

Aus der Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz,
Reproduktionsmedizin, der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Untersuchung morphologischer Kriterien der Gameten und Vorkernstadien zur Erzielung einer Schwangerschaft

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Martin Greuner
aus Bremen

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. W. Lichtenegger
 2.: Prof. Dr. med. H. Alexander
 3.: Prof. Dr. med. J. Kleinstein

Datum der Promotion: 25.04.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung	6
1.1 Kinderwunschtherapie	6
1.2 Der natürliche Zyklus.....	6
1.2 Die In-vitro Fertilisation.....	8
1.3 Möglichkeiten für die Auswahl der Zellen für den Embryotransfer	8
1.3.1 Beurteilung des Follikels.....	9
1.3.2 Biochemische Untersuchungen metabolischer embryonaler Marker.....	9
1.3.3 Mikroskopische, morphologische Beurteilung	10
1.3.3.3 Beurteilung des Vorkernstadiums.....	11
1.4 Auswahl der Zellen für den Embryotransfer.....	12
1.5 Das Embryonenschutzgesetz (EschG).....	12
1.5.1 Die Befruchtungskaskade.....	13
1.5.2 Auswahl der Zellen für den Embryotransfer unter den Bedingungen des deutschen Embryonenschutzgesetzes.....	15
1.6 Die Mehrlingsproblematik	16
1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Studiendesign	18
2.2 Datenerhebung.....	18
2.3 Patientenkollektiv.....	18
2.3.1 Einschlusskriterien.....	19
2.3.2 Ausschlusskriterien.....	19
2.4 Datenerfassung	20
2.4.1 Datenauswertung	20
2.4.2 Statistische Verfahren	20
2.6 Ablauf der Behandlung.....	21
2.6.1 Hypophysensuppression	21
2.6.2 Ovarialstimulation	22
2.6.3 Ovulationsinduktion	22
2.6.4 Gewinnung der paternalen Gameten.....	22
2.6.5 Lichtmikroskopische morphologische Charakterisierung der Spermatozoen	25
2.6.7 Gewinnung der maternalen Gameten (Follikelpunktion).....	26
2.6.8 Lichtmikroskopische morphologische Charakterisierung der Oozyte	27
2.6.9 Lichtmikroskopische morphologische Charakterisierung der Vorkernstadien	34
2.6.10 Embryonenbeurteilung	37
2.6.11 Embryotransfer.....	37
2.6.12 Lutealphasenunterstützung	38
2.6.13 Zyklusausgang	38

3 Ergebnisse	39
3.1 Allgemeine Parameter	39
3.1.1 Auswertung bezüglich allgemeiner Faktoren	40
3.1.2 Einfluss der allgemeinen Faktoren auf den Ausgang der Therapie beim Transfer von zwei oder drei Embryonen	43
3.2 Auswertung bezüglich des Einflusses der paternalen Gameten auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft	49
3.2.1 Zelldichte	49
3.2.2 Morphologie.....	50
3.2.3 Motilität	50
3.3 Auswertung bezüglich des Einflusses der maternalen Gameten auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft	52
3.3.1 Zytoplasma	53
3.3.2 Einschlusskörper (refraktiler Körper)	55
3.3.3 Vakuolen	57
3.3.4 Perivitelliner Spalt.....	58
3.3.5 Polkörper	59
3.3.6 Form der Oozyte.....	60
3.3.7 Zona Pellucida.....	61
3.3.8 Einfluss der zytoplasmatischen und oder extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten (Defekten) auf das Entwicklungspotential der Oozyte	65
3.3.9 Einfluss der Anzahl an Auffälligkeiten (Defekten) auf das Entwicklungspotential der Oozyte.....	66
3.4 Auswertung bezüglich des Einflusses der Vorkernstadien auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft	69
3.4.1 Auswertung bezüglich des Z-Scores	69
3.4.2 Vergleich der Zyklen, in denen überzählige Vorkernstadien zur Auswahl standen, mit den Zyklen, in denen keine überzähligen vorhanden waren, in Hinblick auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate.....	76
3.4.3 Die Lage der Vorkernstadien	77
3.4.4 Bedeutung des Auftretens des Halos für das Entwicklungspotential der Zelle	78
3.4.5 Zusammenfassung des Einflusses der Vorkernstadien auf den Verlauf der Kinderwunschtherapie	79
3.5 Kombination der relevanten Faktoren der Oozyte und der Vorkernstadien .	80
3.6 Auswertung der Geburten und Aborte	83
3.7 Mehrlingsproblematik	86
4 Diskussion	88
4.1 Einfluß des Spermatozoons auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie ..	90
4.2 Einfluß der Oozyte auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie	91
4.2.1 Der Einfluß von zytoplasmatische Faktoren	92
4.2.2 Der Einfluß von extrazytoplasmatische Faktoren	94
4.3 Einfluß des Vorkernstadiums auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie	99
4.4 Kombination von Scoringssystemen zur Verbesserung des Ausgangs der Kinderwunschtherapie	103

4.5 Mehrlingsproblematik.....	105
4.6 Charakteristika der Zellen, die zu einer Geburt führten.....	108
4.7 Charakteristika der Zellen, die eventuell an einem Abort beteiligt waren... 	108
5 Zusammenfassung.....	109
6 Literaturverzeichnis.....	111
7 Eigene Vorträge und Mitarbeit für Publikationen zur Thematik der Beurteilung der Qualität von Oozyten und Vorkernstadien.....	122
8 Anhang	123
9 Danksagung	128
10 Erklärung.....	129
11 Lebenslauf.....	13030

1. Einleitung

1.1 Kinderwunschtherapie

Von unerfülltem Kinderwunsch spricht man, wenn bei einem Paar mit regelmäßigem ungeschützten Verkehr nach einem Jahr keine Schwangerschaft eingetreten ist. Dies betrifft in etwa 10 - 15% aller Paare weltweit (Schirren, 2003). So waren im Jahr 2001 etwa zwei Millionen Paare in Deutschland ungewollt kinderlos (Weigel et al., 2002). Der Wunsch nach einem Kind ist ein tragendes Selbstkonzept der meisten Menschen und kann dazu führen, dass ohne Kind kein Sinn mehr im eigenen Leben oder in der Partnerschaft gesehen wird (Stauber, 1999). Es kommt zur schweren Kränkung des Selbstwertgefühls (Dietz, 2000).

Das Ziel einer Kinderwunschtherapie ist, dem betroffenen Paar bei ihrem Problem des unerfüllten Kinderwunsches zu helfen.

Das „Wunschkind“ ist die erwünschte Lösung.

1.2 Der natürliche Zyklus

Die Menarche stellt den Beginn des monatlichen Zyklus der Frau dar. Der Hypothalamus, genauer die Zellen des „nucleus arcuatus“ und im dorsalen Abschnitt der „Eminentia mediana“ (Karck, 1996) produziert das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH). Das GnRH kontrolliert die Sekretion von Gonadotropinen (dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) und dem luteinisierenden Hormon (LH)) im Hypophysenvorderlappen. In jedem Zyklus beginnen 50-150 Primordialfollikel unter dem Einfluss von FSH zu wachsen. Ein Leitfollikel bildet sich heraus (Wildt, 1990) und die anderen werden atretisch. In dieser Wachstumsphase des Follikels vermehren sich die Granulosa- und Thekazellen. Letztere sezernieren durch die Basalmembran des Follikels Androgene, die in den Granulosazellen unter Einfluss von FSH durch Aromatisierung zu Östrogenen umgewandelt werden. Die so entstandenen Östrogene werden in den Blutkreislauf freigesetzt und stimulieren die Uterusschleimhaut (Proliferationsphase) (Ericson et al., 1985). Der steigende Östrogenspiegel im Blut führt zu einem negativen Feed-back Mechanismus, der die Gonadotropinsekretion hemmt. Bei einer Follikelgröße von 20 bis 25 mm und einem Östrogenanstieg von 150 bis 300

pg/ml wird die Hypophyse zur Ausschüttung von LH angeregt. Dieser LH-Anstieg (peak) löst die Ovulation aus.

Die Oozyte mit einer großen Zahl an Kumulus-Oophorus-Zellen wird aus dem Ovar ausgestoßen und im Pars ampullaris des Eileiters kann die Befruchtung stattfinden. Der Follikel bildet sich zum Corpus luteum um, welches Östradiol und große Mengen Progesteron bildet (Diedrich et al., 1990).

Ein entstehender Embryo kann sich dann in die Zona compacta des Endometriums implantieren.

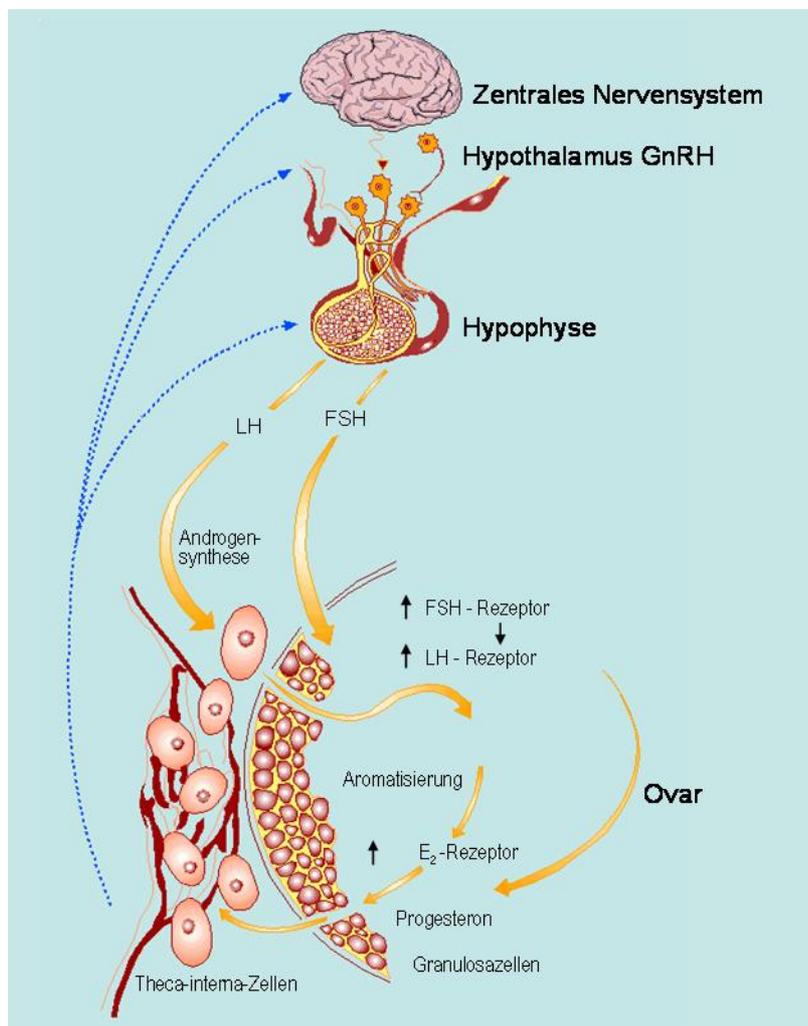


Abbildung (Abb.)1: Hormonelle Regulation im natürlichen Zyklus der Frau (Fortbildung für Ärzte und medizinisches Personal Serono, Unterschleißheim, Deutschland 2001)

1.2 Die In-vitro Fertilisation

Eine Methode der Kinderwunschtherapie ist die In-vitro Fertilisation (IVF). Hierbei wird die Heranreifung mehrerer Follikel stimuliert. Diese Stimulation erfolgt mit Hilfe einer kombinierten Gabe von GnRH-Agonisten und Gonadotropinen oder GnRH-Antagonisten und Gonadotropinen. Hierfür sind verschiedene hormonelle Stimulationsschemata bekannt (Felberbaum und Diedrich 1996).

Ziel ist eine kontrollierte ovarielle Überstimulation, wodurch es möglich wird, viele reife Metaphase-II-Oozyten mit Hilfe einer vaginal durchgeführten Follikelpunktion zu gewinnen. Die Befruchtung der Oozyte findet dann außerhalb des Mutterleibes in einer Kulturschale statt. Die Samenzellen werden zu der Oozyte pipettiert. Ein Spermatozoon dringt in die Oozyte ein und initiiert die Befruchtungskaskade mit Bildung der Vorkernstadien. Nach erfolgreicher Embryokultur mit den ersten Zellteilungen, wird der entstandene Embryo mit Hilfe eines Katheters in die Gebärmutter transferiert.

Die IVF mittels sog. „intrazytoplasmatischer Spermatozoeninjektion (ICSI)“ (Palermo et al., 1992) erfolgt in den Fällen, in denen zu erwarten ist, dass die Samenzellen nicht in der Lage sind, die Zona pellucida zu penetrieren und eine Befruchtung zu bewirken. Dies ist besonders bei stark eingeschränkter Spermatozoenqualität oder bei einem negativen Befruchtungsversuch bei einer IVF der Fall.

Der Unterschied zur IVF ist, dass ein Spermatozoon mit Hilfe einer dünnen Glaspipette in die Oozyte eingebracht wird. Die weitere Kultivierung verläuft dann identisch.

Die ICSI ermöglicht neben der Beurteilung des Kumulus-Oozytenkomplexes, der Vorkernstadien und Embryonen wie bei der IVF auch die detaillierte Beurteilung der Gameten.

1.3 Möglichkeiten für die Auswahl der Zellen für den Embryotransfer

Ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Kinderwunschtherapie ist die Qualität der transferierten Embryonen. Aus diesem Grund wird versucht, Methoden zu finden, die das Entwicklungspotential der Gameten, Zygoten und Embryonen charakterisieren.

1.3.1 Beurteilung des Follikels

Die herangereiften Follikel können bezüglich der Follikelgröße untersucht werden. Mit Zunahme der Follikelgröße findet man eine erhöhte Befruchtungsrates (Dubey et al., 1995). Die Follikelgröße hat aber bei reifen Oozyten keinen Einfluss auf die Teilungsrates und Qualität der Embryonen, so dass kein hoher prognostischer Wert gegeben ist (Kentenich et al., 1987).

Eine andere Möglichkeit ist, den Follikel bezüglich der Blutversorgung (Van Blerkom et al., 1997) mittels Dopplersonographie zu charakterisieren. Diese Methode ist allerdings sehr zeitaufwendig und daher in der Routine kaum möglich. Die Untersuchung biochemischer Marker (z.B. reactive oxygen species (ROS) (Pasqualotto et al., 2004) in der Follikelflüssigkeit ist sehr aufwendig und zeigt keine in der Routine durchführbaren klaren Marker.

1.3.2 Biochemische Untersuchungen metabolischer embryonaler Marker

Es gibt viele Ansätze, um im Kulturmedium des Embryos Marker (siehe Tabelle 1) zu finden, die deutlich das Entwicklungspotential des Embryos charakterisieren. Dies setzt aber die Möglichkeit einer Embryoselektion voraus, die in Deutschland nicht erlaubt ist (Embryonenschutzgesetz (EschG §1 Abs.1).

Diese biochemischen embryonalen Marker sind noch in der Entwicklung und sehr aufwendig von der Methode und daher in einem deutschen Routinelabor momentan nicht durchführbar.

Tabelle (Tab.) 1: Mögliche biochemische embryonale Marker zur Charakterisierung des Entwicklungspotentials des Embryos

Biochemischer Marker	Literatur
Pyruvatstoffwechsel	Leese et al., 1986
Glucosestoffwechsel	Devreker et al., 2005
Aminosäurestoffwechsel	Houghton et al., 2002
Embryonale platelet-activating Factor (PAF) Sekretion	Roudebush et al., 2001
Embryonales human leukocyte antigens-G (HLA-G)	Sher et al., 2004

1.3.3 Mikroskopische, morphologische Beurteilung

Die mikroskopische Beurteilung der Gameten, Zygoten und Embryonen steht in der Routine heutzutage im Mittelpunkt. Bei 38 373 ART-Behandlungszyklen wurde dies in Deutschland (DIR 2005) im Jahr 2005 durchgeführt. Es ist von Bedeutung, die richtigen und wichtigen morphologischen Kriterien der Zellbeurteilung zu ergründen.

Durch die vaginal durchgeführte Punktion werden die Kumulus-Oozytenkomplexe gewonnen. Diese bestehen aus der Oozyte, die von Corona radiata Zellen und einer mehr oder minderen Anzahl von Follikelepithelzellen, den Granulosazellen umgeben sind. Die Corona radiata Zellen stehen in engem Kontakt mit der Oozyte (Hyttel et al. 1986). Zytoplasmafortsätze, die durch die Zona pellucida reichen (Wert u. Larsen 1989), stellen diese Verbindung her und beeinflussen die Zytoplasma- und Kernreifung der Oozyte. Eine morphologische Beurteilung des Kumulus-Oozytenkomplexes ist unter anderem nach Herrler und Beier (1998) möglich. Aussagen lassen sich aber nur bezüglich des Reifestatus der Oozyte machen. Qualitätsunterschiede zwischen reifen M II Oozyten sind nicht ersichtlich.

Die Methode der IVF mit Hilfe der ICSI ermöglicht die nicht-invasive mikroskopische Beurteilung der Gameten, Vorkernstadien und Embryonen.

1.3.3.1 Mikroskopische, morphologische Beurteilung der paternalen Gameten

Im Gegensatz zur IVF kann bei der ICSI ein motiles Spermatozoon mit ovalem Kopf, unauffälligem Mittelstück und Flagellum (Abb.4) (als morphologisch normal klassifiziertes Spermatozoon) unter mikroskopischer Sicht ausgewählt werden, um dieses nach Immobilisierung für die Injektion in die Oozyte zu verwenden.

Die klassischen Spermaparameter (Zelldichte, Motilität und Morphologie) des Ejakulates können für eine prognostische Aussage über den Therapieerfolg herangezogen werden.

1.3.3.2 Mikroskopische, morphologische Beurteilung der maternalen Gameten

Der Kumulus-Oozytenkomplex besteht aus der Oozyte, die direkt umgeben ist von den Corona-radiata-Zellen und den assoziierten Kumulus- oder Granulosazellen. Für die ICSI erfolgt eine enzymatische (Hyaluronidase) und mechanische (mittels Pipetten) Präparation des Kumulus-Oozytenkomplexes, so dass die Oozyte letztendlich isoliert vorliegt. Die reife Oozyte befindet sich nach der Eizellgewinnung durch die Follikelpunktion in der arretierten Metaphase der 2. Reifeteilung der Meiose (MII). Das Vorhandensein des ersten Polkörpers spiegelt den Ploidiegrad der Oozyte wider.

Eine morphologische Beurteilung bezüglich zytoplasmatischer und extra-zytoplasmatischer Faktoren ist möglich, um Aufschluss über das Entwicklungspotential der Oozyte (Serhal et al. 1997, De Sutter et al. 1996) zu bekommen.

Eine normale reife Oozyte ist rund und zeigt ein klares, moderat granuliertes Zytoplasma, einen schmalen perivitellinen Raum, einen intakten ersten Polkörper und eine dünne (<20µm; Montag und Baukloh, 1998) pigmentfreie Zona pellucida (De Sutter et al., 1996; Xia, 1997; Ebner et al., 2000).

Vakuolen, Granulierungen, Einschlüsse, Aggregation des rauen endoplasmatischen Reticulums sowie lytische Bereiche in der Oozyte weisen auf Störungen der zytoplasmatischen (Hassan-Ali et al., 1998; Loutradis et al., 1999; Kahraman et al., 2000) sowie der Kernreifung (Eichenlaub-Ritter et al., 1995; Ebner et al., 2000) hin.

Vergrößerungen des perivitellinen Spaltes sowie dort befindlicher Zytoplasmatrümmer, Fragmentation des ersten Polkörpers und auffällige Zona pellucida (>20µm Durchmesser und oder pigmentiert) weisen auf extrazytoplasmatische Störungen hin.

1.3.3.3 Beurteilung des Vorkernstadiums

Nach Injektion des Spermatozoons in die Oozyte wird nach 16 bis 18 Stunden eine morphologische mikroskopische Beurteilung der Vorkernstadien (Scott et al. (2000), Tesarik et al. (2000), Montag et al. (2001)) möglich.

Die Beurteilung der Vorkernstadien kann bezüglich der Anzahl, der Größe und der Symmetrie der Vorkerne erfolgen. Die Anzahl, Anordnung und Verteilung der Nukleoli (Goessens G. 1984, Tesarik and Kopecny, 1990) in den Vorkernen erlauben eine weitere Einschätzung des Entwicklungspotentials der Zelle. Das Auftreten eines Halo-Effektes (Ebner et al., 2003) ist ein weiterer Faktor, der zur Auswahl herangezogen werden kann.

1.4 Auswahl der Zellen für den Embryotransfer

International ist es weitgehend Praxis, alle entstandenen Vorkernstadien weiter zu kultivieren. Daraus ergibt sich die Möglichkeit nach morphologischen Gesichtspunkten die Qualität der entstandenen Embryonen zu beurteilen. Das erreichte Entwicklungsstadium des Embryos hat einen signifikanten Einfluss auf den Ausgang der Therapie. Die Kultivierung des Embryos bis zur Blastocyste (Blastocystenkultur) (Gardner et al., 1998) ist eine Methode, um die Zellen mit höchstem Entwicklungspotential auszuwählen, schließt aber eine chromosomale Fehlverteilung nicht aus (Munne´ et al., 1998; 2002).

Die Embryoselektion lässt nach Transfer der Embryonen mit der besten morphologischen Entwicklung höhere Schwangerschaftsraten erwarten (Van Royen et al., 1999). In diesem Zusammenhang ergibt sich die Möglichkeit, die Anzahl der zu transferierenden Embryonen zu reduzieren, um das Mehrlingsrisiko herab zu setzen.

1.5 Das Embryonenschutzgesetz (EschG)

In Deutschland ist die Auswahl auf embryonaler Ebene verboten.

Das deutsche Embryonenschutzgesetz vom 13.12.1990 (in Kraft 01.01.1991) regelt detailliert den Umgang mit menschlichen Gameten und Embryonen im Rahmen der Kinderwunschbehandlung.

Das Embryonenschutzgesetz (BGBl.I, 2746) besagt:

§1 Abs.1 Nr. 3 und Nr. 5

Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer

- 3. es unternimmt, innerhalb eines Zyklus mehr als drei Embryonen auf eine Frau zu übertragen,
- 5. es unternimmt, mehr Eizellen einer Frau zu befruchten, als ihr innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen,

In Paragraph 1 Abs. 1 Nr. 3 des Embryonenschutzgesetzes wird die Anzahl der zu transferierenden Embryonen pro Zyklus auf drei beschränkt und der Paragraph 1 Abs. 1 Nr. 5 stellt unter Strafe, wer es unternimmt, mehr Eizellen einer Frau zu befruchten, als ihr innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen. Der Zeitpunkt des Schutzes der Menschenwürde wird mit dem Abschluss der Befruchtungskaskade gleichgesetzt.

In Paragraph 8 Abs.1 wird als Embryo im Sinne dieses Gesetzes die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an gesehen. Eine Auswahl der Eizellen darf nur vor Abschluss der Befruchtungskaskade stattfinden.

1.5.1 Die Befruchtungskaskade

Die menschliche Oozyte befindet sich nach der Ovulation bzw. in der Kinderwunschtherapie bei der In-vitro Fertilisation nach der Follikelpunktion in der Regel in der arretierten Metaphase der 2. Reifeteilung der Meiose (MII). Aufgrund des Eindringens des Spermatozoons in die reife Oozyte bzw. der Injektion des Spermatozoons bei der intracytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) kommt es zur biochemischen Aktivierung der Oozyte (Änderung des Membranpotentials, intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg) und zum Abschluss der zweiten meiotischen Teilung. Der zweite Polkörper mit den Chromatiden eines haploiden Chromosomensatzes wird ausgeschleust und es bildet sich der weibliche, haploide Vorkern (Pronucleus). Parallel kommt es zu periodischen Rotationen des Ooplasmas. Diese zytoplasmatischen Wellen erfolgen im Zeitraum der Dekondensation des Chromatins des Spermatozoons. Es kommt zur Bildung des haploiden paternalen Vorkerns. Mit Hilfe der Mikrotubuli wird der weibliche Pronukleus Richtung männlichem Pendant gezogen, was zur Aneinanderlagerung beider Vorkerne mit Migration zum Zellzentrum (Plachot, 2000) führt.

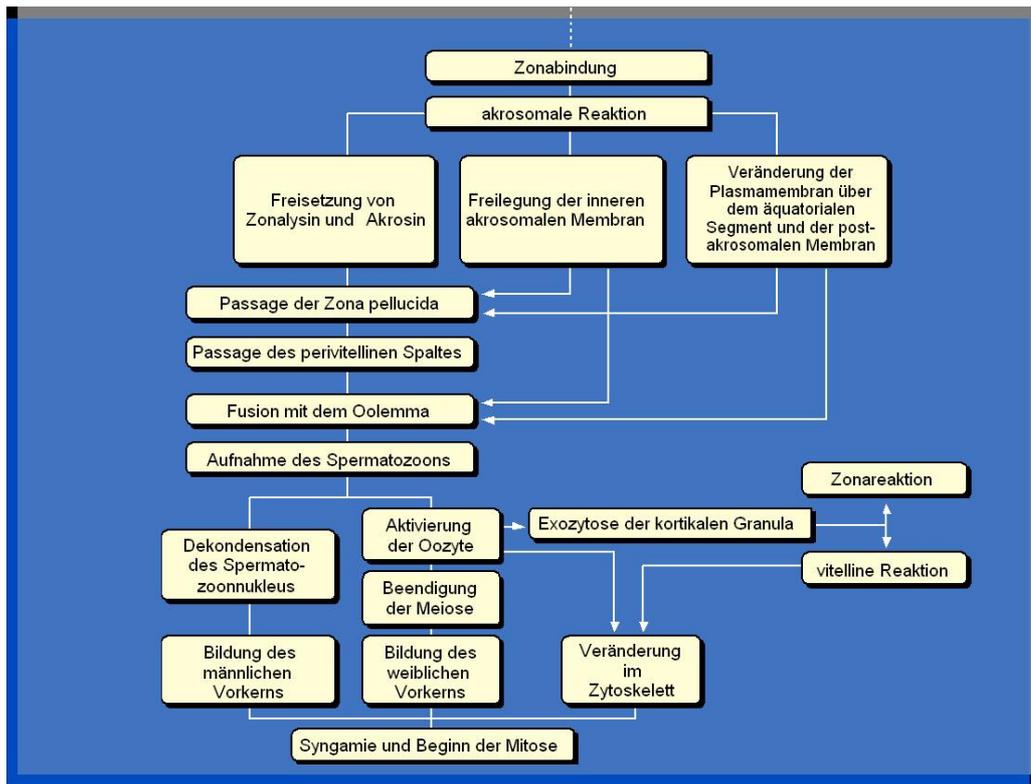


Abb.2: Schematischer Ablauf der menschlichen Befruchtung

Die G1 Phase beginnt ca. 2-3 h nach Spermatozooninjektion und nach 18 bis 20 Stunden ist die Pronukleusbildung abgeschlossen (Nagy et al., 1998). In den nächsten 6 Stunden (S-Phase) findet die identische Reduplizierung der haploiden Chromosomensätze jedes Pronukleus statt und es kommt zur Auflösung der Vorkernmembranen. Damit ist die Befruchtungskaskade abgeschlossen und es beginnt die Embryonalentwicklung.

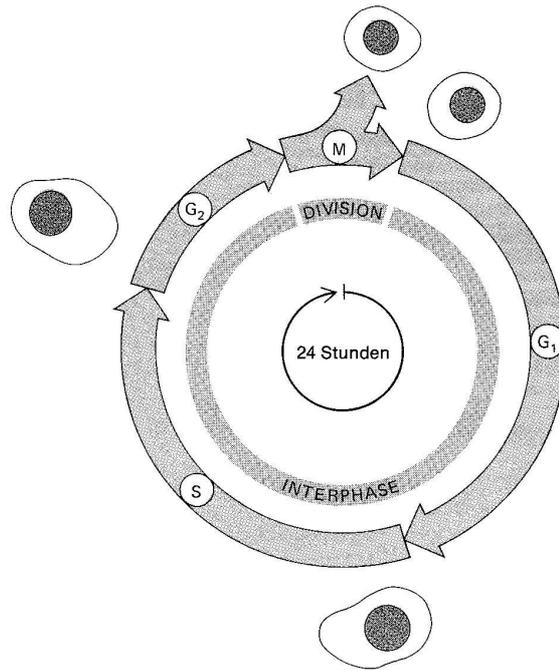


Abb.3: Die vier aufeinander folgenden Stadien des Zellzyklus bei einer typischen Eukaryontenzelle (Alberts et al., 1990)

1.5.2 Auswahl der Zellen für den Embryotransfer unter den Bedingungen des deutschen Embryonenschutzgesetzes

Die Möglichkeiten, die im Ausland mittels der Embryonenauswahl hin zum „single embryo transfer“ (SET) (Gerris et al., 1999) gegeben sind, sind aufgrund des EschG in Deutschland nicht vorhanden. Es müssen alle entstandenen Embryonen transferiert werden, womit bei der erlaubten Höchstzahl von drei Embryonen ein nicht zu vernachlässigendes Mehrlingsrisiko entsteht.

Nach der deutschen Gesetzgebung muß im Pronukleusstadium entschieden werden, welche Zellen aufzubewahren, einzufrieren, oder auch zu verwerfen sind. Die Befruchtung der Eizelle ist mit der Verschmelzung der Pronuklei abgeschlossen. Zum Zeitpunkt der Vorkernbildung muss daher die Auswahl der zu kultivierenden Eizellen stattfinden.

1.6 Die Mehrlingsproblematik

In Deutschland trat bei einem Behandlungserfolg nach ICSI im Zeitraum von 2000 bis 2004 in 21,8% (DIR 2005) der Fälle eine Mehrlingsschwangerschaft ein. Die hohe Mehrlingsrate insbesondere aber die Tatsache, dass es sich beim Transfer von drei Embryonen in 3,1% (DIR 2005) der Geburten um Drillinge handelte, zeigt den Handlungsbedarf zu deren Vermeidung auf.

Die emotionale Bewältigung des realen Eintritts einer Mehrlingsschwangerschaft wird von vielen Paaren als Schock erlebt. Retrospektiv gaben nach Berger et al. (1997) alle Mehrlingse Eltern nach einer IVF-Behandlung an, die Belastung unterschätzt zu haben.

Von der medizinischen Seite sind Mehrlingsschwangerschaften mit Fehl- und Frühgeburten, geringem Geburtsgewicht und erhöhtem prä- und perinatalem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko verbunden.

Das mittlere Gestationsalter bei Drillingen beträgt 32-33 Wochen, wodurch ein geringes Geburtsgewicht mit ca. 1700g die Folge ist. Neunzig Prozent dieser Kinder sind primär intensivversorgungspflichtig und ca. 30% zeigen ein Geburtsgewicht unter 1500g (Selam et al., 1999, Angel et al., 1999). Dies hat eine Totgeburten- und Todesrate („früher Kindstod“) zwischen 9 und 20% (Kaufmann et al., 1998, Roest et al., 1997) gegenüber 0,07% bei Einlingen (Statistisches Bundesamt für das Jahr 1999) zur Folge. Für die Eltern bedeutet eine Mehrlingsschwangerschaft, insbesondere eine Drillingsschwangerschaft häufig Übermüdung, Erschöpfung, Überforderung und Depressivität aufgrund der hohen Belastung (Robin et al., 1996). Eine Berechnung ergab, dass ein kindbezogener Arbeitsaufwand von 190 Arbeitsstunden pro Woche im 1. postnatalen Jahr bewältigt werden muss (Mariano und Hickey, 1998). Die Problematik, dass vermehrt Fehlbildungen vorkommen, verstärkt die Belastung für die Eltern.

Die Reproduktionsmedizin steht in einem Spannungsfeld zwischen dem Erzielen hoher Schwangerschaftsraten einerseits und der Vermeidung riskanter Mehrlingsschwangerschaften andererseits.

Es ist essentiell, Kriterien zu erarbeiten, mit denen hohe Schwangerschaftsraten erreichbar und höhergradige Mehrlingsschwangerschaften (Drillinge) ausgeschlossen werden können.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser prospektiven Multizenterstudie ist es, bekannte Kriterien für die Auswahl der Zellen auf der Ebene der Oozyten und der Vorkernstadien zu verifizieren, um die Zellen mit dem höchsten Entwicklungspotential für die Weiterkultivierung auszuwählen. De Sutter et al. (1996) und Loutradis et al. (1999) zeigen in retrospektiven Studien unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Oozytenmorphologie. Scott et al. (1998, 2000) und Tesarik et al. (2000) zeigen Abhängigkeiten auf zwischen der Beurteilung der Vorkernstadien und den resultierenden Embryonen und Schwangerschaftsraten, wobei Salumets et al. (2001) dies nicht bestätigen können. Hierbei handelt es sich ebenfalls um retrospektive Studien.

Bisher existiert in der internationalen Literatur keine prospektive Untersuchung bezüglich der Auswahl der zu transferierenden Eizellen aufgrund von kombinierten, mikroskopisch morphologischen Beurteilungskriterien für die Oozyten und die Vorkernstadien.

Die Intension dieser Dissertation besteht darin, die Bedeutung der einzelnen morphologischen Faktoren der Oozyte (Beschaffenheit des Zytoplasmas, des Polkörpers, des perivitellinen-Spaltes, der Zona pellucida und der Form der Eizelle) und des Vorkernstadiums (Vorkerngröße und Lage, Anzahl und Symmetrie der Nucleoli, Halo-Effekt,) zu ermitteln, um durch die genaue Charakterisierung der Zellen und die Bewertung „allgemeiner“ Faktoren z.B. Alter der Frau, Anzahl der Vorversuche, Befruchtungsrates, Body Mass Index (BMI) die Erfolgchancen der Kinderwunschtherapie unter den Bedingungen des deutschen Embryonenschutzgesetzes zu erhöhen. Dies ermöglicht die Optimierung der Auswahl auf der Ebene der Oozyten und der Vorkernstadien und somit die Verringerung der zu transferierenden Embryonen bei hohen Schwangerschaftsraten, wodurch die Mehrlingsproblematik angegangen werden soll. Dies ist ein Schritt in Richtung zum Transfer von nur einem Embryo pro Zyklus (Van Royen et al., 1999; Vilska et al., 1999).

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine prospektive Studie zur Untersuchung morphologischer Kriterien der Oozyten und Vorkernstadien bei 564 Behandlungszyklen mit intracytoplasmatischer Spermatozoeninjektion (ICSI).

2.2 Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte im Zeitraum von Januar 2001 bis Dezember 2004 in Form einer Multizenterstudie an der folgende Zentren beteiligt waren:

Tab. 2: Auflistung der an der Multizenterstudie beteiligten Zentren

Zentrum	Ort	Biologe	Anzahl Zyklen
Universitäts Frauenklinik	Bonn	PD Dr. Markus Montag	22
Gem.praxis Tigges, Friol, Gnoth	Grevenbroich	Dr. Bea Maxrath	72
Gem.praxis Fritzsche, Reiher, Hoffmann	Jena	Dipl. Biol. Simone Winkler	226
Gem.praxis Thaele, Happel, Giebel	Saarbrücken	Dipl. Biol. Martin Greuner	244

2.3 Patientenkollektiv

In diese Studie wurden 528 Patientinnen aufgenommen, die folgende Ein und Ausschlusskriterien erfüllten:

2.3.1 Einschlusskriterien

1. Alle standardisierten GnRH-Agonisten- oder Antagonisten- Protokolle (ultralong-, long-, short-, Protokolle)
2. ICSI Behandlungszyklen
3. Prämenopausal
4. ≤ 3 Vorversuche (IVF / ICSI)
5. Hepatitis B,C / HIV negativ
6. antegrade Ejakulation

2.3.2 Ausschlusskriterien

1. Extrauterine Gravidität (EUG) in den letzten 3 Monaten
2. Poor responder (≤ 2 Follikel); basaler FSH-Spiegel >10 IU/L
3. Keine Oozyten gefunden
4. Body mass index (BMI) > 30
5. Spermatozoenkonzentration < 50 bewegliche Spermatozoen aus dem Ejakulat nach Aufarbeitung für ICSI / keine motilen Spermatozoen vorhanden
6. Bakterien / Leukozyten im Ejakulat (Entzündungsanzeichen)
7. Endometriose
8. ausgeprägte Formen der Ovarialinsuffizienz wie die hypogonadotrope oder hypergonadotrope Ovarialinsuffizienz; die hyperprolaktinämische Ovarialinsuffizienz sowie die hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz (Polyzystisches Ovarialsyndrom (PCO))
9. Schwere Erkrankungen (z.B.: Morbus Hodgkin, Multiple Sklerose, Diabetes)
10. Uterus bicornis
11. submuköse, intramurale und subseröse Myome (führt zur Verschlechterung der Implantationsbedingungen)

Patienten, die die Studienbedingungen erfüllten, erhielten pro Zyklus eine fortlaufende Patientinnen-ID (Zentrums Kennzeichnung: Bonn (BN), Jena (JE), Grevenbroich (GR), Saarbrücken (SB) + fortlaufende Zahl) zugeteilt. Jede Nummer wurde nur einmal vergeben. Die Datenerfassung erfolgte prospektiv, indem an dem Tag der Vorkernbeurteilung ein Meldebogen (siehe Anhang) an ein an der Studie teilnehmendes Zentrum versandt wurde.

2.4 Datenerfassung

Die für die Studie relevanten Parameter bezüglich der Morphologie der Gameten, Vorkernstadien und Embryonen wurden in einem Dokumentationsbogen erfasst und mit Excel ausgewertet. Alle weiteren Parameter bezüglich der Anamnese, Stimulation, Punktion, Spermogramm, Transfer, Lutealphase und des Ausgangs des Zyklus wurden mit Hilfe von RecDate (Serono, Deutschland) dokumentiert.

2.4.1 Datenauswertung

Die Auswertung erfolgte in mehreren Bereichen.

