und jeder 7.–8. zu der Geburt eines Kindes. Diese Statistik ist stark altersabhängig, wie Tabelle 1 zeigt (S. XXX).

Diese Auswertung zeigt, dass nicht jeder Embryo entwicklungsfähig ist. Bei einer Kinderwunschtherapie mit-

Abb.1: Time-Lapse-System *Geri*, bestehend aus sechs Inkubationskammern mit jeweils separater Kamera (entspricht jeweils einem kleinem Inkubator für die Zellen einer Patientin).

Abb. 2: Time-Lapse-System *Eeva* mit vier Kameras (1–4), die in den Brutschrank platziert werden. Die kontinuierliche Dokumentation kann am PC beobachtet und von der Software unterstützt bewertet werden.

tels IVF/ICSI ist es das Ziel, möglichst mehrere Eizellen (8–12) zu gewinnen. Hierbei können unterschiedliche Strategien gewählt werden, um allen entwicklungsfähigen Zellen eine Chance zur Implantation zu geben, wie im Folgenden dargestellt wird.

Embryotransfer und Kryokonservierung überzähliger Zellen

Eine Möglichkeit ist, 1–3 Embryonen zu transferieren und die übrigen Zellen im Vorkernstadium einzufrieren. Tritt beim Transfer nach der Eizellgewinnung keine Schwangerschaft ein, kann man in Folgezyklen den eingefrorenen Zellen eine Chance geben. Hierbei werden die Zellen aber dem Stress der Kryokonservierung ausgesetzt.

Der „Deutsche Mittelweg“

Eine andere Möglichkeit ist der „Deutsche Mittelweg“ (2). In Abhängigkeit von der Anamnese der Frau muss der Arzt entscheiden, wie viele Zellen zur Embryonenkultur nötig sind, um 1–3 entwicklungsfähige Embryonen zu erhalten. Der Embryologe muss nun aus diesen Zellen die Entwicklungsfähigen erkennen, um sie für den Embryotransfer auszuwählen.

Die ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) und die Alphascientists (3, 4) haben Zeitpunkte festgelegt, an denen ein Embryo idealerweise das jeweilige Entwicklungsstadium durchlaufen haben sollte. Durch das kontinuierliche Monitoring der Time-Lapse-Systeme ist es jetzt aber auch möglich, genau zu sehen, wie lange jeder Embryo in jedem Stadium verweilt. Besonders die frühen Phasen der Embryonalentwicklungen geben viele Anzeichen für das Entwicklungspotenzial des Embryos (5). Wie lange dauerte die erste Teilung, wie lange verweilte der Embryo als Zwei-, Drei- oder Vierzeller? Die Zeitspanne zwischen dem Zwei- und Vierzeller-Stadium lässt eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit zur Blastozystenbildung und späteren Implantation zu, wie die Literatur bestätigt (s. Abb. 3, S. XXX).

Neben den genauen Zeitpunkten der Zellteilungen wird auch die Art der Zellteilung sichtbar. Chaotische Teilungsmuster deuten hierbei auf ein schlechtes Entwicklungspotenzial hin. Ebenso verhält es sich mit Multinucleation (8), die zu jedem Zeitpunkt erfasst werden kann. Um möglichst viele Informationen zur Auswahl des zu transferierenden Embryos aus den vorhandenen Embryonen zu erhalten, können diese zum Teil bis ins Blastozystenstadium am Tag 5 kultiviert werden.

Verlängerung der Kultur erhöht nicht die Entwicklungsfähigkeit des Embryos

Macht die Blastozystenkultur bis zum Tag 5 den Embryo besser? Das ist zu verneinen, denn die Verlängerung der Kultur macht keinen Embryo entwicklungsfähiger. Sinn macht eine Blastozystenkultur nur dann, wenn aus mehreren Embryonen der bzw. die mit dem höchsten Entwicklungsstadium im Vorfeld nicht ausgewählt werden können. Mit zunehmender Zeit erhält man

Entwicklungsfähigkeit von Embryonen

Alter	Klinische Schwangerschaft	Geborenes Kind
unter 25 Jahre	jeder 4. Embryo	jeder 6. Embryo
25 bis 35 Jahre	jeder 5. Embryo	jeder 7. Embryo
35 bis 40 Jahre	jeder 6. Embryo	jeder 8,5. Embryo
über 40 Jahre	jeder 8,5. Embryo	jeder 12. Embryo

Tab. 1: Darstellung der Anzahl an Embryonen zur Erzielung einer klinischen Schwangerschaft bzw. einer Geburt in Abhängigkeit vom Alter (IVF-Saar Saarbrücken-Kaiserslautern)

3 21.12.2015 16:42:10

mehr Informationen und erkennt, ob überhaupt das Blastozystenstadium erreicht wird.

