

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin

VIVANTES Klinikum am Urban

Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Einfluss verschiedener klinischer Parameter
auf die Erfolgsrate nach
Kryokonservierung imprägnierter menschlicher
Eizellen**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Zahraa Kollmann

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Mendling
 2. Prof. Dr. med. R. Sudik
 3. Prof. Dr. med. W. Hatzmann

eingereicht: 30.01.2008

Datum der Promotion: 28.11.2008

Zusammenfassung

Einfluss verschiedener klinischer Parameter auf die Erfolgsrate nach Kryokonservierung imprägnierter menschlicher Eizellen

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener klinischer und methodischer Parameter (Alter der Patientin, Sterilitätsursachen, primäre und sekundäre Sterilität medikamentöse Stimulation und Zyklusvorbereitung, Art der Befruchtung, Kryokonservierungsdauer der PN-Stadien, Anzahl und Entwicklungsstadium der Embryonen) auf die Entwicklungs- und Implantationsfähigkeit menschlicher Eizellen sowie auf die Schwangerschaftsrate nach Kryokonservierung und Auftauen im Pronucleus-Stadium, zu untersuchen.

Patientinnen mit primärer Sterilität konzipierten deutlich seltener (7,5%) als diejenigen mit sekundärer Sterilität (15,2%). Hatte die Patientin aber nach primärer Sterilität durch assistierte Reproduktionstechnik (ART wie IVF oder ICSI) bereits einmal konzipiert, so stieg die Konzeptionsrate bei einem folgenden Transfer ebenfalls auf 15,4%.

Das Alter der Patientinnen hatte bis zu 40 Jahren keinen eindeutigen Einfluss auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate.

Bei den Sterilitätsursachen erwies sich die „idiopathische“ als besonders aussichtsreich (Schwangerschaftsrate 14,9%), es fanden sich aber nur geringe Unterschiede zwischen männlicher, weiblicher, organischer und hormoneller Ursache. Wenn Ursachen bei beiden Ehepartnern vorhanden waren, sank die SS-Rate auf 6,7%.

Die im Punktionszyklus verwendeten Medikamente zur ovariellen Stimulation zeigten insofern Unterschiede in der Befruchtungsrate als sie nach HMG-Stimulation 55,6% und nach FSH-Stimulation 63,1% betrug. Auch die Überlebensrate nach Auftauen der PN-Stadien war nach HMG-Stimulation niedriger (60,2%) als nach FSH-Stimulation (67,7%), die Schwangerschaftsrate wies allerdings keine deutlichen Unterschiede auf (9,6% bzw. 10,8%).

Die Vorbereitung des Kryotransfer-Zyklus war ebenfalls relevant, da der Transfer im unbeeinflussten Spontanzyklus bezüglich der Schwangerschaftsrate eindeutig am erfolgreichsten war (15,7%). Eine Stimulation mit Clomiphen wie auch mit niedrig dosierter Gonadotropingabe war ähnlich erfolgreich (14,3%). Der Transfer im artifiziiellen Zyklus, also nach Endometriumsaufbau durch Steroidhormone (Estradiolvalerat und Progesteron) erbrachte dagegen nur eine geringe Schwangerschaftsrate (8,6%).

Die Schwangerschaftsrate stieg mit der Anzahl der transferierten Embryonen (1 bis 3) auf das doppelte (6,6% bis 13,2%). Ebenso wirkte sich das zunehmendem Entwicklungsstadium der Embryonen aus (PN-Stadium 5,7%, 4-Zell-Stadium 12,8%). Die mathematische Berücksichtigung der Kombination beider Faktoren ergab sogar eine fünffache Steigerung von einer Zelle im PN-Stadium (4,3%) zu drei Embryonen im 4-Zell-Stadium (23,1).

Die Gefrierlagerungszeit, also die Zeit wie lange eine Eizelle im Pronucleus-Stadium vor der Verwendung tiefgefroren war, wirkte sich nur geringfügig auf die Überlebensrate (71,2% bis 3 Monate, 66,7% über 4 Jahre), nicht jedoch auf die Schwangerschaftsrate aus.