- Auswertung der allgemeinen Faktoren: Anzahl transferierter Embryonen, Alter der Frau, BMI, Anzahl an Vorversuchen, Befruchtungsrates und Anzahl reifer Oozyten sowie des Embryoscores
- Auswertung der Parameter bezüglich der paternalen Gameten
- Auswertung der Parameter bezüglich der maternalen Gameten
- Auswertung der Parameter bezüglich der Vorkernstadien
- Auswertung bezüglich der Kombination der maternalen Faktoren und der Vorkernstadien
- Untersuchung der Geburten, Aborte und Mehrlinge bezüglich morphologischer Faktoren der Gameten und Vorkernstadien

2.4.2 Statistische Verfahren

Zur Auswertung der erhobenen Daten, wurden diese ausgezählt in Hinblick auf absolute und relative Häufigkeiten. Patientendaten mit fehlenden Angaben wurden für die jeweilige Auswertung ausgeklammert. Die zu berücksichtigenden Parameter wurden auf Normalverteilung innerhalb der zu vergleichenden Gruppen untersucht. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde mit Hilfe des T-Testes (Clauß et al., 1999) geprüft, ob die Annahme haltbar ist, dass das arithmetische Mittel in zwei ausgewerteten Stichproben übereinstimmt. Der Chi²-Test (Benninghaus, 1998) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob sich die Anteile eines bestimmten Merkmales in den beiden Stichproben so stark unterscheiden, dass dies nicht als zufällig angesehen werden konnte. Für die Entscheidung über die Annahme oder Ablehnung der geprüften statistischen Hypothese wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% akzeptiert (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Ein

P-Wert zwischen 0,05 und 0,1 wurde als statistische Tendenz gewertet. Bei sehr umfangreichen Tabellen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit darauf verzichtet, nicht signifikante Beziehungen anzugeben.

2.6 Ablauf der Behandlung

2.6.1 Hypophysensuppression

Für die Behandlung der In Vitro Fertilisation ist es wichtig, eine Hypophysensuppression mittels Down-Regulation (Koch et al., 1977, Lerno et al. 1984) oder Antagonistenprotokoll (Felberbaum, 1999; Olivennes et al., 2002; Out et al., 2002) durchzuführen. Diese Suppression ermöglicht eine Unterdrückung der Gonadotropinsynthese der Hirnanhangsdrüse (Down-Regulation) und damit ein extern gesteuertes synchrones Heranreifen der Follikelkohorte durch Gabe von GnRH-Agonisten und Gonadotropinen oder GnRH-Antagonisten und Gonadotropinen.

Die Down-Regulation erfolgte

- nach unterschiedlichen Protokollen
 - Short-Protokoll (Macnamee et al., 1989)
 - Long-Protokoll (Tan et al., 1992; Daya, 1997)
 - Ultra-Long-Protokoll (Ludwig, 2003)

- mit unterschiedlichen Präparaten
 - Decapeptyl (Ferring, Deutschland)
 - Uno-Enantone täglich (Takeda Pharma, Aachen, Deutschland)
 - Enantone-Gyn Depot (Takeda Pharma, Aachen, Deutschland)
 - Synarela (Pharmacia, Karlsruhe, Deutschland)
 - Zoladex-Gyn (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland)

Für das Antagonistenprotokoll wurde Cetrotide (Serono, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet.

Beide Protokolle (Down Regulation und Antagonist) sind bei korrekter Anwendung bezüglich der Erfolgsaussichten gleich zu bewerten (Olivennes et al., 2000).

2.6.2 Ovarialstimulation

Eine kontrollierte ovarielle Hyperstimulation ist notwendig, um durch das Heranreifen mehrerer Follikel die Erfolgsaussichten bei der IVF zu maximieren. Aus folgenden Präparaten wurde ausgewählt, wobei auch die Kombination mehrerer Präparate genutzt wurde:

- Humanes menopausales Gonadotropin (hMG) (Menogon, Ferring, Deutschland)
- Rekombinantes Follitropin (rFSH) (Puregon (Organon, Oberschleißheim, Deutschland); Gonal-F (Serono, Unterschleißheim, Deutschland))
- Urinäres Follitropin (uFSH) (Fertinorm HP (Serono, Unterschleißheim, Deutschland))
- Rekombinantes luteotropes Hormon (rLH) (Luveris Serono, Unterschleißheim, Deutschland)

2.6.3 Ovulationsinduktion

Nach erfolgreicher Stimulation mit ausreichender Follikelbildung und Endometriumsentwicklung erfolgte die Ovulationsauslösung durch intramuskuläre Injektion von 10 000 IE humanem Choriongonadotropin (HCG) (Predalon, Organon, München, Deutschland) (Ludwig et al., 2003).

2.6.4 Gewinnung der paternalen Gameten

Die Ejakulatgewinnung erfolgte orthograd mittels Masturbation in einen sterilen, nicht-toxischen Behälter. Das Ejakulat durfte nicht durch coitus interruptus (saures Vaginalsekret schädigt die Spermatozoenmotilität) oder mit Hilfe eines Kondoms (spermizide Beschichtung) gewonnen werden.

2.6.4.1 Ejakulatpräparation

Die Ejakulatverflüssigung erfolgte bei 37°C auf einer Wärmeplatte oder im Brutschrank. Ein Spermogramm wurde nach den WHO-Richtlinien (WHO-Laborhandbuch, 1999) durchgeführt.

Folgende Parameter wurden dokumentiert:

- Ejakulatmenge
- Spermatozoenkonzentration (Mio/ml)
- Spermatozoenmotilität
 - a: schnelle progressive Beweglichkeit >25 µm/s
 - b: langsam oder träge progressive Beweglichkeit
 - c: nichtprogressive Beweglichkeit (< 5µm/s)
 - d: Immotilität
- Spermatozoenmorphologie (Anzahl Spermatozoen mit normaler Morphologie)

In den Tabellen 3 und 4 werden die Spermatozoenparameter eines Normalbefundes und von Abweichungen davon aufgeführt.

Tab. 3: Nomenklatur und Normalwerte des Ejakulats (WHO-Laborhandbuch, 1999)

Normozoospermie	Volumen	> 2ml
	pH-Wert	7,2 – 7,8
	Spermatozoenzahl	≥ 20 Mio./ml
	Spermatozoenzahl per Ejakulat	≥ 40 Mio./ml
	Motilität	≥50% progressiv bewegliche Spermatozoen (a+b) oder ≥ 25% a
	Morphologie	≥ 30% normale Spermatozoen

Tab. 4: Nomenklatur bei Abweichung von Ejakulatparametern vom Normwert (Eliasson et al., 1970)

Oligozoospermie	Spermatozoenzahl	< 20 Mio/ml
Asthenozoospermie	Motilität	< 50% progressiv bewegliche Spermatozoen (a+b) oder < 25% a
Teratozoospermie	Morphologie	< 30% normale Spermatozoen
Kryptozoospermie	Spermatozoenzahl	< 1Mio./ml
Azoospermie	Spermatozoenzahl	Keine Spermatozoen im Ejakulat
Aspermie	Volumen	Kein Ejakulat
Parvispermie	Volumen	< 2 ml
Nekrozoospermie	Motilität	Nur avitale Spermatozoen

2.6.4.2 Spermatozoenpräparation

Die Separation der Spermatozoen von dem Seminalplasma erfolgte entweder mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation (WHO, 1999; Mortimer, 1994) oder der Swim up Technik (WHO, 1999). Die Kapazitation der Spermatozoen erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5-6% CO₂.

2.6.4.3 Intracytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI)

Die Indikation zur Durchführung der ICSI-Behandlung ist wie folgt:

- schlechte Spermatozoenqualität (weniger als 5 Mio/ml progressiv motile Spermatozoen)
- weniger als 15% normale (Spermatozoen) Morphologie
- ausbleibende Befruchtung bei einer vorherigen IVF-Behandlung

2.6.4.4 Durchführung der intracytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI)

Die Mikromanipulation wurde mit einem beheizbaren inverten Mikroskop mit Hoffmanmodulation bei 400 facher Vergrößerung 5 bis 7 Stunden nach Follikelpunktion durchgeführt. Die Immobilisierung der Spermien erfolgte in 8% Polyvinylpyrrolidonlösung (PVP), die die Geschwindigkeit der Spermatozoen verlangsamt. Anschließend wurde das Spermatozoonflagellum auf den Boden der Petrischale gepresst, wodurch es zur Immotilität des Spermatozoons kommt. Dieses wurde nun mit dem Flagellum voran in die Injektionspipette (ca. 5 µm Durchmesser mit 30-40° angeschliffenem Winkel) aufgenommen. Um die Schädigung des Spindelapparates zu verhindern, wurde die Oozyte mit einer Haltepipette so fixiert, dass der Polkörper sich in 6 bzw 12 Uhr Position befand und in 3 Uhr Position die Injektion durchgeführt wurde. Die Zona pellucida wurde durchstoßen und nach Brechen des Oolemmas wurde das Spermatozoon mit dem Kopf zuerst in die Oozyte injiziert (Van Steirteghem et al., 1993a,b). Nach Injektion wurde jede Oozyte einzeln in Medium (Tabelle 5) gespült und einzeln kultiviert.

2.6.5 Lichtmikroskopische morphologische Charakterisierung der Spermatozoen

Für die intracytoplasmatische Spermatozoeninjektion wurden möglichst nur mikroskopisch, morphologisch normale Spermatozoen verwendet. Ein normales Spermatozoon (Menkveld et al., 1990) muss folgenden Kriterien genügen:

- Ovaler 4,0-5,5µm langer Kopf, Quotient Länge/Breite beträgt 1,5-1,75
- Gut abgegrenztes Akrosom, 40-70 % des Kopfes einnehmend
- 10 – 20 µm Mittelstück
- Flagellum 40 – 50 µm

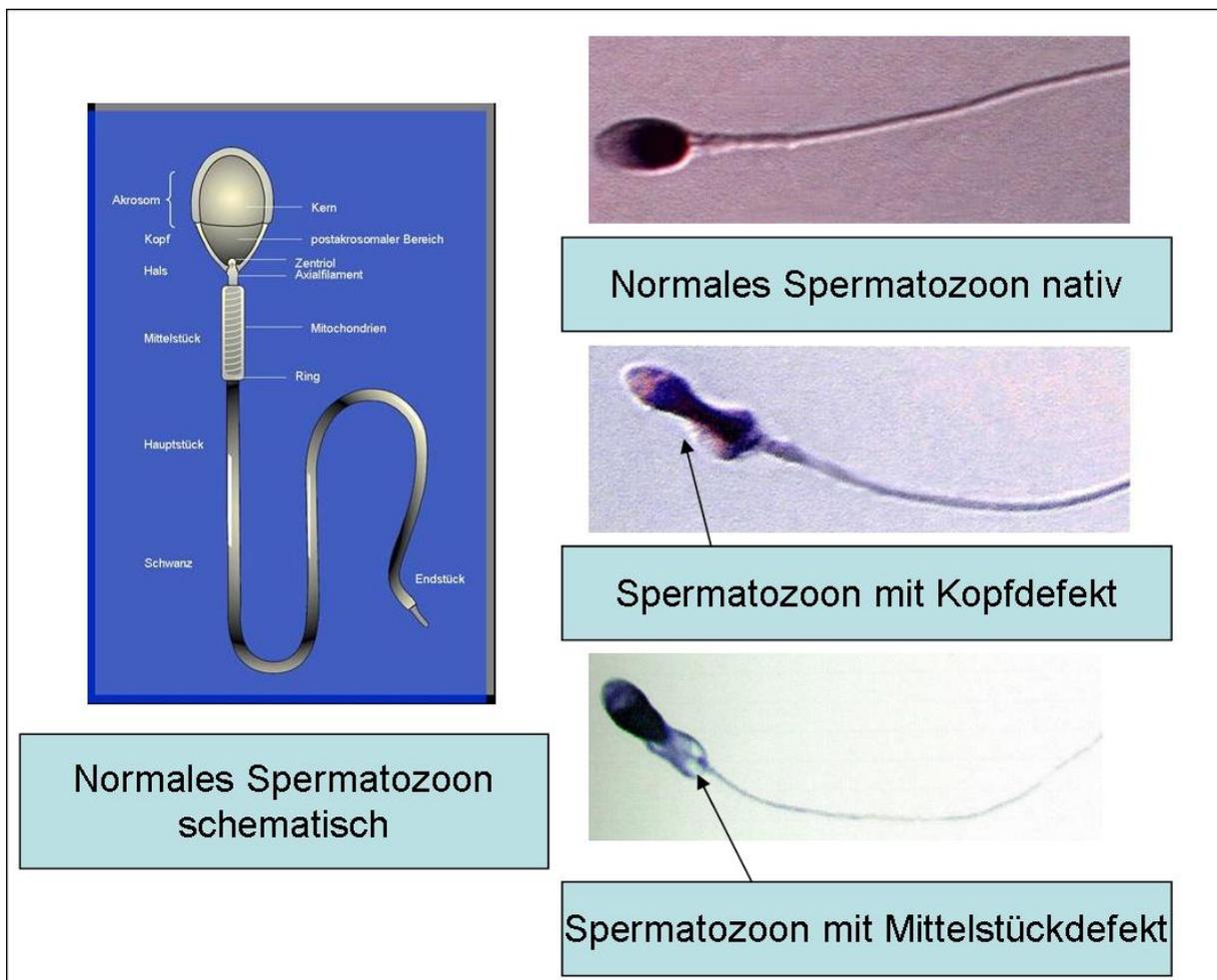


Abb. 4: Spermatozoon mit normaler Morphologie in schematischer und nativer Darstellung sowie im Kopf und Mittelstückbereich abnormale Spermatozoen

2.6.7 Gewinnung der maternalen Gameten (Follikelpunktion)

34-36 Stunden nach Ovulationsinduktion erfolgte eine transvaginal sonografisch kontrollierte Follikelpunktion (Michelmann et al., 1987) zur Gewinnung der Oozyten. Diese liegen in Form sog. Kumulus-Oozyten Komplexe vor und wurden direkt nach Auffindung in Medium (siehe Tab. 5) überführt und in einem Inkubator mit hoher Luftfeuchtigkeit bei 37 °C und 5-6% CO₂ kultiviert.

2.6.7.1 Kulturbedingungen

Die Eizellen wurden in den Zentren in folgenden Kulturmedien bei 37,0-37,3°C (Temperatur T) und 5-6% CO₂ Begasung kultiviert.

Tab. 5: Auflistung der unterschiedlichen verwendeten Kulturmedien

Zentrum (Ort)	Kulturbedingungen		Medium
	T	CO ₂	
Universitäts Frauenklinik (Bonn)	37,3°C	6 %CO ₂	IVF20, G1.2 , G2.2 der Fa. Vitrolife, Schweden
Gem.praxis Tigges, Friol, Gnoth (Grevenbroich)	37,3°C	6 %CO ₂	IVF20, G1.2 , G2.2 der Fa. Vitrolife, Schweden
Gem.praxis Fritzsche, Reiher, Hoffmann (Jena)	37,3°C	5 %CO ₂	Universal-IVF-Medium, Fa. Medicult ,Dänemark ; IVF 30, Fa. Vitrolife, Schweden
Gem.praxis Thaele, Happel, Giebel (Saarbrücken)	37,0°C	6 %CO ₂	Hams F 10 Basis

2.6.7.2 Oozytenpräparation

Die Kumulus-Oozyten Komplexe wurden mindestens für zwei Stunden inkubiert, um den Zellen eine Nachreifung zu ermöglichen. Zur Durchführung der ICSI-Methode und zur Bestimmung des Reifezustandes der Oozyte war es notwendig, eine Oozytenpräparation durchzuführen. Hierzu wurden die Zellen des Cumulus oophorus und der Corona radiata enzymatisch und mechanisch entfernt. Während der Inkubation (max. 60 sec) in einer Hyaluronidaselösung (Type VIII H3757) erfolgte gleichzeitig durch mehrmalige Aspiration mittels einer Pipette (Pipettendurchmesser 150 und 300

µm) die Ablösung der die Oozyte umgebenden Cumulus- und Corona radiata- Zellen. Der ganze Prozess wurde zügig durchgeführt, um eine enzymatische Aktivierung durch die Hyaluronidase zu vermeiden. Anschließend wurden die Oozyten in Medium (Tab. 5) gespült.

2.6.8 Lichtmikroskopische morphologische Charakterisierung der Oozyte

Nach der Denudierung war eine lichtmikroskopische morphologische Charakterisierung der maternalen Gameten möglich. Der Reifestatus jeder Zelle wurde ermittelt.

Eizelle im Stadium:

- Metaphase II (MII), 1. Polkörper sichtbar
- Metaphase I (MI), kein Polkörper und kein Zellkern sichtbar
- Germinal Vesikel (GV), Zellkern sichtbar
- degenerierte Eizelle, dunkles Zytoplasma

Bei allen M II Eizellen wurde eine Fotodokumentation und Beurteilung (modifiziert nach den Kriterien von Serhal et al., 1997) durchgeführt. Die Oozytenmorphologie wurde bei jeder Zelle bei 400 facher Vergrößerung mit „Hoffmann Modulation Contrast“- Optik beurteilt. Alle Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt in Einzelkultur kultiviert, um eine lückenlose Dokumentation zu gewährleisten.

Alle Oozyten und Vorkernstadien der folgenden Abbildungen 5 bis 16 wurden bei 400 facher Vergrößerung erstellt.

Folgende Kriterien der Metaphase II Oozyten wurden beurteilt:

Zytoplasmatische Faktoren:

1. Beschaffenheit des Zytoplasmas
2. Vorhandensein von Einschlusskörpern
3. Vorhandensein von Vakuolen

Extrazytoplasmatische Faktoren:

1. Auffälligkeiten bezüglich des perivitellinen Spaltes
2. Beschaffenheit des Polkörpers
3. Form der Oozyte
4. Dicke und Beschaffenheit der Zona pellucida

Eine morphologisch unauffällige Oozyte hat folgendes Erscheinungsbild:

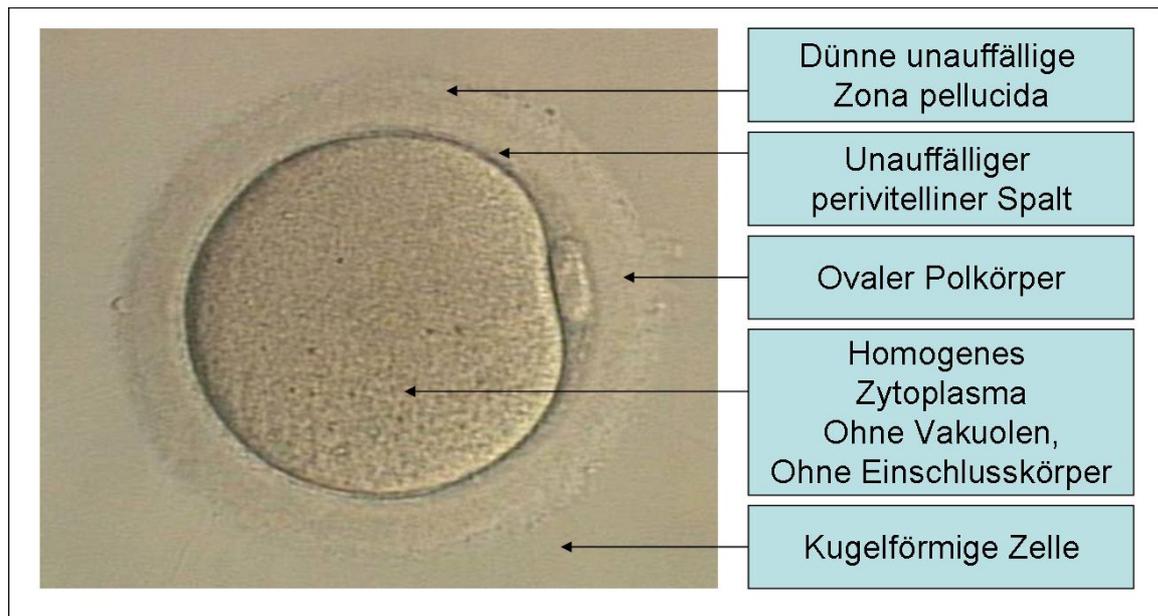


Abb.5: Beispiel einer morphologisch unauffälligen Oozyte bezüglich der erfassten Parameter

2.6.8.1 Die Beschaffenheit des Zytoplasmas

Das Zytoplasma sollte hellgrau, homogen und nur fein granulär erscheinen (Herrler und Beier, 1998).

Die Oocyte wurde bezüglich der Granulierung des Zytoplasmas in drei Gruppen eingeteilt:

- Homogenes Zytoplasma
- Partiiell granuliertes Zytoplasma
- Komplett granuliertes Zytoplasma

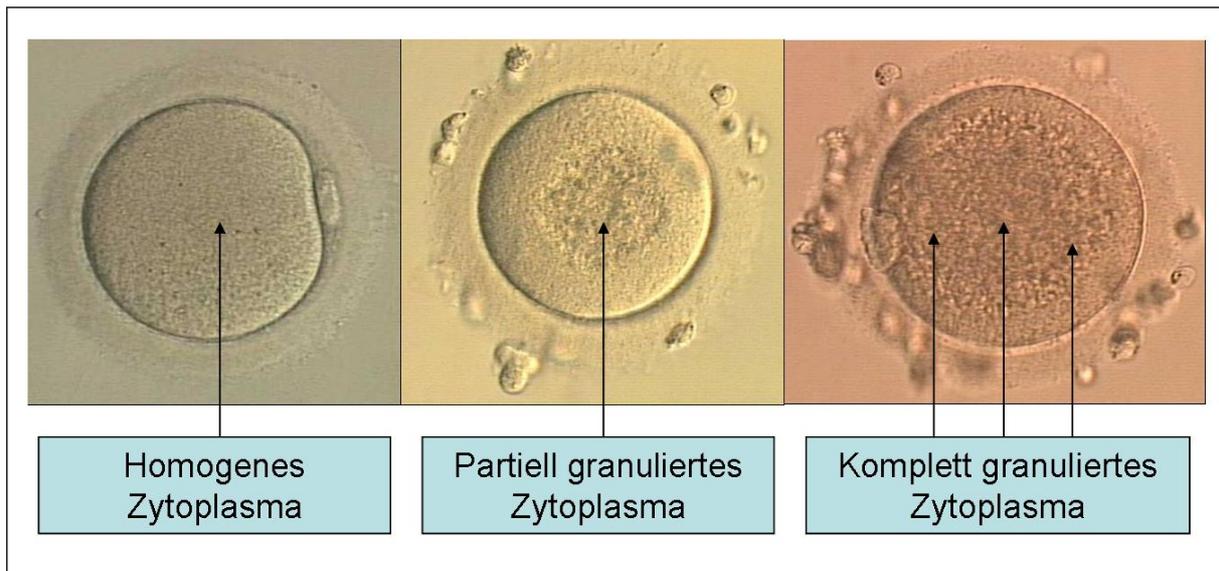


Abb.6: Oocyte mit homogenem, partiell und komplett granuliertem Zytoplasma

2.6.8.2 Das Vorhandensein von Einschlusskörpern

Das Vorhandensein von refraktilen Einschlüssen (Veeck, 1991) unterschiedlicher Form weist auf degenerative Vorgänge hin. Dies wird von Serhal et al. (1997) und Loutradis et al. (1999) als negativer Einfluss für das Erreichen einer Schwangerschaft gewertet. In dieser Studie wurden drei Formen unterschieden.

- Oocyte ohne Einschlusskörper
- Oocyte mit kleinen Einschlusskörpern
- Oocyte mit großen Einschlusskörpern

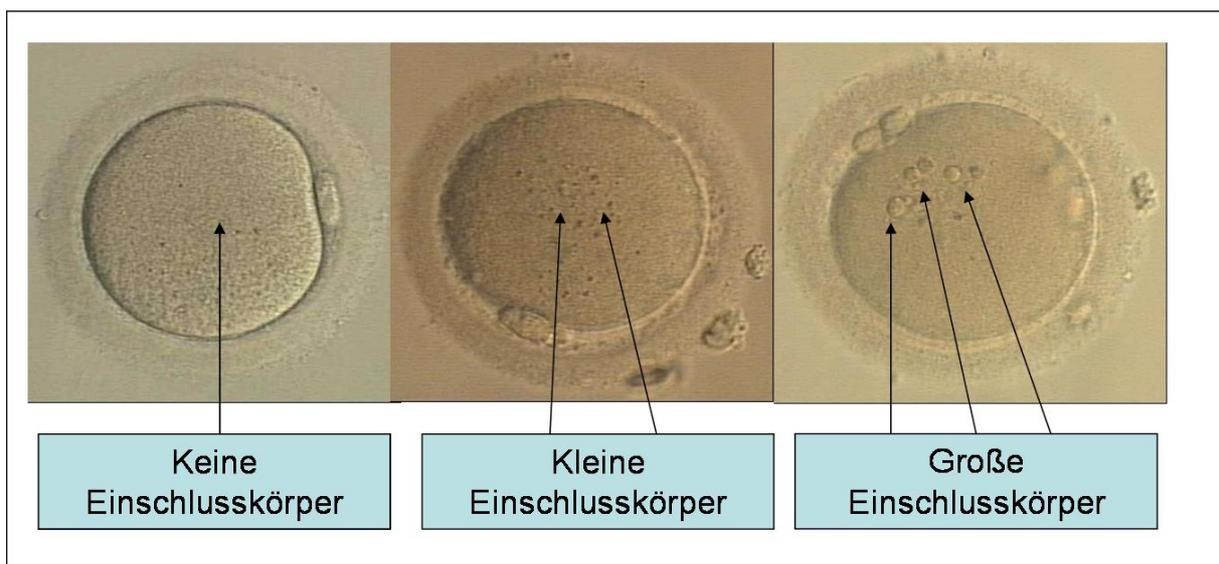


Abb.7: Oocyte mit keinen, kleinen oder großen Einschlusskörpern

2.6.8.3 Das Vorhandensein von Vakuolen

Vakuolen können als flüssigkeitsgefüllte Räume in Folge von Endocytose in Oozyten vorkommen. Dies wurde dokumentiert.

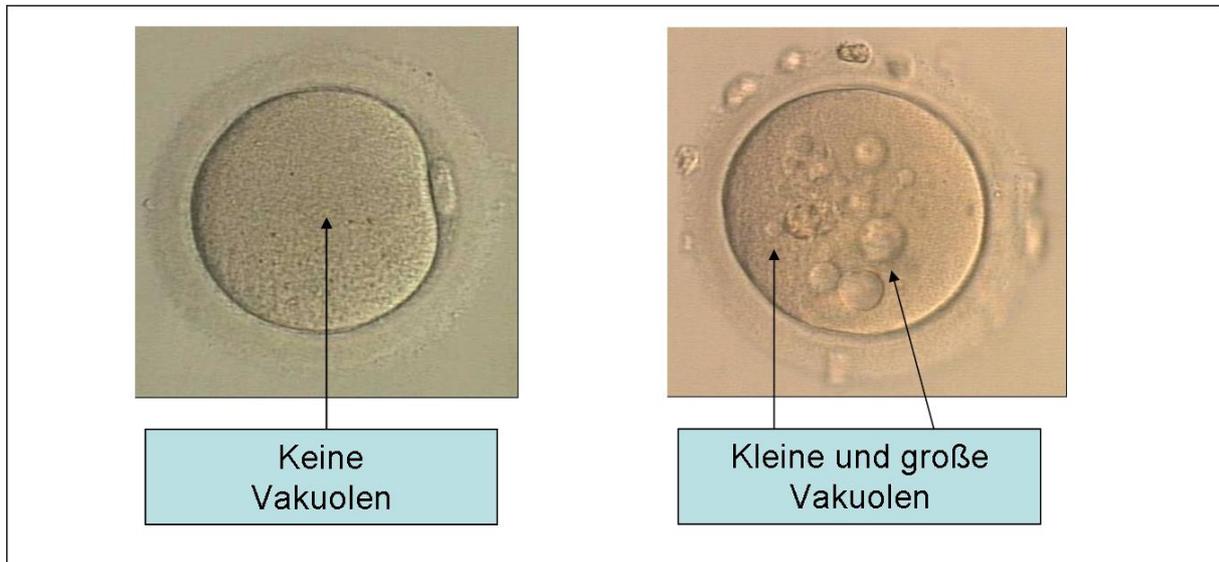


Abb.8: Oozyte ohne und mit kleinen und großen Vakuolen

2.6.8.4 Auffälligkeiten bezüglich des perivitellinen Spaltes (PVS)

Das Zytoplasma (Ooplasma) der Oozyte wird von einer Plasmamembran umgeben. Die äußere Hülle stellt die Zona pellucida dar. Zwischen der Plasmamembran und der Zona pellucida befindet sich der perivitelline Spalt (PVS), auch als extrazelluläre Matrix bezeichnet (Dandekar u. Talbot, 1992)

Es wurde unterschieden zwischen normalem unauffälligem und auffälligem PVS.

Als auffällig wurde gewertet:

- Sehr großer PVS
- Ablagerungen oder Zytoplasmatrümmer (Granula) im PVS

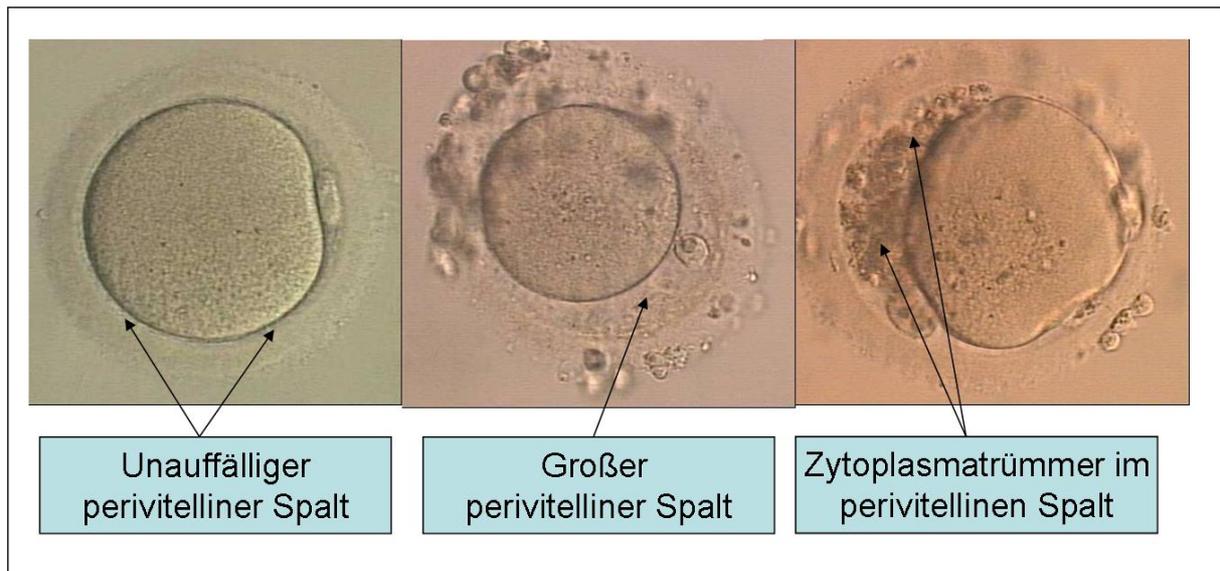


Abb.9: Unauffälliger und auffälliger (großer PVS oder Zytoplasmatrümmer im PVS) perivitelliner Spalt

2.6.8.5 Die Beschaffenheit des ersten Polkörpers

Das Vorhandensein des ersten Polkörpers spiegelt den chromosomalen Status der Oozyte wider. Die Oozyten wurden bezüglich des ersten Polkörpers in drei Klassen eingeteilt.

- Ovaler, runder Polkörper
- Flacher Polkörper
- Fragmentierter Polkörper

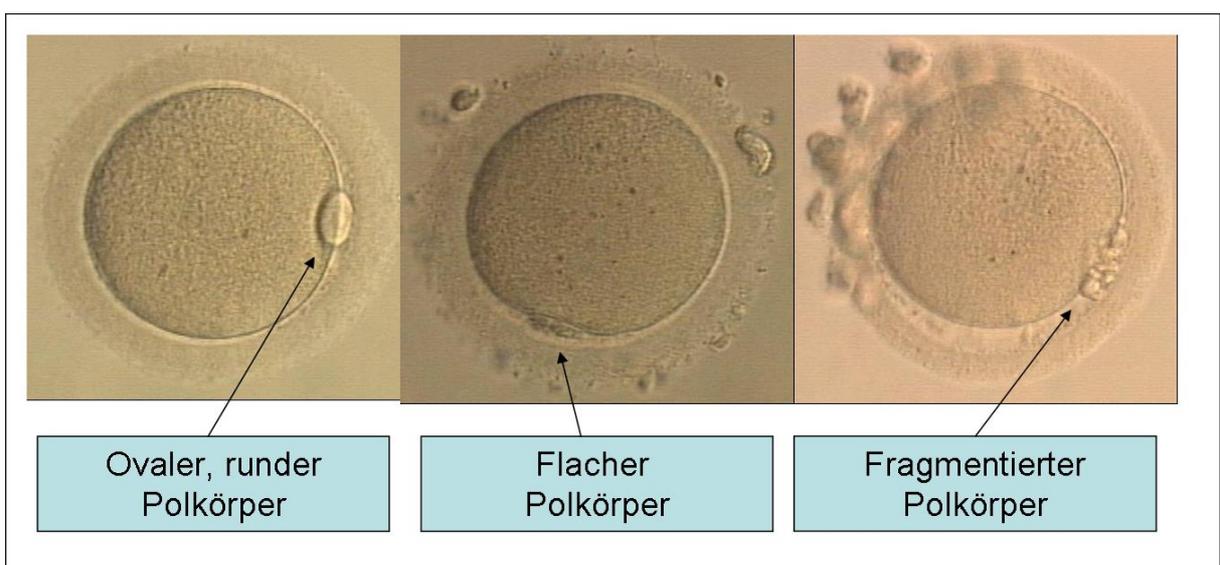


Abb.10: Ovaler, runder Polkörper sowie flacher und fragmentierter Polkörper

2.6.8.6 Form der Oozyte

Die menschliche Oozyte ist eine kugelförmige, zytoplasmareiche Zelle und besitzt beim Menschen während der Ovulation einen Durchmesser von 120- 150 μm (Bucher und Wartenberg, 1989; Veeck, 1999).

Ihre Form konnte unterschieden werden in:

- runde, kugelförmige Oozyte
- ovale (längliche oder deformierte Form) Oozyte

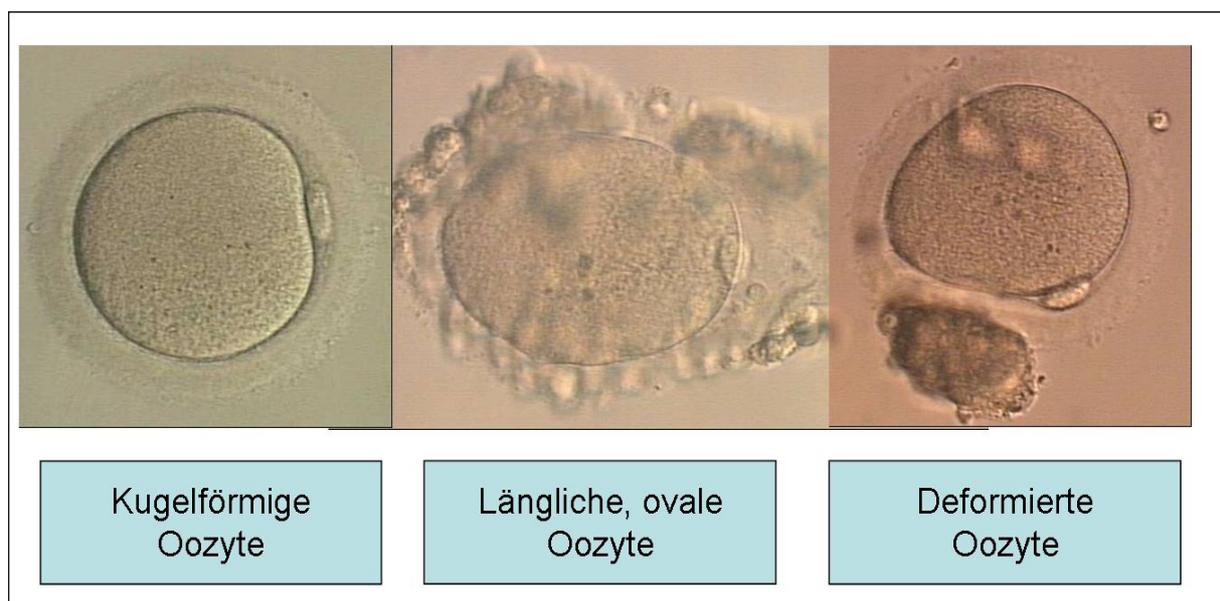


Abb.11: Runde, kugelförmige und längliche, ovale oder deformierte Oozyte

Gelegentlich wurden Riesenzellen mit einem um 20-30% größeren Durchmesser und damit einem 1,5-2 fachen Volumen einer normalen Oozyte gefunden. Diese Zellen wurden nicht für die ICSI verwendet, da es sich um mehrkernige Riesenoocyten (giant oocytes (Austin, 1960)) handelt, deren Entstehung auf die unterbliebene zytoplasmatische Teilung von Oogonien nach erfolgter Kernteilung bzw. auf die Verschmelzung zweier individueller Oogonien zurückzuführen ist.



Abb.12: Normale Oozyte links und Riesenoozyte rechts im Vergleich

2.6.8.7 Dicke und Beschaffenheit der Zona pellucida

Die Dicke der Zona pellucida variiert in der Regel zwischen 5 und 20 μm . Die Beurteilung dieses Unterschiedes und der Einfluss bzw. die Aussagekraft der Dicke der Zona pellucida in Bezug auf die Oozyten und Embryoqualität werden kontrovers diskutiert (Herrler und Beier, 1998).

Die Dicke der Zona pellucida und ihre Beschaffenheit wurden dokumentiert.

