

INTRODUCTIE

De eerste 10 weken van de zwangerschap zijn essentieel voor het zich ontwikkelende embryo: abnormale groei en/of ontwikkeling zal naar alle waarschijnlijkheid gevolgen hebben voor de foetale groei in het 2e en 3e trimester en voor de gezondheid van de pasgeborene. Het is daarom van groot belang om de processen die plaatsvinden gedurende de humane embryogenese goed te definiëren en inzichtelijk te maken. Snelle detectie van problemen bij deze processen zijn belangrijk voor vroege detectie van afwijkingen, bijvoorbeeld in het geval van herhaalde miskramen en bij chromosoomafwijkingen.

Het is echter verbazend dat de klassieke beschrijving van de normale embryonale groei grotendeels gebaseerd is op informatie gebaseerd op abnormale zwangerschappen, zoals miskramen en ectopische zwangerschappen. Voor humane embryo's wordt gebruik gemaakt van het Carnegie Staging Systeem. Stageringsystemen zijn gebaseerd op morfologische ontwikkelingsstadia en hierdoor niet direct afhankelijk van bijvoorbeeld leeftijd of lengte. Het Carnegie Systeem is gebaseerd op zowel interne als externe fysieke karakteristieken van het embryo en is genummerd van 1 tot en met 23. Bij stadium 23 zijn alle interne orgaansystemen aangelegd en is daarom beschreven als het einde van de embryonale periode.

Om echter embryogenese *in vivo* te bestuderen zijn andere technieken nodig. In 1957 werd voor het eerst een foetus zichtbaar gemaakt met echoscopie door Ian Donald. Embryonale groei werd in een curve geplaatst door Robinson in 1975, waarbij hij gebruik maakte van de kop-stuit lengte (CRL). Nog steeds is het meten van de CRL een standaard onderdeel van echoscopisch onderzoek in het eerste trimester. De driedimensionale (3D) echoscopie werd geïntroduceerd in het begin van de jaren '80. Tegenwoordig is de toegevoegde waarde van deze techniek voor het beoordelen van foetale afwijkingen, vooral aan gezicht, ledematen, thorax en wervelkolom onomstreden. Het embryo kan door deze techniek ook zeer goed in beeld worden gebracht. Echter, hoewel 3D echoscopie in naam drie dimensies heeft, worden de beelden bekeken vanaf tweedimensionale (2D) media, namelijk papier of een computerscherm. De derde dimensie, diepte, gaat dus feitelijk weer verloren.

DE I-SPACE VIRTUAL REALITY SYSTEEM

Dit diepteverlies kan ondervangen worden door de toevoeging van een stereoscopisch beeldtechniek. Op 24 maart 2005 werd op de afdeling Bioinformatica van het Erasmus MC in Rotterdam de BARCO I-Space officieel geopend. De I-Space is gebaseerd op een 3D projectietechniek, waarbij verschillende beelden voor het linker- en rechteroog geprojecteerd worden. De hersenen zijn in staat om uit deze twee 'platte' beelden een beeld met diepte te vormen. De I-Space bestaat uit 8 projectoren, geplaatst achter 4 projectiewanden. Deze projectiewanden zijn de drie muren en vloer van een kleine kamer, die aan de voorkant open is. Op iedere wand wordt door twee projectoren twee verschillende beelden geprojecteerd. Een speciaal voor dit systeem ontwikkelde volume rendering applicatie (CAVORE / V-Scope) wordt gebruikt om een 'hologram' te creëren van het te onderzoeken volume. Dit kunnen 3D echobeelden zijn, maar ook CT, MRI of PET scans. Bij binnenkomst krijgt de toeschouwer een bril met gepolariseerde glazen. Het linker- en rechteroog van de gebruiker zien niet hetzelfde beeld op de wanden en vloer, maar beelden die precies zo van elkaar verschillen dat het lijkt of het object driedimensionaal is en als hologram in de ruimte zweeft. Het hologram kan worden gemanipuleerd door een virtuele 'pointer', gekoppeld aan een draadloze joystick en kan qua grootte, oriëntatie, helderheid en transparantie worden aangepast. Ook kunnen willekeurige delen 'weggesneden' worden, zodat in het volume gekeken kan worden. Het grote voordeel voor de onderzoeker is, dat deze precies ziet wat hij of zij doet, in het juiste perspectief. Het bewerken van het beeld gaat dus op een heel natuurlijke manier. Ook kunnen meerdere mensen tegelijk de beelden bekijken in de I-Space, waardoor het ook voor onderwijsdoeleinden zeer geschikt is.