Durch ICSI befruchtete Eizellen führten nach Kryokonservierung seltener zu einer Schwangerschaft (8,0%) als nach IVF (12,9%), beim Primärtransfer war das Ergebnis weniger verschieden (22,1% und 26,7%)

Beim Vergleich Kryotransfer mit Primärtransfer zeigte sich, dass die Schwangerschaftsrate beim Transfer frisch gewonnener Eizellen nach Befruchtung und Kultivierung (=Primärtransfer) mit 24,1% höher war als nach Kryokonservierung mit 10,4%, ein Ergebnis, das in guter Übereinstimmung mit der zeitgleichen Literatur (von 1997- 2004) steht.

Abstract

The Influence of Various Clinical Parameters on the Pregnancy Rates after Cryopreservation of Human Prenuclear Oocytes

It has been the aim of this work to examine the ability of human fertilized eggs in the pronucleus state to develop and implant under different clinical and methodical conditions. (patients age, cause of sterility, primary or secondary sterility, stimulation regimes, method of fertilization, duration of cryopreservation, number and developmental stage of embryos transferred).

Patients with primary sterility conceived significantly less (7,5%) than those with secondary sterility (15,2%). Patients, who had already been pregnant once by artificial reproduction techniques (ART as IVF or ICSI) had also a higher chance to conceive once more by another ART (15,4%).

The age of the women up to 40 years was of no significance concerning the fertilization- and pregnancy-rate.

Looking on the reasons for sterility, the "idiopathic" was the most promising (pregnancy rate 14,9%) but there were only minor differences between male, female, organic and functional causes. When both genders exhibited reasons for infertility, the pregnancy rate decreased to 6,7%.

The different agents used for stimulation in the egg- sampling cycle showed differences to some extent, namely 55,6% after HMG- stimulation in contrast to 63,1% after FSH stimulation. The survival rate after thawing the PN-cells was lower after HMG stimulation (60,2%) than after FSH stimulation (67,7%). Otherwise the pregnancy rate did not show remarkable differences (9,6% bzw. 10,8%).

The pre-treatment of the cryotransfer cycle was very decisive, as the cryotransfer in the unmedicated spontaneous cycle was the most successful with a pregnancy-rate of 15,7%. The stimulation with Clomipene-Citrate as well as low-dose Gonadotrophin application was also rather successful (14,3%)

but the transfer in an artificial cycle, that is stimulation of endometrial development by estradiolvalerate and progesterone, lead to only a low pregnancy rate (8,6%).

The pregnancy rate increased twice (6,6% to 13,2%) with the number of transferred embryos (1 to 3) in the same effect showed the increasing developmental stage of the embryos (PN-cells 4,3% 4-cells 12,8%). The arithmetical consideration of both factors together lead to the fifefold increase of the pregnancy rate from one PN-cell-stage (4,3%) to three 4-cell stages (23,1%).

The freezing time, that means the duration of deep-freezing the impregnated egg cells in the pronucleus state before the transfer, did not influence the survival rate of the thawed cells remarkably (71,2% up to 3 month, 66,7% over 4 years) and did not influence the pregnancy rate.

Fertilization by ICSI after cryokonservation lead to fewer pregnancies than IVF (8,0% vs. 12,9%), but was very similar in the primary transfer (22,1% vs. 26,7%)

The over all pregnancy rate was higher in the "primary transfer" of fresh collected fertilized eggs and cultured embryos (24,1%) than after cryokonservation (10,4%), a result, that is in good accordance with time corresponding publications (1997 – 2004).

Schlagwörter:

Kryopreservation, menschliche Eizellen, artefizielle Befruchtung, pronucleares Stadium

Keywords:

cryopreservation, human oocytes, artificial fertilisation, pronuclear stage

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------------------|---|----|
| Abstract | | 4 |
| Widmung | | 9 |
| Abkürzungsverzeichnis | | 10 |
| Vorwort | | 11 |
| 1 | Einleitung | 12 |
| 1.1 | Historischer Überblick über die Kryokonservierung | 12 |
| 1.2 | Kryokonservierung imprägnierter Eizellen (PN-Stadium) | 13 |
| 1.3 | Indikation für eine PN- Kryokonservierung | 13 |
| 1.4 | Grundlagen und Technik der Kryokonservierung | 14 |
| 1.4.1 | Das Seeding | 15 |
| 1.4.2 | Kryoprotektiva | 15 |
| 1.4.3 | Mechanismus des Äquilibrierens der Zellen im Kryomedium (Äquilibrierungsphase) | 16 |
| 1.4.4 | Einfriermethodik | 17 |
| 1.4.5 | Schäden durch Gefrieren | 17 |
| 1.4.6 | Auftauprozess | 18 |
| 1.4.7 | Gefriergutgeräte | 18 |
| 1.5 | Ursachen, Diagnostik und Therapie der Sterilität | 19 |
| 1.5.1 | Ursachen der Sterilität | 19 |
| 1.5.2 | Diagnostik der Sterilität | 20 |
| 1.5.3 | Therapie der Sterilität, Assistierte Reproduktive Techniken (ART) | 21 |
| 1.5.3.1 | In-vitro-Fertilisation (IVF) | 22 |
| 1.5.3.2 | Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) | 23 |
| 1.5.3.3 | Entwicklung der Embryonen | 24 |
| 1.5.3.4 | Stimulationsmedikamente und -Protokolle | 27 |
| 2 | Herleitung der Aufgabenstellung | 29 |
| 3 | Material und Methodik | 30 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1 | Studienaufbau und Auswertungsziel der Ergebnisse | 30 |
| 3.2 | Patientengut | 30 |
| 3.3 | Follikelpunktion und Inkubation | 32 |
| 3.4 | Praktisches Vorgehen bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) | 32 |
| 3.5 | Technisches Vorgehen bei der Kryokonservierung von Eizellen im Vorkernstadium | 33 |
| 3.6 | Vorbereitung des Zyklus zum Kryotransfer | 36 |
| 3.7 | Embryotransfer | 37 |
| 3.8 | Statistische Methoden | 37 |
| 4 | Ergebnisse | 38 |
| 4.1 | Alter der Patientinnen | 38 |
| 4.2 | Sterilitätsursachen | 43 |
| 4.2.1 | Geschlechtsspezifische Unterschiede | 43 |
| 4.2.2 | Weibliche Ursachen | 46 |
| 4.2.2.1 | Organische Ursachen | 46 |
| 4.2.2.2 | Hormonelle Ursachen | 48 |
| 4.3 | Primäre und sekundäre Sterilität | 50 |
| 4.3.1 | Primäre Sterilität und Sekundäre Sterilität nach Spontanschwangerschaft | 50 |
| 4.3.2 | Primäre und Sekundäre Sterilität nach spontanen und ART-induzierten Schwangerschaften | 53 |
| 4.4 | Medikamente zur ovariellen Stimulation | 55 |
| 4.4.1 | Long- und Short-Protokoll | 55 |
| 4.4.2 | Medikamente zur ovariellen Stimulation im „Long- Protokoll. | 56 |
| 4.5 | Medikamentöse Vorbereitung des Kryo-Transfer-Zyklus | 60 |
| 4.6 | Anzahl und Entwicklungsstadium der transferierten Embryonen | 62 |
| 4.6.1 | Anzahl der transferierten Embryonen | 62 |
| 4.6.2 | Entwicklungsstadium der transferierten Embryonen | 62 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.7 | Vergleich IVF und ICSI | 65 |
| 4.8 | Einfluss der Lagerungszeit kryokonservierter PN-Stadien | 69 |
| 4.9 | Vergleich der Ergebnisse nach Kryotransfer mit den Ergebnissen beim Primärtransfer | 72 |
| 4.9.1 | Vergleich der Schwangerschaftsraten beim Primär- und Kryotransfer | 72 |
| 4.9.2 | IVF und ICSI | 73 |
| 4.9.3 | Primäre und sekundäre Sterilität | 75 |
| 4.9.4 | Alter der Patientin | 77 |
| 5 | Diskussion | 80 |
| 5.1 | Methodik der Kryokonservierung | 80 |
| 5.2 | Klinische Parameter | 81 |
| 5.2.1 | Alter der Patientinnen | 81 |
| 5.2.2 | Anzahl der transferierten Embryonen | 82 |
| 5.2.3 | IVF und ICSI | 84 |
| 5.2.4 | Primäre und sekundäre Sterilität | 84 |
| 5.2.5 | Sterilitäts-Ursachen | 85 |
| 5.3 | Medikamente zur ovariellen Stimulation | 86 |
| 5.4 | Medikamentöse Vorbereitung des Kryotransfer-Zyklus | 87 |
| 5.5 | Entwicklungsstadium des transferierten Embryos | 87 |
| 5.6 | Einfluss der Gefrierlagerungsdauer auf die Schwangerschaftsrate | 88 |
| | Danksagung | 99 |
| | Lebenslauf | 100 |
| | Eidestättliche Erklärung | 101 |