Der Embryo bzw. die Embryonen verbleiben aber länger außerhalb des Körpers, was auch Risiken mit sich bringt. Bis zum 4-Zellstadium wird der Embryo besonders von maternalen Informationen reguliert. Ab dem 4-8-Zellstadium, das in der Regel am Tag 3 erreicht ist, erfolgt die Expression des embryonischen Genoms (9). Die Bedeutung der Epigenetik (10) nimmt damit zu. Krankheiten wie Prader-Willi-, Beckwith-Wiedemann- und Angelman-Syndrom werden hiermit in Verbindung gebracht.

Für den Fall, dass keine Auswahl aus mehreren Embryonen möglich ist, konnte Markus Montag (11) zeigen, dass die Schwangerschaftsraten mit zunehmender Kulturdauer abnehmen. Aus diesen Gründen ist es erstrebenswert, möglichst früh zu erkennen, welche Embryonen sich später zur Blastozyste entwickeln oder nicht, um den Transfer möglichst nicht erst am Tag 5 durchzuführen. Der Embryotransfer sollte so früh wie möglich und so spät wie nötig erfolgen.

Time-Lapse-Systeme können eine wichtige Rolle spielen, wenn es darum geht, die Dynamik der Zellentwicklung zu erfassen. Die zeitlichen Abläufe sowie Ereignisse, die z. B. in der Nacht ablaufen (Multinucleation und abnormale Zellteilungen) werden sichtbar und lassen erkennen, welche Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit zu keiner Schwangerschaft führen. Es fallen aber auch große Mengen an Daten an, wobei besonders in einem Routinelabor diese Informationsflut das Labor überfordern kann.

Automatische Erfassung von Zellteilungen des Embryos

Die meisten Time-Lapse-Systeme erfassen die Entwicklung des Embryos im Hellfeld. Dies ist auch die Art der

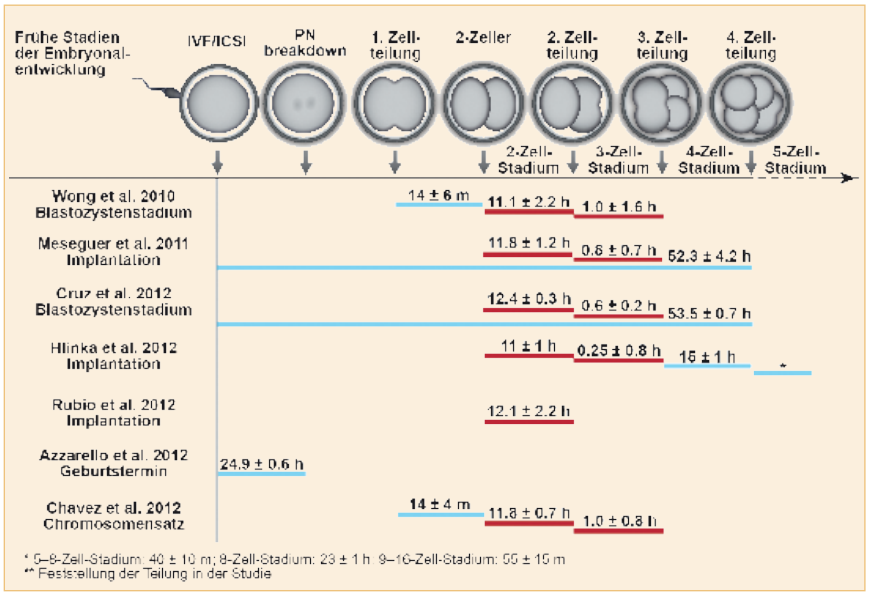

Abb. 3: Literatur zur Vorhersage der weiteren Entwicklung des Embryos zu einem frühen Zeitpunkt der Zellteilungen (6)

Mikroskopie zur morphologischen Routinebeurteilung im IVF-Labor. Das menschliche Auge kann die Zellteilungen erfassen, aber in dieser Art der Darstellung ist es schwer, eine automatische Erfassung durch einen Computer zu ermöglichen.