In dit proefschrift wordt het gebruik van de I-Space geëvalueerd bij het beoordelen van humane embryonale groei en ontwikkeling. De volgende onderzoeksdoelen werden gedefinieerd:

1. De reproduceerbaarheid van embryonale biometrie metingen en volumemetingen vaststellen gebruik makend van deze nieuwe techniek.
2. Kennis van embryogenese *in vivo* verbeteren door gebruik te maken van een stageringssysteem waarbij zowel gelet wordt op morfologie als op biometrie.

3. Het opstellen van normatieve data gerelateerd aan zwangerschapsduur voor zowel standaard embryonale biometrie metingen als voor nieuwe, niet-standaard biometrie metingen.
4. De toepasbaarheid van deze techniek beoordelen bij embryonale en foetale afwijkingen.

De reproduceerbaarheid van metingen verricht in de I-Space (**part 2**) werd vastgesteld in 2 verschillende studies.

De eerste studie (**chapter 2.1**) beschrijft de betrouwbaarheid van diverse 3D metingen vroeg in de zwangerschap. Hiervoor werden 28 zwangerschappen met zwangerschapsduren tussen de 6 en 14 weken geïnccludeerd. Er werden 3D volumes gemaakt en de volgende metingen werden bepaald: de dooierzakdiameter (YS), de kop-stuit lengte (CRL), de biparietale diameter (BPD), de hoofdomtrek (HC) en de buikomtrek (AC). De 3D datasets werden vervolgens naar de I-Space getransporteerd. Hier werden dezelfde metingen verricht. Alle metingen werden driemaal verricht, waarbij het gemiddelde werd gebruikt om te vergelijken. Om de intra-onderzoeker variabiliteit te bepalen werden alle metingen 2x verricht door 1 onderzoeker. Voor de inter-onderzoeker variabiliteit werden alle metingen ook nog verricht door een andere onderzoeker. Vervolgens werden intraclass correlatie coëfficiënten (ICC) bepaald, waarbij een ICC waarde $> 0,90$ betekent dat er sprake is van een goede overeenstemming. Wanneer de 3D metingen vergeleken werden met de I-Space metingen bleek voor alle parameters de ICC groter te zijn dan $0,97$. De intra- en interonderzoeker variabiliteit waren $> 0,96$ voor de 3D metingen en $> 0,98$ voor de I-Space metingen. Hieruit kan geconcludeerd worden metingen met de I-Space Virtual Reality techniek in de vroege zwangerschap betrouwbaar is en minimaal even goed is als de bestaande 2D en 3D meettechnieken.

De tweede studie (**chapter 2.2**) onderzoekt de betrouwbaarheid en nauwkeurigheid van 4 verschillende volume meetmethoden. Hedendaagse echoscopische apparatuur biedt diverse mogelijkheden om volumes te bepalen. In deze studie wordt gekeken naar de volgende technieken:

- VOCAL: een volume meet algoritme wat gebruik maakt van 2D segmentatie rondom een centrale roterende as. Het aantal stappen waarmee om de as gedraaid

wordt kan door de onderzoeker bepaald worden. De computer software berekend het volume op 2 manieren ofwel automatisch ofwel nadat de onderzoeker handmatig in de verschillende vlakken het volume heeft aangegeven.

- Inversion Mode: een segmentatie algoritme waarbij enkel volumes bepaald kunnen worden van hypo-echoische structuren. De grijswaarde van de verschillende voxels bepaald het uiteindelijke volume, waarbij de drempelwaarde voor de grijswaarde door de onderzoeker kan worden ingesteld.
- SonoAVC: dit algoritme identificeert en kwantificeert hypo-echoische regionen binnen een 3D dataset en geeft een automatische schatting van het volume.
- V-Scope: volume rendering applicatie binnen de I-Space. Het segmentatie algoritme groeit vanuit een punt binnen het te onderzoeken volume tot het een vooraf bepaalde drempelwaarde bereikt.