Widmung

Die vorliegende Dissertationsarbeit widme ich meinen lieben Eltern

Abkürzungsverzeichnis

ART Artefizielle Reproduktionstechnik

| | |
|-------|---|
| BGB | Bürgerliches Gesetzbuch |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ESchG | Embryonenschutzgesetz |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon |
| GnRH | Gonadotropin- Releasing Hormon |
| HCG | Humanes Chorion- Gonadotropin |
| HMG | Humanes Menopausales Gonadotropin |
| ICSI | Intracytoplasmatische Spermieninjektion |
| IVF | In Vitro Fertilisation |
| LH | Luteinisierendes Hormon |
| MW | Mittelwert |
| N | Anzahl |
| PBS | Rinderserum Protein |
| PCO | Polycystisches Ovar |
| PN | Pronucleus |
| SD | Standardabweichung |
| SET | Single Embryo Transfer |

Vorwort

Erforschungen des hormonellen Zyklus der Frau mit sensiblen Methoden der Hormonanalytik, der biologischen Voraussetzungen für eine in-Vitro-Kultur menschlicher Keimzellen und der Möglichkeit diese über einen langen Zeitraum zu konservieren haben es ermöglicht, Ehepaaren, die wegen verschiedener Erkrankungen oder biologischer Insuffizienzen vor Jahren noch kinderlos geblieben wären, zu einem eigenen Kind zu verhelfen.

1 Einleitung

1.1 Historischer Überblick über die Kryokonservierung

Im Jahre 1952 berichtete Audry Smith über die Tieftemperaturlagerung von fertilisierten Kaninchen-Oozyten, von denen sich allerdings nach dem Auftauen nur wenige im Kulturmedium weiter teilten.

Sherman und Lin veröffentlichten 1958 eine Studie in der sie unbefruchtete Mäuse- Oozyten auf -10°C unterkühlt hatten. Den Nachweis für das Überleben nach dem Auftauen der Eizellen führten sie, indem sie diese in die Eileiter gepaarter Empfängertiere übertrugen und ihre Entwicklung zu Embryonen feststellten.

1972 erbrachten Whittingham, Leibo und Mazur den endgültigen Beweis für eine erfolgreiche Tiefgefrierkonservierung: Nach dem Transfer von aufgetauten Mäuseembryonen, die zuvor bei Temperaturen von -196 und -269°C konserviert worden waren, konnten lebende Junge geboren werden.

Ein Jahr später wurde in England nach Embryokonservierung und Transfer das erste Kalb geboren.

Parkening et.al. begann 1976 den Kristallisationsprozess im Medium und seine Induktion (Seeding) zu erforschen, dabei wurde auch festgestellt dass die Gefriereschwindigkeit einen erheblichen Einfluss auf den Erfolg der Embryonenkonservierung darstellt.

Eine wichtige Erkenntnis von den Tiermodellen war, dass sich die späteren Teilungsstadien der Embryonen mit ihren kleinen Blastomeren durchweg besser einfrieren ließen (8-Zellstadium bis zur frühen Blastozyste), als die großvolumigen, singulären Oozyten, deshalb wandte sich die Forschung, zunächst der Kryokonservierung der Embryonen zu.

Es gelang Parkening et al. 1976 auch unbefruchtete Maus Oozyten nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen mit epidydimalen Spermien zu fertilisieren und nach Blastozysten- Kultur und Transfer ein lebendes Junges bei der Maus zu erhalten.

Der Physiologe Edwards und der Gynäkologe Steptoe vertraten 1977 in einem Vortrag die Meinung, dass die Kryokonservierung von menschlichen Embryonen insofern von Bedeutung wäre, als nach extrakorporaler Befruchtung menschlicher Eizellen eine dauerhafte Schwangerschaft möglicherweise auch dann zu erzielen sei, wenn die Embryonen nicht im Zyklus der Eizellentnahme transferiert wurden, sondern in einem folgenden, nicht stimulierten Zyklus. Bereits wenige Monate später konnten sie nach Embryotransfer im Zyklus der Eizellentnahme und nach komplikationsloser Schwangerschaft, über die Geburt des ersten durch In-vitro-Fertilisation gezeugten Kindes berichten.

1977 gelang Wittingham die erste erfolgreiche Kryokonservierung von Säugetier Eizellen bei Tiefsttemperatur (-196°C), wonach er lebende Junge erhielt. Im gleichen Jahr gelang ihm auch schon das erfolgreiche Tiefgefrieren von menschlichen Oozyten und Embryonen.

