

Reproduktionsmedizin

Polkörperdiagnostik – Eine Alternative zur verbotenen Präimplantationsdiagnostik?

G. Griesinger, K. Diedrich

Die Polkörperdiagnostik kann sowohl zum Ausschluss maternal vererbter monogener Erkrankungen oder struktureller Chromosomendefekte als auch zur Diagnostik von numerischen Chromosomenfehlverteilungen der Eizelle verwendet werden. Die Polkörperdiagnostik ist, im Gegensatz zu einer genetischen Untersuchung des Embryos im Sinne der Präimplantationsdiagnostik, nach dem deutschen Embryonenschutzgesetz zulässig. Im internationalen Vergleich bevorzugt die Mehrzahl der Arbeitsgruppen jedoch die genetische Diagnostik an Zellen des Embryos.



Dr. G. Griesinger, Lübeck

Im Rahmen der extrakorporalen Befruchtung können Zellen des Embryos (Präimplantationsdiagnostik, PID) oder die Polkörper der unbeeinträchtigten, imprägnierten Eizelle (Präfertilisationsdiagnostik oder Polkörperdiagnostik, PKD) zur genetischen Testung verwendet werden. Im Wesentlichen existieren dazu zwei Indikationen: Erstens wird die PID und PKD verwendet, um bei einem Paar mit Anlage zur Vererbung einer bestimmten genetischen Erkrankung eine Schwangerschaft in großer Gewissheit herbeizuführen, dass das werdende Kind von dieser Erbkrankheit nicht betroffen ist. Zweitens wird die PID und PKD als Screening-Methode zur Erkennung von Chromosomenfehlverteilungen eingesetzt, mit dem Ziel die Effizienz der IVF-Therapie zu steigern. In Deutschland ist nach dem deutschen Embryonenschutzgesetz lediglich die PKD zulässig, die noch vor Verschmelzung des mütterlichen und väterlichen Vorkernes abgeschlossen sein muss. Dies stellt Reproduktionsmediziner, Biologen und Humangenetiker vor große logistische und technische Herausforderungen. Darüber hinaus ist die PKD im Vergleich zur PID mit einer Reihe von der Methode immanenten Nachteilen verbunden.

Biopsie von Eizelle und Embryo

Die Polkörper (PK) sind ein Nebenprodukt der Reifeteilung der Eizelle. Nach der ersten Reifeteilung wird der erste PK ausgestoßen, rund 3–4 Stunden nach Imprägnierung der Eizelle der zweite. Nach gegenwärtigem Wissenstand sind die PK für eine weitere embryonale Entwicklung ohne Bedeutung und degenerieren rasch.

Die Eröffnung der Zona pellucida (ZP) für die Entnahme der PK aus dem perivitellinen Raum kann mechanisch, chemisch oder per Laser erfolgen. Die größten Fallzahlen liegen für die mechanische Eröffnung der ZP vor. Dazu wird die Eizelle mit einer Haltekapillare im Mikromanipulator fixiert, die Zona mittels einer geschliffenen Glaspipette angebohrt und der PK dann durch das entstandene Loch mittels einer Saugpipette entnommen. Die chemische Eröffnung der Zona durch Ätzung mittels Säure wurde wegen schlechter Ergebnisse frühzeitig verlassen. In Deutschland wird die Eröffnung der Zona pellucida durch Laserung favorisiert, die im Wesentlichen von der Bonner Arbeitsgruppe etabliert wurde. Nach den limitierten, vorliegenden Daten ist davon auszugehen, dass die laserinduzierte und die mechanische Eröffnung der Zona gleichwertige Ergebnisse liefern. Eine Risikoerhöhung durch eine der beiden Methoden für Schwangerschaftsverlauf oder das Neugeborene ist nach den vorliegenden Daten nicht ableitbar.

Die Biopsie des Embryos zur Entnahme von einer oder zwei Blastomeren kann

nach chemischer oder laserinduzierter Eröffnung der Zona pellucida erfolgen. Die mechanische Zonaeröffnung ist nur von untergeordneter Bedeutung.

Problemstellungen der Polkörper- und Embryobiopsie

Bei untraumatischer Entfernung beider Polkörper ist mit keiner Einschränkung der Fertilisationsrate, der Teilungsrate und der Blastozystenbildung zu rechnen.