Bij deze studie werd gekozen voor een *in vitro* opzet en een *in vivo* opzet. Voor het *in vitro* gedeelte werden met water gevulde ballonnen in een testreservoir geplaatst, waarna 3D volumes bepaald werden. Vervolgens werd het vooraf vastgestelde volume vergeleken met de volumes die berekend werden door de verschillende technieken. Hierbij bleek SonoAVC standaard te kleine volumes te meten, terwijl de andere methoden ongeveer gelijkwaardig waren. Intra- en inter-onderzoeker variabiliteit waren goed voor alle technieken. Het *in vivo* gedeelte maakte gebruik van de dooierzakken van 24 zwangerschappen met een gemiddelde zwangerschapsduur van 9 weken (spreiding 6-11 weken). Hierbij bleek de ICC waarde voor alle technieken $> 0,91$ te zijn. V-Scope en VOCAL hadden de beste ICC met het kleinste betrouwbaarheidsinterval. Hieruit kunnen we concluderen dat van de 4 technieken alleen SonoAVC niet in alle gevallen nauwkeurige en betrouwbare volumes kon meten. De nieuw geïntroduceerde V-Scope applicatie bleek accuraat en betrouwbaar.

In **part 3** van dit proefschrift beschrijven we hoe kennis van embryogenese *in vivo* toe kan nemen door gebruik te maken van een stageringsysteem. In deze studie werd van embryo's gevisualiseerd in de I-Space, het Carnegie Stadium bepaald. Hierbij werd gebruik gemaakt van 19 IVF/ICSI zwangerschappen met zwangerschapsduren tussen de 7 en 10 weken. In totaal werden 48 3D volumes beoordeeld. De embryo's werden gestagieerd op basis van enkel externe morfologische kenmerken waarbij de nadruk lag op de ledemaatontwikkeling. Na het stageren werd de kop-stuitlengte

(CRL) gemeten. Het stadium en de lengte werd vervolgens vergeleken met de leeftijd gebaseerd op de punctiedatum en met de klassieke data uit de embryologie literatuur over de Carnegie collectie. De resultaten lieten zien dat het relatief eenvoudig was om de embryo's te stageren: door de diepteperceptie in de I-Space gaat het bepalen van de positie en locatie van bijvoorbeeld de armen zeer natuurlijk. De bepaalde stadia bleken goed te corresponderen met de gemeten lengte. Echter, wanneer de leeftijd gebaseerd op de punctiedatum vergeleken werd met de leeftijd in de embryologieliteratuur voor de verschillende stadia bleek in 28 van de 48 gevallen het embryo voor te lopen in leeftijd. Het stadium werd dus eerder bereikt dan voorheen beschreven. Hier zijn meerdere verklaringen voor te bedenken. De studiepopulatie bestond uit IVF/ICSI zwangerschappen, waarbij eraan kan worden getwijfeld of deze zwangerschappen in alle opzichten als normaal kunnen worden beschouwd. Ook wordt in deze studie enkel naar externe morfologie gekeken. Echter, een andere verklaring zou kunnen zijn dat de Carnegie collectie bestaat uit embryo's na miskramen en ectopische zwangerschappen, welke dus niet volledig normaal hoeven te zijn. Tevens was de zwangerschapsduur (leeftijd) gebaseerd was op menstruatiedata, hetgeen ook niet volledig betrouwbaar is. Concluderend kan gesteld worden dat met behulp van de I-Space groei en ontwikkeling gedurende de embryogenese goed kan worden gevolgd. Door lengtemetingen te combineren met een stageringssysteem als het Carnegie systeem wordt een beter en completer beeld gekregen van het zich ontwikkelende embryo.

In **part 4** worden normatieve data in relatie tot zwangerschapsduur gepresenteerd voor verschillende biometrie metingen.

In de studie in **chapter 4.1** werden in een longitudinale studieopzet 3D metingen verricht bij 32 zwangerschappen met zwangerschapsduren tussen de 6 en 14 weken. In totaal werden 125 3D volumes geanalyseerd in de I-Space. Er werden groeicurven gemaakt van de volgende parameters: kop-stuitlengte (CRL), biparietale diameter (BPD), hoofdomtrek (HC), buikomtrek (AC), lengte van de arm, breedte van de schouder, breedte van de elleboog, breedte van de heupen en breedte van de knieën. De CRL, BPD en HC kon in meer dan 96% van alle patiënten gemeten worden. De AC in 78%. De breedte van schouder, elleboog, heup en knie in meer dan 95% en de lengte van de arm in 82%. De CRL curve werd vergeleken met de als eerste ter wereld gepubliceerde curve van Robinson en Fleming uit 1975 en deze bleek vrijwel identiek

te zijn. Geconcludeerd kan worden dat, met behulp van een innovatieve techniek als de I-Space, het opstellen van groeicurven van zowel bestaande parameters als nog niet eerder gemeten structuren goed haalbaar is. Door de diepteperceptie is het mogelijk om metingen te verrichten in drie dimensies, waardoor een beter totaalbeeld ontstaat van de groei en ontwikkeling van het embryo in het eerste trimester.