Das Interesse in dieser Phase richtete sich auf die Zusammensetzung idealer Medien zur Embryokultivierung und auf die Verbesserung der Technik

Trounson und Mohr berichteten 1983 in Australien erstmalig von einer Schwangerschaft, die nach Kryokonservierung eines zuvor bei -196°C im 8-Zell-Stadium konservierten Embryo eingetreten war, diese endete in der 24. SSW mit einer Fehlgeburt.

Zeilmaker et al. in den Niederlanden berichteten 1984 von einer Geburt dichorialer gesunder Zwillinge nach Einfrieren und Auftauen von 8-Zell-Embryonen.

Cohen et al. teilten 1985 eine Geburt nach Transfer eines im Blastozysten-Stadium eingefrorenen und aufgetauten Embryos mit, wobei Glycerin als Kryoprotektivum benutzt worden war.

1986 veröffentlichten Diedrich et al. Schwangerschaften nach In-vitro-Fertilisation und Embryotransfer zuvor kryokonservierter Oozyten.

1.2 Kryokonservierung imprägnierter Eizellen (PN-Stadium)

Imprägnierte Eizellen sind Eizellen, bei denen nach dem Eindringen des Spermiums männlicher und weiblicher Vorkern noch nicht miteinander verschmolzen sind und gelten in diesem Sinne noch nicht als Embryonen (EschG §8, Abs. 1). Während in den meisten Ländern der Welt die Kryokonservierung früher Embryonalstadien bevorzugt wurde, dieses Vorgehen aber in Deutschland verboten ist, gewann die Tiefgefrierkonservierung von imprägnierten Eizellen in der BRD im Zusammenhang mit der Verabschiedung des Embryonenschutzgesetzes 1991 zunehmend an Bedeutung (Mandelbaum J. 1987, Siebzehnrübl E. 2000).

1.3 Indikation für eine PN- Kryokonservierung

In Deutschland ist eine Indikation zur Kryokonservierung imprägnierter Eizellen dann gegeben, wenn mehr imprägnierte Eizellen erzeugt werden als in einem IVF- oder ICSI-Zyklus transferiert werden können, da in Deutschland pro Zyklus lediglich drei Embryonen transferiert werden dürfen (EschG § 1, Abs. 1.3). Das Kryokonservieren von Embryonen ist nur im Notfall gestattet.

Die Kryokonservierung ist aus der modernen Reproduktionstechnologie nicht mehr wegzudenken. Sie erlaubt es, im Punktions-Zyklus nur eine begrenzte Anzahl von Embryonen zu übertragen, wodurch die Rate an Mehrlings-Schwangerschaften vermindert wird. Durch die Möglichkeit einer späteren Übertragung wieder aufgetauter PN-Stadien, bzw. Embryonen nach Kultivierung, lassen sich die Zyklen, in denen eine Befruchtung möglich ist, pro Punktion vermehren. Wenn im Stimulationszyklus eine Überstimulierung erfolgt, wird diese durch die Punktion der Follikel schon gemäßig und es ist nicht notwendig, in diesem Zyklus auch einen Transfer durchzuführen, der für die Patienten, falls eine Schwangerschaft eintreten würde, eine große Gefahr für OHSS (Ovarian Hyperstimulation Syndrome) darstellen könnte. Durch die Möglichkeit, Eizellen im Pronucleusstadium einzufrieren, entfällt für alle Beteiligten der ethische oder moralische Konflikt, der mit dem Vorhandensein evtl. ungenutzter Embryonen verbunden ist. (Nikolettos and Al-Hasani 2000).

Die Kryopreservation erlaubt es auch, die Fruchtbarkeit aufrecht zu erhalten, für den Fall, dass eine Chemo- oder Radiotherapie gemacht werden müsste, wenn es möglich ist, diese Therapien bis zur Eigewinnung zu verschieben. (Seli and Tangir 2005)

Die Gefriertechnik von Pronucleus- Stadien ist inzwischen so fortgeschritten, dass für das Einfrieren von PN-Stadien kein Unterschied mehr besteht zum Einfrieren bereits entwickelter Embryonen (Al-Hasani et al. 2000, Ragni et al. 2005).