Die PKD kann am ersten wie auch am ersten und zweiten PK durchgeführt werden; im Sinne der Sensitivität und Spezifität der PKD ist die Testung beider PK von Vorteil. Die Entnahme beider Polkörper kann entweder sequenziell mit einem Zeitabstand von wenigen Stunden oder simultan erfolgen. Nachteilig an der sequenziellen Entnahme ist, dass die PK-Biopsie mit einem insgesamt höheren Zeitaufwand verbunden ist. Außerdem muss die Eizelle zweimalig für einige Minuten aus den optimalen Bedingungen des Inkubators entfernt werden. Bei Entfernung des zweiten PK ist darauf zu achten, dass dieser sich schon vollständig von der Eizelle getrennt hat und nicht noch Zytoplasmabrücken bestehen, da ansonsten einerseits die Eizelle durch die Absaugung des PK traumatisiert werden kann und andererseits durch Mitentfernung von noch bestehenden Spindelfaserresten iatrogene Chromosomenfehlverteilungen (Monosomien) möglicherweise verursacht werden können.

Bei simultaner Entnahme beider PK befindet sich der erste PK oft schon in einem fortgeschrittenen Stadium der Degeneration und ist für die genetische Diagnostik nur noch eingeschränkt verwendbar. Insgesamt gibt es heute noch kein standar-

disiertes Vorgehen zur PK-Biopsie und verschiedene Arbeitsgruppen bevorzugen in Abhängigkeit vom Erfahrungshintergrund verschiedene Vorgehensweisen.

Zur Entnahme von Zellen des Embryos gilt heute der Tag 3 der embryonalen Entwicklung (der Embryo besteht zu diesem Zeitpunkt aus bis zu 10 Blastomeren) als optimaler Zeitpunkt, wobei die individuelle Entwicklungsgeschwindigkeit des einzelnen Embryos berücksichtigt werden sollte. Die weitere in-vitro Entwicklung des Embryos in das Stadium der Blastozyste wird durch Biopsie am Tag 3 nicht beeinträchtigt. Wird die Biopsie zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt, also im Vier-Zellstadium, kann die weitere Entwicklung des Embryos gestört werden. Gleiches gilt für eine spätere Entnahme, da dann einzelne Blastomeren nur erschwert aus dem Zellverband des „Kompaktionsstadiums“ des Embryos gelöst werden können.

Zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit werden heute häufig 2 Blastomeren entnommen. Die Entnahme erfolgt simultan und ist dementsprechend mit vergleichsweise geringerem Arbeitsaufwand verbunden. Allerdings gibt es auch erste Hinweise, dass das Implantationspotenzial nach Entnahme von 2 Zellen geringer ist als nach Entnahme von einer Zelle – im Besonderen wenn die Embryobiopsie frühzeitig durchgeführt und damit ein signifikanter Anteil der Zellmasse des Embryos entfernt wird. Für monogene Erkrankungen wird im Regelfall dennoch die Entnahme von 2 Blastomeren favorisiert, da die diagnostische Sicherheit vorrangig ist und üblicherweise das Verfahren bei normal fertilen Paaren mit guter Prognose durchgeführt wird.

Einsatz der PKD

Die PKD kann zur Detektion von numerischen Chromosomenfehlverteilungen, monogenen Erkrankungen, Translokationen, X-chromosomal vererbten Erkrankungen, wie auch zur HLA-Typisierung eingesetzt werden. Die wesentlichen Limitierungen der PKD ergeben sich daraus, dass jeweils nur das mütterliche Ge-

nom untersucht werden kann und dass lediglich eine indirekte Aussage über den genetischen Status der Eizelle getroffen werden kann.

Für monogene Erkrankungen schränkt dies den Einsatz der PKD auf X-chromosomale, autosomal-rezessive sowie maternal vererbte autosomal-dominante Erkrankungen ein. Bei autosomal-rezessiver Vererbung kann nur die Homozygotie für ein Allel im späteren Embryo durch PKD ausgeschlossen werden, nicht jedoch die Heterozygotie und damit Anlageträgerschaft für die Erkrankung bei dem resultierenden Kind. Dies bedeutet jedoch auch, dass eine hohe Zahl an Eizellen verworfen werden muss, auch wenn eine Heterozygotie des Embryos als akzeptabel betrachtet würde.