In **chapter 4.2** is dezelfde studipopulatie gebruikt als in **chapter 4.1**. Nu zijn echter metingen verricht van de lengte van de navelstreng, de lengte van de ductus vitellinus en de breedte van deze structuren bij de verschillende aanhechtingpunten. Ook is gekeken hoe de positie veranderd van de dooierzak ten opzichte van het embryo in het verloop van de tijd. Lengtemetingen van de navelstreng en ductus vitellinus kunnen alleen verricht worden wanneer van 3 dimensies gebruik gemaakt kan worden. In de I-Space kan gebruik gemaakt worden van een 'tracing-functie', waardoor ook structuren die erg gekronkeld zijn gemeten kunnen worden. De lengte van de navelstreng bleek in 55% te meten en bleek een nauwe relatie te vertonen met de zwangerschapsduur. De lengte van de ductus vitellinus kon gemeten worden in 42%. Er bleek geen relatie te zijn tussen de lengte van deze structuur en de zwangerschapsduur. Wanneer naar de positie van de dooierzak gekeken werd ten opzichte van het embryo bleek dat de dooierzak zich steeds verplaatst. Er leek geen sprake te zijn van een vaste richting. Wel kan hieruit geconcludeerd worden dat er 'iets' moet bewegen, bij een zwangerschapsduur waarbij in principe slechts zeer geringe bewegingen beschreven zijn. De navelstreng is vaak bestudeerd, maar doordat lengte voorheen niet meetbaar was gedurende de zwangerschap is ook nog niet vastgesteld of er een relatie is tussen de lengte van de navelstreng en bijvoorbeeld zwangerschapsuitkomst. Hetzelfde geldt voor de ductus vitellinus. Echter, aangezien deze structuren het embryo verbinden met de structuren waaruit zij voeding ontvangen (eerst de dooierzak, dan de placenta) lijkt het niet meer dan logisch dat ook deze structuren essentieel zijn voor de groei en ontwikkeling van het embryo.

In **part 5** wordt geëvalueerd wat de toepasbaarheid van deze nieuwe techniek is bij embryonale en foetale afwijkingen.

Chapter 5.1 beschrijft een casus van een tot de placenta beperkte trisomie 16 mozaïek. De patiënte werd reeds vanaf de 5^e week van de zwangerschap echoscopisch gezien

en ondanks een zekere termijn bleek de groei en ontwikkeling al zeer vroeg achter te lopen. Omdat bij de 10^e week sprake bleek van een verdikte nekplooi (2.9mm) en de PAPP-A waarde extreem laag was, werd een vlokcentest en vervolgens een vruchtwaterpunctie verricht. De uitslagen toonden een normaal vrouwelijk karyogram, maar in de placenta bleek een mozaïek trisomie 16 aanwezig. De zwangerschap werd nauwkeurig vervolgd. Hoewel de groei steeds onder de p2.5 bleef waren verder geen aanwijzingen voor congenitale afwijkingen. De bevalling werd ingeleid op basis van een door de zwangerschap geïnduceerde hypertensie. Bij 37 weken zwangerschapsduur werd een meisje geboren met een geboortegewicht van 2010 gram (< p2.5). In het volgende jaar klom haar groei naar het 50^e percentiel in de eerste 2 maanden en was er sprake van een normale ontwikkeling. Deze casus is bijzonder omdat niet eerder werd beschreven dat de groei al zo vroeg vertraagd kan zijn bij een trisomie 16 mozaïek in de placenta. Ook was niet eerder een relatie gelegd tussen een lage PAPP-A waarde en deze diagnose. Tevens werd duidelijk dat het enkel meten van de CRL er mogelijk toe kan leiden dat een eventuele groeivertraging niet ontdekt wordt doordat op basis van de CRL de zwangerschapstermijn bijgesteld wordt. Het belang van het bestuderen van embryogenese in verband met de gevolgen van eventuele afwijkingen gedurende deze periode voor het verdere verloop van de zwangerschap wordt door deze casus geïllustreerd. De I-Space heeft toegevoegde waarde doordat het deze embryogenese al vanaf vroeg in de zwangerschap duidelijk zichtbaar maakt.