Wesentlich problematischer gestaltet sich dagegen die Kryokonservierung menschlicher Oocyten, da diese eine sehr kälteempfindliche Spindel und eine stark verhärtende Zona pellucida aufweisen. Coticchio et al. (2006) erreichten mit einem veränderten Sucrose-Protokoll als Gefrierschutz dass der Spindelapparat beim Auftauvorgang nicht mehr beschädigt wurde. Nach Kazem et al. (1995) beträgt die Erfolgsrate der Befruchtung wieder aufgetauter Oocyten nach IVF 13,5% aber 45,9% nach ICSI, woraus sie schließen, dass die Spermien bei der IVF die verhärtete Zona pellucida nicht überwinden können.

Man darf mit einer Verbesserung dieser Rate durch neue Gefriertechniken wie z.B. der Vitrifikation hoffen. Das Kryokonservieren menschlicher Oocyten wird allein schon dadurch einen Platz in der Fortpflanzungsmedizin erhalten, weil das gesamte Genom der Frau beliebig lange erhalten werden kann, was zum Beispiel für Frauen mit beginnenden Wechseljahr-Symptomen von Bedeutung ist, und auch nach schweren Krankheiten mit Verlust der Ovarialfunktion jederzeit auf dieses Genom zurückgegriffen werden kann ohne dass zum Zeitpunkt der Kryokonservierung schon ein bestimmter Partner vorhanden sein muss.

1.4 Grundlagen und Technik der Kryokonservierung

Wie schon aus der Darstellung zur Geschichte der Kryokonservierung hervorgeht, ist die Möglichkeit dieser Technik an verschiedenen Spezies untersucht worden. Es zeigten sich sowohl Spezies-Unterschiede als auch Unterschiede im Gefrierpotential von Oozyten und Embryonen unterschiedlicher Teilungsstadien. Während sich zum Beispiel bei Mäusen alle Entwicklungsformen relativ unkompliziert konservieren ließen war dies bei menschlichen Oozyten oder Embryonen deutlich schwieriger.

Durch den Prozess des Tiefgefrierens und Auftauens sollen die Ausgangseigenschaften des biologischen Materials möglichst nicht verändert werden. Folgende Probleme treten beim Tiefgefrieren von Embryonen, PN-Stadien oder Eizellen auf (Mazur 1977,1980):

1. Eiskristallbildung: Diese setzt zunächst im extrazellulären Medium ein. Zwischen den Eiskristallen befindet sich die noch nicht eingefrorene extrazelluläre Lösung.

2. Zunahme der Elektrolytkonzentration: Zufolge der Eiskristallbildung werden die extrazellulären Elektrolyte konzentriert, wodurch sich ein wachsender Konzentrationsunterschied von gelösten Stoffen zwischen der unterkühlten Lösung in den Zellen und der zunehmend konzentrierteren Lösung außerhalb der Zelle ausbildet.

3. Dehydrierung: Wegen des dadurch erfolgten Unterschieds in der Elektrolytkonzentration zwischen intra- und extrazellulärem Raum fließt Wasser aus der Zelle so dass diese dehydriert. (Mazur 1965).

Bei Temperaturen unter -139°C sistierte der Stoffwechsel einer Zelle so dass insbesondere bei Abkühlung bis -196°C keine Veränderung das heißt Alterung der Zelle geschieht. Die Ausgangseigenschaften bleiben also zeitlich nahezu unbeschränkt erhalten. (Leibo u. Mazur 1971, Friedler et al. 1988).

1.4.1 Das Seeding

Die Zugabe chemischer Substanzen zu Wasser erniedrigt dessen Gefrierpunkt unter 0°C proportional der Zahl der gelösten Teilchen in der Volumeneinheit.

Der Inhalt einer Zelle bleibt beim Kühlen zunächst ungefroren, da die Zellmembran die Bildung von Eiskristallen bei Temperaturen über -10°C verhindert. Der Zellinhalt wird zunehmend unterkühlt. Diesen Vorgang nennt man „Supercooling“ oder Unterkühlung (Mazur 1980), d.h. der Gefrierpunkt wird unterschritten.

Bei extrazellulärer Eiskristallbildung steigt die Temperatur infolge der freiwerdenden Kristallisationswärme wieder sprunghaft bis zum Gefrierpunkt an. Nach einer Periode des Gleichgewichtes bei der sich abgegebene Kristallisationswärme und Energieentzug die Waage halten, sinkt die Temperatur des Mediums (Leibo und Mazur, 1978). Dies kann wiederum beim Tiefgefrieren von Embryonen zu einer verringerten Überlebensrate nach dem Auftauen durch intrazelluläre Eisbildung führen (Willadsen 1977).