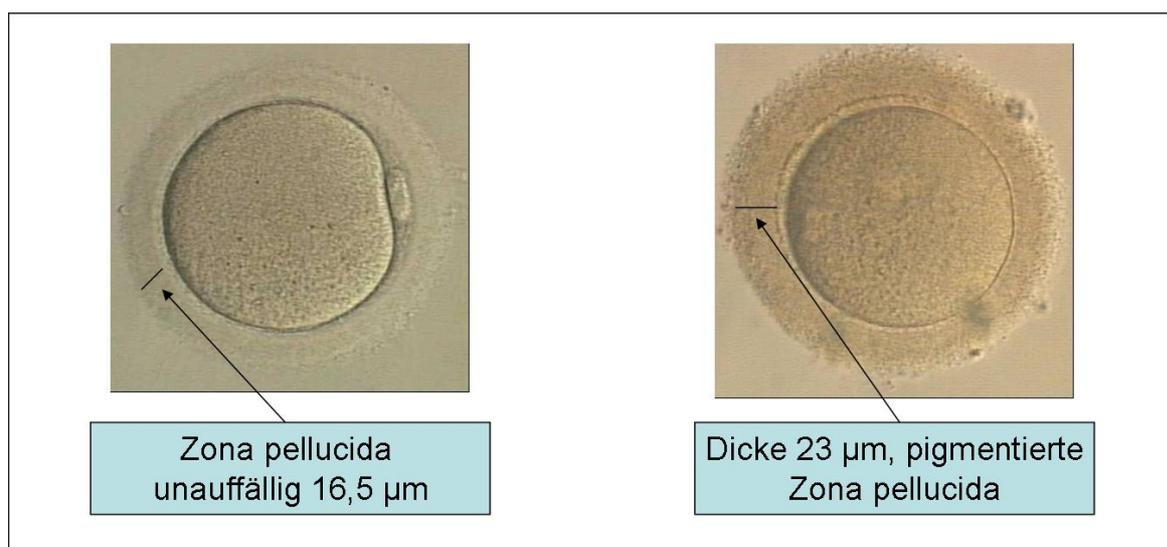


Abb.13: Normale unauffällige und auffällige Zona pellucida bezüglich der Dicke und der Beschaffenheit (Pigmentierung)

2.6.9 Lichtmikroskopische morphologische Charakterisierung der Vorkernstadien

16 bis 18 Stunden nach Injektion des Spermatozoons in die Oozyte erfolgte die Kontrolle, ob eine Befruchtung initiiert wurde. Dabei wurden die Oozyten auf folgende Kriterien hin untersucht:

- Vorhandensein und Anzahl von Vorkernen
- Vorkernscoring nach Scott et al. (2000)
- Lage der Vorkerne in der Oozyte
- Vorhandensein eines Halos (Ebner et al., 2003; Stalf et al., 2002)
-

2.6.9.1 Vorhandensein und Anzahl von Vorkernen

Am Tag nach der Follikelpunktion (ca. 16-18h nach Spermatozoeninjektion) wurde analysiert, ob es in den Oozyten zu einer regelgerechten Vorkernentwicklung (zwei Vorkerne) gekommen war. Hierbei wurde festgelegt, welche Zellen für den Transfer vorgesehen und welche kryokonserviert oder verworfen wurden. Oozyten, die keine regelgerechte Vorkernentwicklung (null, ein oder mehr als zwei Vorkerne) aufwiesen, wurden in 96% Ethanol vernichtet.

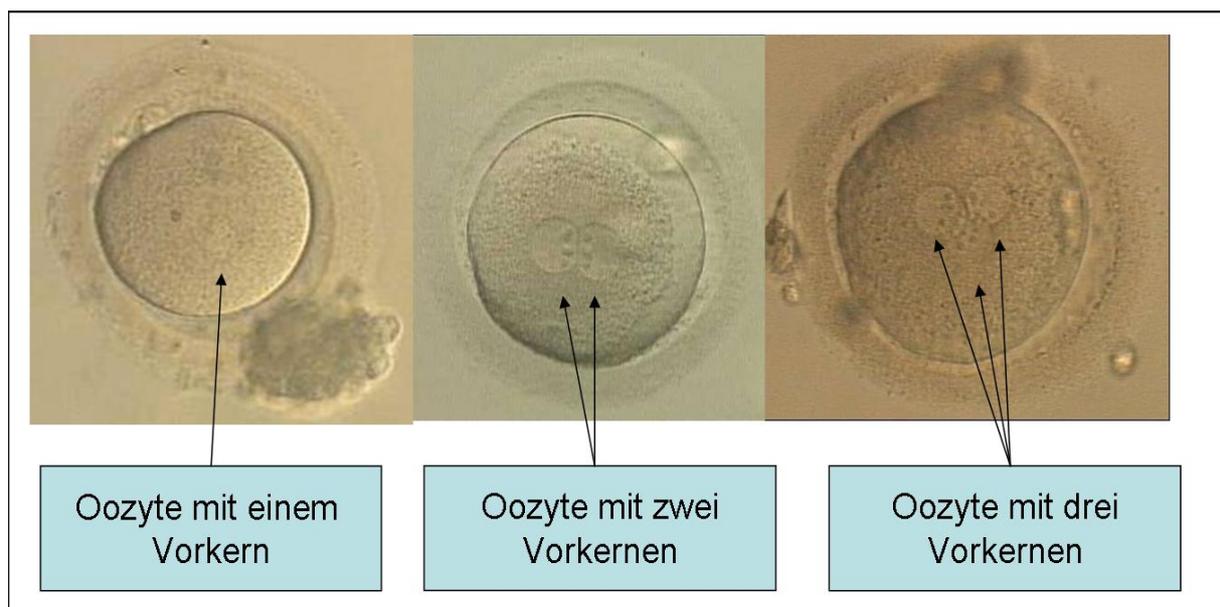


Abb.14: Oozyte mit einem, zwei und drei Vorkernen

2.6.9.2 Vorkernscoring nach Scott et al. 2000

Ein Vorkernscoring wurde bei allen Vorkernstadien mit zwei Vorkernen 16-18 Stunden nach Injektion des Spermatozoons durchgeführt. Analysiert wurde die Anordnung der Vorkerne (aneinander angelagert oder getrennt) und die Anzahl und das Polarisationsphänomen (Nucleoli in einer Vorkernhemisphäre angeordnet, wird als polarisiert bezeichnet) der Nucleoli in den Vorkernen.

- Z1: Gleiche Anzahl (3-7), Größe und Polarisation der Nucleoli in den Vorkernen
- Z2: In etwa gleiche Anzahl (3-7) und Größe aber nicht polarisierte Nucleoli
- Z3: Verschiedene Anzahl und oder nicht polarisierte Nucleoli in den Vorkernen
- Z4: Vorkerne unterschiedlich groß oder nicht aneinander gelagert

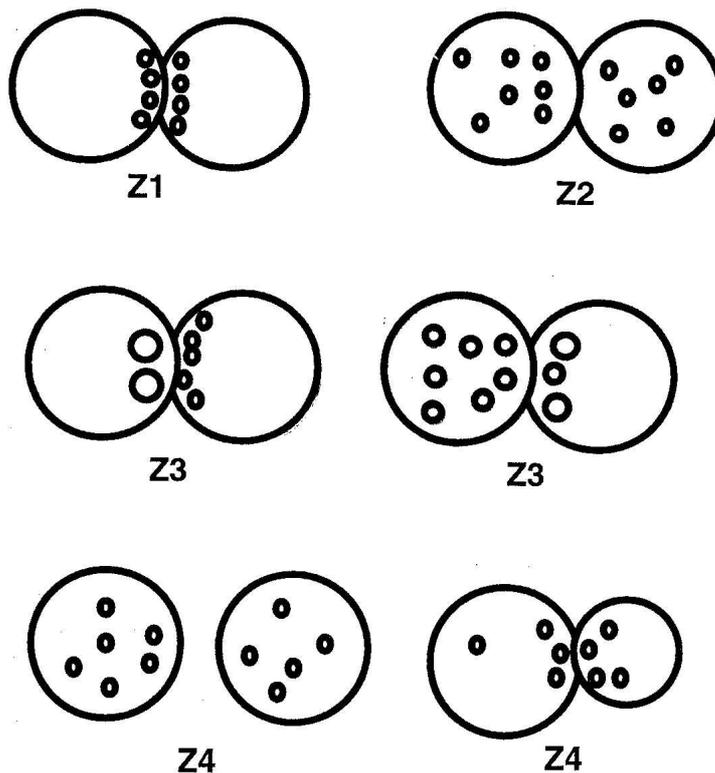


Abb.15: Schematische Darstellung der Vorkernmuster (Z-Score)

2.6.9.3 Lage der Vorkerne in der Oozyte

Bezüglich der Lage der Vorkerne in der Oozyte wurde unterschieden in

- Zentral
- Peripher

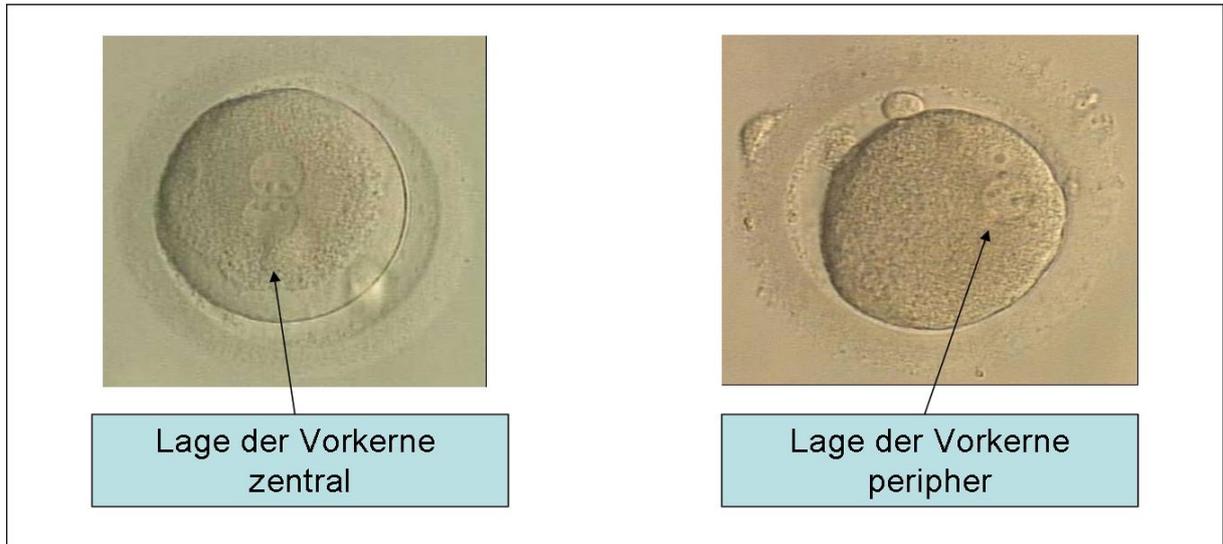


Abb.16: Darstellung der Lage der Vorkerne in der Oozyte zentral oder peripher

2.6.9.4 Vorhandensein eines Halos (Ebner et al., 2003; Stalf et al., 2002)

In dem Zytoplasma der Oozyte ist häufig der Effekt eines Halos (das Fehlen der granulären Struktur im Randbereich) zu beobachten (Scott et al., 1998). Das Vorhandensein oder Fehlen des Halos wurde dokumentiert.

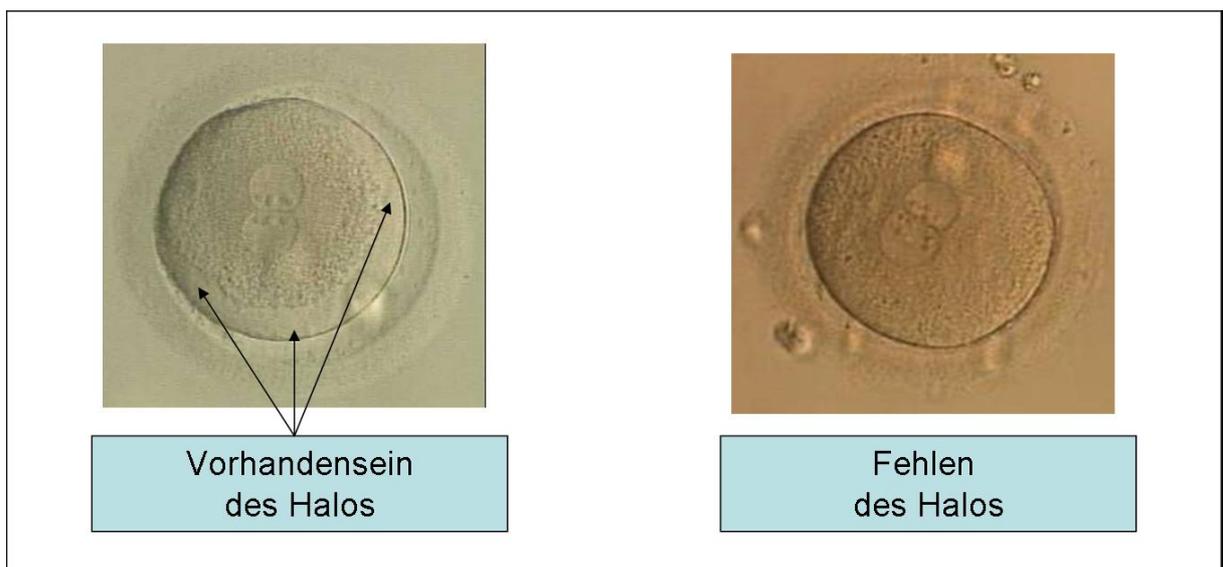


Abb.17: Auftreten oder Fehlen eines Halos im Vorkernstadium

2.6.10 Embryonenbeurteilung

Die Vorkernstadien für den Embryotransfer wurden unter Berücksichtigung der vorhandenen Erkenntnisse (Kombination der Oozyten-Vorkernbeurteilung) ausgewählt und in Einzelkultur weiterkultiviert. An jedem Tag wurde morgens ein Embryograding nach Hill et al., 1989 und Steer et al., 1992 (Tab.6) durchgeführt. Der Embryoscore jedes Embryos sowie der kumulative Embryoscore des Transfers wurden nach Steer et al. (1992) dokumentiert.

Der Embryo wurde bezüglich seiner morphologischen Erscheinung in A, B, C und D (Tab.6) eingeteilt. Dieses Grading repräsentiert einen Multiplikator. Der Score des Embryos ergibt sich aus dem Multiplikator mal der Anzahl der Blastomeren des Embryos. Der kumulative Embryoscore ergibt sich aus der Summe der Embryoscores der transferierten Embryonen pro Patient pro Transfer.

Tab.6: Embryograding (nach Hill et al., 1989 und Steer et al., 1992)

Grad	Faktor	Fragmente	Blastomeren	Zytoplasma
A	4	-	Gleichförmig, rund Symmetrisch angeordnet	Gleichmäßig Leicht granuliert
B	3	Bis 10%	Leichte Größenunterschiede Form etwas unregelmäßig	Ungleichmäßig granuliert
C	2	20 bis 50%	Ungleichmäßig groß, großer PVS Ungleichmäßig verteilt Reduzierte Blastomerenhaftung	Dunkle Granula Vakuolen
D	1	> 50%	Nur eine Blastomere sichtbar Ungleichförmige Blastomeren Großer PVS Blastomeren ungleich verteilt	Dunkle Granula Vakuolen

2.6.11 Embryotransfer

Der Embryotransfer erfolgte am Tag zwei (Tag2) oder drei (Tag3) nach der Punktion. Es wurde der Embryoscore, die Endometriumdicke und ein evtl. assisted hatching (Eröffnen der Zona pellucida) (Montag und Baukloh, 1998) mit einem kontaktfreien Diodenlaser mit 1480 nm Wellenlänge dokumentiert.

Der Embryotransfer wurde bei der Patientin in Steinschnittlage durchgeführt. Der, bzw. die Embryonen wurden mit möglichst wenig Kulturmedium (höchstens 15 µl) in die Katheterspitze eines Embryotransferkatheters aufgezogen. Nach Reinigung der Vagina mit 0,9% Kochsalzlösung erfolgte das Platzieren des, bzw. der Embryonen transvaginal und transzervikal ins Cavum uteri mittels des Katheters. Letzterer wurde unter mikroskopischer Sicht anschließend gespült, um zu kontrollieren, ob die Embryonen nicht im Katheter verblieben waren.

2.6.12 Lutealphasenunterstützung

Im Rahmen einer Sterilitätstherapie mit Anwendung von GnRH-Analoga in der Ovulationsstimulation ist es nötig, eine Lutealphasenunterstützung durchzuführen (Bourgain et al., 2003). Ab dem Transfer erfolgte eine tägliche intravaginale Applikation von Progesteron (Utrogest, Kade Deutschland oder Crinone, Serono, Unterschleissheim) als hormonelle Unterstützung. Eine hCG Gabe kann zudem als Stimulator der Progesteronsynthese im Corpus luteum dienen. Diese hormonelle Unterstützung sollte zumindest bis zum Schwangerschaftstest 12 Tage nach Embryotransfer angewendet werden.

2.6.13 Zyklusausgang

14-15 Tage nach Follikelpunktion wurde der β -hCG-Spiegel im Serum bestimmt. Bei einem positiven Wert (>30 I.E./Liter) wurde die hormonelle Unterstützung mit Progesteron fortgeführt (Bourgain et al., 2003; Ludwig et al., 2002) und wenn nötig zusätzlich noch mit Östrogen unterstützt. Im positiven hCG-Fall wurde eine Woche später eine vaginale Ultraschallkontrolle durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur klinische Schwangerschaften erfasst. Eine klinische Schwangerschaft ist eingetreten, wenn neben dem hCG-Anstieg das Auftreten einer Fruchthöhle gesehen wurde. Bei dem Eintreten einer Schwangerschaft wurde die Anzahl der Fruchthöhlen und die Herzaktivitäten registriert. Die Betreuung der Schwangerschaft erfolgte durch die niedergelassenen Gynäkologen. Der Verlauf der Schwangerschaft und bei Geburt der Geburtsverlauf, der Entbindungsmodus, sowie Komplikationen wurden dokumentiert. Vom Kind wurden der Gesundheitszustand, die Größe und das Gewicht sowie evtl. Fehlbildungen notiert.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Parameter

Es wurden 564 Zyklen mit intracytoplasmatischer Spermatozoeninjektion (ICSI) bei 528 Patientinnen durchgeführt. In allen Fällen konnten Oozyten (insgesamt 5676) gewonnen werden und in 562 Fällen kam es zu einem Embryotransfer. Hieraus resultierten 181 klinische Schwangerschaften (SS), wobei es bei 144 zur Geburt von 175 Kindern kam. Die allgemeinen Ergebnisse werden in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 7 : Allgemeine Kenngrößen der Studie

Patientinnen	528	Altersdurchschnitt (20 Jüngste/45 Älteste)	32,5 Jahre ±4,3
		BMI (Durchschnitt)	22,7±3,2
		Anzahl Vorversuche (Durchschnitt)	0,8 ±0,9
Zyklen	564	Oozyten gewonnen	5676
		Oozyten pro Punktion (Durchschnitt)	10 ±4,4
		MII Oozyten	4778
		MII Oozyten pro Punktion (Durchschnitt)	8,5 ±3,8
		Reguläre Vorkernstadien	3342
		Befruchtungsrate	70% ±20,6
Transfers	562	Embryonen transferiert	1204
		Embryonen pro Transfer (ET) (Durchschnitt)	2,14 ±0,5
		Implantationsrate (IR)	18,4%
Schwangerschaften(SS)	181	Schwangerschaftsrate (SSR) pro ET	32,2%
Geburten	144	Baby take home Rate	25,6%
Geborene Kinder	175	Einlingsgeburten	114
		Zwillingsgeburten	29
(7Zyklen Geburt und Abort)		Drillingsgeburt	1
		Mehrlingsrate	20,8%
Aborte (davon 7 auch Geburt)	39	Abortrate	21,5%
EUG	5		2,8%

Für den Ausgang einer Kinderwunschtherapie sind viele Faktoren entscheidend. Die Intension dieser Dissertation besteht darin, durch die genaue Charakterisierung der Gameten und der Vorkernstadien die Auswahl der Zellen mit dem höchsten Entwicklungspotential zu optimieren. Es ist wichtig, „äußere“ Faktoren (Alter der Frau, Anzahl Vorversuche, Anzahl transferierter Embryonen, Befruchtungsrate, Anzahl gewonnener bzw. reifer Oozyten) mit einzubeziehen, um die Erfolgchancen der Kinderwunschtherapie unter den Bedingungen des deutschen Embryonenschutzgesetzes zu erhöhen.

In wenigen Fällen waren bei den Oozyten und Vorkernstadien (<1%) einzelne Faktoren nicht genau definierbar und wurden daher nicht erfasst, wodurch geringe Diskrepanzen bezüglich der absoluten Zahlen in den Auswertungstabellen zu erklären sind.

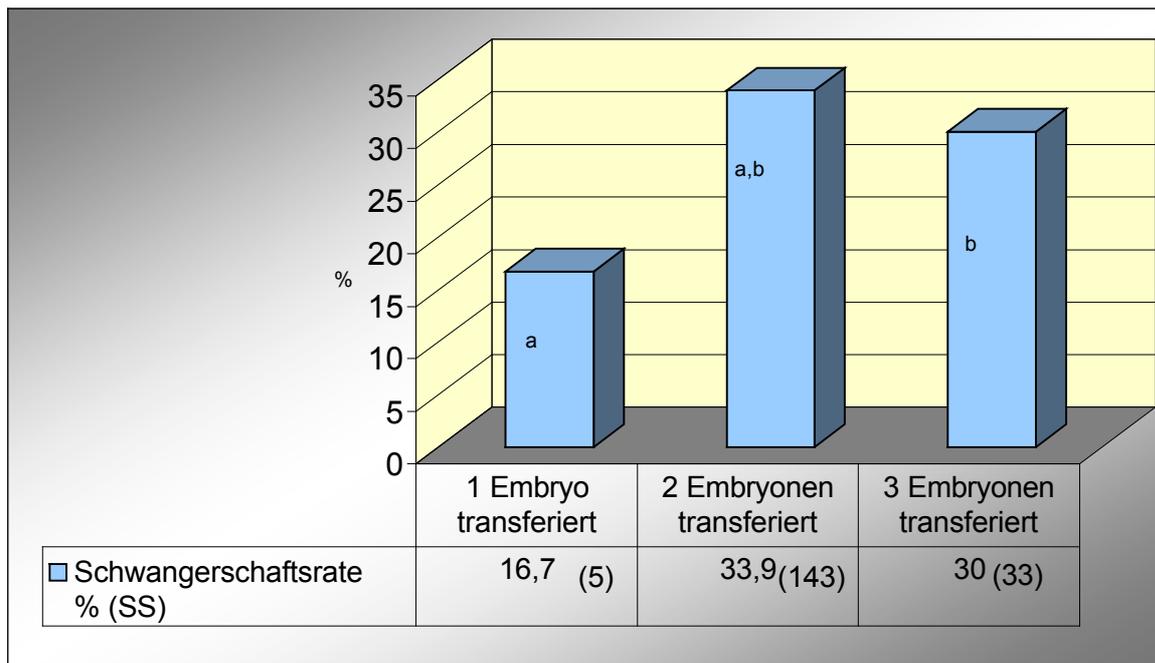
Ein wichtiger Aspekt ist die Zumutbarkeit für den Patienten, das bedeutet, die Auswahl der Zellen für den Transfer wurde nach dem momentanen Stand der Literatur durchgeführt. Somit ist die Gruppenstärke mit den vermeintlich schlechteren Parametern immer geringer und teilweise statistisch nicht mehr auswertbar.

3.1.1 Auswertung bezüglich allgemeiner Faktoren

(Anzahl transferierter Embryonen, Alter der Frau, Body Mass Index (BMI), Anzahl Vorversuche, Befruchtungsrate, Anzahl reifer Oozyten)

3.1.1.1 Einfluss der Anzahl der transferierten Embryonen auf die Schwangerschaftsrate

Die Anzahl der transferierten Embryonen wurde so gewählt, dass die Schwangerschaftschance möglichst groß und das Mehrlingsrisiko gering war. Nur ein Embryo wurde immer dann transferiert, wenn nicht mehr als ein Vorkernstadium zur Verfügung stand. Dies war bei 30 Zyklen der Fall. Mit 422 Zyklen trat der Transfer von zwei Embryonen (Det) am häufigsten auf. Drei Embryonen (bei 110 Zyklen) wurden in der Regel nur dann transferiert, wenn die Schwangerschaftschancen auf Grund der Anzahl an Vorversuchen (>1), der Befruchtungsrate (<50%), des Alters der Frau (>37Jahre) oder der Qualität der Vorkernstadien vermindert waren. Die niedrigeren Implantationsraten der Zyklen mit drei Embryonen beim Transfer lassen sich so erklären (Transfer 2 Embryonen 21,4%/Transfer 3 Embryonen 11,5%). Daraus resultierend betrug die Mehrlingsrate beim Transfer von zwei Embryonen 22,8% und bei drei Embryonen 11,5%. Der BMI-Durchschnitt (22,3/22,7/22,9) der Frauen war, ob ein, zwei oder drei Embryonen transferiert wurden, nicht signifikant unterschiedlich.



^aP<0,05; ^bP=ns (nicht signifikant)

Abb. 18.: Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen pro Transfer

Wie aus der Abb. 18 hervorgeht, waren die Schwangerschaftsraten beim Vergleich der Transfers von einem zu zwei Embryonen beim Transfer signifikant unterschiedlich, auch wenn der Anteil der Transfers mit einem Embryo (n=30) gering war. Sofern bei den Zyklen lediglich ein Embryo zum Transfer gelangte, konnte ein deutlich (P<0,05) höheres Alter der Patientinnen und eine signifikant (P<0,05) geringere Befruchtungsrate und Oozytenanzahl festgestellt werden, im Vergleich mit Zyklen bei denen zwei oder drei Embryonen transferiert wurden.

Die Schwangerschaftsraten der Transfers mit zwei oder drei Embryonen wiesen keine signifikanten (P= 0,440) Unterschiede auf, obwohl die Patientinnen, bei denen drei Embryonen transferiert wurden, signifikant älter (P=0,017) waren und mehr Vorversuche (1,5 zu 0,6; P=0,001) durchgeführt hatten, als die Patientinnen, bei denen lediglich zwei Embryonen zum Transfer gelangten. Da die Schwangerschaftsraten der Zyklen mit zwei oder drei Embryonen beim Transfer nicht unterschiedlich waren, wurden diese ausgewertet, um den Einfluss der Parameter Alter der Frau, Anzahl Vorversuche, BMI, Anzahl MII Oozyten und Befruchtungsrate auf den Ausgang der Therapie abzuschätzen.

Die Auswertung erfolgte, indem der zu untersuchende Parameter auf signifikante Unterschiede bezüglich der Schwangerschaftsraten ausgewertet wurde.

Um zu erkennen, ob andere Parameter den auszuwertenden beeinflusst haben, wurden die zu vergleichenden Gruppen auf Homogenität bezüglich der anderen Parameter untersucht (Tabelle A im Anhang). Wenn signifikante Unterschiede zu erkennen waren, wurden diese aufgeführt.

Tab 8. : Allgemeine Kenngrößen der Zyklen mit einem Embryotransfer mit zwei oder drei Embryonen

Patientinnen	508	Altersdurchschnitt (20 Jüngste/45 Älteste)	32,4Jahre \pm 4,3
		BMI (Durchschnitt)	22,7 \pm 3,2
		Anzahl Vorversuche (Durchschnitt)	0,8 \pm 0,9
Zyklen	532	Oozyten gewonnen	5463
		Oozyten pro Punktion im (Durchschnitt)	10,3 \pm 4,4
		MII Oozyten	4604
		MII Oozyten pro Punktion im (Durchschnitt)	8,7 \pm 3,8
		Reguläre Vorkernstadien	3269
		Befruchtungsrage	71% \pm 19,2
Transfers	532	Embryonen transferiert	1174
		Embryonen pro Transfer (Durchschnitt)	2,2 \pm 0,4
		Implantationsrate	21,4%
Schwangerschaften (SS)	176	Schwangerschaftsrate pro Transfer	33,1%
Geburten	140	Baby take home Rate	26,3%
Geborene Kinder	171	Einlingsgeburten	110
		Zwillingsgeburten	29
(7Zyklen Geburt und Abort)		Drillingsgeburt	1
		Mehrlingsrate	21,4%
Aborte (davon 7 auch Geburt)	38	Abortrate	21,6%
EUG	5		2,8%

3.1.2 Einfluss der allgemeinen Faktoren auf den Ausgang der Therapie beim Transfer von zwei oder drei Embryonen

(Alter, Body Mass Index, Anzahl an Vorversuchen der Frau, Befruchtungsrate und Anzahl MII-Oozyten)

3.1.2.1 Einfluss des Alters der Frau auf die Schwangerschaftsrate

Tab.9: Einfluss des Alters der Frauen zum Zeitpunkt des Zyklus auf die Schwangerschaftsrate

Alter (Jahre)	Zyklen Anzahl (n)	Schwangerschaftsrate (SS)
>31	177	35,6% ^a (63)
31-35	225	32,4% ^{a,b} (73)
36-40	116	33,6% ^{b,c} (39)
> 40	12	8,3% ^c (1)

^{a,b}P=ns; ^cP<0,005

Es zeigte sich mit dem Chi² Test erst ab einem Alter über 40 Jahre der Frau eine signifikante Abnahme der Schwangerschaftsrate. Die Implantationsrate (Tabelle A Anhang) nahm kontinuierlich mit dem Alter ab. Dies war nicht signifikant (P= 0,130; 0,414) bis zum 40. Lebensalter. Frauen über 40 Jahre zeigten eine signifikant geringere Implantations- (P= 0,041) und Schwangerschaftsrate (P= 0,002) als jüngere Frauen. Zudem war bei Frauen mit einem Lebensalter über 40 Jahren die Anzahl an Vorversuchen höher und die Anzahl an Oozyten niedriger (Tabelle A im Anhang).

Tab.10: Anzahl transferierter Embryonen (Emb) in Abhängigkeit vom Alter und daraus resultierende Schwangerschaftsrate (SSR) und Implantationsrate (IR)

Alter der Frau (Jahre)	2Emb:3Emb transferiert	2 Emb. (Zyklen/SS/Fruchthöhle) SSR (IR)	3 Emb. (Zyklen/SS/Fruchthöhle) SSR (IR)
< 31	5,1:1	(148/54/72) 36,5 % (24,3%)	(29/9/10) 31,0 % (11,5%)
31-35	3,9:1	(181/58/73) 32,0 % (20,2%)	(46/15/16) 32,6 % (11,6%)
36-40	3,0:1	(87/30/35) 34,5 % (20,1%)	(29/9/9) 31,0 % (10,3%)
>40	1,0:1	(6/1/1) 16,7 % (8.3%)	(6/0/0) 0 % (0%)

Mit zunehmendem Alter der Frau wurden mehr Embryonen transferiert. So nimmt das Verhältnis der Transfers mit zwei Embryonen zu drei Embryonen ab. Der Vergleich der Altersgruppe < 31 Jahre mit der im Alter von 31-35 Jahren zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl transferierter Embryonen (P=0,310). Die Altersgruppe <31 Jahre und 35-40 Jahre zeigte tendenziell (P= 0,070) mehr Embryonen beim Transfer im höheren Alter. Patientinnen über 40 bekamen signifikant (P=0,004) mehr Embryonen transferiert als die Altersgruppe < 31 Jahre.

Die Schwangerschaftsraten zeigten bis zum 40. Lebensjahr keine signifikanten Unterschiede (Tab.9).

3.1.2.2 Einfluss des Body Mass Index (BMI) der Frau auf die unterschiedlichen Parameter und die Schwangerschaftsrate

Das Körpergewicht der Frau in Relation zur Körpergröße (Gewicht in Kilogramm geteilt durch Größe zum Quadrat) ergibt den body mass index, der einen Einfluss auf die Schwangerschaftsraten haben kann. Dies ist bekannt bei starker Adipositas (BMI>30 (Berkow et al., 1999), so dass dies als Ausschlusskriterium gewertet wurde.

Tab.11: Einfluss des Body Mass Index (BMI) der Frau auf die Schwangerschaftsrate (Einteilung Berkow et al., 1999)

BMI	Zyklen n	Schwangerschaftsrate (SS)
< 20 (Untergewicht)	95	28,4% ^a (27)
20-25 (Normalgewicht)	321	34,9% ^{a,b} (112)
>25 (Übergewicht)	116	31,9% ^b (37)

^{a,b}P=ns

Der BMI hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Ausgang der Therapie bei einem Patientenkollektiv mit einem BMI <30. Dies zeigten die Schwangerschafts- (Tab. 11) und Implantationsraten (Tabelle A im Anhang; IR: BMI<20 zu 20-25 P= 0,1481; und 20-25 zu >25 P=0,981).

3.1.2.3 Einfluss der Anzahl der Vorversuche der Frau auf die Schwangerschaftsrate

Die Anzahl der Vorversuche wurde mit nicht mehr als drei Vorversuche als Einschlusskriterium gewertet.

Tab.12: Einfluss der Anzahl der Vorversuche auf die Schwangerschaftsrate

Vorversuche	Zyklen n	Schwangerschaftsrate (SS)
0	264	37,9% ^{a,d} (100)
1	159	32,1% ^{a,b} (51)
2	81	22,2% ^{b,c,d} (18)
3	28	25,0% ^c (7)

^{a,b,c}P=ns; ^dP<0,01

Die Betrachtung der Anzahl Vorversuche jeweils von einem Versuch zum nächsten ließ keinen signifikanten Einfluss auf die Schwangerschaftsrate erkennen.

Wurde der Einfluss von zwei negativen Vorversuchen auf die Schwangerschaftsrate (22,2%) zu einem Vorversuch (32,1%) untersucht, so war die Wahrscheinlichkeit für das Erreichen einer Schwangerschaft im letzteren Fall tendenziell höher (P=0,111) und war beim Vergleich zu keinem Vorversuch (37,9%) signifikant erhöht (P= 0,009), wie aus Tabelle 12 hervorgeht. Die Anzahl an transferierten Embryonen nahm mit Zunahme der Versuche signifikant zu (Tabelle A Anhang).

3.1.2.4 Einfluss der Befruchtungsrate auf die Schwangerschaftsrate

Die Befruchtungsrate eines Zyklus ergibt sich aus der Anzahl reifer MII Eizellen, bei denen die ICSI durchgeführt wurde, und der daraus resultierenden Anzahl an Vorkernstadien mit zwei Vorkernen (Anzahl Vorkernstadien /Anzahl MII Eizellen x 100 in %).

Tab. 13 : Einfluss der Befruchtungsrate auf die Schwangerschaftsrate

Befruchtungsrate	Zyklen n	Schwangerschaftsrate (SS)
<50%	56	16,1% ^a (9)
50-69,9%	180	31,1% ^{a,b} (56)
70-79,9%	98	36,7% ^{b,c} (36)
≥80%	198	37,9% ^c (75)

^aP<0,05;

^{b,c}P=ns

Die Befruchtungsrate zeigte bei einem Wert von <50% einen signifikanten negativen Einfluss (P= 0,028) auf die Schwangerschaftschancen eines Paares. Diese hatten allerdings auch schon mehr Vorversuche als Paare mit Zyklen mit höherer Befruchtungsrate. Die Schwangerschaftschance wies bei Befruchtungsraten >50% (Tabelle 13) keine signifikanten Unterschiede auf, zeigte jedoch mit zunehmenden Befruchtungsraten eine Erhöhung der Schwangerschaftsraten.

3.1.2.5 Einfluss der Anzahl der MII Oozyten auf die Schwangerschaftsrate

Das Ausschleusen des ersten Polkörpers signalisiert den chromosomalen Reifestand der Oocyte. Sie befindet sich dann in der arretierten Metaphase der 2. Reifeteilung der Meiose. Patienten mit einer geringen „ovariellen Response“ auf die Stimulation (≤2 Follikel) wurden nicht in die Studie aufgenommen (Ausschlusskriterium).

Tab.14: Einfluss der Anzahl M II Oozyten auf die Schwangerschaftsrate

M II Oozyten	Zyklen n	Schwangerschaftsrate (SS)
< 6	116	32,7% ^a (38)
6-10	258	31,4% ^{a,b} (81)
>10	158	36,1% ^b (57)

^{a,b}P=ns

Es waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Einflusses der Anzahl MII Oozyten auf die Schwangerschaftsrate festzustellen.

Auch die genaue Aufschlüsselung der Gruppe <6 MII Oozyten zeigte bei bis zu 3 MII Oozyten eine 35,5%-ige und bei bis zu 4 MII Oozyten eine 33,8%-ige Schwangerschaftsrate pro Transfer, wobei die Größe der Gruppen relativ gering war (31 bzw. 65 Zyklen).

In Abb. 19 werden die allgemeinen Parameter zusammengefasst, die einen signifikanten Einfluss auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie hatten.

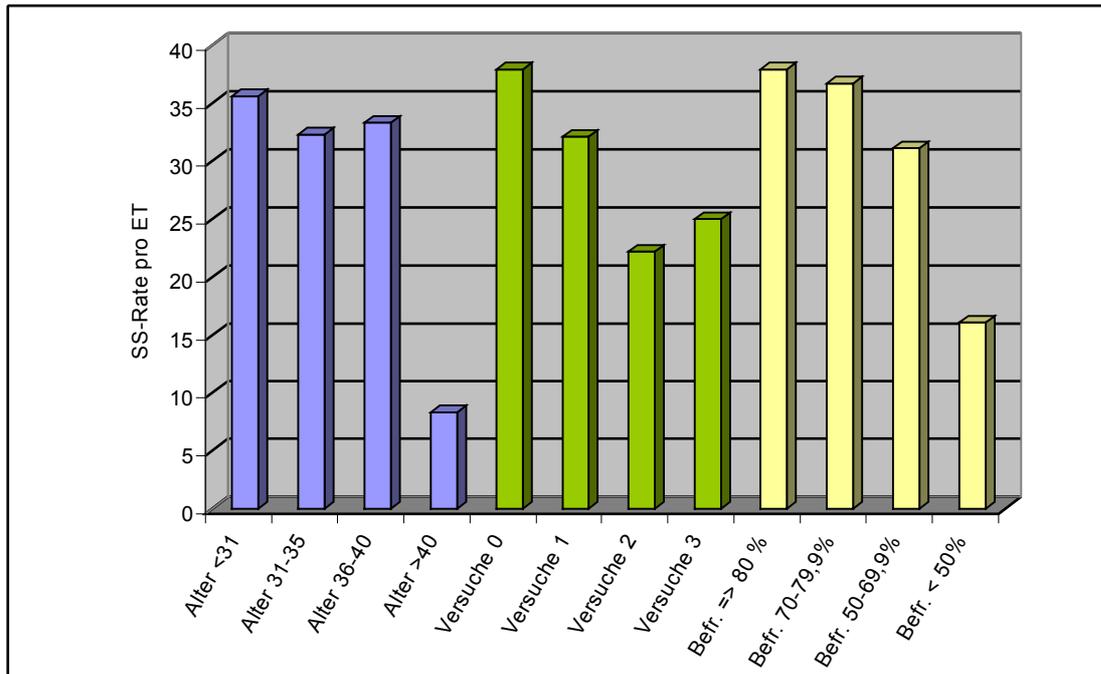


Abb. 19: Signifikante Parameter „Alter der Frau, Anzahl an Vorversuchen und die Befruchtungsrate“ bezüglich der Schwangerschaftsrate beim Transfer von zwei oder drei Embryonen

3.1.2.6 Einfluss des Embryoscores auf die unterschiedlichen Parameter und die Schwangerschaftsrate

Bezüglich des Embryoscores muss zwischen dem Transfer von zwei und drei Embryonen unterschieden werden, da es sich um einen addierten Score handelt. Bei 422 Zyklen wurden zwei Embryonen und nur bei 110 Transfers drei Embryonen transferiert. Die Gruppe mit drei Embryonen war für statistische Auswertungen relativ klein und daher wurden nur die Transfers mit zwei Embryonen ausgewertet. Ebenso war entscheidend, gleiche Transfertage auszuwerten. Nicht bei allen Zyklen wurde bis

zum Tag3 nach der Follikelpunktion kultiviert und aus diesem Grund wurden die Embryonen nach der Kulturdauer ausgewertet.