Das *Eeva*-Time-Lapse-System verfügt über ein Dunkelfeld. Dieses lässt die äußeren Membranen des Embryos deutlicher werden, so dass der Computer diese erfassen kann. Änderungen der Membranen werden aufgezeichnet und damit kann ein Computerprogramm die Entwicklung des Embryos auswerten (12). Eine große Menge an Informationen kann verarbeitet werden, so dass eine Vorauswahl getroffen wird. Damit müssen nicht mehr alle Embryonen vom Embryologen beurteilt werden, sondern nur die, die im Vorfeld eine positive Prognose aufweisen. Die Kombination aus relativ objektiver Beurteilung durch ein Computerprogramm und langjähriger Erfahrung des Embryologen lässt die Wahrscheinlichkeit steigen, wirklich den Embryo mit dem höchsten Entwicklungspotenzial auszuwählen (13). Zudem ist der Punkt der Arbeitsminimierung, dass Zellen mit schlechter Prognose bis zum Tag 3 durch die Software von *Eeva* aussortiert werden, wichtig, damit diese Methode auch in der Routine eingesetzt werden kann.

Ausblick

Der Transfer von nur einem Embryo (SET) ist leider in Deutschland noch nicht die Routine. Die Tatsache, dass 2013 im Durchschnitt 1,9 Embryonen transferiert wurden, begründet die relativ hohe Mehrlingsrate von 23,18 %. Es ist verständlich, besonders durch die Kostensituation der IVF in Deutschland, dass die Patienten auf einen Transfer von zwei Embryonen drängen, um ihre Chance auf eine Schwangerschaft möglichst zu erhöhen. Wenn es möglich wird, das Potenzial der Zellen besser abzuschätzen, wird es hoffentlich in Zukunft nicht mehr nötig sein, mehr als einen Embryo zu transferieren bei gleichbleibenden Schwangerschaftsraten.

Zusammenfassung

Time-Lapse-Systeme können die Zellentwicklung von Embryonen dokumentieren. Dabei werden die Embryonen nicht besser, aber es wird die Dynamik und Kinetik der Embryonalentwicklung erfasst. Abnormale Zellteilungen, Multinucleation und Fragmentationen der Zellentwicklung werden erkannt und helfen möglichst

ohne verlängerte Kultur bis zur Blastozyste, den einen Embryo mit dem höchsten Entwicklungspotenzial auszuwählen. Dies sollte zu hohen Schwangerschaftsraten bei niedriger Mehrlingsrate führen.

Literatur

1. Deutsches IVF-Register: Jahrbuch 2013, DGGG 2013.
2. Frommel M: Deutscher Mittelweg in der Anwendung des Embryonenschutzgesetzes (ESchG) mit einer an den aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand orientierten Auslegung der für die Reproduktionsmedizin zentralen Vorschrift des § 1, Abs. 1, Nr. 5 ESchG. In: Journal Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2007;4(1):27-33.
3. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology: The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Human Reproduction 2011;0:0:1-14.
4. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group Embryology: Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Reproductive BioMedicine online 2011;22:632-646.
5. Althayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S: Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. Fertil Steril 2014; 101(6):1637-1648.
6. Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S: Biomarkers identified with time lapse imaging: discovery, validation and practical application. Fertil Steril 2013;99(4):1035-1043.
7. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M: Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. Reprod BioMed Online 2012;25(4):371-381.
8. Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G and Gerris J: Multinucleation in cleavage stage embryos. Hum Reprod 2003;18(5):1062-1069.
9. Braude P, Bolton V, Moore S: Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. Nature 1988:332(6163):-459-461.
10. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher D, Roifman M, Weksberg R: Basic concepts of epigenetics. Fertil Steril 2013:99(3):607-615.
11. Montag M, van der Ven K, Dorn C, van der Ven H: Extended embryo culture reduces the implantation rate on day 4 and day 5 when only a maximum of three embryos are cultured beyond the pronuclear stage. Eur J Obst Gynecol Reprod Biol 2006;124(1):65-69.
12. Wong CC, Loewke KF, Bossert NC, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera R: Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyste stage. Nat Biotechnol 2010:28(10):1115-1121.
13. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharia M, Loewke KE, Shen S: Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. Fertil Steril 2013;100:412-419.

Autor

Dr. rer. medic.
Martin Greuner
Clinical Senior Embryologist
Gemeinschaftspraxis Happel/
Giebel/Tauchert/von Blohn
IVF-SAAR Saarbücken-Kaiserslautern
Europaallee 15
66113 Saarbrücken