Die Rationale der Aneuploidie-Diagnostik am Polkörper basiert auf der Beobachtung, dass die Mehrzahl der autosomalen, numerischen Aneuploidien durch Fehlverteilungen der Chromosomen in der Meiose der Eizelle begründet sind. Jedoch auch hier gilt, dass paternal begründete Aneuploidien, wenngleich diese auch seltener auftreten dürften, nicht detektiert werden können. Ebenso können Chromosomenfehlverteilungen, die in einer der mitotischen Zellteilungen nach Fertilisierung der Eizellen entstehen, nicht erfasst werden.

Nachteile der PKD

Die Untersuchung der Polkörper ist nur eine indirekte Methode der Untersuchung des genetischen Status der Eizelle.

Die PKD untersucht nur das mütterliche Genom.

Eine Geschlechtsbestimmung mittels PKD ist dementsprechend nicht möglich.

Die PKD sollte an beiden Polkörpern durchgeführt werden. Dies ist technisch und logistisch aufwendig.

FISH-Sonden, die zur Aneuploidie-Diagnostik verwendet werden, haben eine geringere Bindungseffizienz in Polkörpern im Vergleich zu Blastomeren.

Bei der Aneuploidie-Diagnostik mittels FISH können Fehldiagnosen durch eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden im ersten Polkörper verursacht werden.

Bei der PKD für monogene Erkrankungen können Fehldiagnosen durch den Austausch homologer Chromosomenabschnitte („crossing-over“) in der Meiose I für den untersuchten Genbereich begründet werden. Dieses Risiko muss minimiert werden, was den Aufwand der genetischen Diagnostik erhöht.

Nach PKD für autosomal-rezessive oder X-chromosomal-rezessive Erkrankungen ist eine hohe Anzahl an Eizellen nicht für die Befruchtung geeignet, besonders dann, wenn nur der erste Polkörper untersucht werden kann.

Bei rezessiven Erkrankungen ist eine Information durch PKD, ob der resultierende Embryo Anlageträger der untersuchten Erkrankung sein wird oder nicht, prinzipiell nicht möglich.

Vorteile der PKD

Die PKD gilt als weniger invasiv.

Bei der Aneuploidiediagnostik am Embryo können Fehldiagnosen durch ein chromosomales Mosaik des Embryos verursacht werden. Diese Quelle der Fehldiagnose entfällt bei der Polkörperdiagnostik.

Die PKD gilt als ethisch eher akzeptabel, da keine Verwerfung von Embryonen erfolgen muss.

Fazit

Die PKD ist mit einer Reihe von Nachteilen im Vergleich zur genetischen Untersuchung von Embryonen verbunden. Zusätzlich erschweren die Einschränkungen des Embryonenschutzgesetzes die klinische Anwendung der Methode.

Im Falle einer molekulargenetischen Diagnostik für monogene Erkrankungen ist die PKD an beiden PK im engen zeitlichen Rahmen des Embryonenschutzgesetzes

häufig nicht zu bewerkstelligen. Während in den Ländern, in denen Embryonenauswahl erlaubt ist, das Zeitlimit für die genetische Diagnostik das Erreichen des Blastozystenstadiums der Embryonen darstellt, müssen in Deutschland die Ergebnisse der PKD bereits innerhalb von 7–11 Stunden vorliegen. Im Ausland wird dementsprechend als weiterer Vorteil der PKD angeführt, dass eine längere Zeit für die diagnostische Untersuchung der Zellen zur Verfügung steht als nach Biopsie von Blastomeren am Tag 3 der In-vitro-Kultur.

Auch im Falle einer FISH(Aneuploidie)-Diagnostik könnte die Zahl der untersuchten Chromosomen gesteigert werden, wenn mehr Zeit für die Diagnostik zur Verfügung stünde. Dies wäre eine Voraussetzung, um die postulierten klinischen Effekte der Aneuploidie-Diagnostik maximieren zu können.

Zusammenfassend für Deutschland ist die PKD im Vergleich zur PID als Notlösung zu betrachten. Die PKD ist aber nicht per se Methode der zweiten Wahl, sondern kann sinnvoll mit der PID kombiniert werden oder dann eingesetzt werden, wenn besonders zeitaufwändige genetische Untersuchungsmethoden zur Anwendung kommen.

Literatur bei den Autoren

*Dr. Georg Griesinger
Klinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe
Universitätsklinikum SH, Campus Lübeck
E-Mail: Georg.Griesinger@
frauenklinik.uni-luebeck.de*