Tab.15: Zusammenhang zwischen dem Embryoscore am zweiten (Tag2) oder dritten Tag (Tag3) nach Follikelpunktion zur Schwangerschaftsrate

	Anzahl Zyklen	Schwangerschaftsrate (SS)
Embryoscore Tag2		
<21	112	16,1 % ^a (18)
21-30	144	43,1 % ^{a,b} (62)
>30	53	50,9 % ^b (27)
Embryoscore Tag3		
<31	74	14,9 % ^c (11)
31-50	164	29,3 % ^{c,d} (48)
>50	118	53,4 % ^d (63)

^{a,d}P<0,001; ^bP=ns; ^cP<0,05;

Der Embryoscore wies einen signifikanten Einfluß auf den Ausgang der Therapie auf. Am Tag2 nach Follikelpunktion erhöhte sich die Schwangerschaftsrate deutlich (P<0,001) sobald der Embryoscore über 21 lag und am Tag3 nach Follikelpunktion zeigte sich signifikant (P= 0,017 und <0,001), je höher der Embryoscore, desto größer die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft. Die Abb. 21 verdeutlicht dies grafisch.

Es bestand zudem ein Zusammenhang (Tabelle B im Anhang) zwischen der Befruchtungsrate und der Anzahl an Vorversuchen und dem Embryoscore. Je höher der Embryoscore war, desto höher war die Befruchtungsrate im Zyklus und desto weniger Vorversuche waren bei der Patientin durchgeführt worden.

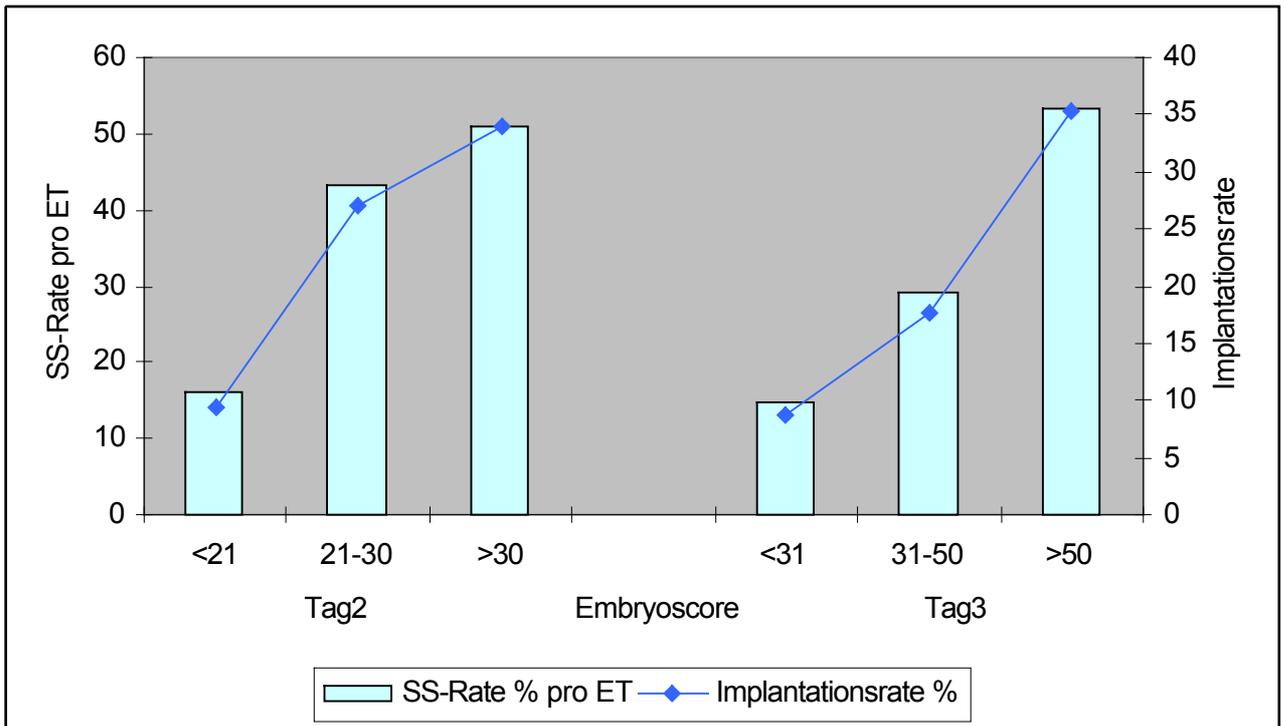


Abb. 21: Darstellung der Implantations- und Schwangerschaftsrate (pro Transfer) in % beim Transfer von zwei Embryonen in Abhängigkeit vom addierten Embryoscore beider Embryonen am Tag2 und Tag3.

3.2 Auswertung bezüglich des Einflusses der paternalen Gameten auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft

Besteht ein Zusammenhang zwischen den klassischen Spermatozoenparametern Zelldichte, Morphologie, Motilität und der Schwangerschaftsrate?

3.2.1 Zelldichte

Der Mittelwert der Zelldichte betrug 22 Mio/ml mit einer Standardabweichung von 34,4, wobei der höchste Wert 291 Mio/ml und der niedrigste 0,0001 Mio/ml betrug.

Der Vergleich der unterschiedlichen Zelldichten ergab keine signifikanten Unterschiede ($P=0,339$; $0,499$ und $0,964$) bei den Schwangerschaftsraten (Anhang Tab.C).

Auch bei der Gegenüberstellung des Auftretens einer Oligozoospermie (373 Zyklen) und keiner Oligozoospermie (191 Zyklen) konnten keine signifikanten Unterschiede ($P=0,287$) bezüglich der Schwangerschaftsrate (32,2% / 31,9%) festgestellt werden.

Die Zelldichte hatte bei Anwendung der ICSI-Methode keinen signifikanten Einfluss auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie.

3.2.2 Morphologie

Befinden sich in einem Ejakulat weniger als 30% normal geformte Spermatozoen, wird dies als Teratozoospermie bezeichnet (WHO Laborhandbuch, 1999).

Bei 525 Zyklen wurde eine Morphologie durchgeführt. Bei 74 Ejakulaten wurden nur Spermatozoen mit eingeschränkter Morphologie gefunden. Der höchste prozentuale Wert an normal geformten Spermatozoen im Ejakulat war 54% (siehe Tabelle C im Anhang).

Beim Vergleich der folgenden Zyklen, in denen a) keine normal geformten Spermatozoen, b) 1-14% normal, c) 15-29% normal oder d) ≥ 30 % normale geformte Spermatozoen vorhanden waren, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Schwangerschaftsraten (27,0%; 34,3%; 31,8%; 31,6%) ($P=0,242$; 0,496; 0,505). Die Implantationsraten (14,1%; 20,0%; 20,5; 16,1%) ließen eine Tendenz ($P=0,091$) zwischen der Gruppe ohne normal und mit 1-14% normal geformten Spermatozoen feststellen. Im Vergleich zu den Zyklen mit 15-29% ($P=0,128$) oder ≥ 30 % ($P=0,583$) normal geformten Spermatozoen war diese Tendenz nicht mehr erkennbar.

Die Morphologie spielte daher offensichtlich keine signifikante Rolle als Marker für den Ausgang der Therapie.

3.2.3 Motilität

Eine Asthenozoospermie ist definiert, wenn die progressive Beweglichkeit (a+b) der Spermatozoen unter 50%, bzw. die schnell progressiven (a) unter 25% liegen.

521 Zyklen konnten bezüglich der Motilität ausgewertet werden. Bei nur 10 Zyklen war eine schnell progressive (a) Beweglichkeit von >25 % zu finden. Bei 86 Zyklen lag die progressive Motilität (a+b) ≥ 50 %. Der hohe Anteil an Asthenozoospermien war erwartungsgemäß, da die Subfertilität des Mannes die Hauptindikation zur Durchführung der ICSI ist.

Die Schwangerschaftsraten der Zyklen mit Spermatozoenmotilitäten a+b <11 %, 11-30% und >30 % zeigten keine signifikanten Unterschiede ($P=0,392$ und 0,585). Ebenso verhielt es sich mit dem Anteil der „a“ Motilitäten, wenn keine (0%) motilen Spermatozoen mit 1-9% „a“- oder >9 % „a“ Anteil an motilen Spermatozoen ($P=0,698$ und 0,999) verglichen wurden.

Bei Anwendung der ICSI-Methode in der Kinderwunschtherapie war die Qualität der Spermatozoenmotilität für den Ausgang der Therapie nicht relevant, solange motile Spermatozoen vorhanden waren.

In der Abb.22 wird der Einfluss der paternalen Faktoren auf die Schwangerschaftsrate bei der Durchführung der ICSI zusammengefasst.

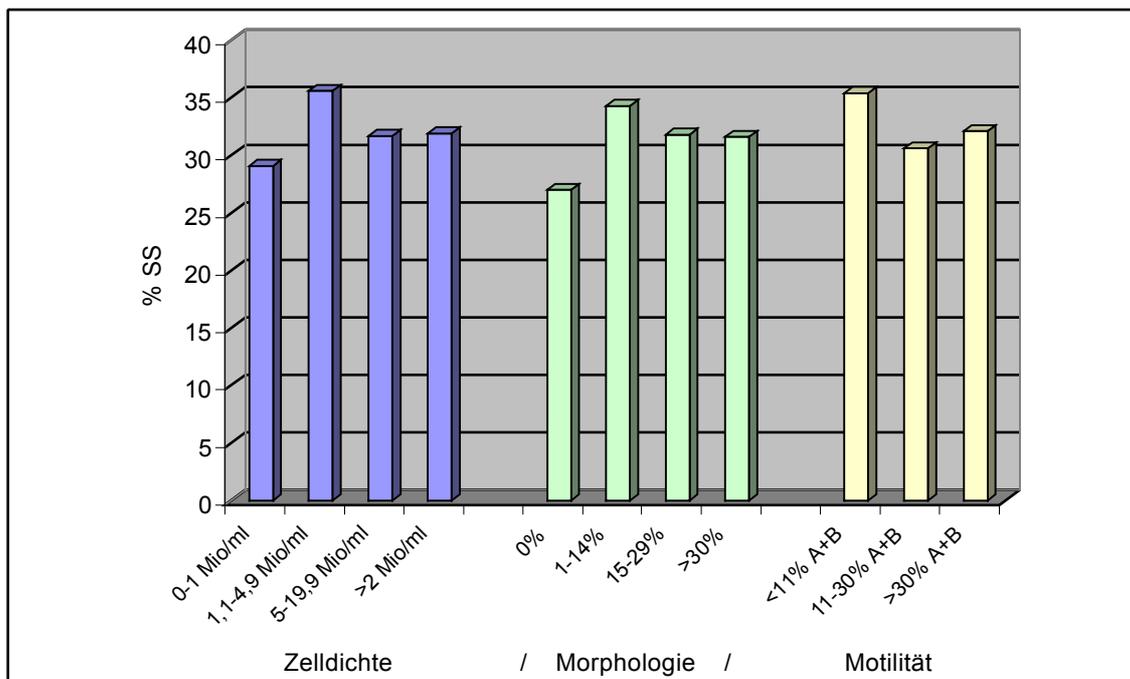


Abb. 22: Zusammenhang zwischen den klassischen Spermatozoenparametern Zelldichte, Morphologie, Motilität und der Schwangerschaftsrate

Die zu vergleichenden Gruppen zeigten bei der Auswertung der Zelldicht, Morphologie und Motilität keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters der Frau, des Alters des Mannes, der Anzahl an Vorversuchen der Frau, der Anzahl an transferierten Embryonen, der Befruchtungsrate und der Implantations- und Schwangerschaftsrate (Tabelle C im Anhang). Lediglich der Vergleich der Ejakulate mit keinen Spermatozoen mit „normaler“ Morphologie zu denen mit ≥ 30 % Spermatozoen mit „normaler“ Morphologie ließ im Alter der Frau und in der Befruchtungsrate signifikante Unterschiede (Tabelle C im Anhang) erkennen.

3.3 Auswertung bezüglich des Einflusses der maternalen Gameten auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft

Bei der Studie wurden bei 564 Zyklen 5676 Kumulus-Oozytenkomplexe gefunden. Nach Entfernung des Kumulus wurde eine Beurteilung der Reife durchgeführt, wobei sich 4778 Oozyten in der zweiten Reifeteilung der Meiose (MII) befanden. Diese Oozyten wurden morphologisch dokumentiert und charakterisiert, um herauszufinden, welche Faktoren als Marker für das Entwicklungspotential der Oozyte geeignet sind. Nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) entstanden 3342 Vorkernstadien (2PN) (Befruchtungsrate 70%) mit zwei Vorkernen.

Ausgewertet wurde der Einfluss jedes einzelnen Faktors (Zytoplasma, Einschlusskörper, Vakuolen, perivitelliner Spalt, Polkörper, Form der Oozyte und die Zona pellucida) auf die resultierenden Befruchtungs- und Degenerationsraten sowie den Z- und Embryoscore. Bei der Auswertung der einzelnen Faktoren wurde allerdings nicht unterschieden, ob die Zelle nur eine Abnormalität zeigte oder ob mehrere zu registrieren waren, da dies zu große Kombinationsmöglichkeiten und zu geringe Fallzahlen beinhaltet hätte. Es wurde getestet, welche Unterschiede auftreten beim Vorhandensein zu untersuchenden Auffälligkeit verglichen mit dem Fehlen derselbigen. Für den Z-Score wurde der Prozentanteil an Z1 Vorkernstadien angegeben, da sie die signifikant ($P=0,012$ Tabelle 40) (Scott et al., 2000) beste Entwicklungsprognose hatten. Zudem wurden die Z4 mit besonders schlechter Prognose (Scott et al., 1998) aufgeführt. Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurden die Z2 und Z3 nicht mit aufgeführt.

Die Auswertung des Embryoscores in Bezug auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft (Tab. 17) zeigte am Tag2, dass ein signifikanter Unterschied beim Transfer von 2 Embryonen zu registrieren war, wenn der addierte Embryoscore >20 war. Dies entsprach einem Embryoscore >10 bei einem Embryo. Am Tag3 wurde signifikant in „schlechte“ (<16), „gute“ (16-25) und „sehr gute“ (>25) Embryonen vom Score her unterschieden. Aus diesen Gründen wurde am Tag2 der Prozentanteil der Embryonen mit einem Score >10 und am Tag3 <16 und >25 angegeben. Es entstanden 1204 Embryonen, wobei nicht alle am Tag2 und Tag3 beurteilt wurden. Wie bei dem Z-Scoring wurden die Embryonen mit einem Score <10 am Tag2 und zwischen 16 und 25 am Tag3 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt. In den folgenden

Tabellen wird daher die Gesamtanzahl beurteilter Embryonen und die Embryonen mit einem Score >10 am Tag2 und <16 oder >25 aufgeführt.

Um Schwangerschaftsraten auswerten zu können, wurden die Transfers mit zwei Embryonen ausgewertet (422 Zyklen), da die Fallzahlen bei drei Embryonen (110 Zyklen) und einem Embryo (30 Zyklen) pro Transfer zu gering und die Kombinationsmöglichkeiten bei drei Embryonen zu groß waren.

Wenn es signifikante Unterschiede in den zu vergleichenden Gruppen gab, bezüglich des Alters der Frau, der Anzahl Vorversuche und der Befruchtungsrate, wurden diese aufgeführt.

3.3.1 Zytoplasma

Bei 4766 Oozyten konnte die Beschaffenheit des Zytoplasmas dokumentiert werden.

Bei 3515 zeigte sich ein homogenes und bei 1251 ein granuliertes Zytoplasma. Bezogen auf die Granulierung des Zytoplasmas wurde nach partiell (990 Oozyten) und komplett granuliert (261 Oozyten) differenziert. Die Anzahl der komplett granulierten Oozyten war relativ gering. In Hinblick auf die Befruchtungsrate zeigte sich eine Abnahme derselbigen mit dem Grad der Granulierung (72,1% homogen; 65,7% partiell granuliert und 59,4% komplett granuliert). Die Befruchtungsrate von Oozyten mit homogenem Zytoplasma war signifikant ($P=7 \cdot 10^{-5}$) höher, als die von granulierten Oozyten. Partiiell granulierten Oozyten hatten nur von der Tendenz ($P=0,059$) her eine höhere Befruchtungsrate als komplett granulierten Oozyten.

Da die komplett granulierten Oozyten nur eine geringe Anzahl ausmachten und da es keine signifikanten Unterschiede zwischen den partiell und komplett granulierten Oozyten gab, wurden diese beiden Gruppen zusammengefasst.

Tab.16: Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit des Zytoplasmas der Oozyte und der weiteren Entwicklung in Form der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3342 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1146 am Tag2 und 984 am Tag3 beurteilt)

Zytoplasma % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
Homogen 73,8% (3515)	72,1% ^a (2537)	4,9% ^b (175)	22,1% ^c (560)	3,5% ^d (90)	66,2% ^e (607)	22,6% ^f (181)	31,4% ^g (251)
Granulierung 26,2% (1251)	64,3% ^a (805)	8,6% ^b (107)	19,1% ^c (154)	4,2% ^d (34)	59,9% ^e (137)	27,7% ^f (51)	28,8% ^g (53)

^{a,b}P<0,001; ^{c,e}P<0,1; ^{d,f,g}P=ns

Die resultierenden Vorkernstadien und Embryonen am Tag2, die aus homogenen Oozyten entstanden waren, zeigten lediglich eine Tendenz (P=0,072 und 0,070) zu einem höheren Entwicklungspotential. Letzteres war am Tag3 nicht mehr erkennbar.

Die Auswertung der Transfers mit zwei Embryonen in Hinblick auf das Zytoplasma (homogen oder granuliert) der Oozyten, aus denen sie entstanden waren, brachte sehr unterschiedliche Fallzahlen (zwei Embryonen aus homogenen Oozyten = 297 Zyklen; ein Embryo aus homogen und einer aus einer granulierten Oozyte = 96 Zyklen; beide Embryonen aus granulierten Oozyten = 28 Zyklen). Die Schwangerschaftsraten, die aus Oozyten mit homogenem Zytoplasma (32,3%) resultierten, lagen jedoch nicht höher als die bei gemischten Transfers (37,5%) oder bei Transfers von Embryonen, die aus granulierten Oozyten entstanden (39,3%).

Oozyten mit granuliertem Zytoplasma zeigten eine signifikant geringere Befruchtungs- und eine höhere Degenerationsrate. Die Entwicklung der Vorkernstadien und Embryonen sowie die resultierenden Implantations- und Schwangerschaftsraten waren aber nicht signifikant unterschiedlich.

Granulierungen des Zytoplasmas der Oozyten hatten zwar einen Einfluss auf die Befruchtungsrate, aber nicht auf den Ausgang der Therapie.

3.3.2 Einschlusskörper (refraktiler Körper)

Bei 2836 Oozyten konnten keine Einschlusskörper dokumentiert werden, hingegen zeigten 1930 Oozyten Einschlusskörper, die in kleine (bei 1403 Oozyten) und große Einschlusskörper (bei 527 große) differenziert wurden. Bei dem Vergleich des Vorhandenseins großer oder kleiner Einschlusskörper, waren keine signifikanten Unterschiede in der Befruchtungsrate (68,0%/67,9%) und dem Embryoscore zu erkennen („gut“ entwickelte Embryonen (>10Tag2, >15 Tag3) Tag2 (60,3%/54,8%) Tag3 (74,8%/73,3%). Lediglich der Anteil an Z1 Vorkernstadien war bei der Gruppe mit nur kleinen Einschlusskörpern signifikant höher (P=0,001).

Nur 105 Vorkernstadien, die aus Oozyten mit großen Einschlusskörpern entstanden waren, wurden für die Embryokultur ausgewählt und nur bei drei Transfers wurden ausschließlich Embryonen aus Oozyten mit großen Einschlusskörpern transferiert.

Aus diesen Gründen erfolgte die Auswertung unter Berücksichtigung des Auftretens oder Fehlens von Einschlusskörpern (2836 Oozyten ohne und 1930 Oozyten mit Einschlusskörpern).

Tab.17: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Einschlusskörpern im Zytoplasma der Oozyten und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3342 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1146 am Tag2 und 986 am Tag3 beurteilt)

Einschlusskörper % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
keine 59,5% (2836)	71,6% ^a (2030)	5,9% ^b (168)	24,6% ^c (499)	2,6% ^d (53)	68,4% ^e (502)	22,4% ^f (144)	31,1% ^g (200)
vorhanden 40,5% (1930)	68,0% ^a (1312)	5,9% ^b (114)	16,6% ^c (217)	5,4% ^d (71)	58,9% ^e (243)	25,7% ^f (88)	30,9% ^g (106)

^a P<0,01; ^{b,f,g} P=ns; ^{c,d} P<0,001; ^e P<0,005

Tab.18: Übersicht der Transferzyklen mit jeweils zwei Embryonen. Diese entstanden aus Oozyten folgender Kombination: 1. Beide Oozyten ohne Einschlusskörper (EK); 2. Eine Oozyte mit und eine ohne Einschlusskörper; 3. Beide Oozyten mit Einschlusskörper

Einschlusskörper (EK)	Zyklen	Implantationsrate(n)	Schwangerschaftsrate(n)
2 Oozyten keine EK	210	24,8% ^{a,c} (104)	38,6 % ^{d,f} (81)
1 Oozyte keine EK + 1 Oozyte EK vorhanden	130	19,2% ^{a,b} (50)	30,0 % ^{d,e} (39)
2 Oozyten EK vorhanden	81	16,7% ^{b,c} (27)	28,4 % ^{e,f} (23)

^{a,d,f}P<0,1; ^cP<0,05; ^{b,e}P=ns

Oozyten, die keine Einschlusskörper aufwiesen, zeigten eine signifikant „bessere“ Entwicklung bis zum Tag2 (höhere Befruchtungsrate, mehr Vorkernstadien mit Z1-Score und mehr Embryonen mit einem Embryoscore >10 am Tag2), als solche mit Einschlusskörpern. Am Tag3 war dieser Unterschied im Embryoscore allerdings nicht mehr zu erkennen, und die Schwangerschaftsraten waren nicht signifikant unterschiedlich. Embryonen, die aus Oozyten ohne Einschlusskörper entstanden waren, implantierten aber signifikant (P=0,0361) häufiger als solche aus Oozyten mit Einschlusskörpern (vgl. Tab. 18). Die signifikanten Unterschiede werden in Abb.23 grafisch zusammengefasst.

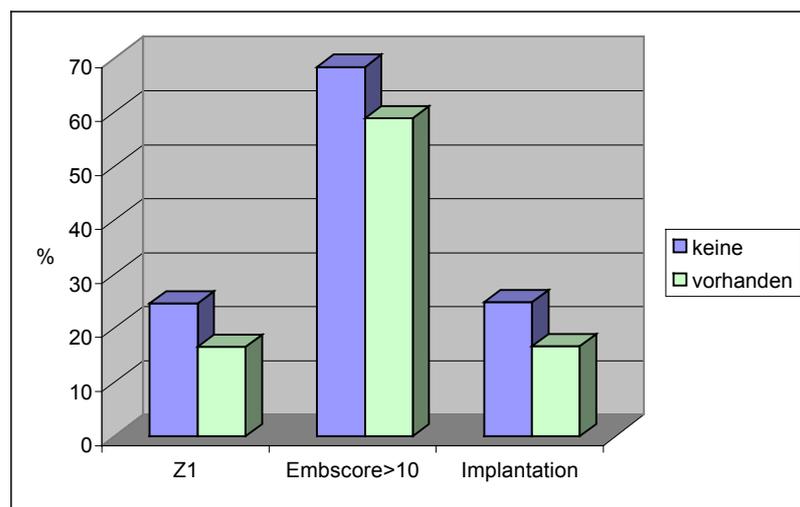


Abb.23: Vergleich der signifikanten Unterschiede (Anteil an resultierenden Vorkernstadien mit einem Z1 Score, Embryoscore am Tag2 und der Implantationsrate beim Transfer von zwei Embryonen) bei der Kultivierung von Oozyten mit und ohne Einschlusskörpern.

3.3.3 Vakuolen

Es konnten bei 4766 Oozyten Angaben bezüglich des Vorhandenseins von Vakuolen gemacht werden. Eine Auswertung bezüglich der resultierenden Schwangerschaften wurde nicht durchgeführt, da nur 37 Embryonen aus Oozyten mit Vakuolen entstanden, und es sich in diesen Fällen in der Regel um „gemischte“ Transfers (ein Embryo entstanden aus einer Oozyte mit und einer aus einer Oozyte ohne Vakuolen) handelte.

Tab.19: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Vakuolen in den Oozyten und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3341 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1146 am Tag2 und 986 am Tag3 beurteilt)

Vakuolen % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
keine 93,0% (4434)	70,5% ^a (3126)	5,7% ^b (252)	21,7% ^c (679)	3,5% ^d (110)	65,5% ^e (710)	23,2% ^f (220)	31,3% ^g (297)
vorhanden 7% (332)	64,8% ^a (215)	9,0% ^b (30)	17,2% ^c (37)	6,5% ^d (14)	69,4% ^e (34)	32,4% ^f (12)	21,6% ^g (8)

a,b,d P<0,05; c,e,f,g P=ns

Aus der Tabelle 19 geht deutlich hervor, dass Oozyten mit Vakuolen eine signifikant schlechtere Befruchtungs- und eine deutlich höhere Degenerationsrate aufwiesen. Das Auftreten von Vakuolen in Oozyten war allerdings relativ selten (7%) und die sich weiterentwickelnden Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Embryonalentwicklung.

3.3.4 Perivitelliner Spalt

Bei 4767 Oozyten konnten Angaben bezüglich Auffälligkeiten des perivitellinen Spaltes (PVS) gemacht werden. In Tabelle 20 wird der Zusammenhang zwischen diesen Auffälligkeiten und der weiteren Entwicklung (Befruchtungsrate, Vorkern- und Embryoscore) der Zellen dargestellt.

Tab.20: Zusammenhang zwischen Auffälligkeiten des PVS und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3341 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1146 am Tag2 und 986 am Tag3 beurteilt)

PVS % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
unauffällig 72,5% (3454)	71,6% ^a (2472)	5,4% ^b (186)	23,3% ^c (576)	3,3% ^d (81)	65,3% ^e (582)	23,6% ^f (183)	31,0% ^g (240)
auffällig 27,5% (1313)	66,2% ^a (869)	7,3% ^b (96)	16,1% ^c (140)	4,9% ^d (43)	63,6% ^e (162)	23,6% ^f (49)	30,8% ^g (64)

^{a,c}P<0,001; ^{b,d}P<0,05; ^{e,f,g}P=ns

Die Beschaffenheit des PVS wies signifikante Unterschiede auf bezüglich der Befruchtungs- und Degenerationsrate sowie des Z-Scores. Oozyten mit unauffälligem PVS zeigten höhere Befruchtungs- und geringere Degenerationsraten, sowie einen größeren Anteil an Vorkernstadien mit Z1- und einen geringeren mit Z4-Score. Bezüglich der Embryonalentwicklung waren keine Unterschiede zu erkennen, wobei allerdings zu bedenken ist, dass die Gruppenstärken sehr inhomogen waren (Embryonen aus Oozyten mit unauffälligem PVS 891 Tag2 bzw. 774 Tag3 und mit auffälligem PVS 255 Tag2 bzw. 208 Tag3).

Bei der Auswertung der Transfers mit 2 Embryonen in Hinblick auf die Schwangerschaftsraten waren die Fallzahlen ebenso sehr unterschiedlich (266 Transfers mit Embryonen aus Oozyten mit unauffälligem PVS; 127 gemischte Transfers und nur 29 reine Transfers mit Embryonen aus Oozyten mit auffälligem PVS). Die resultierenden Schwangerschaftsraten waren nicht (signifikant) unterschiedlich (34,7%/34,6%/24,1%) (P=0,989 und 0,252), wobei die 29 Zyklen mit auffälligen Oozyten bezüglich des PVS sicherlich eine zu kleine Gruppe darstellten.

3.3.5 Polkörper

Bei 4767 Oozyten konnte die Beschaffenheit des ersten Polkörpers dokumentiert werden. Es wurde unterschieden zwischen normal runden (2747 Oozyten) und auffälligen (2020 Oozyten) Polkörpern. Eine Unterteilung der Polkörper in flach und fragmentiert wurde durchgeführt, zeigte aber keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Befruchtungsrate (66,5%/70,5%), der Degenerationsrate (6,5%/7,1%) und des Z-Scores (z.B. dem Anteil Z1 Vorkernstadien 21,1%/22,7%). Die Unterteilung der Transfers nach dem Polkörper in flach, fragmentiert und normal zeigte zu viele Variationsmöglichkeiten mit zu geringer Gruppengröße. Die Auswertung erfolgte in der Unterteilung normaler und auffälliger Polkörper, wie in Tab. 21 dargestellt.

Tab.21: Zusammenhang zwischen dem Polkörper und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3341 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1146 am Tag2 und 986 am Tag3 beurteilt)

Polkörper % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
normal 57,6% (2747)	70,6% ^a (1939)	5,1% ^b (141)	20,8% ^c (403)	3,6% ^d (70)	65,8% ^e (482)	21,9% ^f (138)	33,9% ^g (214)
auffällig 42,4% (2020)	69,5% ^a (1403)	7,0% ^b (141)	22,3% ^c (313)	3,9% ^d (54)	63,4% ^e (262)	26,5% ^f (94)	25,6% ^g (91)

a,c,d,e,f P=ns; b,g P<0,01

Aus der Tabelle 21. wird ersichtlich, dass die Oozyten mit einem „normalen“ Polkörper sich lediglich in der Degenerationsrate und dem Anteil an „sehr gut“ entwickelten Embryonen am Tag3 (signifikant) von den Oozyten mit „auffälligem“ Polkörper unterschieden. Die Vorkernstadien und Embryonen am Tag2 entwickelten sich unabhängig von der Art des Polkörpers. Die Tabelle 22 zeigt zudem, dass die Beschaffenheit der Polkörper von weiterkultivierten Oozyten keinen signifikanten Einfluss auf die Implantations- und Schwangerschaftsraten hatte.

Tab.22: Auswertung der Zyklen mit Transfer von zwei Embryonen in Hinblick auf die Beschaffenheit des Polkörpers der weiterkultivierten Oozyten

Polkörper (PK)	Zyklen	Implantationsrate (n)	Schwangerschaftsrate (n)
2 Oozyten normale PK	194	22,2% ^{a,c} (86)	35,6% ^{d,f} (69)
1 Oozyte normaler PK + 1 Oozyte auffälliger PK	144	23,6% ^{a,b} (68)	36,1% ^{d,e} (52)
2 Oozyten auffällige PK	84	16,1% ^{b,c} (27)	26,2% ^{e,f} (22)

^{a,c,d,e,f}P=ns; ^bP<0,1

3.3.6 Form der Oozyte

Es wurden bei 4767 Oozyten die Form (4156 rund, kugelförmig / 611 auffällig (länglich oder deformiert)) der Zelle dokumentiert.

Im Vergleich zu rund geformten Oozyten zeigten von der Form auffällige Oozyten ein schlechteres Entwicklungspotenzial bezüglich der Befruchtungs- und Degenerationsrate sowie des Z- und Embryoscores. Diese Beobachtungen sind in Tabelle 23 zusammenfassend dargestellt.

Tab.23: Zusammenhang zwischen der Form der Oozyte und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3341 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1146 am Tag2 und 986 am Tag3 beurteilt)

Form % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
rund 87,2% (4156)	70,8% ^a (2944)	5,4% ^b (225)	22,6% ^c (665)	3,3% ^d (97)	66,1% ^e (703)	22,5% ^f (207)	31,9% ^g (293)
auffällig 12,8% (611)	65,0% ^a (397)	9,3% ^b (57)	13,1% ^c (52)	6,6% ^d (26)	50,0% ^e (41)	37,3% ^f (25)	17,9% ^g (12)

^{a,d,e}P<0,005; ^{b,c}P<0,001; ^fP<0,01; ^gP<0,05

Zum Transfer wurden meist Vorkernstadien ausgewählt, die aus „normal“ geformten Oozyten entstanden waren. Bei Transferzyklen mit zwei Embryonen waren lediglich 63 Embryonen aus Oozyten mit „auffälliger“ Form beteiligt. Die Auswertung des Einflusses der Form der Oozyte auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate wurde nicht tabellarisch dargestellt, da nur vier Transfers mit ausschließlich Embryonen, die aus Oozyten mit „auffälliger“ Form entstanden waren, durchgeführt wurden. Aus diesen vier Transfers resultierte keine Schwangerschaft.

Die Transfers (362) mit zwei Embryonen, die aus „normal“ geformten Oozyten entstanden waren, zeigten eine Implantations- und Schwangerschaftsrate von 22,4% (IR) bzw. 35,1% (SSR). Bei 55 Transfers handelte es sich um gemischte Transfers (ein Embryo, der sich aus einer deformierten und ein weiterer, der sich aus einer runden Oozyte entwickelte). Hieraus resultierte eine Implantationsrate von 15,5% und Schwangerschaftsrate von 29,1%. Dabei unterschieden sich die Implantationsraten der Embryonen, die sich aus „normal“ geformten Oozyten entwickelten, zwar nicht signifikant von den Raten der Embryonen, die aus „auffälligen“ Oozyten hervorgingen, jedoch zeigte sich für die ersteren eine tendenziell ($P=0,088$) etwas höhere Implantationsrate. Kein signifikanter Unterschied ($P=0,383$) wurde in der Schwangerschaftsrate beider „Transferarten“ gefunden, wobei allerdings die geringe Fallzahl der „auffälligen“ Oozyten zu beachten ist.

3.3.7 Zona Pellucida

Es wurde bei 4528 Oozyten die Dicke und bei 4361 Oozyten die Beschaffenheit der Zona pellucida dokumentiert. Eine Dicke von $>20 \mu\text{m}$ wird in der Literatur (Montag und Baukloh, 1998) als auffällig bezeichnet. Die Dicke der Zona pellucida variierte zwischen 5,5 und $34,4 \mu\text{m}$. Die Oozyten, die eine Dicke der Zona pellucida von $> 20\mu\text{m}$ aufwiesen, zeigten zu 30,4% zudem eine Auffälligkeit in der Beschaffenheit der Zona pellucida, wogegen diese Auffälligkeit bei dünnerer Zona pellucida nur bei 18% der Zellen zu erkennen war.

In den Tabellen 24 und 25 wird der Einfluss der Dicke der Zona pellucida auf die weitere Entwicklung der Zelle aufgeführt.

Tab.24: Zusammenhang zwischen der Dicke der Zona pellucida (unauffällig bis 20 µm und auffällig >20 µm) und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3341 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1094 am Tag2 und 935 am Tag3 beurteilt)

Zonadicke % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
Unauffällig 69,5% (3145)	71,1% ^a (2235)	4,2% ^b (133)	19,1% ^c (427)	4,8% ^d (107)	63,6% ^e (501)	22,2% ^f (153)	33,9% ^g (233)
Auffällig 30,5% (1383)	69,4% ^a (960)	10,0% ^b (138)	24,1% ^c (231)	1,7% ^d (16)	66,1% ^e (203)	29,6% ^f (73)	19,8% ^g (49)

^{a,e}P=ns; ^{b,d,g}P<0,001; ^cP<0,005; ^fP<0,05

Tab.25: Auswertung der Transferzyklen mit 2 Embryonen bezüglich normaler oder auffälliger Dicke der Zona pellucida bei den Oozyten, die weiterkultiviert wurden

Zonadicke (ZD)	Zyklen	Implantationsrate (n)	Schwangerschaftsrate (n)
2 Oozyten normale ZD	256	21,3% ^{a,c} (109)	33,6% ^{d,f} (86)
1 Oozyte normale ZD + 1 Oozyte auffällige ZD	71	26,8% ^{a,b} (38)	43,7% ^{d,e} (31)
2 Oozyten auffällige ZD	85	18,2% ^{b,c} (31)	28,2% ^{e,f} (24)

^{a,c,d,f}P=ns; ^bP<0,1; ^eP<0,05

Bezogen auf die Befruchtungsrate und den Embryoscore am Tag2 zeigte die Dicke der Zona pellucida keine signifikanten Unterschiede. Oozyten mit einer dicken Zona pellucida wiesen höhere Degenerationsraten auf. Kam es bei diesen Zellen zur Entwicklung, war ein größerer Anteil an Z1 und ein geringerer Anteil an Z4 Vorkernstadien zu verzeichnen. Am Tag3 wiesen zwar mehr Zellen mit einer Zona < 20µm einen höheren Embryoscore auf, jedoch waren die Unterschiede in der Implantations- oder Schwangerschaftsrate nicht signifikant. Dies wird aus Tabelle 25 deutlich.

Ein weiterer Aspekt der Zona pellucida ist die Beschaffenheit (Art), die bei 960 Oozyten Auffälligkeiten im Hinblick auf die Pigmentierung aufwiesen. Der Einfluss dieser Erscheinungsform auf die Befruchtungs- und Degenerationsrate sowie die

Embryonalentwicklung und Implantations- und Schwangerschaftsrate wird in Tabelle 26 und 27 zusammengefasst.