Eine Unterkühlung des Einfriermediums lässt sich vermeiden, wenn man knapp unterhalb seines Gefrierpunktes künstlich Kristallisationsbildung auslöst. Diesen Vorgang nennt man **Seeding**. Die Rückwärmung vermindert sich und die Temperaturdifferenz bleibt kleiner.

Die Seeding-Temperatur sollte möglichst am Gefrierpunkt des kryoprotektiven Mediums liegen. Die Seedingtemperatur sollte nach Leibo u. Mazur (1978) noch für 2 bis 5 min gehalten werden, um ein thermisches und osmotisches Gleichgewicht zu erreichen

1.4.2 Kryoprotektiva

Um die Überlebensrate zu verbessern wurde der größte Erfolg mit Verfahren erzielt, die langsame Einfrier- und schnelle Auftau- Protokolle verwenden. Unabhängig davon ist der Gebrauch von kryoprotektiven Zusätzen (Gefrierschutzmittel) zum Überleben der Zelle notwendig. Die größten Erfolge werden mit Verfahren erzielt die ein langsames Einfrier- und schnelles Auftau- Protokoll unter Einsatz von kryoprotektiven Zusätzen verwenden.

Vor Beginn des Einfrierens werden die Zellen mit dem kryoprotektiven Medium äquilibriert, dessen Konzentration schrittweise gesteigert wird, um osmotisch bedingte Schäden zu vermeiden.

Die Permeabilität eines Kryoprotektivums ist von der Temperatur und dem Permeabilitätskoeffizient abhängig, der von Oocyt bis Blastocyt zunimmt. Die Equilibrierung verläuft bei höheren Temperaturen

schneller als bei niedrigen Temperaturen, weshalb bei höheren Äquilibrationstemperaturen eine höhere Toxizität für die Zelle gegeben ist (G. Prietl, S. Al-Hasani et.al1987).

Kryoprotektiva werden in zwei Klassen eingeteilt, in penetrierende und nicht penetrierende Gefrierschutzmittel (Meryman 1971).

1. Penetrierende Gefrierschutzmittel

Z. B. Glycerin, DMSO (Dimethylsulfoxid), Propandiol.

Das Charakteristikum penetrierender Kryoprotektiva ist die Fähigkeit, durch eine Zellmembran hindurchzuströmen. Dies wird durch ein geringes Molekulargewicht ermöglicht. Der protektive Effekt dieser Gruppe der Gefrierschutzmittel besteht in der Verminderung der Dehydrierung der Zelle (Meryman 1970). und verhindert somit die übermäßige Schrumpfung (Meryman1956). Renard et al. führten 1984 Propandiol in die Embryo-Kryokonservierung ein, das zusammen mit Sucrose durch ihren osmotischen Effekt die Zelldehydrierung unterstützt.

2. Nicht penetrierende Gefrierschutzmittel

Wie z.B. Sucrose, Dextrane und Albumin.

Nicht penetrierende Gefrierschutzmittel dringen nicht in die Zellen ein, sondern üben ihre Schutzwirkung im extrazellulären Raum aus. Dabei werden sie in niedrigmolaren Konzentrationen eingesetzt.

Eine wichtige Schutzwirkung, die sie ausüben, ist die Stabilisierung der Zellmembran (Farrant u. Morris 1973). Meist wird das Kryomedium Sucrose verwendet.

1.4.3 Mechanismus des Äquilibrierens der Zellen im Kryomedium (Äquilibrierungsphase)

Bringt man eine Eizelle, eine PN-Zelle oder einen Embryo aus einer isotonen Lösung (Medium) in eine hypertone Lösung (z.B. Glycerin) so schrumpft sie zunächst weil sie Wasser an den Extrazellulärraum abgibt bis ein Ausgleich mit dem permeablen Gefrierschutzmittel erreicht worden ist (Leibo 1989).

Glycerin oder DMSO penetrieren zusammen mit Wasser in die Zelle bis ein Äquilibrierung an der Zellmembran hergestellt ist. Das Zellvolumen entspricht danach dem Ausgangsvolumen in isotoner Lösung. Hierbei spielt die osmotische Pufferwirkung der Sucrose eine wichtige Rolle, das heißt dass Sucrose den Grad des Anschwellens des Embryos kontrolliert (Fiedler et al 1988).

1.4.4 Einfriermethodik

Bei der Kryokonservierung von menschlicher Oozyten und imprägnierten Eizellen und Embryonen sind **zwei Verfahren** gebräuchlich.