In **chapter 5.2** wordt de I-Space gebruikt bij het evalueren van 4 patiënten waarbij echoscopisch werd vastgesteld dat er mogelijk sprake was van een ambigu genitaal. Deze diagnose was met 2D en 3D echoscopie gesteld, maar in alle gevallen bleef er onduidelijkheid over de precieze afwijking. De 3D echobeelden werden beoordeeld in de I-Space en gekeken werd of in de I-Space bepaald kon worden of het genitaal mannelijk, vrouwelijk dan wel ambigu was. De I-Space diagnose werd vergeleken met de 2D, 3D en post-partum diagnose. In alle 4 casus bleek de I-Space diagnose correct. In 3 casus bleek sprake van een vrouwelijk genitaal, waarbij 1 patiënt met een normaal vrouwelijk genitaal bij een XY karyogram. In 1 casus bleek sprake van een ambigu genitaal. In de I-Space was niet vast te stellen wat de afwijking precies inhield, maar dit bleek ook post-partum zeer moeizaam. Het meest opvallend was, dat in 2 casus op 2D echoscopie de diagnose ambigu genitaal was gesteld, met 3D

echoscopie sprake leek van hypertrofie van de clitoris, terwijl zowel in de I-Space als post-partum een normaal vrouwelijk genitaal werd gezien. Wel werd in de I-Space vastgesteld dat de labia minora wat vergroot leken, echter normaal passend bij de zwangerschapsduur. De I-Space heeft dus toegevoegde waarde bij het beoordelen van congenitale afwijkingen waarbij diepteperceptie helpt bij het inschatten van de positie en grootte van de verschillende structuren.

CONCLUSIES

In dit proefschrift wordt gebruik gemaakt van een innovatieve beeldvormende techniek bij het bestuderen van normale humane embryonale groei en ontwikkeling. De I-Space Virtual Reality systeem is uniek in zijn vermogen de derde dimensie zichtbaar te maken en om metingen te kunnen verrichten in deze derde dimensie. Aangezien de metingen betrouwbaar uitgevoerd blijken te kunnen worden konden nieuwe biometrie groeicurven werden opgesteld van zowel al bekende parameters als van metingen aan structuren die voorheen niet meetbaar waren met gangbare echoscopische technieken. Ook kunnen in de I-Space morfologische kenmerken als ledemaatontwikkeling duidelijk zichtbaar gemaakt worden, waardoor een stageringsysteem als het Carnegie systeem ook *in vivo* kan worden toegepast. Al deze mogelijkheden leiden ertoe dat er een completer beeld ontstaat van de groei en ontwikkeling van een embryo in het eerste trimester. Dit kan als basis dienen voor het vaststellen wat normaal is en wat abnormale groei is, waardoor de implicaties hiervan voor het verdere verloop van de zwangerschap eerder duidelijk zullen worden. Een volgende stap zal zijn om volumes te bepalen van het totale embryo, waarbij wederom vastgesteld dient te worden wat normaal is en wat niet.

Het Erasmus MC is voor zover wij weten het enige centrum ter wereld wat gebruik maakt van een dergelijk systeem voor het bestuderen van medisch beeldmateriaal. De versie zoals gebruikt in deze studie, waarbij een volledige kamer gebruikt wordt, kan echter gereduceerd worden tot een desktop applicatie, waardoor in principe elke dokter medisch 3D beeldmateriaal op zijn eigen bureau in alle drie de dimensies kan beoordelen. Dit zal het counselen van de patiënt een stap verder brengen, omdat

bijvoorbeeld embryonale en foetale anatomie ook voor niet-medici dan zeer duidelijk zichtbaar is.

De I-Space biedt in zijn huidige vorm een opzienbarende, nieuwe manier om de groei en ontwikkeling van embryogenese te bestuderen. Dit zal uiteindelijk leiden tot een verschuiving van prenatale diagnostiek in vooral het 2^e en 3^e trimester van de zwangerschap naar ook het 1^e trimester. Hierdoor kan deze 'Virtual Embryoscopy' ertoe bijdragen dat embryonale geneeskunde een stap dichterbij gekomen is.