Tab.26: Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit (Art) der Zona pellucida (unauffällig, auffällig) und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3056 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1042 am Tag2 und 885 am Tag3 beurteilt)

Zonaart % (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
Unauffällig 78,0% (3401)	70,1% ^a (2383)	6,2% ^b (212)	21,0% ^c (500)	3,6% ^d (86)	67,4% ^e (541)	23,4% ^f (157)	30,3% ^g (203)
Auffällig 22,0% (960)	70,1% ^a (673)	7,2% ^b (69)	17,2% ^c (116)	5,8% ^d (39)	53,5% ^e (128)	29,8% ^f (64)	27,0% ^g (58)

^{a,b,g}P=ns;

^{c,d}P<0,05;

^eP<0,001;

^fP<0,1

Tab.27: Auswertung der Transferzyklen mit 2 Embryonen bezüglich normaler oder auffälliger Beschaffenheit (Art) der Zona pellucida bei den Oozyten, die weiterkultiviert wurden

Zonaart (ZA)	Zyklen	Implantationsrate (n)	Schwangerschaftsrate (n)
2 Oozyten normale ZA	281	23,0% ^{a,c} (129)	35,9% ^{d,f} (101)
1 Oozyte normale ZA + 1 Oozyte auffällige ZA	63	19,8% ^{a,b} (25)	33,3% ^{d,e} (21)
2 Oozyten auffällige ZA	58	16,4% ^{b,c} (19)	25,9% ^{e,f} (15)

^{a,b,c,d,e,f}P=ns

Oozyten mit unauffälliger Beschaffenheit (Art) der Zona pellucida zeigten in der weiteren Entwicklung im Z- und Embryoscore am Tag2 ein höheres Entwicklungspotential als solche mit auffälliger Zona pellucida. Die absoluten Zahlen der Implantations- und Schwangerschaftsraten unterstützten dies, waren jedoch nicht signifikant (^{c,f}P=0,1358; 0,1407) unterschiedlich. Eine Ursache dafür könnte in der geringen Zyklenanzahl an Transfers mit Embryonen, die aus Oozyten mit auffälligen Zona pellucida entstanden waren, liegen.

In der Tabelle 28 werden alle untersuchten morphologischen Parameter der Oozyten aufgeführt im Hinblick auf ihren Einfluss (Signifikant, Tendenz oder Nicht Signifikant) auf die weitere Entwicklung der Zelle und die resultierenden Implantations- und Schwangerschaftsraten.

Tab.28: Zusammenfassung des Einflusses der maternalen Faktoren auf die Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), den Z- und Embryoscore und den daraus resultierenden Implantations- (IR) und Schwangerschaftsraten (SSR)

	Befr.rate	Deg.rate	Z1 Score	Emb.-score Tag2	IR	SSR
Zytoplasma	Signifikant	Signifikant	Tendenz	Tendenz	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant
Einschlusskörper	Signifikant	Nicht Signifikant	Signifikant	Signifikant	Signifikant	Tendenz
Vakuolen	Signifikant	Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant	Zu geringe Fallzahl	Zu geringe Fallzahl
PVS	Signifikant	Signifikant	Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant
Polkörper	Nicht Signifikant	Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant
Form	Signifikant	Signifikant	Signifikant	Signifikant	Tendenz	Zu geringe Fallzahl
Zonadicke	Nicht Signifikant	Signifikant	Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant
Zonaart	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant	Signifikant	Signifikant	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant

3.3.8 Einfluss der zytoplasmatischen und oder extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten (Defekten) auf das Entwicklungspotential der Oozyte

Die Oozyten wurden morphologisch untersucht in Hinblick auf zytoplasmatische (Beschaffenheit des Zytoplasmas und das Vorhandensein von Einschlusskörpern oder Vakuolen) und extrazytoplasmatische (Auffälligkeiten bezüglich des perivitellinen Spalte, des Polkörpers, der Form der Oozyte und der Zona pellucida) Auffälligkeiten.

Die Auswertung der Weiterentwicklung von Oozyten, die keine, nur zytoplasmatische oder extrazytoplasmatische oder beide Arten an Auffälligkeiten aufwiesen wird in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tab.29: Zusammenhang zwischen der Art der Auffälligkeit und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3056 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1146 am Tag2 und 986 am Tag3 beurteilt)

Auffälligkeit (Oozyten)	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
keine 11,6% (552)	77,0% ^{a,b,c} (425)	2,9% ^{e,f} (16)	28,7% ^{h,i} (122)	1,4% ^{k,l} (6)	69,8% ^{n,o,p} (132)	13,6% ^{q,r} (24)	38,4% ^{s,t} (68)
zytoplasmatisch 12,6% (603)	67,3% ^{a,d} (406)	2,3% ^{e,g} (14)	15,3% ^{h,j} (62)	4,4% ^{k,m} (18)	64,9% ⁿ (96)	24,6% ^q (30)	39,3% ^s (48)
extra- zytoplasmatisch 30,7% (1463)	72,3% ^{b,d} (1058)	5,6% ^{f,g} (82)	25,3% ^{i,j} (268)	2,7% ^{l,m} (29)	67,8% ^o (259)	27,4% ^r (91)	28,6% ^t (95)
zyto- und extra- zytoplasmatisch 45,1% (2151)	67,5% ^c (1452)	7,9% (170)	18,2% (264)	4,9% (71)	60,2% ^p (257)	24,5% (87)	26,5% (94)

^{a,c,h,j,r}P<0,001;

^{b,d,f,p,q,t}P<0,05;

^{e,i,l,m,n,o,s}P=ns;

^gP<0,005;

^kP<0,01

Die vollständige Auswertung der zytoplasmatischen und extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten in Bezug auf Schwangerschaftsraten war aus statistischen Gründen nicht sinnvoll, da es zu viele Kombinationsmöglichkeiten gab und die Anzahl an Transfers mit nur einer Art an Auffälligkeit zu gering war (zwei Embryonen beim Transfer, wobei beide ihren Ursprung hatten in Oozyten mit: keiner (17 Zyklen), nur zytoplasmatischen (14 Zyklen), nur extrazytoplasmatische (75 Zyklen), oder extrazytoplasmatischen und zytoplasmatischen (73 Zyklen) Auffälligkeiten).

Die 75 Zyklen mit zwei Embryonen, die ausschließlich aus Oozyten mit extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten entstanden waren, wiesen eine Schwangerschaftsrate von 30,7% auf. Im Vergleich zu allen Transfers mit zwei Embryonen (Schwangerschaftsrate 33,9%) war dies nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz hierzu zeigten die Zyklen (73), bei denen beide weiterkultivierte Oozyten extrazytoplasmatischen und zytoplasmatischen Auffälligkeiten aufwiesen, eine signifikant ($P < 0,05$) geringere Schwangerschaftsrate (21,9%) als die Zyklen mit Oozyten, die nur durch extrazytoplasmatische Defekte charakterisiert waren und die Gesamtheit der Zyklen mit zwei Embryonen. Dies deutet darauf hin, dass die extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten separat betrachtet eine geringere Bedeutung auf die resultierende Schwangerschaftsrate hatten als die zytoplasmatischen und die Kombination beider Auffälligkeiten.

3.3.9 Einfluss der Anzahl an Auffälligkeiten (Defekten) auf das Entwicklungspotential der Oozyte

Bei 4767 Oozyten konnte eine Beurteilung im Hinblick auf die zytoplasmatischen (Beschaffenheit des Zytoplasmas, Vorhandensein von Einschlusskörpern, Vorhandensein von Vakuolen) und extrazytoplasmatischen (perivitelline Spalt, Polkörper, Symmetrie der Oozyte, Zona pellucida) Auffälligkeiten durchgeführt werden. Jede Kombination von Auffälligkeiten wurde festgestellt. Aufgelistet und ausgewertet wurden die Oozyten bezüglich der Anzahl an Auffälligkeiten (Defekten).

Tab.29: Auflistung der Häufigkeit des Auftretens einer Auffälligkeit pro Oozyte

Auffälligkeiten	0	1	2	3	4	5	6	7
Zellen	552	1283	1469	917	415	100	27	4
%	11,6	26,9	30,8	19,2	8,7	2,1	0,1	0,08

Nur sehr wenige Zellen zeigten gleichzeitig sechs oder sieben Auffälligkeiten und nur zehn Oozyten mit fünf Defekten wurden zu Embryonen weiterkultiviert. Aufgrund der geringen Anzahl erfolgte keine weitere Auswertung dieser Zellen.

Tab.30: Zusammenhang zwischen der Anzahl an Defekten (0-5) und der Befruchtungs- (Befr.rate) und Degenerationsrate (Deg.rate), sowie des Z- (3324 Vorkernstadien, Z2 und Z3 nicht aufgeführt) und Embryoscores (Emb.score) (Embryonen 1143 am Tag2 und 975 am Tag3 beurteilt)

Defekte	Befr.rate	Deg.rate	Z-Score		Emb.score Tag2 >10	Emb.score Tag3	
			Z1	Z4		<16	>25
0	77,0%	2,9%	28,7%	1,4%	70,0%	13,6%	38,4%
1	71,2%	3,7%	23,1%	3,8%	69,4%	19,6%	35,2%
2	70,6%	5,9%	20,8%	2,9%	65,0%	17,5%	26,8%
3	67,5%	8,1%	18,4%	5,3%	54,7%	27,1%	26,4%
4	66,3%	8,7%	17,1%	5,1%	54,8%	31,6%	17,5%
5	54,0%	15,0%	5,0%	4,0%			

Wie in Tabelle 30 dargestellt, zeigte sich mit der Anzahl der Defekte eine kontinuierliche, signifikante (z.B. 0 Defekte zu 1 Defekt $P=0,011$) Abnahme der Befruchtungsrate. Ebenso nimmt die Anzahl an degenerierten Zellen mit der Anzahl an Defekten zu (z.B. 0 Defekte zu 2 Defekte $P=0,006$). Je weniger Defekte eine Zelle hatte, desto besser war auch ihre weitere Entwicklung. Dies spiegelt sich im signifikant höheren Anteil an Z1 Vorkernstadien (0 Defekte zu 1 Defekt $P=0,027$) wider. Der Anteil an weit entwickelten Embryonen (Tag2 0 Defekte zu 3 Defekte $P=0,003$; Tag3 0 Defekte zu 2 Defekte $P=0,009$) nahm kontinuierlich mit der Anzahl an Defekten ab.

Die separate Auswertung der Transfers mit zwei Embryonen bei denen ausschließlich Oozyten ohne Auffälligkeiten weiterkultiviert wurden, war mit n=17 zu gering.

Aus diesem Grund wurden die Transferzyklen mit zwei Embryonen, in denen wenigstens eine Oozyte mit maximal (max.) einem Defekt vorlag, mit den Zyklen verglichen, in denen jede Oozyte mindestens 2 Defekte aufwies. Dabei wurde deutlich, dass erstere zu einer signifikant höheren Implantations- und Schwangerschaftsrate führten (23,6% versus 16,5% bzw. 37,3% versus 26,3% siehe Tab. 31).

Tab.31: Auswertung der Zyklen mit zwei Embryonen beim Transfer bezüglich der Anzahl an Defekten bei den Oozyten, die weiterkultiviert wurden

2 Embryonen aus Oozyten mit	Zyklen	Implantationsrate (n)	Schwangerschaftsrate (n)
Mind. 1 Oozyte mit max. 1 Defekt	284	23,6% ^a (134)	37,3% ^b (106)
Jede Oozyte mit mind.2 Defekten	133	16,5% ^a (44)	26,3% ^b (35)

^{a,b}P<0,05

Es stellte sich die Frage, ob die Anzahl an Defekten bei den Oozyten altersabhängig war. Die in Tabelle 31 aufgeführten beiden Gruppen hatten Oozyten mit unterschiedlich vielen Defekten aber der Altersdurchschnitt (31,7 versus 32,6 Jahre) und die durchschnittliche Anzahl an Vorversuchen (0,58 versus 0,62) ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Der prozentuelle Anteil an Oozyten mit max. einem Defekt, wie in Tabelle 32 ausgewertet, war altersunabhängig.

Tab.32: Prozentueller Anteil an Oozyten mit max. einem Defekt in Abhängigkeit vom Alter der Frau

Alter (Jahre)	Prozentueller Anteil Oozyten mit max. 1 Defekt (Oozyten max. 1 Defekt / Oozyten der Altersgruppe)
< 31	38,5% (657/1708)
31-35	38,1% (785/2063)
36-40	39,1% (364/932)
>40	38,7% (29/75)

3.4 Auswertung bezüglich des Einflusses der Vorkernstadien auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft

Das Vorkernstadium stellt die Stufe des Lebens vor der Zygotenbildung und damit vor dem Abschluss der Befruchtungskaskade dar. Nach dem Embryonenschutzgesetz muss in diesem Stadium die Entscheidung getroffen werden, ob die Zellen transferiert, kryokonserviert oder verworfen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Z-Score bezüglich der Vorkerne, des Auftretens eines Halos und die Lage der Vorkerne in der Zelle dokumentiert, um die Relevanz als Entscheidungskriterium für die Auswahl der zu transferierenden Zellen festzustellen.

3.4.1 Auswertung bezüglich des Z-Scores

Aus 4778 reifen Metaphase II-Oozyten entstanden nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion (nach 16-18 Stunden) 3342 Vorkernstadien mit zwei Vorkernen. Das entspricht einer Befruchtungsrate von 70%.

Bezüglich des Z-Scores teilten sich die Vorkernstadien wie folgt auf.

Tab.33: Aufteilung der Vorkernstadien mit zwei Vorkernen nach ihrem Z-Score

	Z1	Z2	Z3	Z4
Anzahl (n)	716	379	2122	125
%	21,4	11,3	63,5	3,7

3.4.1.1 Embryonenqualität in Form des Embryoscores in Abhängigkeit vom Z-Score des Vorkernstadiums

Der Embryoscore, wie in Tabelle 17 und Abbildung 21 gezeigt, war ein signifikanter Marker, um die Embryonenqualität und damit die Chance, eine Schwangerschaft zu erzielen, anzuzeigen. Embryotransfers wurden am Tag2 sowie am Tag3 nach Follikelpunktion durchgeführt. Es erfolgte eine Dokumentation des Embryoscore. In vielen Fällen wurden die Embryonen, die am Tag3 transferiert wurden, zudem am Tag2

beurteilt. Die Embryonenbeurteilung wurde bei 1146 Embryonen am Tag2 und bei 986 am Tag3 durchgeführt.

Nach dem Stand der Literatur wurden für den Embryotransfer Vorkernstadien nach ihrem Z-Score ausgewählt (Z1 dann Z2, Z3 und wenn keine anderen vorhanden waren , Z4). Da aus diesem Grund nur 12 Embryonen aus Vorkernstadien mit einem Z4 Score entstanden, wurden diese aufgrund der geringen Anzahl nicht separat aufgeführt.

In Tabelle 34 und 35 werden die prozentualen Anteile der Embryonen mit einem Score>10 am Tag2 und <16 sowie >25 am Tag3 in Abhängigkeit von dem Z-Score der Vorkernstadien, aus denen sie entstanden waren, aufgeführt.

Tab. 34: Häufigkeit in % des Auftretens eines Embryoscores in Abhängigkeit vom Z-Score am Tag2

Z-Score	Embryonen	Embryoscore Tag2 >10 (Embryonen)
Z1	439	72,5 % ^{a,c} (318)
Z2	189	59,8 % ^{a,b} (113)
Z3	506	60,8 % ^{b,c} (308)

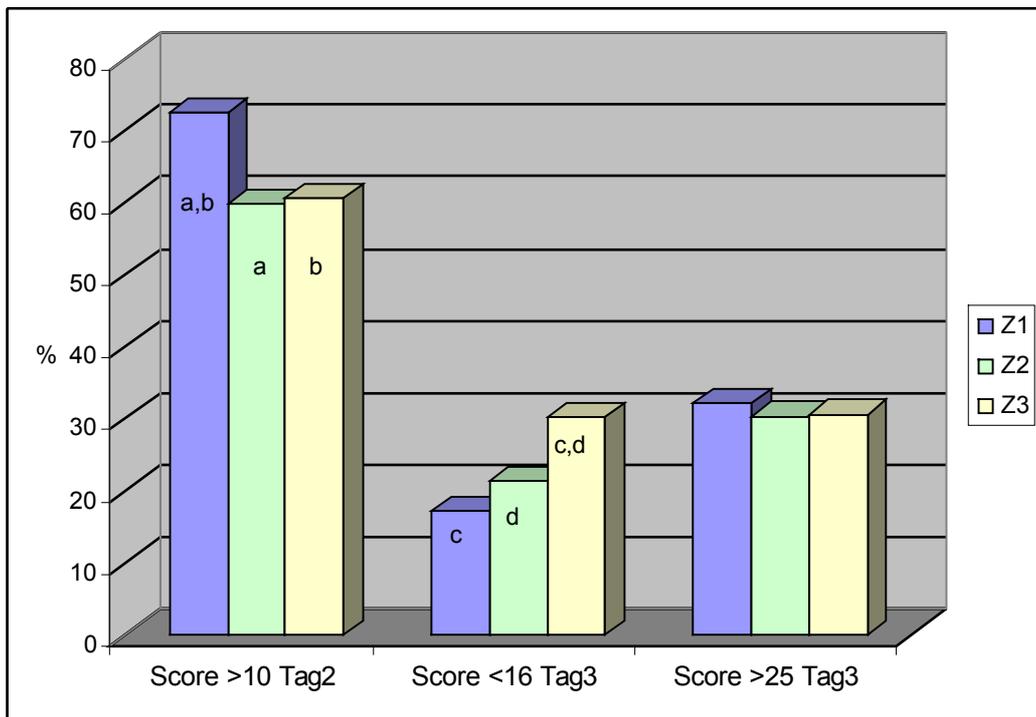
^aP<0,005; ^bP=ns; ^cP<0,001

Tab. 35: Häufigkeit in % des Auftretens eines Embryoscores in Abhängigkeit vom Z-Score am Tag3

Z-Score	Embryonen	Embryoscore Tag3 <16 (Embryonen)	Embryoscore Tag3 >25 (Embryonen)
Z1	368	17,1 % ^{a,c} (63)	32,1 % ^{d,f} (118)
Z2	188	21,3 % ^{a,b} (40)	30,3 % ^{d,e} (57)
Z3	418	30,1 % ^{b,c} (126)	30,6 % ^{e,f} (128)

^{a,d,e,f}P=ns; ^bP<0,05; ^cP<0,001

Die Ergebnisse zeigten, dass die Embryonen, die aus Z1 Vorkernstadien entstanden waren, sich am Tag2 zu einem signifikant größeren Anteil zu Embryonen mit einem Score >10 entwickelten als jene Embryonen, die aus Z2 oder Z3 Vorkernstadien kultiviert wurden. Am Tag3 war der Anteil an „langsam“ (Score<16) entwickelten Embryonen aus Z1 Vorkernstadien geringer als aus Z2 oder Z3 Vorkernstadien. Dieser Zusammenhang zwischen der Embryonenqualität und dem Z-Score der Vorkernstadien aus denen sie entstanden waren, wird in Abb. 27 dargestellt.



a,b,c,d P<0,05

Abb. 27: Häufigkeit in % des Auftretens eines Embryoscores am Tag2 und Tag3 in Abhängigkeit vom Z-Score

3.4.1.2 Auswertung der Transfers in Abhängigkeit vom Z-Score der Vorkernstadien

Die Studienbedingungen ermöglichten es, dass ein bis drei Embryonen transferiert wurden. Bezüglich der Vorkernmuster (Z-Score) ergaben die vier Scores (Z1, Z2, Z3 und Z4) 33 mögliche Transferkombinationen, wodurch eine Auswertung jeder Kombination zu unterschiedliche und teilweise zu geringe Gruppengrößen ergab.

Die Transfers, bei denen Embryonen nur aus einer Art des Z-Scores entstanden, wurden ausgewertet, wobei die Anzahl aus Z2 (34) Vorkernstadien sehr gering gegenüber den Z1 (133) und Z3 (134) Vorkernstadien war. Diese Gruppe aus Z2 Vorkernstadien zeigte eine 16,1% Implantationsrate und 25,0% Schwangerschaftsrate und wurde aufgrund der geringen Anzahl statistisch nicht weiter ausgewertet.

Die Transfers mit Embryonen, die ausschließlich aus Vorkernstadien mit Z1-Score entstanden waren, zeigten höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten im Vergleich zu solchen aus Vorkernstadien mit Z3-Score (23,2% versus 13,0% bzw. 34,6% versus 25,4% siehe Tab. 36).

Tab.36: Transfers mit ein bis drei Embryonen, wobei nur eine Art des Z-Scores beim Transfer vertreten war

Z-Score	Zyklen	Implantationsrate	Schwangerschaftsrate
nur Z1	133	23,2% ^a	34,6 % ^b
nur Z3	134	13,0% ^a	25,4 % ^b

^aP<0,005;

^bP=0,1

Um die Gesamtheit der Transfers auswerten zu können und nicht zu kleine Gruppen zu erhalten, wurden die Zyklen, bei denen zumindest ein Z1- bzw. Z2- (kein Z1) oder Z3 – Score (kein Z1 und Z2) enthalten waren, zusammengefasst. Aus diesem Grund erfolgte die Auswertung in Abhängigkeit von dem Vorhandensein oder des Fehlens eines bestimmten Z-Scores beim Transfer.

Es zeigte sich, dass aufgrund der schlechten Prognosen in der Literatur (Scott et al., 2000; Tesarik et al., 2000) Z4 Vorkernstadien nur zum Transfer ausgewählt wurden, wenn keine anderen Zellen mit einem besseren Score vorhanden waren. Dies war bei 9

Zyklen der Fall, bei denen Z4 Vorkernstadien zur weiteren Entwicklung kultiviert wurden. Bei 2 Zyklen wurden nur Z4 Vorkernstadien (2 Embryonen beim Transfer) weiterkultiviert, wobei keine Schwangerschaft entstand. Auf Grund der geringen Zyklenzahl und der somit geringen Anzahl an Embryonen aus Z4-Vorkernstadien wurden diese nicht separat aufgeführt.

Die höchste Schwangerschaftsrate (37,3%) wurde erzielt, wenn mindestens ein Z1-Vorkernstadium zum Transfer weiterkultiviert wurde. Niedrigere Schwangerschaftsraten waren zu verzeichnen, wenn kein Z1- aber mindestens ein Z2-Vorkernstadium (27,9%) bzw. kein Z1- und kein Z2- aber mindestens ein Z3-Vorkernstadium (24,3%) vorhanden waren (siehe Tab. 37).

Tab. 37: Therapieausgang in Abhängigkeit vom Z-Score der Vorkernstadien beim Transfer von ein bis drei Embryonen, wobei das Vorhandensein gegen das Nicht-Vorhandensein eines Z-Scores ausgewertet wurde

Z-Score	Zyklen	Implantationsrate (Fruchthöhlen)	Schwangerschaftsrate (Schwangerschaften)
Mindestens 1xZ1	316	21,0% ^{a,c} (144)	37,3% ^{d,f} (118)
Mindestens 1xZ2 (Kein Z1)	104	18,9% ^{a,b} (40)	27,9% ^{d,e} (29)
Mindestens 1xZ3 (Kein Z1, Z2)	140	12,3% ^{b,c} (37)	24,3% ^{e,f} (34)

^{a,e}P=ns;

^bP<0,05;

^cP<0,005;

^dP<0,1;

^fP<0,01

Das Alter der Frau (32,2:32,7:32,9) und die Anzahl transferierter Embryonen (2,17:2,04:2,16) der drei in Tabelle 37 verglichenen Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich. Ein Unterschied zeigte sich in der durchschnittlichen Anzahl an Vorversuchen (0,79:0,56:0,93) der Patientin. Frauen, die im Zyklus mindestens (mind.) ein Vorkernstadium mit einem Z2-Score (Kein Vorkernstadium mit Z1) aufwiesen, hatten signifikant (im Vergleich zu Z1 P=0,026 und Z2 P=0,001) weniger Vorversuche im Vergleich zu Zyklen mit mindestens einem Vorkernstadium mit Z1- oder Z3-Score. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass die Implantationsrate der Zyklen mit Vorkernstadien mit mindestens einem Z2-Score im Vergleich zu denen mit mind. einem Z1 Score nicht signifikant unterschiedlich waren.

Die Auswertung aller Zyklen, wobei die Zyklen zusammengefasst wurden mit Vorkernstadien mit Z2 und Z3 Score (Tab.37 Gruppe 2 und 3; 244 Zyklen) im Vergleich zu den Transfers mit mind. einem Embryo der aus einem Z1 Vorkernstadium hervorgegangen war zeigten, das letztere eine signifikant höhere Implantations- (P=0,003) und Schwangerschaftsraten (P=0,004) aufwiesen. Das Durchschnittsalter (32,2:32,9) sowie die Anzahl transferierter Embryonen (2,17:2,1) und Vorversuche (0,79:0,77) waren hierbei nicht signifikant unterschiedlich.

Die Auswertung der Transferzyklen mit zwei Embryonen beim Vergleich der Zyklen mit mind. einem Embryo, der aus einem Z1 Vorkernstadium hervorgegangen war, mit den Zyklen mit Embryonen, die aus Z2 oder Z3 Vorkernstadien entstanden waren (Tab. 38 Gruppe 2 und 3; 194 Zyklen), bestätigt die Ergebnisse des vorigen Abschnittes. Die Implantations- (25,0%:17,6%) und Schwangerschaftsraten (39,4%:27,9%) waren signifikant (IR P=0,009 und SS P=0,014) höhere bei Zyklen mit mind. einem Z1 Vorkernstadium im Vergleich zu solchen, bei denen lediglich Z2 oder Z3 Vorkernstadien weiterkultiviert wurden. Die Ergebnisse des Vergleichs werden in Tabelle 38 zusammengefasst, wobei die Zyklen mit mind. einem Z1, mind. einem Z2- (kein Z1) und mind. einem Z3-Vorkernstadium (kein Z1 und Z2) separat aufgeführt werden.

Tab. 38: Therapieausgang in Abhängigkeit vom Z-Score der Vorkernstadien beim Transfer von zwei Embryonen. Dabei wurde das Vorhandensein oder Fehlen von Z1 bzw. Z2 gegenüber anderen Scores ausgewertet. Z4 Vorkernstadien wurden nicht in die Auswertung aufgenommen.

Z-Score	Zyklen	Implantationsrate (Fruchthöhlen)	Schwangerschaftsrate (Schwangerschaften)
Mind. 1xZ1	226	25,0% ^{a,c} (113)	39,4% ^{d,f} (89)
Mind. 1xZ2 (Kein Z1)	94	20,0% ^{a,b} (38)	28,4% ^{d,e} (27)
Mind. 1xZ3 (Kein Z1, Z2)	100	15,0% ^{b,c} (30)	27,0% ^{e,f} (27)

^{a,b,e}P=ns; ^cP<0,01; ^dP<0,1; ^fP<0,05

Zur Verdeutlichung des Einflusses des Z-Scores wird dieser in Abb.28 grafisch aufgearbeitet.

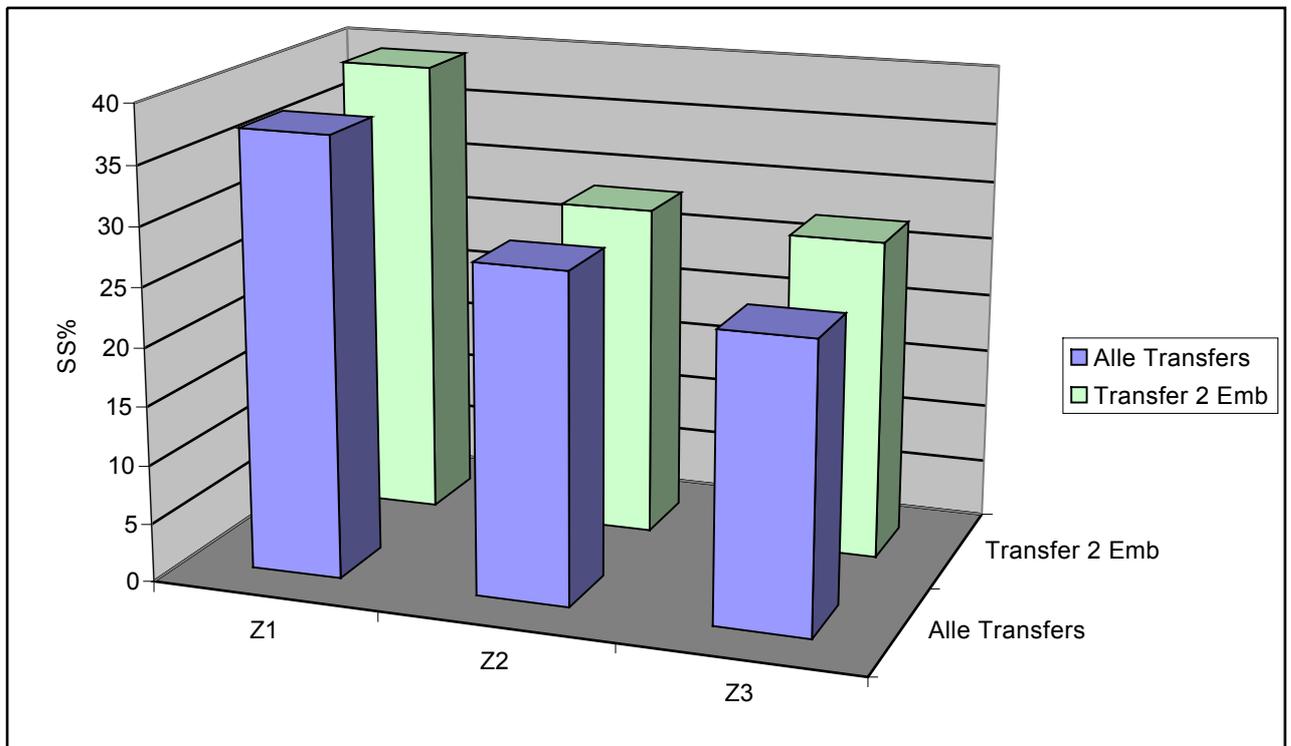


Abb.28: Vergleich der Schwangerschaftsraten der Transfers mit mind. einem Embryo, der aus einem Z1 Vorkernstadium entstanden war, mit denen mit mind. einem Z2 und keinem Z1-Score und mind. einem Z3 und keinem Z1 oder Z2 Vorkernstadium.

(Alle Transfers: beinhaltet die Auswertung aller 562 Transferzyklen der Studie;

Transfer 2 Emb: Auswertung der Zyklen (422) mit zwei Embryonen beim Transfer)

3.4.2 Vergleich der Zyklen, in denen überzählige Vorkernstadien zur Auswahl standen, mit den Zyklen, in denen keine überzähligen vorhanden waren, in Hinblick auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate.

Ausgewertet wurden die Zyklen bei denen zwei Embryonen für den Transfer zur Verfügung standen, da diese Gruppe die größte Anzahl darstellte. Eine gemeinsame Auswertung mit den Transfers mit drei Embryonen erfolgte nicht, da drei Embryonen schon eine größere Auswahl beinhaltet.

Tab. 39: Implantations- (IR) und Schwangerschaftsraten (SSR) in Abhängigkeit davon, ob eine Auswahl aus überzähligen Vorkernstadien zum Embryotransfer (mit zwei Embryonen) erfolgen konnte

Auswahlmöglichkeit	Zyklen	IR (n)	SSR (n)
Keine	41	11,0% ^{a,b} (9)	19,0% ^{d,e} (8)
Auswahl aus Vorkernstadien (Z1,Z2,Z3)	381	22,6% ^a (172)	35,4% ^d (135)
Auswahl aus Z2 und/oder Z3	156	18,6% ^c (58)	29,5% ^f (46)
Auswahl aus Z1	75	28,0% ^{b,c} (42)	41,3% ^{e,f} (31)

^{a,c,d,e}P<0,05; ^bP<0,005; ^fP<0,1

Die Tabelle 39 verdeutlicht, dass die Möglichkeit zur Auswahl aus Vorkernstadien einen positiven Einfluss (höhere IR und SSR) auf den Ausgang der Therapie hatte, insbesondere, wenn aus Z1 Vorkernstadien ausgewählt werden konnte. Es ist allerdings zu bedenken, dass die Kohorte der Patientinnen mit wenig Vorkernstadien (Keine Auswahlmöglichkeit) aufgrund des höheren Alters, einer geringeren Befruchtungsrates und einer höheren Anzahl an Vorversuchen eine schlechtere Prognose für den Eintritt einer Schwangerschaft hatte, im Vergleich zu Patientinnen mit Auswahlmöglichkeit aus Vorkernstadien (P<0,001).

3.4.3 Die Lage der Vorkernstadien

Die Vorkernstadien befinden sich in der Regel zentral in der Zelle. Dies war in der vorliegenden Arbeit bei 3060 Vorkernen (91,6%) der Fall. Bei 249 Zellen befanden sich die Vorkerne (7,5%) peripher am Rand (randständig) der Zelle und 33 waren nicht eindeutig zuzuordnen.

Tab.40: Aufteilung der zentral und peripher (randständig) gelegenen Vorkernstadien nach ihren Z-Scores

Pronuklei (n)	Z1	Z2	Z3	Z4
zentral (3060)	22,4% ^a (685)	11,8% ^b (361)	63,0% ^c (1928)	2,8% ^d (86)
peripher (249)	9,2% ^a (23)	4,4% ^b (11)	72,3% ^c (180)	14,1% ^d (35)

^{a,b}P<0,001;

^{b,c}P<0,005;

Das Auftreten von randständigen Vorkernen korrelierte mit einem „schlechteren“ Z-Score. Im Vergleich zu zentral gelegenen Pronuklei war der Anteil an Z1 Vorkernstadien verringert, wenn die Vorkerne randständig waren (22,4% versus 9,2%). Auch waren in letzterem Fall mehr Z4 Vorkernstadien zu beobachten. Diese Vorkernstadien mit randständigen Pronuklei zeigten zudem eine verzögerte Embryonalentwicklung am Tag2. Dies wurde deutlich in einem signifikant (P=0,007) geringeren Anteil an Embryonen mit einem Embryoscore >10 im Vergleich zur Entwicklung der Vorkernstadien mit zentralen Vorkernen. Am Tag3 war bezüglich der „sehr gut“ entwickelten Embryonen (Score >25) kein signifikanter (P=0,674) Unterschied mehr erkennbar.

Die Auswertung bezüglich der Schwangerschaftsrate der Transferzyklen mit jeweils zwei Embryonen war nicht sinnvoll, da nur in 30 Zyklen Vorkernstadien mit peripheren und zentralen Vorkernen (Schwangerschaftsrate 30%) und nur in 5 Zyklen (davon drei Schwangerschaften (60%)) lediglich periphere Vorkerne für den Embryotransfer weiterkultiviert wurden. Die Zyklenzahlen waren für eine Auswertung zu gering. Für genauere Aussagen sind größere Fallzahlen erforderlich. Das Auftreten von drei Schwangerschaften aus Vorkernen mit peripheren Pronuklei zeigte aber, dass diese Embryonen implantieren können. Leider kam es zu einer Eileiterschwangerschaft (EUG), einem Abort und nur einer Geburt.

3.4.4 Bedeutung des Auftretens des Halos für das Entwicklungspotential der Zelle

Das Phänomen des Halo tritt nur bei Vorkernstadien auf. In der Studie entstanden 3342 Vorkernstadien, bei denen bei 2641 (79,0%) der Halo dokumentiert werden konnte. 676 (20,2%) Vorkernstadien zeigten keinen Halo, bei 25 (0,7%) Vorkernstadien konnten keine eindeutigen Angaben gemacht werden.

In Tabelle 41 erfolgte eine Aufteilung der Vorkernstadien in Hinblick auf das Vorkommen eines Halos und verschiedener Z-Scores.

Tab. 41: Aufteilung der Vorkernstadien bezüglich des Vorhandenseins eines Halos und des Z-Scores.

	Z1	Z2	Z3	Z4
Mit Halo (2641)	24,8% ^a (655)	10,4% ^b (275)	62,3% ^c (1645)	2,6% ^d (69)
Ohne Halo (676)	8,8% ^a (59)	15,1% ^b (102)	68,3% ^c (462)	7,9% ^d (53)

^{a,b,d}P<0,001; ^cP<0,005

Es zeigte sich, dass der Halo häufiger bei Vorkernstadien auftrat, die einen Z1 Score (P<0,001) und damit eine bessere Schwangerschaftsprognose hatten.

Am Tag2 zeigte der Vergleich des Embryoscores hinsichtlich der Vorkernstadien mit und ohne Halo keine signifikanten Unterschiede (P= 0,206) bezogen auf die „gut“ (Embryoscore>10) entwickelten Embryonen (65,5% aus Vorkernstadien mit Halo und 60,9% ohne Halo) Am Tag3 war der Anteil an langsam entwickelten Embryonen aus Vorkernstadien mit (23,0%) und ohne Halo (26,6%) auch nicht signifikant unterschiedlich (P=0,300), jedoch waren mehr „sehr gut“ entwickelte Embryonen (Embryoscore>25) (28,9%/40,4%) vorhanden, wenn die Vorkernstadien keinen Halo aufwiesen (P=0,002). Da die Embryonalentwicklung keine eindeutige Aussage zur Bewertung des Halos ermöglichte, wurde auf die tabellarische Darstellung verzichtet.

Tab.42: Auswertung der Transferzyklen mit 2 Embryonen bezüglich des Auftretens oder Nichtauftretens eines Halos bei den Vorkernstadien, die weiterkultiviert wurden

Halo	Zyklen	Implantationsrate (n)	Schwangerschaftsrate (n)
2xHalo	299	20,2% ^{a,c} (121)	32,1% ^{d,f} (96)
1xHalo + 1xkein Halo	75	27,3% ^{a,b} (41)	41,3% ^{d,e} (31)
2xkein Halo	45	20,0% ^{b,c} (18)	33,3% ^{e,f} (15)

^{a,b,c,d,e,f}P=ns;

Die Auswertung bezüglich der verschiedenen Kombinationen beim Transfer von zwei Embryonen, die aus Vorkernstadien mit Halo und ohne Halo entstanden waren, ist in Tabelle 42 aufgeführt und zeigte ebenfalls keine signifikant höheren Implantations- oder Schwangerschaftsraten beim Vergleich der einzelnen Gruppen. Das Auftreten des Halos bei Vorkernstadien stellte kein positives Merkmal dar.

3.4.5 Zusammenfassung des Einflusses der Vorkernstadien auf den Verlauf der Kinderwunschtherapie

Die Anwendung des Z-Scores bei den Vorkernstadien erlaubt eine Aussage über das Entwicklungspotential der imprägnierten Eizelle. Dabei zeigten die Z1 Vorkernstadien signifikant das höchste Entwicklungspotential und die höchsten Schwangerschaftsraten. Hinsichtlich der Schwangerschaftsrate war der Unterschied zwischen Z2 und Z3 Vorkernstadien nicht signifikant, wohl aber hinsichtlich der Implantationsraten.

Der Haloeffekt trat häufiger bei Z1 Vorkernstadien auf, zeigte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Implantations- oder Schwangerschaftsraten.

Peripher gelegene Pronuklei waren nicht häufig und signifikant seltener bei Z1 oder Z2 Vorkernstadien und häufiger bei Z4 Vorkernstadien vorzufinden. Eine Auswertung im Hinblick auf Implantations- und Schwangerschaftsraten war aufgrund der geringen Zyklenzahl nicht möglich, da es jedoch zu Schwangerschaften kam, ist eine Implantation derartiger Vorkernstadien grundsätzlich nicht auszuschließen.

Die Auswertungen des Z-Scorings und des Halos werden in Tabelle 43 im Hinblick auf den Einfluss auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate zusammengefasst.

Tab.43: Einfluss der Faktoren „Z-Score“ und „Halo“ in der Vorkernbeurteilung bezogen auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate beim Transfer von zwei Embryonen

	Implantationsrate	Schwangerschaftsrate
Z1-Score zu Z2	Nicht Signifikant	Tendenz
Z1-Score zu Z3	Signifikant	Signifikant
Z2-Score zu Z3	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant
Haloeffekt	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant

3.5 Kombination der relevanten Faktoren der Oozyte und der Vorkernstadien

Die Auswahl der Zellen für den Embryotransfer auf der Ebene der Oozyte, zeigte signifikant höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten (SSR), wenn die Oozyten höchstens eine Auffälligkeit aufwiesen im Vergleich zu Oozyten mit mehr Auffälligkeiten. Auf der Ebene des Vorkernstadiums waren höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten zu verzeichnen, wenn Vorkernstadien mit dem Z1-Score beim Transfer vertreten waren. Mit Zunahme des Embryoscores stieg die Implantations- und Schwangerschaftsrate kontinuierlich an (Tab. 15). Bei den Transferzyklen mit zwei Embryonen war bei einem kumulativen Embryoscore >30 am Tag2 (SSR 50,9%) und >50 am Tag3 (SSR 53,4%) die höchste Schwangerschaftsrate zu registrieren gegenüber Transfers mit geringeren Embryoscores (Score<21 am Tag2 SSR 16,1% und Score <31 am Tag3 SSR 14,9%). Es muss jedoch bedacht werden, dass die Auswahl auf der Oozyten- und Vorkernebene erfolgte und der Embryoscore daher beobachtenden Charakter hatte. Schließlich ist nicht bekannt, wie sich die Zellen mit schlechterem Oozyten und Vorkernscore entwickelt hätten.

Die Tabelle 44 stellt die unterschiedlichen Implantationsraten und Schwangerschaftsraten unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Auswahlebenen (Oozyte, Vorkernstadium und Embryo) beim Transfer von zwei Embryonen zusammen.

Tab.44: Darstellung der Implantations- (IR) und Schwangerschaftsraten (SSR) der Studie nach unterschiedlichen Auswahlverfahren beim Transfer von zwei Embryonen

Auswahlkriterium	Zyklen	IR (n)	SSR (n)
Mindestens (mind.) 1 Oozyte mit höchstens 1 Defekt	284	23,6% (134)	37,3% ^{b,c} (106)
Mind. 1 Vorkernstadium mit Z1-Score	226	25,0% (113)	39,4% ^{b,d} (89)
Mind. 1 Oozyte höchstens 1 Defekt und mind. 1 Vorkernstadium Z1-Score	151	26,8 (81)	42,4% ^{a,b,e,f} (64)
Beide Embryonen aus Oozyten mit mind. 2 Defekten und kein Vorkernstadium Z1-Score	60	11,7% (14)	18,3% ^f (11)
Kumulativer Embryoscore >50 am Tag3	118	35,2% (83)	53,4% ^{c,d,e} (63)
Mind. 1 Oocyte höchstens 1 Defekt, 1 Vorkernstadium Z1-Score, Embryoscore Tag3 >50	52	37,5% (39)	57,7% (30)
Keine Auswahl, da nur zwei Vorkernstadien	41	11,0% (9)	19,5% ^a (8)

^{a,d} P<0,01; ^b P=ns; ^c P<0,005; ^e P<0,1; ^f P<0,001

Die Auswahl auf der Oozytenebene (Oozytenscoring (OS)) bei Zellen mit höchstens einer Auffälligkeit zeigte signifikant (P=0,030) höhere Schwangerschaftsraten als Zellen, die mehr Auffälligkeiten aufwiesen. Ebenso zeigten die Zyklen mit mind. einem Z1 Vorkernstadium (Vorkernscoring (VS)) höhere Schwangerschaftsraten (P=0,012) als solche, bei denen kein Z1 Vorkernstadium weiterkultiviert wurde.

Ein kontinuierlicher Anstieg der Schwangerschaftsrate wurde mit der Weiterentwicklung der Zellen und damit verbundenen Auswahlebene von der Oozyte (OS) über das Vorkernstadium (VS) zum Embryo (Embryoscoring (ES)) beobachtet. Die Kombination des Oocyten- und Vorkernscorings (OV=OS+VS), führte mit 42,4% zu einer deutlichen signifikanten (P=0,007) Erhöhung der Schwangerschaftsrate im Vergleich zu den Zyklen, bei denen keine Auswahl möglich war. Es muss aber bedacht werden, dass die Zyklen, bei denen nur zwei Vorkernstadien vorhanden waren und somit keine Auswahl getroffen werden konnte, ein signifikant älteres Patientinnenkollektiv mit signifikant geringeren Befruchtungsraten aufwiesen verglichen mit Zyklen, bei denen aus

Vorkernstadien für den Transfer ausgewählt werden konnte. Die Anzahl an Vorversuchen war nicht unterschiedlich.

Die drei Auswahlverfahren (OS, VS und OV) waren im Vergleich der Schwangerschaftsraten zueinander nicht signifikant unterschiedlich (OS/VS $P=0,727$; OS/OV $P=0,303$ und VS/OV $P=0,492$). Ebenso verhielt es sich mit den Implantationsraten. Der Altersdurchschnitt und die Anzahl Vorversuche waren ebenfalls nicht unterschiedlich.

Erfolgte aber der Vergleich des Oozyten- (OS) oder Vorkernscore (VS) mit dem Embryoscore (ES) z.B. am Tag3, so korrelierte letzterer mit signifikant höheren Schwangerschaftsraten (OS/ES $P=0,003$; VS/ES $P=0,01$).

Das Embryonenscoring zeigte gegenüber der Kombination (OV) aus Oozytenscoring und Vorkernscoring nur eine Tendenz ($P=0,073$) zu höheren Schwangerschaftsraten.

Die Kombination des Oozyten- und Vorkernscorings mit einem Embryoscoring zeigte mit 57,7% absolut die höchsten Schwangerschaftsraten.

Es muss aber bedacht werden, dass beim Embryoscoring die Auswahl der Zellen für den Transfer auf der Oozyten- und Vorkernebene getroffen wurde. Es ist nicht vorhersehbar, wie sich die übrigen Zellen entwickelt hätten, da die Weiterkultivierung aller Vorkernstadien auf Grund des Embryonenschutzgesetzes verboten ist.

Die unterschiedlichen Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Art des Scorings sind in Abb.28 zusammenfassend dargestellt.

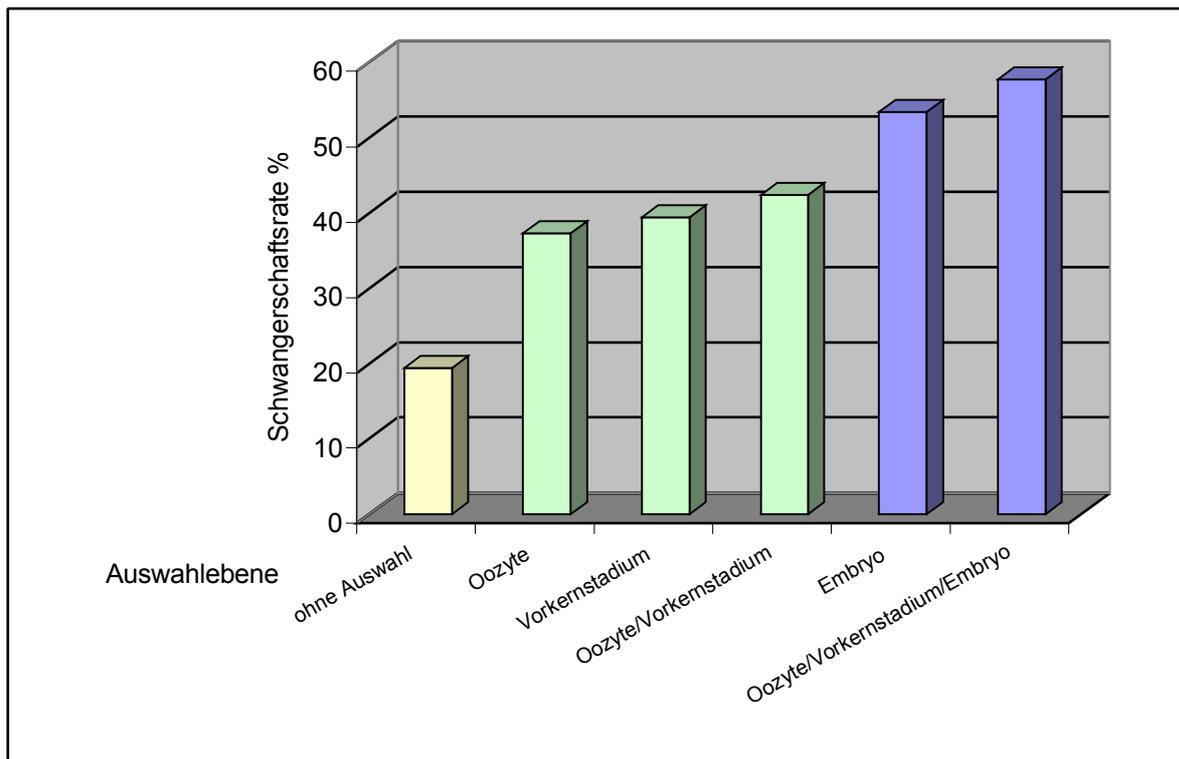


Abb.28: Darstellung der unterschiedlichen Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Ebene, auf der die Auswahl getroffen wurde.

3.6 Auswertung der Geburten und Aborte

In 32 Zyklen (Geburten) implantierten alle transferierten Embryonen (n=61). Die Oozyten- und Vorkernqualität wurde für diese Zyklen ausgewertet.

In 39 Zyklen kam es zu Aborten. Nur in drei Zyklen konnte der Abort direkt einer Zelle (5 Embryonen) zugeordnet werden. Insgesamt wurden bei den Zyklen, bei denen es zu einem Abort kam, 82 Embryonen transferiert, davon implantierten 48 und führten zu einer Fruchthöhle. Die transferierten Embryonen konnten aber nicht direkt dem Abort zugeordnet werden. Bei 7 Zyklen wurde eine Zwillingsschwangerschaft festgestellt, die in einem Abort und einer Geburt resultierte. Aus diesen Gründen war eine genaue Zuordnung des Embryos zum Abort nicht möglich. Es konnten lediglich die Prozentanteile der Zellen, die an den Zyklen mit Abort beteiligt waren, angegeben werden.

Aus der Tabelle 45 geht die Oozytenqualität der Zellen hervor, die implantierten und die, die möglicherweise am Abort beteiligt waren.

Tab.45: Oozytenqualität der Zellen, die implantierten oder möglicherweise am Abort beteiligt waren. Es wurde der prozentuelle Anteil der implantierten Embryonen an der Gesamtanzahl an transferierten Zellen angegeben.

	Transferierte Zellen % (n)	Zellen, die zur Geburt führten % (n)	Zellen, die ev. am Abort beteiligt waren % (n)
Anzahl Defekte			
Höchstens 1 Defekt	47,7% (572)	5,1% (29)	6,4% (37)
Mindestens 2 Defekte	52,3% (628)	5,1% (32)	7,1% (45)
Zytoplasma			
Normal	79,6% (956)	5,1% (49)	6,0% ^a (58)
Auffällig	20,4% (245)	4,9% (12)	9,8% ^a (24)
Einschlusskörper			
Keine	64,2% (771)	5,3% (41)	7,3% (56)
Vorhanden	35,8% (430)	4,7% (20)	6,0% (26)
Vakuolen			
Keine	95,9% (1152)	5,1% (59)	6,5% ^b (75)
Vorhanden	4,1% (49)	4,1% (2)	14,3% ^b (7)
PVS			
Normal	77,9% (937)	5,0% (47)	7,2% (67)
Auffällig	22,1% (264)	5,3% (14)	5,7% (15)
Polkörper			
Normal	64,0% (765)	4,8% (37)	6,9% (53)
Auffällig	36,0% (436)	5,5% (24)	6,7% (29)
Form			
Normal	92,8% (1114)	5,7% ^c (60)	7,1% (79)
Auffällig	7,2% (87)	1,1% ^c (1)	3,4% (3)
Zona Dicke			
Bis 20	70,7% (813)	5,3% (43)	6,5% (53)
> 20	29,3% (337)	5,3% (18)	7,7% (26)
Zona Art			
Normal	77,2% (847)	5,7% (48)	6,7% (57)
Auffällig	22,8% (250)	4,4% (11)	6,8% (17)

^{a,b}P<0,05;

^cP<0,1;

alle anderen Fälle=ns

Oozyten mit höchstens einem Defekt implantierten signifikant häufiger als solche mit mehr Auffälligkeiten (Tab.31). Die Betrachtung der Zellen, von denen man sicher sagen konnte, dass sie implantierten, ergab aber keinen häufigeren Anteil von implantierten Zellen mit höchstens einem Defekt. Die separate Auswertung jeder einzelnen Auffälligkeit ergab, dass die Zellen mit der Auffälligkeit genauso häufig bei den implantierten Embryonen vertreten waren wie die Zellen ohne solch einen Defekt.

Lediglich die Oozyten mit einer auffälligen Form zeigten eine Tendenz ($P=0,083$) zu einer geringeren Anzahl an implantierten Embryonen im Vergleich mit kugelrunden Zellen.

Die Anzahl an Auffälligkeiten bei der Oozyte spiegelte sich nicht in der Anzahl an Aborten wider. Oozyten mit mehr als einem Defekt waren nicht signifikant häufiger an Aborten ($P=0,633$) beteiligt als Oozyten mit weniger Auffälligkeiten.

Lediglich Oozyten mit auffälligem Zytoplasma ($P=0,039$) und mit Vakuolen ($P=0,035$) traten signifikant häufiger bei Aborten auf als Zellen, die diese Auffälligkeiten nicht aufwiesen.

Die Zellen, die implantierten und die, die eventuell am Abort beteiligt waren, wurden sowohl im Hinblick auf die Oozytenqualität als auch hinsichtlich der Qualität des Vorkernstadiums in Form des Z-Scores ausgewertet. Die Aufteilung der Vorkernstadien nach ihrem Z-Score wird in Tabelle 46 aufgeführt.

Tab.46: Verteilung der transferierten Embryonen nach dem Z-Score der Vorkernstadien und dem prozentualen Anteil an implantierten bzw. möglicherweise am Abort beteiligten Zellen

	Transferierte Zellen (1204)	Zellen, die zur Geburt führten (n)	Zellen, die ev. am Abort beteiligt waren (n)
Z1	38,8% (467)	6,9% (32) ^{a,b}	7,5% (35) ^d
Z2	16,4% (197)	7,6% (13) ^{a,c}	6,1% (12) ^d
Z3	43,9% (529)	3,0% (16) ^{b,c}	6,6% (35) ^d
Z4	0,9% (11)	0	0

^{a,d} P= ns; ^b P<0,01; ^c P<0,05

Aus der Tabelle 46 wird ersichtlich, dass die Z1 und Z2 Vorkernstadien fast gleich häufig ($P=0,906$) einem implantierten Embryo zuzuordnen waren. Dagegen konnte den Z3 und Z4 Vorkernstadien im Vergleich zu Z1 Vorkernstadien ($P=0,005$) und Z2

Vorkernstadien (P=0,029) signifikant seltener ein implantiertes Embryo nachgewiesen werden.

Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Vorkernstadienscores und den möglicherweise am Abort beteiligten Embryonen zu erkennen.

Tab.47: Verteilung der transferierten Zellen nach ihrem Embryoscore am Tag3 und dem prozentuellen Anteil an implantierten bzw. möglicherweise am Abort beteiligten Embryonen

Embryoscore	Transferierte Embryonen (n)	Embryonen, die zur Geburt führten (n)	Embryonen, die evtl. am Abort beteiligt waren (n)
> 25	31,0% (300)	8,7% ^a (26)	8,7% ^b (26)
≤ 25	69,0% (668)	3,4% ^a (23)	6,0% ^b (40)

^aP<0,001;

^bP=ns

Der Embryoscore spiegelte einen deutlichen Zusammenhang mit der Geburtenrate wider. Embryonen mit einem Embryoscore >25 am Tag3 konnten signifikant häufiger einer Implantation zugeordnet werden, als Embryonen mit einem niedrigeren Embryoscore.

Hinsichtlich der Abortrate und dem Embryoscore waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

3.7 Mehrlingsproblematik

Eine Mehrlingsschwangerschaft ist aus medizinischer Sicht mit einem erhöhten Fehlbildungs- und Frühgeburtsrisiko behaftet. Insbesondere Drillingschwangerschaften sind hiervon betroffen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der zu transferierenden Embryonen möglichst auf zwei reduziert. Drei Embryonen wurden, wie unter „Auswertung bezüglich allgemeiner Faktoren“ angeführt, nur bei verminderter Schwangerschaftschance transferiert (>1 Vorversuchen, Befruchtungsrate <50%, Alter der Frau >37 Jahre, schlechte Zellqualität). In einigen Fällen bestanden die Patienten auf den Transfer von drei Embryonen. In der vorliegenden Arbeit kam es nur

in einem Fall zu einer Drillingsschwangerschaft bei einer Frau mit einem Alter von 34 Jahren und guter Schwangerschaftschance, der vom Transfer von drei Embryonen abgeraten wurde, aber darauf bestand.

Die hohe Mehrlingsrate von 20,8% resultiert aus den Zwillingsgeburten der Transferzyklen mit zwei Embryonen.

Die Patientinnen mit Zwillingsgeburten waren nicht jünger ($P=0,088$) noch hatten sie weniger Vorversuche ($P=0,153$) als die Patientinnen mit Einlingsgeburten. Zwischen diesen beiden Gruppen gab es auch keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf die Anzahl der Zyklen mit einer Befruchtungsrate $< 50\%$, der Oozyten, Vorkernstadien und Embryoqualität. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 48 zusammengefasst.

Tab. 48 Auswertung der Geburten (Einlinge, Zwillinge und Drillinge) hinsichtlich des durchschnittlichen Alters und die Anzahl an Vorversuchen (Vorversuche) der Frau, der Befruchtungsrate (% Anteil der Zyklen mit einer Befruchtungsrate $< 50\%$ (Befr.rate)) und der Qualität der Oozyten (% Anteil der Zyklen mit mindestens einem Embryo aus einer Oozyte mit höchstens einem Defekt(Qualität Oozyte)) und Vorkernstadien (% Anteil der Zyklen mit mindestens einem Vorkernstadium mit Z1 Score, das weiterkultiviert wurde(Qualität Vorkern)) und der prozentuale Anteil an Zyklen mit einem kumulativen Embryoscore > 50 beim Transfer von zwei Embryonen (Emb.score > 50)

Geburten (n)	Alter der Frau	Vorversuche	Befr.rate $< 50\%$ (%)	Qualität Oozyte (%)	Qualität Vorkern (%)	Emb.score > 50 (%)
Einlinge (114)	32,1 ^a	0,6 ^b	7,0 ^c	59,6 ^d	64,9 ^e	62,0 ^f
Zwillinge (29)	30,5 ^a	0,4 ^b	3,4 ^c	75,9 ^d	69,0 ^e	62,5 ^f
Drillinge (1)	34	1	0	0	100	

^{a,b,c,d,e,f} P= ns

4 Diskussion

Für den Ausgang der Kinderwunschtherapie ist es mit entscheidend, Marker für die Erkennung der Zellen mit dem höchsten Entwicklungspotential zu finden. Eine voll entwickelte Zelle erreicht nach der Oogenese die Meiose, um dann mit einem Spermatozoon fertilisiert zu werden. Dies beinhaltet die Bildung der haploiden Vorkerne und nach dem Abschluss der Befruchtungskaskade erfolgen die ersten Teilungen der Embryonalentwicklung. Im Stadium der Blastozyste erfolgt das „Hatching“ und anschließend die Implantation. Die Schwangerschaft soll dann nach Etablierung und Weiterentwicklung in die Geburt eines Kindes enden.

Bei der in vitro Fertilisation weisen aber nur ca. 10% der gewonnenen Oozyten die Entwicklungskompetenz zu einem implantationsfähigen Embryo auf (Borini et al., 2004, Coticchio et al., 2004). Ca. 25% der Oozten sind aneuploid (Van Blerkom, 1998), und ca. 70% der Embryonen enthalten 44 Stunden nach Fertilisation aneuploide Blastomeren (Ziebe et al., 2003).

Die nicht invasive morphologische Beurteilung der Teilungsgeschwindigkeit (Thurin et al., 2005) und Fragmentation (Hardarson et al., 2002) der Embryonen wird international herangezogen, um das Entwicklungspotential der Embryonen zu beurteilen. Aufgrund des deutschen Embryonenschutzgesetzes ist diese Methode in Deutschland nicht möglich. Es darf keine Embryonenselektion stattfinden, und die Auswahl von höchstens drei Zellen muss im Vorkernstadium abgeschlossen sein.

Aus diesem Grund werden in dieser vorliegenden prospektiven Multizenterstudie mit 564 Zyklen, 4778 reifen Oozyten und 3342 Vorkernstadien die Kriterien der Gameten und Vorkernstadien herausgearbeitet, anhand derer eine Aussage über das weitere Entwicklungspotential der Zelle getroffen werden kann.

Um bewerten zu können, ob die allgemeinen Faktoren Alter, Body Mass Index, Anzahl an Vorversuchen der Frau sowie Befruchtungsrate und Anzahl MII Oozyten oder der zu untersuchende Parameter der Oozyte oder des Vorkernstadiums den Ausgang der Therapie beeinflusst hatten, wurden diese allgemeinen Faktoren mit ausgewertet.

In der Literatur (Fedorcsak et al., 2004 und Kailasam et al., 2004) werden bei Patientinnen mit einem body mass index > 30 und/oder wenigen Follikeln nach Stimulation geringere Schwangerschaftsraten beschrieben als bei Patientinnen mit einem body mass index <30 und/oder >2 Follikel. Dies ist insbesondere bei der Anzahl an MII Oozyten (DIR 2005) der Fall. Aus diesem Grund wurden diese Patientinnen

(body mass index >30 und/oder ≤ 2 Follikel) nicht mit in die vorliegende Arbeit aufgenommen, um den Einfluss dieser beiden Faktoren zu minimieren. Der Body Mass Index der Frau und die Anzahl an MII Oozyten nach Follikelpunktion hatten in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf die Schwangerschaftsrate und wurden bei den weiteren Auswertungen nicht berücksichtigt.

Das Alter der Frau hat eine wichtige Bedeutung für die Chancen eines Paares, eine Schwangerschaft mit Geburt eines gesunden Kindes zu erzielen. Der Anteil aneuploider Oozyten nimmt mit dem Alter der Frau zu (Sancken et al., 2005) und die Schwangerschaftsrate ab (DIR 2005).

Es zeigte sich aber in der vorliegenden Arbeit wie auch im DIR (2005), dass bei einer ausreichenden ovariellen Reserve und mindestens 2 Embryonen beim Transfer, die Reproduktionsmedizin in der Lage war, die Schwangerschaftsrate bis zum 40. Lebensalter der Frau oberhalb von 30% zu etablieren. In der Statistik vom DIR wurden allerdings nur die Zyklen aufgeführt, bei denen auch zwei Vorkernstadien mindestens „im Überschuss“ waren. Mit einem Alter über 40 Jahren fiel die Schwangerschaftsrate in der vorliegenden Arbeit auf 8% und im DIR auf 10,5% ab.

Bei der Anzahl an Vorversuchen der Frau zeigte sich, dass die Chancen eine Schwangerschaft nach zwei vorangegangenen Vorversuchen mit negativem Ergebnis zu erzielen, signifikant gemindert waren. Ebenso war die Schwangerschaftsrate bei Befruchtungsraten unter 50% deutlich (signifikant) vermindert.

Da das Alter der Frau, die Anzahl an Vorversuchen und die Befruchtungsraten einen signifikanten Einfluss auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie hatten, wurden diese Parameter bei den folgenden Untersuchungen ausgewertet, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit eine Aufführung nur erfolgte, wenn bedeutsame (signifikante) Unterschiede erkennbar waren.

4.1 Einfluß des Spermatozoons auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie

Ein weiterer Aspekt ist die Möglichkeit, dass das Spermatozoon einen Einfluss auf den Ausgang der Therapie haben kann.

Nach der Pubertät werden fortlaufend mittels der Spermiogenese innerhalb von 64 Tagen Spermatozoen neu gebildet (Sadler, 1998). Eine Alterung wie bei den Oozyten findet somit nicht statt. Die Funktion des Spermatozoons ist die Befruchtung der Oozyte und damit verbunden die Weitergabe des haploiden Chromosomensatzes des Mannes. Die Gameteninteraktion erfolgt wie eine Kaskade (Beier, 1992), wobei das Spermatozoon die Phasen Kapazitation, Oozytenerkennung und Bindung, akrosomale Reaktion, Penetration der Zona pellucida, des perivitellinen Raumes und Fusion mit dem Oolemma durchlaufen muss, um in das Zytoplasma der Oozyte zu gelangen. Bei infertilen Männern liegen meist Störungen der Spermatozoenmotilität (Asthenozoospermie) und/oder der Anzahl (Oligozoospermie) und/oder der Morphologie (Teratozoospermie) vor, die diesen Prozess verhindern. Die World Health Organisation (WHO, 1999) hat bezüglich dieser Spermatozoenparameter Grenzen festgelegt, ab denen die Chance zur natürlichen Konzeption geringer einzuschätzen sind. Müssen die Spermatozoen aus eigenen Kräften in die Oozyte gelangen, wie es auch bei der Durchführung der konventionellen In Vitro Fertilisation (IVF) der Fall ist, zeigten Studien (Grow et al., 1994), dass die Motilität, Anzahl (Duncan et al., 1993) und Morphologie (Kruger et al., 1988) der Spermatozoen einen signifikanten Einfluss auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie haben.

Die Durchführung der IVF mittels sog. „intracytoplasmatischer Spermieninjektion“ (ICSI) ermöglicht dem Labormitarbeiter, ein Spermatozoon auszuwählen, um dieses im Zytoplasma der Oozyte zu positionieren.

Der Einfluss der klassischen Spermatozoenparameter Zelldichte, Morphologie und Motilität wurden mit den resultierenden Schwangerschaftsraten in Relation gesetzt. Keine der drei Parameter zeigte einen deutlichen (signifikanten) Einfluss auf den Ausgang (Befruchtungs-, Implantations- oder Schwangerschaftsrate) der Kinderwunschtherapie.

Ein statistischer Zusammenhang zwischen der Spermaqualität und der Schwangerschaftsrate war nicht nachweisbar. Die Spermaqualität wurde daher in den folgenden Untersuchungen nicht weiter mit berücksichtigt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Nagy et al. (1995), Oehninger et al. (1995) und Svalander et al. (1996), die auch keine Unterschiede feststellen konnten, solange motile Spermatozoen vorhanden waren. In der Literatur werden nur dann Unterschiede beschrieben (Miller and Smith, 2001), wenn immotile Spermatozoen für die ICSI verwendet wurden. In der vorliegenden Arbeit war das Fehlen von motilen Spermatozoen ein Ausschlusskriterium.

Der Labormitarbeiter kann das Spermatozoon für die ICSI auswählen und ist somit in der Lage, in den meisten Fällen jene zu verwenden, die eine normale Morphologie aufweisen. Aber auch die Ejakulate mit „morphologisch anomalen“ im Vergleich zu „normalen“ Spermatozoen, zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Schwangerschaftsraten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Nagy et al. (1996). Die morphologischen Untersuchungen wurden bei 1000 facher Vergrößerung durchgeführt. Es ist nicht auszuschließen, dass bei >6000 facher Vergrößerung Strukturen sichtbar werden (Bartoov et al., 2003), die einen Einfluss auf den Ausgang der Therapie nehmen können.

In dieser vorliegenden prospektiven Arbeit unter den beschriebenen Bedingungen war kein signifikanter Einfluss der motilen paternalen Gameten auf die Schwangerschaftsraten zu erkennen. Dieses Ergebnis ermöglicht erst die Untersuchung morphologischer Kriterien der Oozyten und Vorkernstadien zur Erzielung einer Schwangerschaft, da der paternale Einfluss ohne Bedeutung war.

4.2 Einfluß der Oozyte auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie

In der pränatalen Entwicklung der Frau wandern die Urkeimzellen in die Gonadenanlagen und differenzieren sich zu Oogonien und dann zu den primären Oozyten. Nach der Replikation der DNA treten diese in die Prophase der 1. Reifeteilung. Dies geschieht im 3. Monat der Schwangerschaft. Bei der Geburt befinden sich die primären Oozyten in dieser Prophase und verharren im Diktyotän. Die Gesamtzahl der primären Oozyten wird auf 700 000 bis 2 Millionen geschätzt. Bis zur Pubertät wird die Mehrzahl atretisch und zu Beginn der Pubertät sind nur noch 40 000 vorhanden. Nach der Pubertät in der reproduktiven Phase der Frau kommen dann

weniger als 500 Oozyten zum Abschluss der 1. Reifeteilung und zur Ovulation (Sadler, 1998). Dies bedeutet, dass einige Oozyten, die im Leben erst spät zur Reife gelangen, sehr lange im Diktyotänstadium verbleiben und evtl. schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Für den Embryologen ist es wichtig, mittels einer nicht invasiven morphologischen Beurteilung der Oozyten diese Schädigungen abzuschätzen. Eine morphologisch normale Oozyte hat eine kugelförmige Form von 130 bis 150µm und wird charakterisiert durch eine dünne ($\leq 20\mu\text{m}$) unauffällige Zona pellucida, einen unauffälligen perivitellinen Spalt, einen ovalen Polkörper und ein homogenes Zytoplasma ohne Vakuolen oder Einschlusskörper.

In der Literatur (De Sutter et al., 1996; Loutradis et al., 1999) werden unterschiedliche Aussagen bezüglich der Relevanz der Oozytenqualität gemacht. Ein Problem ist dabei, dass teilweise Faktoren zusammengefasst oder vernachlässigt wurden, der Embryologe aber jede einzelne Auffälligkeit beurteilen muss.

Zudem kann jede Oozyte mehrere Defekte aufweisen oder der Defekt in unterschiedlich starker Ausprägung vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde jeder Faktor zunächst separat erfasst und sein Einfluss auf die Befruchtungs- und Degenerationsrate, den Z- und Embryoscores und die resultierenden Schwangerschaftsraten ausgewertet. Es wurde dabei nicht berücksichtigt, ob weitere Auffälligkeiten vorhanden waren. Die Ausprägung der Auffälligkeit wurde dokumentiert aber meistens nicht berücksichtigt, da die Anzahl an entstehenden Untergruppen zu groß und somit statistisch nicht mehr auswertbar war.

4.2.1 Der Einfluß von zytoplasmatischen Faktoren

Im Zytoplasma wurden bei 26,2% der Oozyten partielle und komplette Granulierungen, bei 40,5% Einschlusskörper und bei 7% Vakuolen festgestellt. Es kamen auch mehrere zytoplasmatische Abnormitäten gleichzeitig vor. Bei diesen Auffälligkeiten waren signifikant geringere Befruchtungsraten und bei Granulierungen und Vakuolen höhere Degenerationsraten festzustellen. Der Prozess der zytoplasmatischen Reifung (Sundström und Nilsson, 1988) ist noch nicht geklärt, und die unterschiedlichen Erscheinungsformen des Zytoplasmas könnten diese Entwicklung widerspiegeln. Die Abnormitäten im Zytoplasma könnten die Funktion der Mikrotubuli (Van Blerkom, 1990) und der Spindel (Ebner, 2006) negativ beeinflussen. Dies würde die geringeren Befruchtungsraten und höheren Degenerationsraten erklären.

Nach Initiation der Befruchtungskaskade zeigten die Zellen ohne Auffälligkeiten in den Absolutwerten in allen Fällen und bezogen auf signifikante Unterschiede in den meisten Untersuchungen einen höheren Anteil an Z1 Vorkernstadien („gute“ Prognose) und „gut“ entwickelten Embryonen (Tag2 Embryoscore >10, und Tag3 > 25) und eine geringere Anzahl an Z4 Vorkernstadien und „schlechter“ entwickelten Embryonen (Embryoscore Tag3 <16).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Loutradis et al. (1999), der ebenfalls sich langsamer entwickelnde Embryonen bei Auffälligkeiten der Oozyten feststellte. In der Untersuchung wurden die Auffälligkeiten allerdings alle zusammengefasst und nicht differenziert. Ebenso verhält es sich bei den Untersuchungen von Serhal et al. (1997) und De Sutter et al. (1996), wobei diese keine signifikanten Unterschiede in der Befruchtungsrates und Embryonalentwicklung feststellen konnten. Die Fallzahlen waren mit 837 und 528 Oozyten in den vorher genannten Arbeiten gering und die Absolutwerte zeigten auch in diesen Studien höhere Befruchtungsrates bei Oozyten ohne Auffälligkeiten. Xia (1999) differenzierte in seiner Studie nicht bezüglich der Art der zytoplasmatischen Auffälligkeit. Aber auch er stellte die Korrelation zwischen zytoplasmatisch auffälligen Oozyten und schlechteren Befruchtungs- und Entwicklungsrates der Embryonen als äußerst bedeutsam dar. Balaban et al. (1998) konnten keine Beeinflussung durch die Morphologie der Oozyten feststellen, allerdings fassten sie die Auffälligkeiten in Bezug auf die Schwangerschaftsrates zusammen und beim Vergleich der Befruchtungsrates und weiteren Entwicklung waren die Gruppengrößen sehr unterschiedlich und zum Teil zu klein (167 Oozyten).

In der vorliegenden Arbeit war der negative Einfluss der Granulierungen, Einschlusskörper und Vakuolen -separat betrachtet- nicht signifikant unterschiedlich bezogen auf die Schwangerschaftsrates, wobei beim Auftreten von Einschlusskörpern eine negative Tendenz zu erkennen war. Bei der konventionellen IVF werden Einschlusskörper mit ausbleibender Befruchtung in Zusammenhang gebracht (Veeck, 1988). Die ICSI kann dies zum Teil ausgleichen (Balaban et al., 1998), wenn auch in der vorliegenden Arbeit geringere Befruchtungsrates vorzufinden waren. Auf der Ebene der zytoplasmatischen Auffälligkeiten war der negative Einfluss der Einschlusskörper deutlich in der Implantationsrate (signifikant) und in der Schwangerschaftsrates (tendenziell) zu erkennen.

Der negative Einfluss der zytoplasmatischen Auffälligkeiten war bei Zusammenfassung aller drei Faktoren (Zytoplasma, Einschlüsse und Vakuolen) deutlich erkennbar im Vergleich zu unauffälligen Oozyten. Die Befruchtungsrates war signifikant geringer und der Z-Score von der Prognose her schlechter (weniger Z1 und mehr Z4 Vorkernstadien). Die Degenerationsrate unterschied sich nicht, ein Hinweis darauf, dass die Durchführung der ICSI und die Empfindlichkeit der Oozyte nicht von den Faktoren in der Zelle beeinflusst wurden.

4.2.2 Der Einfluß von extrazytoplasmatische Faktoren

Anders verhielt es sich bei den extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten (PVS, Polkörper, Form der Oozyte und Zona pellucida), deren Vorhandensein sich in signifikant höheren Degenerationsraten (jeder Faktor separat und alle zusammen betrachtet) widerspiegelte. Diese Faktoren führen bei der Durchführung der ICSI eher zu Degenerationen. Die extrazytoplasmatischen Faktoren zusammengefasst hatten keinen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung der Zelle bis auf die Tatsache, dass am Tag3 mehr Embryonen mit einem geringeren (Embryoscore >16) und weniger mit einem hohen Embryoscore (Embryoscore >25) erkennbar waren. Die Schwangerschaftsrate der Zyklen mit zwei Embryonen beim Transfer, die ausschließlich aus Oozyten mit extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten entstanden waren, war mit 30,7% statistisch nicht geringer als die Gesamtheit der Transfers mit zwei Embryonen (33,9%).

Balaban et al. (1998) und De Sutter et al. (1996) zeigten beide vergleichbare Ergebnisse. Die Studie von Balaban et al. (1998) differenziert die extrazytoplasmatischen Faktoren allerdings nur nach der Beschaffenheit der Zona pellucida und des perivitellinen Spaltes (PVS) und De Sutter et al. (1996) hatten in ihrer Studie geringe Fallzahlen (528 Oozyten).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 4778 Oozyten der PVS, der Polkörper, die Form und die Zona pellucida beurteilt.

Ein Phänomen war das Auftreten eines auffälligen PVS in Form von einem sehr großen Spalt oder Zytoplasmatrümmern (Granula) im Spalt. Die Ursache könnte in hohen Gonadotropindosen liegen, da bei solchen Patienten das Phänomen signifikant häufiger vorkommt (Hassan-Ali et al., 1998). Es könnte sich bei den Granula um Rückstände von Coronazellausläufern (Sathanathan, 1997) oder Produkten einer extrazellulären Matrix

(Dandekar et al., 1992) handeln. In der vorliegenden Arbeit wie in der Studie von Hassan-Ali et al. (1998) hatte der PVS weder auf die Embryonalentwicklung noch auf die resultierenden Schwangerschaftsraten einen Einfluss. Im Gegensatz zu Hassan-Ali et al. (1998) zeigten die Daten der vorliegenden Arbeit eine signifikant schlechtere Befruchtungsrate und einen geringeren Anteil an Z1 und höherer Anteil an Z4 Vorkernstadien. In der Embryonalentwicklung konnte dieser Einfluss ausgeglichen werden, was die nicht vorhandenen Unterschiede sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in den Schwangerschaftsraten belegen.

Wie der PVS durch das hormonelle Umfeld beeinflusst werden kann (Ebner et al., 2006), so ist der Polkörper vom Reifestatus der Oozyte abhängig. Der erste Polkörper in normaler Form wurde von einigen Autoren (Ebner et al., 1999, 2000, 2002, Xia, 1997) als positiver prognostischer Faktor gewertet. Es wird davon ausgegangen, dass eine zu schnelle Endreifung der Zellen vor der Follikelpunktion zu einem degenerativen Prozess des ersten Polkörpers und somit zu Fragmentationen führen kann (Eichenlaub-Ritter et al., 1995). Der Reifestatus der Oozyte wird durch den ersten Polkörper angezeigt, wobei ein zeitabhängiger Zerfall zu erwarten ist (Ortiz et al., 1983). Die Morphologie des ersten Polkörpers kann Aufschluss über das postovulatorische Alter der Eizelle geben. Darin begründen die oben genannten Autoren eine schlechte Prognose bei fragmentierten Polkörpern. Es ist anzunehmen dass die Auswahl der Zellen für den Transfer in den Untersuchungen von Ebner et al. (1999, 2000, 2002) und Xia (1997) aufgrund der Embryonenmorphologie getroffen wurde, wodurch die Zellen mit einem normalen Polkörper durch das Kriterium der Embryonalentwicklung eine spätere Selektion erfahren und somit der Einfluss des Polkörpers überdeckt worden sein könnte. Ciotti et al. (2004) und De Santis et al. (2005) zeigten zu diesen Arbeiten widersprüchliche Daten, wonach weder ein Zusammenhang zwischen dem ersten Polkörper und der Befruchtungsrate noch zu der Embryonenqualität oder Schwangerschaftsrate bestand. Sie fanden auch, dass die Injektion des Spermatozoons zwischen 5 und 7 Stunden nach Follikelpunktion signifikant höhere Schwangerschaftsraten aufwies als die Injektion zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt. In den Untersuchungen von Ebner et al. (1999, 2000) wurde die Polkörperbeobachtung (2-3 Stunden) und die Injektion des Spermatozoons (3 bis 4 Stunden nach Follikelpunktion) früher durchgeführt, was zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Polkörperbeurteilung und ICSI ebenfalls 5 bis 7 Stunden nach Follikelpunktion durchgeführt und die Ergebnisse bestätigen die Daten von Ciotti et al. (2004) und De Santis et al. (2005). Es zeigten sich keine unterschiedlichen Befruchtungsraten, Vorkernscores und Schwangerschaftsraten. Am Tag2 war die Embryonalentwicklung vergleichbar, lediglich am Tag3 waren mehr „gut“ entwickelte Embryonen zu beobachten. Die gleiche Entwicklung der Oozyten mit unterschiedlicher Polkörpermorphologie wurde durch genetische Untersuchungen von Verlinsky et al. (2003) unterstützt, wonach die Form des Polkörpers keinen Aufschluss über die genetische Konstitution zuließ.

Die Oozyte ist in der Regel von runder Form. In der vorliegenden Arbeit war dies bei 87,2% (4156 Oozyten) der Fall. Dies zeigte, dass Auffälligkeiten bezüglich der Form nicht so häufig waren. In den meisten Untersuchungen wird dieses Kriterium gar nicht berücksichtigt oder war, wie bei Balaban et al. (1998) noch seltener (3% der Zellen). Im Gegensatz zu Balaban et al. (1998), die keine Unterschiede feststellten, verfügten die Zellen in der vorliegenden Arbeit mit länglicher oder deformierter Form über ein erkennbar geringeres Entwicklungspotential als kugelförmige runde Oozyten. Dies war signifikant von der Befruchtungsrates bis zur Embryonalentwicklung und auch die Implantationsraten waren beim „gemischten Transfer“ -mit Embryonen aus Oozyten einer auffälligen und einer unauffälligen Form- geringer als beim Transfer von Embryonen aus Oozyten mit unauffälliger Form. Die Schwangerschaftsrates konnte aufgrund der niedrigen Fallzahl mit Zyklen, bei denen nur Embryonen aus deformierten Oozyten transferiert wurden, statistisch nicht ausgewertet werden (vier Zyklen, aus denen keine Schwangerschaft entstand).

Die Zona pellucida wird von drei Proteinen (hZP1, hZP2 und hZP3) (Harris et al., 1994), die in Genfamilien zusammengefasst sind, gebildet. Sie sind zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert. Die Dicke der Zona pellucida variierte in der vorliegenden Arbeit zwischen 5,5µm und 34,4µm. Ein Grund für die unterschiedliche Dicke kann ein unterschiedlicher präovulatorischer Hormonstatus sein (Loret De Mola et al., 1997). Die Methode der ICSI überwindet diese äußere Barriere, indem das Spermatozoon direkt in der Zelle abgesetzt wird. Es war daher erwartungsgemäß kein Unterschied in den Befruchtungsrates bei Oozyten mit normaler und auffälliger Zona pellucida zu erkennen. Die höheren Degenerationsraten bei Oozyten mit dicker Zona pellucida (>20 µm) lassen sich durch eine stärkere mechanische Behandlung bei der ICSI erklären.

Bei auffälliger Beschaffenheit der Zona pellucida war keine höhere Degenerationsrate zu registrieren.

Die weitere Entwicklung bezüglich des Z-Scores war bei Oozyten mit einer Dicke der Zona pellucida $>20\mu\text{m}$ „besser“ (mehr Z1 und weniger Z4 Vorkernstadien), wobei sich dies weder in den Implantations- noch in den Schwangerschaftsraten widerspiegelte. Shen et al. (2005) konnten ebenfalls zeigen, dass die Dicke der Zona pellucida keine Unterschiede in der Schwangerschaftsrate bewirkte.

Die Auswertung der Oozyten bezüglich der Beschaffenheit der Zona pellucida zeigte in der vorliegenden Arbeit zwar keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Befruchtungs- und Degenerationsrate zwischen auffälliger und unauffälliger Zona pellucida, jedoch war die weitere Entwicklung der Oozyten mit auffälliger Zona pellucida „schlechter“ (weniger Z1, mehr Z4 und weniger Embryonen mit einem Embryoscore >10 am Tag2). Zudem waren die Absolutwerte der Implantations- und Schwangerschaftsrate geringer bei Oozyten mit auffälliger Beschaffenheit der Zona pellucida. Statistisch war dies nicht signifikant, wobei die unterschiedlichen Zyklenzahlen einen Einfluss haben könnten (281 Transfers mit Embryonen nur aus Oozyten mit unauffälligen und 58 mit auffälliger Zona pellucida).

Die separate Betrachtung der Auffälligkeiten in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass jede einzelne einen Einfluss auf die Entwicklung hatte, dies sich aber nicht in signifikant niedrigeren Schwangerschaftsraten ausdrückte. Die Summierung der Auffälligkeiten in einer Zelle nach zytoplasmatischen und extrazytoplasmatischen Anomalitäten beeinflusst das Entwicklungspotential der Zelle negativ. Dies wurde ersichtlich im Vergleich der Befruchtungsraten und der Embryonalentwicklung am Tag2 bei der Kultivierung von Oozyten ohne und mit zyto- oder extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten. Die extrazytoplasmatischen Anomalitäten hatten auf die Schwangerschaftsrate (30,7%) einen geringeren Einfluss als das kombinierte Auftreten von extra- und zytoplasmatischen Auffälligkeiten (Schwangerschaftsrate 21,9%).

Die Differenzierung der Oozyten nach der Anzahl an Defekten unabhängig welcher Art, verdeutlicht, dass die Anhäufung an Auffälligkeiten die weitere Entwicklung signifikant beeinflusst. Die Befruchtungsrate, die Anzahl an „guten“ Vorkernstadien (Z1), und die weitere Entwicklungsgeschwindigkeit (Embryoscore >10 Tag2 und >25 Tag3) der Embryonen nahmen kontinuierlich mit der Anzahl an Defekten ab. In demselben Maße nahmen die Degenerationsrate, die Anzahl an „schlechteren“ Vorkernstadien und der Anteil sich langsam entwickelnder Embryonen (Embryoscore <10 Tag2 und <16 Tag3)

zu. Dies drückte sich signifikant in der Implantations- und Schwangerschaftsrate aus, sobald Oozyten mit höchstens einer Auffälligkeit (IR:23,6%; SSR:37,3%) verglichen wurden mit solchen, die mindestens zwei Auffälligkeiten (IR: 16,5%; SSR:26,3%) aufwiesen (IR, SSR $P < 0,05$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen mit einer höheren Anzahl an Zyklen (564 gegenüber 155 und 65) die Ergebnisse von Loutradis et al. (1999) und Xia (1997). Serhal et al. (1997) berichteten zwar von keinen Unterschieden in der Befruchtungsrate jedoch bei einer Untersuchung von nur 106 Zyklen. Zudem zeigten ihre Ergebnisse signifikant geringere Schwangerschaftsraten bei Oozyten mit Defekten (3% im Vergleich zu 24% bei Oozyten mit normaler Morphologie). De Sutter et al. (1996) kommen zu dem Schluss, dass die Anzahl an Defekten die Befruchtungsrate nicht signifikant beeinflussen, jedoch sind die absoluten Werte der Befruchtungsrate sinkend (Oozyten mit keiner (72%), einer (66%) und mehreren Auffälligkeiten (63%)). Die Anzahl an Oozyten war sehr gering (Anzahl: Oozyten mit keiner (194), einer (206) und mehreren Auffälligkeiten (128)) in der Studie von De Sutter et al. (1996), wodurch eventuell keine signifikanten Unterschiede sichtbar wurden. Zudem wurden weniger Faktoren untersucht, was dazu führte, dass prozentual mehr Oozyten als normal (36,7%) beschrieben wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden 7 Faktoren mit einbezogen. Indem eine Oozyte mit einer Auffälligkeit als normal definiert wurde, ergab sich der gleiche prozentuale Anteil (38,5%), wie in der Studie von De Sutter et al. (1996) mit der einzigen Ausnahme, dass die vorliegende Arbeit eine viel höhere Fallzahl (4478 Oozyten) berücksichtigt. Dies könnte ein Grund für die signifikant abnehmende Befruchtungsrate darstellen. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit die Degenerationsrate und Embryonalentwicklung mit einbezogen, die signifikant zeigten, dass Oozyten mit höchstens einer Auffälligkeit ein höheres Entwicklungspotential aufweisen als solche mit mindestens zwei Defekten. Die Implantations- und Schwangerschaftsraten spiegelten dies wider.

Die Untersuchungen von Balaban et al. (1998) zeigten vergleichbare Ergebnisse bezüglich des prozentualen Anteils an normalen Oozyten (36,9%), jedoch stehen die Ergebnisse hinsichtlich des Entwicklungspotentials im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit. Es ist anzunehmen, dass die Auswahl der zu transferierenden Zellen wie in der Türkei üblich aufgrund einer Embryonenselektion erfolgte, und diese könnte den Effekt des Oozytenscorings überdeckt haben.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse von Xia (1997) nicht bestätigt werden, wonach jüngere Frauen einen höheren Anteil an Oozyten mit normaler Morphologie hatten. Der prozentuale Anteil an Oozyten mit höchstens einem Defekt war altersunabhängig.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass die Anzahl an Defekten entscheidend für eine Aussage über das Entwicklungspotential war. Die extrazytoplasmatischen Faktoren spielten eine geringere Rolle. Traten sie gemeinsam mit zytoplasmatischen Faktoren auf, waren die Schwangerschaftsraten signifikant niedriger. Dies verhielt sich ebenso, wenn eine Oozyte mindesten zwei Auffälligkeiten aufwies.

4.3 Einfluß des Vorkernstadiums auf den Ausgang der Kinderwunschtherapie

Durch das Eindringen bzw. das Einbringen des Spermatozoons in die Eizelle wird die Befruchtungskaskade initiiert. Der zweite Polkörper wird ausgeschleust und es kommt zur Bildung der beiden Pronuklei. Das Embryonenschutzgesetz (ESchG) bezeichnet dies als „imprägnierte Eizelle“. Die Auswahl der Zellen für den Transfer muss vor der Auflösung der pronuklearen Membran der Vorkerne erfolgen, denn das ESchG bezeichnet die entstehende Zygote bereits als Embryo und stellt die Embryonenauswahl unter Strafe.

Beide Vorkerne entstehen in der Regel getrennt und lagern sich im Verlauf der Entwicklung zentral im Zytoplasma aneinander an. Die Nucleoli können in den Vorkernen fluktuieren (Payne et al., 1997)) und fusionieren (Tesarik und Kopecny, 1989). Sie sind der Ort der ersten Transkription der Vorläufer rRNA (Tesarik und Kopecny, 1990) und sollten sich im Zuge der Entwicklung polar an der Bindungsstelle der Vorkernhemisphäre anordnen. Dieser Prozess ist zeitabhängig (Plachot, 2000), und daher war es wichtig, dass die Vorkernbeurteilung immer im gleichen Zeitfenster 16-18 Stunden nach Durchführung der ICSI erfolgte.

Scott und Smith (1998) entwarfen ein komplexes Vorkernscoring zur Beurteilung des Entwicklungspotentials der Zelle. Die Anordnung der Nucleoli in den Vorkernen war hierbei ein Parameter, der von Tesarik und Greco (1999) verfeinert und von Scott et al. (2000) zum Z-Scoring ausgebaut wurde. Die prognostische Bedeutung der Verteilung der Nucleoli in den Vorkernen wurde in den Arbeiten von Wittemer et al. (2000), Balaban et al. (2001), Montag et al. (2001) und Zollner et al., (2002) bestätigt. Auf der

Ebene der Vorkernstadien wurde in der vorliegenden Arbeit das Z-Scoring (Scott et al. (2000)) durchgeführt und zudem die Lage der Vorkerne und das Auftreten eines Halos dokumentiert.

Die Auswertung der Embryonenqualität in Abhängigkeit vom Z-Score des Vorkernstadiums zeigte am Tag2 signifikant mehr Embryonen mit einem Score >10, wenn diese aus einem Z1 Vorkernscore entstanden waren. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Scott et al. (2000), wobei letztere alle Zellen bis zum Tag3 oder Tag5 (Blastocystenkultur) kultivierten und dann eine Embryonenauswahl durchführten. Diese Vorgehensweise ist in Deutschland verboten und begründet die geringere Anzahl an beurteilten Embryonen pro Zyklus (nur die, die für den Transfer vorgesehen waren). Am Tag3 waren in Abhängigkeit vom Z-Score signifikant mehr Embryonen, die aus einem Z3-Score Vorkernstadium hervorgegangen waren von geringerer Qualität (Embryoscore <16). Die Auswertung bezüglich der Embryonen mit einem Embryoscore >25 am Tag3 zeigten im Vergleich Z1, Z2 und Z3 keine signifikanten Unterschiede. Die einzelnen Gruppen (Z1, Z2, Z3) zeigten aber eine signifikant unterschiedliche Streuung in ihren Embryoscores, welche sich in der unterschiedlichen Standardabweichung (25,8 für Z1; 18,9 für Z2 und 1,5 für Z3) und den Konfidenzintervallen (23,0-29,5 für Z1; 16,8-21,7 für Z2 und 1,3-1,8 für Z3) widerspiegelte. Die unterschiedliche Embryonalentwicklung in Abhängigkeit vom Vorkernscoring zeigten Kahraman et al. (2002). Sie zeigten zudem, dass sich aus Vorkernstadien mit einem Z3 Score (als GII bezeichnet) signifikant häufiger chromosomal abnormale Embryonen (56,2%) entwickelten als aus Z1 oder Z2 (37,6% als GI bezeichnet) Vorkernstadien. Gamiz et al. (2003) konnten diese Beobachtung allerdings nur bis zu einem Alter der Frau von 37 bestätigen.

Die Vorkernstadien mit einem Z1 Score zeigten in der Embryonalentwicklung und den daraus resultierenden Transfers (Schwangerschaftsrate 34%) die „beste“ Prognose gegenüber allen anderen Z-Scores. Prozentual gesehen wurden relativ wenig Vorkernstadien mit einem Z2-Score weiterkultiviert (17% Z2 gegenüber 38,7% Z1 und 44,6% Z3). Die statistische Beurteilung war daher nicht immer möglich. Es zeigte sich aber, wie auch in der Arbeit von Scott et al. (2000), dass die prognostischen Unterschiede zwischen den Z2 und Z3 Vorkernstadien geringer waren im Vergleich zu den Vorkernstadien mit einem Z1-Score.

Das Vorkernscoring in Abhängigkeit von der Anordnung der Nucleoli zeigte wie weit der Zellzyklus nach Aktivierung durch das Spermatozoon fortgeschritten war. In der Arbeit von Plachot (2000) wurde die zeitliche Abfolge der Entwicklungen einer injizierten

Oozyte 2 bis 9,5 Stunden nach ICSI bildlich dokumentiert. Es ist deutlich das Durchlaufen der Z-Scores vom Z4 Stadium mit voneinander getrennten Vorkernen über das Z3, Z2 bis zum Z1 Stadium zu erkennen. Die mikroskopische Untersuchung erlaubt eine vergleichende Beurteilung der Vorkernstadien eines Zyklus und somit die Auswahl der Zellen, die die Entwicklung am „weitesten“ durchlaufen haben. 16-18 Stunden nach ICSI war dies signifikant erkennbar bei den Vorkernstadien mit polarisierten Nucleoli gleicher Anzahl (3-7) in der Vorkernhemisphäre die sich am anderen Vorkern anlagerte. Die Schwangerschaftsrate war bei Transfers mit zwei Embryonen, von denen mindestens ein Embryo aus einem Z1 Vorkernstadium hervorgegangen war, mit 39,4% signifikant höher als bei Transfers mit mindestens einem Z2 (Kein Z1) (SSR 28,4%) oder mindestens einem Z3 (Kein Z1 oder Z2) (SSR 27,3%) Vorkernstadium.

Es wirkte sich positiv auf den Erfolg eines Zyklus aus, wenn aus überzähligen Vorkernstadien zwei für die Embryokultur ausgewählt werden konnten (siehe Tabelle 39). Bestand keine Auswahlmöglichkeit aus Vorkernstadien für den Embryotransfer, betrug die Implantationsrate (IR) nur 11,0% und die Schwangerschaftsrate (SSR) 19,0%. Signifikant höhere Implantations- (22,6%) und Schwangerschaftsraten (35,5%) wurden erreicht, wenn aus Vorkernstadien ausgewählt werden konnte und insbesondere, wenn die Auswahl aus Z1 Vorkernstadien getroffen werden konnte (IR 28,0%, SSR 41,3%). Dies verdeutlicht, dass die synchrone, polare Anordnung der Nucleoli an der Kontaktstelle der Vorkerne ein hohes Entwicklungspotential der Zelle und die Anzahl dieser Zellen in einem Zyklus eine signifikant höhere Chance zur Erzielung einer Schwangerschaft darstellte.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Tesarik und Greco (1999), Scott et al. (2000), Montag et al. (2001) und Zollner et al., (2002) konnten Salumets et al. (2001) das Z-Scoring nicht bestätigen, wobei das Scoringsystem etwas abweicht, indem in polarisierte Nucleoli in beiden (I), in einem (II) und in keinem (III) Vorkern unterschieden wurde. Die Gruppe III zeigte ebenso wie im Z-Scoring Z3 geringere Embryoscores, aber die Gruppe II (Bestandteil des Z3 Scores) war nicht unterschiedlich zur Gruppe I (Z1). Die geringe Zyklenzahl 105 und das unterschiedliche Scoringsystem könnten zu diesem Ergebnis geführt haben.

Neben dem Scoring der Vorkerne aufgrund der Verteilung der Nucleoli wurde in der vorliegenden Arbeit das Phänomen des Halos untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Mitochondrien und andere Zellorganellen handelt, die zu den Vorkernen transportiert werden (Van Blerkom et al., 2000). Das Erscheinungsbild des

Halos wird in der Literatur unterschiedlich bewertet und tritt bei 67,7 bis 88,7% (Salumets et al., 2001; Stalf et al., 2002; Ebner et al., 2003) der Vorkernstadien auf. In der vorliegenden Arbeit war der Anteil 79,0% und lag damit im Bereich der angegebenen Literatur.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das Phänomen des Halos häufiger bei Vorkernstadien mit einem Z1 Score auftrat, die Implantations- und Schwangerschaftsraten jedoch nicht beeinflusste. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Salumets et al. (2001) und im Gegensatz zu Ebner et al. (2003), der das Auftreten des Halos generell als positives Zeichen wertet. Zollner et al. (2002) differenzierten zwischen normalen Halos als positiven Einflussfaktor und konzentrischen oder extremen Halos als negativer Faktor. Die Beurteilung der Wertigkeit des Halos ist problematisch, da er in unterschiedlichen Erscheinungsformen auftritt und in der Literatur sehr unterschiedlich bewertet wird (kein Einfluss: Salumets et al. (2001); abhängig von der Erscheinungsform positiv oder negativ: Zollner et al. (2002); generell positiv Ebner et al. (2003)). Die vorliegende Arbeit zeigte durch die nicht unterschiedlichen Implantations- und Schwangerschaftsraten beim Auftreten oder Fehlen des Halos, dass die undifferenzierte Aussage „vorhanden oder nicht vorhanden“ keinen prognostischen Wert hatte.

Die Lage der Vorkerne in der Oozyte wurde in der Literatur meist nicht berücksichtigt. In der vorliegenden Arbeit befanden sich 92,5% der Vorkerne zentral in der Zelle. Nur 7,5% der Vorkernstadien zeigten randständige Vorkerne. Das relativ seltene Auftreten dieses Phänomens dürfte den Grund für die geringe Beachtung in der Literatur darstellen. In der Studie von Garello et al. (1999) wurde dieses Phänomen der randständigen Vorkerne mit ausbleibender oder verlangsamter Embryonalentwicklung in Zusammenhang gebracht. Es wurden aber nur 19 Vorkernstadien mit randständigen Vorkernen beurteilt und dies bei IVF und ICSI. In der vorliegenden Arbeit konnten bei 249 Vorkernstadien randständige Vorkerne beobachtet werden. Das Entwicklungspotential bezüglich des Z-Scores und der Embryonalentwicklung war bei diesen Zellen wie in der Studie von Garello et al. (1999) bis zum Tag2 geringer einzuschätzen (mehr Vorkernstadien mit einem Z3 oder Z4 Score und mehr Embryonen mit einem Score <10 am Tag2 als bei Vorkernstadien mit zentralen Vorkernen). Am Tag3 waren jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Embryonalentwicklung mehr zu erkennen. Das Eintreten von drei Schwangerschaften bei 5 Zyklen mit Embryonen, die nur aus Vorkernstadien mit randständigen Vorkernen entstanden waren, zeigte,

dass diese implantieren können und somit eine generell schlechte Prognose fraglich ist. Für eine Aussage sind mehr Zyklen nötig.

In der vorliegenden Arbeit war auf der Ebene der Vorkernstadien nur das Z-Scoring von signifikant prognostischem Wert in Bezug auf den Ausgang der Therapie. Dies bestätigte die Arbeiten von Wittemer et al. (2000), Montag et al. (2001) und Zollner et al. (2002).

4.4 Kombination von Scoringssystemen zur Verbesserung des Ausgangs der Kinderwunschtherapie

Die Anwendung der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation rekrutiert eine Vielzahl an Follikeln, wobei es sich nicht vermeiden lässt, dass auch solche heranreifen, die normalerweise atretisch geworden wären (Ebner et al., 2006). Die morphologische Beurteilung der Oozyte (wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt) gibt die Möglichkeit, das Entwicklungspotential abzuschätzen. Zyklen mit 2 Embryonen beim Transfer, von denen mindestens eine Oozyte höchstens eine Auffälligkeit aufwies, zeigten eine IR von 21,5% und SSR von 37,3%. Hatte jede Zelle mindestens zwei Defekte, fiel die IR auf 16,5% und die SSR auf 26,3%.

Nach erfolgter Injektion des Spermatozoons sollte es zur Initiation der Befruchtungskaskade und damit zur Initiation der Vorkernbildung kommen. Die Auswahl der Zellen auf dieser Ebene nach ihrem Z-Score zeigte bei den Zyklen mit zwei Embryonen beim Transfer, von denen mindestens einer aus einem Z1 Vorkernstadium entstanden war, eine IR von 25,0% und eine SSR von 37,3%. Im Vergleich zu Zyklen bei denen die Embryonen aus Z3-Vorkernstadien entstanden waren (IR 14,9% und SSR 27,3%), waren diese Werte signifikant höher. Der Vergleich des Oozyten- und Vorkernscorings zeigte aber keine signifikant höheren IR (23,6% zu 25,0%) und SSR (37,3% und 39,4%). Bei der Betrachtung der Zyklen mit zwei Embryonen beim Transfer, von denen mindestens eine Oozyte höchstens einen Defekt (positiv) und mindestens ein Z1 Vorkernstadium (positiv) aufwies, zeigte die Kombination beider Scoringssysteme mit einer IR von 26,8% und SSR von 42,4% von den Absolutwerten eine Steigerung der Schwangerschaftsrate. Dies war im Vergleich zu der separaten Betrachtung beider Scoringssysteme aber nicht signifikant. Die deutschen Bedingungen des Embryonenschutzgesetzes ermöglichen nur die Auswahl bis zur Ebene der Vorkernstadien. Hierbei zeigte sich, dass bei einem „positiven“ Oozyten- und

Vorkernscore die IR (26,8% zu 11,7%) und SSR (42,4% zu 18,3%) signifikant höher waren als wenn beide „negativ“ waren. Aus ethischen und aus Gründen der Zumutbarkeit für den Patienten war es nicht möglich, solche Zyklen in einer randomisierten Studie durchzuführen.

Die morphologischen Beurteilungen haben allgemeingültigen Charakter. Dies zeigte sich darin, dass die vorliegende Arbeit eine Multizenterstudie war, bei der unterschiedliche Personen mit unterschiedlichen Kulturbedingungen die Untersuchung durchgeführt hatten.

Die Schwangerschaftsraten waren aber deutlich geringer als in den Studien (Fisch et al., 2001 SSR 60%; Scott et al., 2000 SSR 57%), in denen dem Vorkernscoring eine Embryonenauswahl angeschlossen wurde. Die höheren Schwangerschaftsraten bei der kombinierten Auswahl der Zellen für den Transfer auf der Vorkern- und embryonalen Ebene gegenüber der Auswahl auf einer der Ebenen separat verdeutlicht die Arbeit von Nagy et al. (2003) (Schwangerschaftsrate: Auswahlkriterium Vorkernstadien 23,2%, Embryonen am Tag3 25,5%, Kombiniert Vorkernstadien + Embryonen am Tag3 39,2%).

Die Auswertung der Transfer mit zwei Embryonen mit einem Embryoscore >50 in der vorliegenden Arbeit verdeutlichte den Einfluss der Embryonenauswahl. Die IR (35,2%) und SSR (53,4%) waren signifikant höher als wenn die Auswahl auf der Oozyten oder Vorkernebene erfolgte. Zum kombinierten Oozyten und Vorkernscoring war aber nur noch eine Tendenz ($P=0,073$) erkennbar. Die höchsten Schwangerschaftsraten zeigten die Zyklen, bei denen auf der Oozytenebene mindestens eine Zelle höchstens einen Defekt und auf der Vorkernebene mindestens ein Z1 Vorkernstadium vorhanden waren und sich aus diesen Zellen Embryonen mit einem kumulativen Embryoscore > 50 entwickelten (IR 37,5%, SSR 57,7%).

Zu bedenken ist allerdings immer, dass die Auswahl der Zellen für den Transfer im Oozyten und Vorkernstadium getroffen wurde und daher keine Embryonenauswahl stattfinden konnte. Somit können keine Aussagen getroffen werden in Hinblick auf die eventuelle Embryonalentwicklung der überzähligen Zellen. Auch der Aspekt eines „early cleavage“ (zeitliche Beurteilung der ersten Zellteilung), der als „positives“ Entwicklungssignal der Zelle gewertet wird (Shoukir et al., 1997), konnte aus Gründen des EschG nicht mitberücksichtigt werden. De Placido et al. (2002) und Fisch et al. (2001) entwickelten einen kombinierten Score aus Z-Scoring, Embryoscore und Blastocystenkultur. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der vorliegenden Arbeit

(„positiver Score“: Placido et al. 2002, IR 12,5% und SSR 50,0%; Fisch et al. 2001, IR 39,0% und SSR 59,0%; vorliegende Arbeit IR 37,5% und SSR 57,7%).

Die Entwicklung der Oozyte bis zum Embryo ist ein fortlaufender Prozess, und jede morphologische Beurteilung zeigt nur den momentanen Entwicklungsstand der Zelle. Die steigenden Schwangerschaftsraten mit zunehmenden Informationen über die Zellen in der vorliegenden wie in den obigen Arbeiten lassen sich so erklären.

Die Embryonenauswahl ist ein Bestandteil zur detaillierten Beurteilung des Entwicklungspotentials der Zellen. Es existiert aber keine Arbeit, in der die kumulative Auswahl und Charakterisierung von der Oozyte bis zum Embryo basierend auf den Einzelstadien durchgeführt wurde. International ist die Embryonenauswahl die „dominierende“ Praxis (Michelmann, 2000). Der Vergleich der Schwangerschaftsraten in Europa zwischen den Ländern mit Embryonenauswahl (höchste SSR 37,1% Griechenland und geringste 10,2 Mazedonien) und ohne (Deutschland 28,2%) zeigte große Schwankungen aber Deutschland unterschied sich nicht erheblich von seinen Nachbarn (Nyboe Andersen et al., 2007) (z.B. Frankreich 26,5%; Deutschland 28,2%; England 30,3%). Ein Grund hierfür könnte sein, dass in den Nachbarländern die Auswahl der Zellen für den Embryotransfer nur auf der embryonalen Ebene vorgenommen wurde. So zeigt die vorliegende Arbeit mit der Auswahl der Zellen für den Transfer auf der Oozyten- und Vorkernebene mit einer IR von 18,4% und SSR von 32,2% höhere Werte als die meisten Länder in Europa. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind aber natürlich auch ein Faktor, der zu höheren IR und SSR führen kann.

4.5 Mehrlingsproblematik

Die von Nyboe Andersen et al. (2007) publizierte durchschnittliche Schwangerschaftsrate von nur 28,7% in Europa im Jahr 2003 zeigt, dass eine detaillierte Beurteilung der Zellen von der Oozyte bis zum Embryo nötig ist, um den Erfolg in der Kinderwunschtherapie zu optimieren. Die hohe Mehrlingsrate -in der vorliegenden Arbeit betrug sie 20,8% und in Deutschland nach ICSI im Jahr 2004 21,17% (DIR 2005))- zeigt jedoch die Dringlichkeit zur Reduzierung der Anzahl an zu transferierenden Embryonen hin zum „single embryo transfer“ (Van Royen et al., 1999; Vilska et al., 1999). Nach der Auswertung von Imaizumi (2003) stieg die Drillingsrate in Deutschland von 1972 bis 1999 um das 30 fache und die Zwillingsrate der dizygoten

Zwillinge um das 1,5 fache. Die Mehrlingsproblematik beinhaltet ein großes medizinisches Risiko für Mutter und Kind. Dieses spiegelt sich z.B. im Geburtsgewicht wider. Im Jahr 2005 betrug das durchschnittliche Geburtsgewicht nach der Durchführung der Kinderwunschtherapie mittels ICSI bei den Einlingen 3320g, bei den Zwillingen 2444g und bei den Drillingen 1700g (DIR 2005). Mehrlingsschwangerschaften sind zudem mit einem erhöhten Fehl- und Frühgeburten- und prä- und perinatalem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko verbunden im Vergleich zu Einlingsschwangerschaften.

Neben den schwerwiegenden medizinischen Risiken und Gefahren für das Kind dürfen auch die psychischen Belastungen für die Familie nicht vernachlässigt werden, die meistens als schwerwiegender empfunden werden als die körperlichen Belastungen (Robin et al. 1996). Auf beide Aspekte wurde in der Einleitung schon eingegangen. Zudem bedeutet eine Mehrlingsschwangerschaft für die Gesellschaft einen hohen Kostenaufwand. In der Arbeit von Fiddlers et al. (2006) wurden die Kosten der Durchführung eines Embryotransfers mit einem selektierten Embryo (elektiven single embryo transfer eSET) denen eines Transfers mit zwei selektierten Embryonen (DET) gegenübergestellt. Bei beiden Arten des Transfers wurden die zu transferierenden Zellen auf der embryonalen Ebene ausgewählt. Die Schwangerschaftsrate war bei dem DET zwar höher (39,6% gegenüber 20,8%), aber jede Schwangerschaft bedeutete auf Grund der erhöhten Mehrlingsrate einen finanziellen Mehraufwand bis vier Wochen nach Geburt von 19 096 Euro. Die Verlängerung der Untersuchungszeit nach der Geburt auf 6 Monate wie in der Studie von Kjellberg et al. (2006), lässt die zusätzlichen Kosten pro Geburt auf 71 940 Euro ansteigen. International konnte gezeigt werden, dass die Geburtenrate bei einem Patientenkollektiv mit „guter Schwangerschaftsprognose“ nicht signifikant unterschiedlich waren sofern zwei oder drei Embryonen transferiert wurden (Westergaard et al., 2000; Staessen et al., 1993). In Deutschland ist der Transfer von mehr als drei Embryonen untersagt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur zu 21% drei Embryonen transferiert, und dies erfolgte in den meisten Fällen bei Patienten mit einer „eingeschränkten Schwangerschaftsprognose“ (Patientin > 35 Jahre, und oder mehrere erfolglose Vorversuche, Befruchtungsrate<50% und „schlechte“ Zellqualität). Die Mehrlingsrate der Transferzyklen mit drei Embryonen betrug nur 11,5%. Beim Transfer von zwei Embryonen traten zu 22,8% Zwillinge auf. Die Reduzierung auf zwei Embryonen mit Auswahl auf der Oozyten- und Vorkernstadienebene zeigte ohne Embryonenauswahl

eine Schwangerschaftsrate von 33,9%. Es darf nicht vernachlässigt werden, dass auch Zwillingsgeburten im Vergleich mit Einlingsgeburten mit einer erhöhten Frühgeburtlichkeit und einem geringeren Geburtsgewicht (DIR 2005) verbunden sind. Ronalds et al. (2005) konnten zudem zeigen, dass das kognitive Verhalten sich bei Einlingen und Zwillingen unterschied. Der mittlere IQ lag bei Zwillingen im Alter von 7 Jahren um 5,3 Punkte niedriger als bei Einlingen. Es ist fraglich, ob eine weitere Reduzierung auf einen Embryo unter den deutschen Bedingungen ohne Embryonenauswahl eine so hohe Erfolgsaussicht ermöglicht. Die Transferzyklen, bei denen lediglich eine Oozyte sich zu einem Embryo entwickelte, erreichten nur eine Schwangerschaftsrate von 16,7%. Dies entspricht in etwa den Daten aus dem DIR 2005 mit 12,0%. Es ist zu bedenken, dass es sich in der vorliegenden Arbeit bei den Transfers mit nur einem Embryo um keine „elektiven single embryo transfers“ handelte, sondern aus Gründen der Verfügbarkeit nicht mehr Embryonen transferiert werden konnten. Die Patientinnen dieser Transferzyklen mit einem Embryo waren signifikant ältere und die Zyklen zeigten eine signifikant geringere Befruchtungsrate und somit eine schlechtere Schwangerschaftsprognose als Transferzyklen mit zwei Embryonen.

Die Betrachtung der Zwillings- im Vergleich zu den Einlingsgeburten, zeigte keine signifikanten Unterschiede im Alter der Frau, der Anzahl an Vorversuchen, der Befruchtungsrate und der Oozyten-, Vorkernstadien- und Embryonenqualität. Es ist aber fraglich, ob durch die Reduzierung auf einen Embryo die Anzahl an Zyklen mit einem geringen Embryoscore nicht ansteigen würden. International konnten in Studien Schwangerschaftsraten zwischen 32,4% und 65,4% bei selektiertem Patientenkollektiv und Embryoselektion beim Transfer von einem Embryo erreicht werden (Martikainen et al., 2001; Neubourg et al., 2002). Hohe Schwangerschafts- bei geringen Mehrlingsraten sind aber nur mit einer kombinierten Auswahl auf der Oozyten-, Vorkern- und Embryonenebene möglich. Es ist sehr fraglich, ob ohne Embryonenauswahl die Schwangerschaftsraten nicht deutlich verringert wären und ob die Patienten dieses Risiko eingehen würden. Insbesondere die hohe finanzielle Eigenbeteiligung lässt die Patienten eher ein Mehrlingsrisiko eingehen als die Gefahr, keine Schwangerschaft zu erzielen. Dieser Aspekt macht auch die Durchführung einer Studie mit Reduzierung der Anzahl an zu transferierenden Embryonen auf einen Embryo bei guter „Schwangerschaftsprognose“ des Zyklus ohne Embryonenauswahl fraglich.

4.6 Charakteristika der Zellen, die zu einer Geburt führten

Die Zyklen, in denen alle transferierten Embryonen implantierten, wurden bezüglich der Morphologie der Oozyten und der Vorkernstadien untersucht.

Auf der Oozytenebene zeigte sich, dass Oozyten mit einer auffälligen Form signifikant seltener ($P=0,05$) zur Implantation kamen als alle anderen Zellen. Zytoplasmatische und extrazytoplasmatische Auffälligkeiten (ausgenommen die Form) waren gleich häufig bei den implantierten Embryonen verzeichnet. Die Kugel als Form ermöglicht eine optimale große Kontaktfläche zwischen den einzelnen Blastomeren. Dies kann als Erklärung für eine häufigere Implantation kugeliger Zellen im Vergleich zu Zellen mit auffälliger deformierter Form herangezogen werden (Harderson et al. 2001). Es ist aber zu bedenken, dass die Anzahl an Embryonen, die einer Geburt eindeutig zugeordnet werden konnten, relativ gering (61) war. Auf der Vorkernebene implantierten die Vorkernstadien mit einem Z1 oder Z2 Score signifikant ($P<0,05$) häufiger als die mit einem Z3 Score. Dies deutet darauf hin, dass das Z-Scoring eine aussagekräftigere Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit der Zelle darstellt als das Oozytenscoring. Das Embryoscoring zeigte mit einem P-Wert von $P<0,001$ signifikant mehr Embryonen, die implantierten, wenn der Embryoscore des Transfers >25 war. Es ist anzunehmen, dass mit fortlaufender Entwicklung der Zelle die Aussagekraft bezüglich ihres Entwicklungspotentials zunimmt. Die genaueste Charakterisierung des Potentials der Zelle war aber in einer kombinierten Beurteilung (absolut höchste Schwangerschaftsrate in der Studie 57,7% sowie in der Literatur De Placido et al., 2002 und Fisch et al., 2001) der Entwicklung von der Oozyte zum Embryo zu erkennen.

4.7 Charakteristika der Zellen, die eventuell an einem Abort beteiligt waren

Im Gegensatz zu den Geburten, bei denen eine Zelle direkt einer Geburt zugeordnet werden konnte, konnte bei den Aborten nur untersucht werden, welche Zellen am Transfer und damit eventuell am Abort beteiligt waren.

Es zeigten sich lediglich mehr Aborte, wenn die Oozyten Defekte bezüglich des Zytoplasmas aufwiesen oder Vakuolen vorhanden waren. Alle anderen morphologischen Beurteilungen des Oozyten-, wie des Vorkernscorings zeigten keine Unterschiede. Auch der Embryoscore konnte keine Aussage machen über die Wahrscheinlichkeit, ob eine Schwangerschaft zu einem Abort führt oder nicht.

5 Zusammenfassung

Diese Multizenterstudie umfasst 564 stimulierte Zyklen mit In-vitro Fertilisation mittels sog. „intracytoplasmatischer Spermatozoeninjektion“ (ICSI), bei denen 5676 Oozyten gewonnen wurden. Sie ist die erste Arbeit, die die morphologischen Kriterien der Gameten und Vorkernstadien einzeln und kombiniert herausarbeitet, um so die Zellen mit dem höchsten Entwicklungspotential zur Erzielung einer Schwangerschaft auszuwählen. Aufgrund des Embryonenschutzgesetzes ist die Auswahl auf der Ebene der Embryonen in Deutschland verboten.

Auf der paternalen Ebene zeigten die klassischen Spermatozoenparameter Zelldichte, Morphologie und Motilität keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Schwangerschaftsraten, wobei eine Spermatozoenanzahl von < 50 bewegliche Spermatozoen nach Aufbereitung oder keine motilen Spermatozoen als Ausschlusskriterium fungierte.

Auf der maternalen Ebene wurde eine lichtmikroskopische, morphologische Beurteilung der zytoplasmatischen und extrazytoplasmatischen Faktoren durchgeführt. Auffälligkeiten des Zytoplasmas, des perivitellinen Spaltes, der Form der Oozyte, der Beschaffenheit der Zona pellucida und das Auftretens von Einschlusskörpern oder Vakuolen zeigten eine signifikante schlechtere Befruchtungsrates sowie eine deutliche Verschlechterung der Weiterentwicklung der Zelle. Der erste Polkörper hatte keinen Einfluss auf die Befruchtungsrates. Die Auffälligkeiten –jede einzeln für sich betrachtet– hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Schwangerschaftsrates. Die Betrachtung der Schwangerschaftsrates in Abhängigkeit von der Anzahl an Auffälligkeiten der Oozyten, zeigte in der vorliegenden Arbeit aber einen Unterschied. Je weniger Auffälligkeiten eine Oozyte aufwies, desto höher war die Befruchtungsrates, die Anzahl an Vorkernstadien mit einem Z1-Score und der Embryoscore. Oozyten mit höchstens einer Auffälligkeit zeigten mit 37,3% eine signifikant höhere Schwangerschaftsrates gegenüber solchen mit mehr als einer Auffälligkeit (26,5%). Die Anzahl an Auffälligkeiten bei der Oozyte spiegelte sich nicht in der Anzahl an Aborten wider.

Auf der Ebene der Vorkernstadien zeigte die Anzahl und Verteilung der Nucleoli in den Vorkernen das Entwicklungspotential der Zelle an. Gleich große, aneinander angelagerte Vorkerne mit symmetrisch angeordneten Nucleoli an der Äquatorialplatte der Zelle (Z1) zeigten die meisten Embryonen mit einem hohen Embryoscore und der höchsten Schwangerschaftsrates. Diese Z1 sowie Z2-Vorkernstadien (gleiche Anzahl

und Größe aber nicht polarisierte Nucleoli) konnten signifikant häufiger einem implantierten Embryo zugeordnet werden, als Vorkernstadien in denen die Vorkerne verschiedene Anzahl und oder nicht polarisierte Nucleoli (Z3) aufwiesen. Ein Zusammenhang des Vorkernscores zu möglicherweise an einem Abort beteiligten Zellen, konnte nicht gesehen werden.

Die Vorkerne befanden sich in 92,5% der Vorkernstadien zentral in der Zelle. Das Auftreten von randständigen Vorkernen (7,5% der Zellen) korrelierte mit einem schlechteren Z-Score (weniger Z1 und mehr Z4) und einer verzögerten Embryonalentwicklung am Tag2, führte aber auch zu Schwangerschaften. Für genauere Aussagen sind größere Fallzahlen erforderlich.

Ein positives Signal des Halos, konnte die vorliegende Arbeit nur in Bezug auf die Vorkernstadien zeigen. Die Embryoqualität und die resultierenden Schwangerschaften wurden vom Halo nicht beeinflusst.

Die Auswahl von Oozyten mit höchstens einer Auffälligkeit, ebenso wie Vorkernstadien mit einem Z1-Score separat betrachtet, zeigten signifikant bessere Schwangerschaftsraten mit 34,0% und 37,3% im Vergleich zu Oozyten mit mehr als einem Defekt (26,5%) oder einem Z3-Score (25,4%). Beide Scoringsysteme waren im gleichen Maße aussagekräftig. Sofern das Oozytenscoring mit Zellen mit höchstens einer Auffälligkeit kombiniert wurde mit dem Z-Scoring mit Zellen, die einen Z1-Score aufwiesen, konnte eine absolute Schwangerschaftsrate von 42,4% erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem der Embryoscore dokumentiert, auch wenn in Deutschland auf dieser Ebene keine Auswahl stattfinden darf. Die Transfers mit einem kumulativen Embryoscore >50 zeigten eine Schwangerschaftsrate von 53,4%, die höher war, als die bei der Auswahl auf der Oozyten und/oder Vorkernebene. Die höchste Schwangerschaftsrate mit 57,7% wurde registriert, wenn auf allen drei Auswahlebenen eine „positive“ Beurteilung festgestellt wurde. Eine detaillierte Charakterisierung der Zelle von der Oozyte bis zum Embryo sollte die Reduzierung der zu transferierenden Embryonen zum „single embryo transfer“ bei hohen Schwangerschaftsraten ermöglichen.

Die Embryonenauswahl ist zur Zeit in Deutschland jedoch verboten, aber eine Kombination dieses Verfahrens mit der Oozyten- und Vorkernbeurteilung sollte es in Zukunft ermöglichen, das Entwicklungspotential der Zellen zu charakterisieren und den Patienten eine optimale Therapie mit möglichst geringen Mehrlingsraten zukommen zu lassen.

6 Literaturverzeichnis

Angel J, Kalter C, Morales W, Rasmussen C, Caron L. Aggressive perinatal care for high-order multiple gestations: Does good perinatal outcome justify aggressive assisted reproductive techniques? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; 181: 253-259

Austin C. Anomalies of fertilization leading to triploidy. *J. Cell Comp. Physiol.* 1960; 56: 1-15

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercanv R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 3431-3433

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artiz S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil. Steril.* 2003; 80: 1413-1419

Beier H. Die molekulare Biologie der Befruchtungskaskade und der beginnenden Embryonalentwicklung. *Ann. Anat.* 1992; 174: 491-508

Benninghaus H. Deskriptive Statistik. Teubner Studienskripten, 8.Aufl, Stuttgart, Leipzig 1998;

Berger M, Bindt C, Ohlsen K. Elternschaft und Kindesentwicklung nach durch IVF erfülltem Kinderwunsch. Abschlussbericht für das Bundesministerium für Bildung, Forschung, Wissenschaft und Technologie, Bonn 1997

Berkow R, Beers M, Fletcher A. Handbuch Gesundheit. Mosaik Verlag München 1999; 681-682

Borini A, Lagalla C, Sciajno R, Distratis V, Bonu MA, Cattoli M, Coticchio G. Artificial reproductive technology achievements for optimizing embryo quality. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1034: 252-261

Bourgain C, Smitz J, Devroey P. Meta-analysis on luteal support. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 656

Brähler E, Stöbel-Richter Y, Huinink J, Glander H. Zur Epidemiologie gewollter und ungewollter Kinderlosigkeit in Ost- und Westdeutschland. *Reproduktionsmedizin* 2001; 17: 157-162

Bucher O, Wartenberg H. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 11 Aufl. Huber, Bern 1989; 520-531

Ciotti P, Notarangelo R, Morselli-Labate A, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 2334-2339

Clauß G, Finze F R, Partzsch L. Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner. 3. Aufl. Harri Deutsch Verlag, Thun, Frankfurt am Main

Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. Artificial reproductive technology achievements for optimizing embryo quality. Ann. N. Y. Acad. Sci. Dec 2004; 1034: 252-261

Dandekar P, Aggeler J, Talbot P. Structure distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. Hum. Reprod. 1992; 7: 391-398

Dandekar P and Talbot P. Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. Mol. Reprod Dev. 1992; 31: 135-143

Daya S. Optimal protocol for gonadotropin releasing hormone agonist use in ovarian stimulation. Abstract book 10 th world congress on in vitro fertilisation and assisted reproduction Vancouver, Canada, 1997; 24.05-28.05, 405-410

De Santis L, Cino I, Rabellotti, Calzi F, Persico P, Borini A, Coticchio G. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. Reprod. BioMed. Online 2005; 11: 36-42

De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod. 1996; 11: 595-597

Devreker F. Uptake and release of glucose, pyruvate and lactate, non-invasive embryo quality assessment. Eshre Campus 2005; 77-91

Diedrich K, Al Hasani S, van der Ven H, Diedrich C, Krebs D. In vitro Fertilisation und Embryotransfer. In Diedrich K, ed. Neue Wege in Diagnostik und Therapie der Sterilität. Stuttgart: Enke, 1990; 169-195

DIR Deutsches IVF Register: Jahrbuch 2005, Deutsche Gesellschaft für Gyn. und Geburtshilfe 2005

Ditz S. Sterilität, in Neises M., Dietz S.: Psychosomatische Grundversorgung in der Frauenheilkunde. Thieme, Stuttgart, New York 2000; 104-114

Duncan W, Glew M, Wang X, Prediction of in-vitro fertilization rates from semen variables. Fertil. Steril. 1993; 59: 1233-1238

Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increase rates of implantation and pregnancy. Fertil. Steril. 1999; 72: 599-603

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rates and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod. 2000; 15: 427-430

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 2415-2418

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development. *Hum. Reprod. Update* 2003a; 9: 251-262

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 2406-2412

Ebner T, Moser M, Tews G. Die Bedeutung der Morphologie der Oozyte hinsichtlich ihres weiteren Entwicklungspotentials. *J. für Reprod. und Endokrinologie* 2006; 1: 17-23

Ebner T. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *RBM Online* 2006; 12: 5007-512

Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 2343-2349

Eliasson R, Helinga F, Lübcke F, Meyhöfer W, Niermann H, Steeno O, Schirren C. Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia* 1970; 2; 1257

Ericson GF, Magolfin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen production cells. A review of structur/function relationships. *Endocr. Rev.* 1985; 6:371

Fedorcsak P, Dale P, Storeng R, Ertzeid G, Bjercke S, Oldereid N, Omland A, Abyholm T, Tanbo T. Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 2523-2528

Felberbaum R. Cetrorelix in controlled ovarian stimulation for ART. Results of phase III, multiple dose treatment. *Gynecol. Endocrinol.* 1999; 13: 14

Fiddelers A, van Montfoort A, Dirksen CD, Dumoulin JC, Land J, Dunselman G, Janssen JM, Severens J, Evers J. Single versus double embryo transfer: cost-effectiveness analysis alongside a randomized clinical trial. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2090-2097

Fisch J, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The graduated embryo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 1970-1975

Gamiz P, Rubio C, Jose de los Santos M, Mercader A, Simon C, Remohi J, Pellicer A. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 2413-2419

Gardner D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft W.: Culture and transfer of human blastocysts increase implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. *Fertil. Steril.* 1998; 69: 84-88

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: 2588-2595

Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2581-2587

Grow D, Oehninger S, Seltman H. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil. Steril.* 1994; 62: 559-567

Goessens G. Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.* 1984; 87: 107-158

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: 313-318

Hardarson T, Lofman C, Coull G, Sjogren A, Hamberger L, Edwards R. Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod Biomed Online* 2002; 5: 36-38

Harris J, Hibler D, Fontenot G, Hsu K, Yurewics EC; Sacco AG. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq* 1994; 4: 361-393

Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 3425-3430

Herrler A and Beier H. Die Beurteilung der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung bei der assistierten Reproduktion. *Reproduktionsmedizin* 1998; 14: 131-142

Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, Osteen KG, Wentz AC. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil. Steril.* 1989; 52: 801-806

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 999-1005

- Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78: 615-625
- Imaizumi Y. A comparative study of zygotic twinning and triplet rates in eight countries, 1972-1999. *J. Biosoc. Sci.* 2003; 35: 287-302
- Kailasam C, Keay S, Wilson P, Ford W, Jenkins J. Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 1544-1547
- Kahraman S, Yain K, Dönmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2390-2393
- Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 3193-3200
- Karck U. GnRH und seine Analoga. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mb, Stuttgart 1996
- Kaufmann G, Malone F, Hravey-Wilkes K, Chelmov D, Penzias A, Dalton M. Neonatal morbidity associated with triple pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1998; 91: 342-348
- Kentenich H, Sabri O, Schmiady H, Schönegg W, Stauber M. Lohnt es sich kleinere Follikel zu punktieren? Zur Abhängigkeit von Follikelgröße und Teilungsrate. *Kongreßbericht Bonn 1987*; 270-275
- Kjellberg T, Carlsson P, Bergh C. Randomized single versus double embryo transfer: obstetric and paediatric outcome and a cost-effectiveness analysis. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 210-216
- Klein J, Sauer MV. Assessing fertility in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185: 758-770
- Kruger T, Acosta A, Simmons K, Swanson R, Matta J, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization *Fertil. Steril.* 1988; 49: 112-117
- Leese HJ, Hoopr M, Edwards RG, Ashwood-Smith M. Uptake of pyruvate by early human embryos determined by a non-invasive technique. *Hum. Reprod.* 1986; 1: 181-182
- Loret De Mola J, Garside W, Bucci J, Tureck R, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture :correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1997; 14: 0332-336
- Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 1999; 72: 240-244

Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schroder AK, Loning M, Weiss JM, Diedrich K. Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients needs in ovarian stimulation for IVF: results of a prospective, randomized study. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 2842-2845

Ludwig M, Doody KJ, Doody KM. Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril* 2003; 79: 1051-1059

Macnamee MC, Howles CM, Edwards R, Tayler P, Elder K. Short term luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment:prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in-vitro-fertilization. *Fertil Steril* 1989; 52: 264

Mariano C and Hickey R. Multiple pregnancy, multiple needs. *Can. Nurs.* 1998; 2 : 26-30

Martikainen H, Tiitinen A, Tomas C, Tapanainen J, Orava M, Tuomivaara L, Vilks S, Hyden-Granskog C, Hovatta O. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 1900-1903

Melden D. Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertil Steril* 1993; 5: 1-5

Menkveld R, Stander F, Kotze T, Kruger T, Van Zyl J. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria *Hum Reprod.* 1990; 5: 586-592

Michelmann H. Der programmierte Misserfolg. *Reproduktionsmedizin* 2000; 16:181-182

Miller J and Smith T. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum. Reprod.* 2001; 5: 918-924

Montag M und Baukloh V. Verbessert „Assisted Hatching“ die Schwangerschaftsrate? *Reproduktionsmedizin* 1998; 14: 327-329

Montag M and van der Ven H. on behalf of the German Pronuclear Morphology Study Group : Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum. Reprod.* 2001; 11: 2384-2389

Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology.* Oxford University Press 1994; 393

Munne´ S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod. Update* 1998; 4: 842-855

Munne´ S, Sandalinas M, Escudero T, rquezC, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos:evidence of a maternal age effect. *Reproductive Biomedicine Online* 2002; 4: 223-232

Nagy Z, Liu J, Joris H, Verheye G, Tournaye H, Camus M, Derde M-P, Devroey P, Van Steirteghem A. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 1123-1129

Nagy Z, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H, Van Sterteghem A. 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: 1606-1612

Nagy Z, Dozortsev D, Diamond M, Rienz L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. 2003; 80: 67-74

Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Ryckaert G, Valkenburg M, Barudy-Vasquez J, Gerris J. Impact of patients' choice for single embryo transfer of a top quality embryo versus double embryo transfer in the first IVF/ICSI cycle. 2002; 17: 2621-2625

Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi O. Embryonic soluble HLA-G as a marker of development potential in embryos. *Hum. Reprod.* 2005; 20: 138-146

Nyboe Andersen A, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, d Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 1513-1525

Oehninger S, Veeck L, Lanzendorf S, Maloney M, Toner J, Muasher S. Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 977-981

Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire JC; Alvarez S, Moreau L, Nicollet B, Zorn JR, Bouchard P, Frydman R. Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetorelix) or a depot formula of a LH-RH agonist (triptorelin). *Fertil. Steril.* 2000; 73: 314-320

Olivennes F, Franchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum. Reprod. Update* 2002; 8: 279-290

Ortiz M, Lucero P, Croxtto H. Postovulatory aging of human ova: II spontaneous division of the first polar body. *Gamete Res.* 1983; 7: 269-276

Out Hj; Mannaerts BM. The gonadotrohin-releasing hormone antagonist ganirelix-history and introductory data. *Hum. Fertil.* 2002; 5: G5-10, discussion G10-2, G41-8

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18

Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. Effect of follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil. Steril.* 2004; 81: 973-976

Plachot M. Fertilization. *Hum. Reprod.* 2000; Suppl.4, 15: 19-30

Plachot M, Selva J, Wolf JP, Bastit P, de Mouzon J. Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2002; 10: 772-779

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Mathews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-laps video cinematography. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 532-541

Robin M, Corroyer D, Casati I. Childcare patterns of mothers of twins during the first year. *J. Child. Psychol. Psych.* 1996;17: 453-460

Roest J, Mous HVH, Van Heusden A, Verhoeff A, Mous HV, Zeilmaker G. A triplet pregnancy after in-vitro fertilization is a procedure- related complication that should be prevented by replacement of two embryos only. *Fertil. Steril.* 1997; 67: 290-295

Ronald G, De Stavola B, Leon D. The cognitive cost of being a twin: evidence from comparisons within families in the Aberdeen children of the 1950s cohort study. *BMJ* 2005, doi:10.1136/bmj.38633.594387.3°

Roudebush W, Winger J, Toledo A, Kort H, Massey H. Embryonic platelet-activating factor: an indicator of embryo viability. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 163

Sadler Thomas *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1998; 12-17

Sadler Thomas *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1998; 12-17

Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari A, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 2177-2181

Sancken U, Burfeind P, Engel W. Die Bedeutung des mütterlichen Alters für die Entstehung von numerischen Chromosomenaberrationen. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 2005; 2: 109-114

Sathanathan H. Ultrastructure of the human egg. *Hum. Cell.* 1997; 10: 21-38

Schirren C. *Unerfüllter Kinderwunsch – Leitfaden Reproduktionsmedizin für die Praxis*. 3. Aufl., Deutscher Ärzte-Verlag Köln 2003

Scott L and Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1003-1013

Scott L, Alvero R, Leondiris M, Miler B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2394-2403

Selam B, Lembert A, Stone J. Pregnancy complications and neonatal outcomes in multiple pregnancy reduced to twins compared with nonreduced twin pregnancies. *Am. J. Perinatolog.* 1999; 16: 65-71

Serhal P, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 1267-1270

Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum. Reprod.* 2005; 20: 1596-1606

Sher G, Keskinetepe L, Nouriani M, Roussev R, Batzofin J. Expression of a sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-H embryos: a potentially valuable indicator of embryo competency and IVF outcome. *Reprod. Biomed Online* 2004; 9: 74-78

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: 1531-1536

Staessen C, Janssenswillen C, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem AC. Avoidance of triplet pregnancies by elective transfer of two good quality embryos. *Hum. Reprod.* 1993; 8: 1650-1653

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: 355-362

Stanger J und Yovich J. Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinising hormone levels during follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985; 92: 385-393

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2000

Stauber M. Kinderwunsch, Fertilität und Sterilität. In Stauber et al., *Psychosomatische Geburtshilfe und Gynäkologie*. 1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1999

Steer C, Mills C, Tan S, Campbell S, Edwards R. 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: 117-119.

Sundström P, Nilsson BO. Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycles is asynchronous. *Hum. Reprod.* 1988; 3: 613-619

- Svalander P, Jakobsson A, Forsberg A, Bengtsson A, Wikland M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to "strict criteria" sperm morphology. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1019-1022
- Tan S, Royston P, Cambell S. Cumulative conception and live birth rates after in-vitro fertilization. *Lancet* 1992; 339: 1390-1394
- Tesarik J, Kopecny V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res.* 1989; 24: 135-149
- Tesarik J and Kopecny, V. Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with early RNA synthetic activity. *Exp. Cell. Res.* 1990; 191: 153-156
- Tesarik J, Junca A, Hazout A, Aubriot F, Nathan C, Cohen-Bacrie, 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: 1396-1399
- Thurin A, Hardarson T, Hausken J, Jablonowska B, Lundin K, Pinborg A, Bergh C. Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients. *Hum. Reprod.* 2005; 20: 1876-1880
- Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organisation in meiotically mature human oocytes after exogeneous ovarian hyperstimulation. *J. Of Electron Microscopical Technologies* 1990; 16: 324-346
- Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 1047-1055
- Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte development competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1998; 15: 226-234
- Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2621-2633
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2345-2349
- Van Steirteghem A, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde M, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod.* 1993a; 8, 1055-1060

Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1993b; 8: 1061-1066

Veeck L. Oocyte assessment and biological performance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988; 541: 259-274

Veeck L. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol.2 Williams&Wilkins, Baltimore 1991;

Veeck L. An Atlas of human Gametes and Conceptuses. Parthenon Publishing, Casterton Hall, Carnforth 1999

Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, Kuliev A. Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod. Biomed. Online* 2003; 7: 336-341

Vilksa S, Tiitinen A, Hyden-Granskog C, Hovatta O. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2392-2395

Weigel M, Neumann G, Keck C, Geisthövel F, Rabe T. Empfehlung zu Infektionsrisiken bei Verfahren der assistierten Reproduktion. *Frauenarzt* 2002; 43: 87-94

Wert S, Larsen W. Meiotic resumption and gap junction modulation in the cultured rat cumulus-oocyte complex. *Gamete Res.* 1989; 22: 143-162

Westergaard HB, Johansen AM, Erb K, Andersen AN. Danish national IVF registry 1994 and 1995. Treatment, pregnancy outcome and complications during pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2000; 79: 384-389

WHO Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1999; 4 Auflage

Wildt L. Die endokrine Kontrolle der Ovarialfunktion und die Pathophysiologie endokriner Ovarialfunktionsstörungen. In Diedrich K, ed. *Neue Wege in Diagnostik und Therapie der Sterilität.* Stuttgart: Enke, 1990; 1-25

Wittmer C, Bettahar-Lebuge K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2591-2597

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 1750-1755

Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, Nyboe Andersen A, Selleskog U, Nielsen D, Grondahl C, Kim H, Arce J. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 2575-2581

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: 1327-1333

7 Eigene Vorträge und Mitarbeit für Publikationen zur Thematik der Beurteilung der Qualität von Oozyten und Vorkernstadien

Publikationen:

Greuner M. Blastozysten Kultivierung und Blastozysten Transfer; Bericht von der 15. ESHRE-Tagung vom 26.-30. Juni 1999 in Tours (Frankreich). Reproduktionsmedizin 1999; 15: 307-308

Mitarbeit an der deutschen Multizenterstudie zur Vorkernbeurteilung, die zu folgender Publikation führte:

Montag M and van der Ven H. on behalf of the German Pronuclear Morphology Study Group : Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. Hum. Reprod. 2001; 11: 2384-2389

Vorträge:

Greuner M. PN-Scoring. XII. Deutschen IVF-Laborleitertreffen der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe Abteilung Reproduktionsmedizin am Klinikum an der CAU zu Kiel. 05.2000

Greuner M. PN-Scoring. Regionales Arbeitstreffen der AGRBM in Karlsruhe. 06.2002

Greuner M. Erfahrungsbericht zur Vorkernbeurteilung. Fortbildungsveranstaltung „Zellbiologie“ der AGRBM in Jena 02.2003

Greuner M. Von der Eizelle zum Vorkernstadium, prognostischer Wert morphologischer Kriterien. 4. Symposium für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin XVII. Jahrestreffen der Deutschen IVF-Zentren. Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Zentralklinikum. 11.2003

Hoppe I. und Greuner M. Scoringsysteme bis zum Embryo-Transfer (Gameten, PN-Stadien, Embryonen). Leitung der Diskussionsrunde beim Praxisseminar Reproduktionsbiologie der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen im IVF-Zentrum Ulm. 04.2005

aufgeführt in: Hoppe I, Baukloh V, Montag M, Weiss D. Praxisseminar Reproduktionsbiologie 22.-24.04.2005 in Ulm. Hoppe I und Greuner M. Scoringsysteme bis zum Embryo-Transfer (Gameten, PN-Stadien, Embryonen). J Reproduktionsmed. Endokrinol. 2005; 2, 115-116

Greuner M. Morphologische Prognosefaktoren für den Eintritt einer Schwangerschaft nach IVF oder ICSI. Fortbildungsveranstaltung ART-PMA Kinderwunschbehandlung 2005 Ärztekammer des Saarlandes in Perl-Nennig. 06.2005

Greuner M. Entwicklungspotentiale von der Gamete bis zum Embryo. Bericht aus der Promotionsarbeit: „Untersuchung morphologischer Kriterien der Gameten und Vorkernstadien zur Erzielung einer Schwangerschaft“ Fortbildung für alle an der Reproduktionsmedizin interessierten Kollegen. Charite´ Campus Mitte, Innere Medizin, Sauerbruchweg 1, Berlin

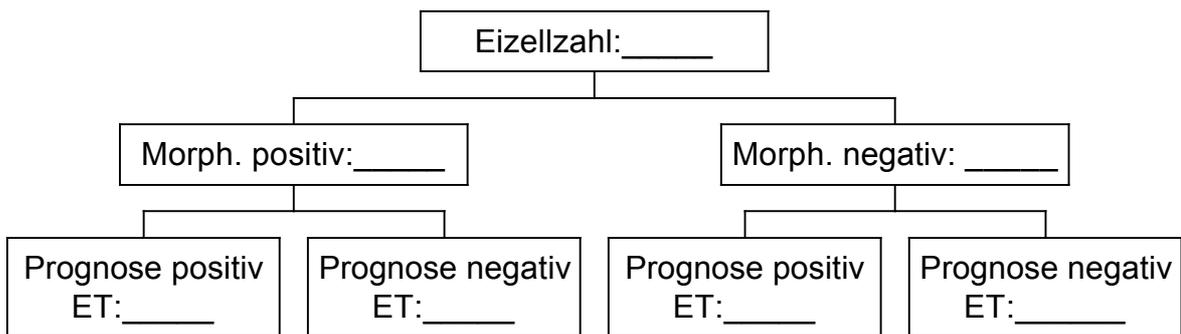
8 Anhang

1. Meldebogen
2. Tabelle A: Einfluss des Alters, des Body Mass Index und die Anzahl Vorversuche der Frau sowie die Befruchtungsrate und Anzahl M II Oozyten auf die Implantationsrate
3. Tabelle B: Auswertung des Alters und der Anzahl an Vorversuche der Frau sowie der Anzahl M II Oozyten und die Befruchtungs- und Implantationsrate in Abhängigkeit vom Embryoscore am Tag2 und Tag3
4. Tabelle C: Auswertung des Einflusses der klassischen Spermatozoenparameter Zelldichte, Morphologie und Motilität auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate sowie die Erfassung der Parameter Alter der Frau und des Mannes, Anzahl an Vorversuchen, Anzahl transferierter Embryonen und die Befruchtungsrate in Abhängigkeit von den Spermatozoenparametern

Information des Starts einer Patientin zur Erreichung einer Prospektivität der Studie

Zentrum ID :	
Patienten ID :	
Datum:	

Eizell / Vorkernbeurteilung



Erläuterung des Meldebogens:

Eizellzahl: Anzahl an gewonnenen M II-Oozyten

Die weiteren Angaben betreffen die weiterkultivierten Zellen:

Morph. positiv: Beurteilung der Oocyte als „normal“ (Dünne unauffällige Zona pellucida, unauffälliger perivitelliner Spalt, homogenes Zytoplasma ohne Vakuolen oder Einschlusskörper kugelförmige Zelle mit ovalem Polkörper)

Morph. Negativ: Oocyte mit Abweichungen von der als „normal“ definierten Form

Prognose positiv ET: Weiterkultiviertes Vorkernstadium mit Z1 oder Z2 Score

Prognose negativ ET: Weiterkultiviertes Vorkernstadium mit Z3 oder Z4 Score

Tab. A: Einfluss des Alters, des Body Mass Index (BMI) und die Anzahl Vorversuche der Frau sowie die Befruchtungsrate (Befr.rate) und Anzahl M II Oozyten auf die Implantationsrate (IR) beim Transfer von zwei oder drei Embryonen. Erfasst wurde der durchschnittlichen Parameter (Alter der Frau, Anzahl an Vorversuchen (Vorver.), BMI, M II Oozyten, Anzahl transferierter Embryonen (ET Emb.), Befruchtungsrate (Befr.rate)) für jede einzelne ausgewerteten Gruppe. Nur wenn signifikante Unterschiede auftraten, wurden diese angegeben. Die Signifikanzen zur Implantationsrate wurden im Ergebnisteil angegeben.

	Zyklen (n)	Alter der Frau	Vorver.	BMI	MII Oozyten	ET Emb.	Befr.-rate	IR (%)
Alter der Frau								
<31	177		0,7 ^a	23,2	9,5 ^c	2,16 ^{d,e}	70,9	21,7
31-35	226		0,8	22,5	8,8	2,2	72,8	18,1
36-40	117		0,8	22,7	7,3	2,25 ^e	70,4	17,1 ^j
>40	12		1,6 ^a	21,1	6,0 ^c	2,5 ^d	77,5	3,3 ^j
BMI								
< 20	95	32,6	0,87		9,5	2,2	72	15,8
20-25	321	32,6	0,79		8,4	2,2	71	19,2
>25	116	31,4	0,67		8,8	2,2	73,7	19,5
Vorversuchen								
0	264	31,9		22,9	8,6	2,1 ^f	73,5	23,2
1	159	32,4		23,0	9,1	2,3 ^{f,g}	71,2	17,9 ^k
2	81	33,9		22,0	8,0	2,4 ^{g,h}	68,9	10,8 ^k
3	28	32,4		22,1	9,4	2,6 ^h	67	9,5
Befr.srate								
<50	56	32,6	1,1 ^b	23,3	9,1	2,3		8,5 ^l
50-69,9	180	32,1	0,77 ^b	22,4	8,6	2,2		16,0 ^{l,m}
70-79,9	98	32,6	0,77	22,5	10,4	2,1		21,9 ^m
≥80	198	32,5	0,7	23,1	7,7	2,2		22,6
MII Oozyten								
<6	115	33,8	0,71	23,0		2,1	80,7 ⁱ	18,8
6-10	258	32,3	0,81	22,8		2,3	69,4 ⁱ	17,2
>10	158	31,3	0,77	22,5		2,2	69,7	20,6

^{a,b,c,d,h} P>0,005; ^e P<0,1; ^f P<0,001; ^{g,i,j,k,l,m} P<0,05 alle anderen Fälle = ns

Tab. B: Auswertung allgemeiner Parameter (Alter der Frau, Anzahl an Vorversuchen, BMI, MII Oozyten, Befruchtungsrate (Befr.rate), Implantationsrate (IR)) in Abhängigkeit vom Embryoscore (Emb.score) am Tag2 und Tag3 beim Transfer von 2 Embryonen. Die Signifikanzen zur Implantationsrate wurden im Ergebnisteil angegeben.

	Anzahl Zyklen	Alter der Frau	Vorversuchen	BMI	MII Oozyten	Befr.rate	IR
Emb.score Tag 2							
0-20	112	32,5	0,61 ^a	22,5	8,6	70,7 ^b	9,4 ^e
21-30	144	32,8	0,54	23,0	8,4	72,6	27,1
>30	53	30,8	0,38 ^a	22,8	8,6	78,8 ^b	34,0 ^e
Emb.score Tag 3							
0-30	74	32,7	0,88 ^{c,d}	22,4	7,6	71,3	8,8 ^f
31-50	164	32,3	0,60 ^c	22,6	9,4	73,4	17,7 ^{f,g}
>50	118	32,3	0,36 ^d	23,1	8,0	74,8	35,2 ^g

^a P<0,1 ^b P<0,01 ^c P<0,05 ^{d,e,f,g} P<0,001 alle anderen Fälle = ns

Tab. C: Auswertung der Zyklen (n) (Alter der Frau, des Mannes, Anzahl an Vorversuchen der Frau (Vorversuche), Anzahl transferierter Embryonen (ET Emb.) und Befruchtungsrate (Befr.rate) in Hinblick auf die klassischen Spermatozoenparameter (Zelldichte (Mio/ml), Morphologie (Morph.) und Motilität) und den Ausgang der Therapie (Implantationsrate (IR) und Schwangerschaftsrate (SSR)). Nur wenn signifikante Unterschiede auftraten, wurden diese angegeben. Die Signifikanzen zur Implantations- und Schwangerschaftsrate wurden im Ergebnisteil angegeben.

	n	Alter Frau	Alter Mann	Vorversuche	ET Emb.	Befr.rate %	IR %	SSR SS/Zyklen
Zelldichte Mio/ml								
0-1	86	31,9	36	0,8	2,2	71,1	18,2	29,1 % (25/86)
1,1-4,9	101	32,1	34,8	0,6	2,1	66,9	20,1	35,6 % (36/101)
5-19,9	186	32,2	35,2	0,7	2,1	70,2	19,3	31,7 % (59/186)
≥20	191	33,3	36	0,8	2,2	71,9	16,5	31,9 % (61/191)
Morph.								
0	74	31,5 ^a	34,1	0,70	2,2	69,1	14,1	27,0 % (20/74)
1-14	230	32,1	35,1	0,94	2,1	68,1 ^b	20,0	34,3 % (79/230)
15-29	107	32,8	36,3	0,64	2,1	73,5 ^b	20,5	31,8 % (34/107)
≥30	114	33,4 ^a	36,0	0,75	2,1	73,0	16,1	31,6 % (36/114)
Motilität A+B A								SSR
0-10	96	32,6	36,3	0,75	2,2	70,1	17,7	35,4 %
0	376	32,2	35,5	0,81	2,2	69,2	18,5	31,6 %
11-30	245	32,2	35,5	0,78	2,1	70,0	19,5	30,6 %
1-9	104	33,4	36,0	0,79	2,1	71,4	18,8	33,7 %
>30	218	32,8	35,1	0,79	2,1	70,6	17,5	32,1 %
>9	79	32,9	34,5	0,63	2,1	73,8	17,0	31,6 %

^a P<0,005

^b P<0,05

alle anderen Fälle = ns

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Norbert von Rooj bedanken, der zu mir in Berlin bei einem IVF-Treffen sinngemäß sagte: „Wenn Du nicht weißt, welche Zellen Du zur Weiterkultivierung aussuchen sollst, und wenn die Literatur keine klaren Aussagen zulässt, dann finde es selbst heraus“ und mich mit Markus Montag, Bea Maxrath und Simone Winkler zusammen brachte, woraus diese Arbeit sich entwickelte.

Herrn Prof. Dr. W. Lichtenegger möchte ich danken, dass er es ermöglichte, dass daraus das Thema meiner Dissertation wurde. Diesbezüglich danke ich ebenfalls Frau Dr. Bettina Pfüller.

Bei Dr. Hardi Schmiady und PD Dr. Markus Montag möchte ich mich bedanken für die äußerst konstruktive und motivierende Betreuung der gesamten Arbeit. PD Dr. Markus Montag, Dr. Bea Maxrath und Simone Winkler möchte ich für die Durchführung und das Gelingen dieser Multizenterstudie ganz herzlich danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Elmar Beck, der meine Statistikenkenntnisse in die richtigen Bahnen gelenkt hat.

Meinen Chefs der GMP Thaele, Happel, Giebel möchte ich ganz herzlich danken, dass ich diese detaillierte Beurteilung der Zyklen durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt der Firma Serono für die finanzielle Unterstützung der Arbeitstreffen der Multizenterstudie und der Firma Serono und Organon für die Hilfe bei der Literaturrecherche.

Mein größter Dank gilt meiner lieben Frau Gunda, die mir den Rücken freigehalten hat und so manchen Abend allein verbringen musste. Meinen lieben Kindern Jennifer und Yannick danke ich, dass sie akzeptiert haben, wenn ich im Arbeitszimmer verschollen war.

10 Erklärung

„Ich, Martin Greuner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Untersuchung morphologischer Kriterien der Gameten und Vorkernstadien zur
Erzielung einer Schwangerschaft

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Hiermit erkläre ich:

- dass weder früher noch gleichzeitig ein zweites Promotionsverfahren durchgeführt wurde,
- dass mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“