1. Das schnelle Verfahren: Hierbei erfolgt nach dem Seeding eine Abkühlung bis $-30 - 45^{\circ}\text{C}$, anschließend wird die Paillette direkt in den flüssigen Stickstoff (-196°C) getaucht. Diese Methodik ist gekennzeichnet durch einen geringen intrazellulären Wasserverlust und ein begrenztes Ausmaß an kleinen Eiskristallen. Je schneller die Kühlung verläuft desto geringer ist die Dehydratation. Aigner et al (1992) untersuchten den Unterschied zwischen dem langsamen und ultraschnellen Einfrieren auf den Spindelapparat der Oozyten bei Mäusen. Die Studie zeigte, dass die zweite Methode häufiger einen unbeschädigten Spindelapparat liefert.

2. Das langsame Verfahren: Hierbei wird das Gefriergut nach dem Seeding bis zu minus $60^{\circ}\text{C} - 120^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und erst dann in flüssigen Stickstoff (-196°C) gegeben. (Einfrierschema nach Trounson und Mohr 1983).

1.4.5 Schäden durch Gefrieren

Ganz allgemein hängt die Empfindlichkeit der Zellen beim Einfrieren und Auftauen vom Teilungsstadium ab, in dem Sinne, dass größere Zellen wie z.B. Eizellen deutlich empfindlicher sind als kleine Zellen, zum Beispiel die einer Morula (Sathanathan et al. 1987). Man führt dies auf eine Störung des Spindelapparates während der Metaphase II zurück. Intrazelluläre Eiskristallbildung und hochkonzentrierte Lösungen spielen dabei eine große Rolle (De Leuw et. al. 1991).

Weitere Faktoren sind:

1. Osmotische Auflösung der embryonalen Zellmembranen als Folge der steigenden intrazellulären Konzentration von Elektrolyten während des Gefrierens (Lovelock 1953, Mazur 1977).

2. Schädigung der intrazellulären Proteine durch die hohe intrazelluläre Elektrolytkonzentration im Rahmen der Dehydrierung. Levin (1976) und Miller (1976) sehen darin auch einen Grund für die Lysis der embryonalen Zellen.

3. Eine mechanische Schädigung von Zellstrukturen durch große Eiskristalle (Leibo 1977). Das Ausmaß der Schäden durch intrazelluläres Gefrieren korreliert mit der Gesamtmenge an Eis pro Zelle. Dabei sind auch die osmotischen Kräfte die beim Einschmelzen des intra- und extrazellulären Eises auftreten von Bedeutung (Farrant et. al. 1977).

Die optimale Kühlrate ist die, die langsam genug ist, um die Bildung von intrazellulärem Eis zu verhindern, aber schnell genug ist, um die Zeitdauer, der die embryonalen Zellen den Lösungseffekten ausgesetzt sind, zu minimieren (Mazur 1970). Das Optimum liegt dort, wo beide Effekte minimal sind (Mazur et. al.1972).

4. Wenn das Aufwärmen langsam vor sich geht, wachsen kleine Eiskristalle zusammen. Dieser Vorgang der Kristallbildung während des Erwärmens wird **Rekristallisation** genannt und führt zum Zerreißen von intrazellulären Membranen, wonach die Zelle abstirbt (Mazur et. al. 1972; Whittingham 1980).

Das Ausmaß der Schäden während der Rekristallisation ist proportional zur Dauer des Auftauprozesses (Diller et. al. 1972).

Die Fähigkeit der Zellen, Tiefgefrieren zu überleben, hängt nach Mazur (1970) mehr vom Schutz der Zelloberfläche als vom Schutz des Zellinneren ab. Das Zellinnere enthält normalerweise hohe Konzentrationen an schützenden Makromolekülen. Auch die Ergebnisse von Friedler et. al. (1988) deuten auf eine Abhängigkeit der Überlebensfähigkeit vom Schutz der Zelloberfläche hin. Sie wiesen nach, dass Kryoprotektiva auch ohne Penetration die Zelle schützen können.

5. Kryomikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass Risse in der Zona pellucida durch Bruchstücke im Eis (fracture planes) entstehen können. Rapide Temperaturveränderungen gelten als Ursache dafür.

Die Zonenschäden treten nur an solchen Stellen auf, wo „fracture planes“ den Embryo passieren. Dabei wird die Überlebensfähigkeit der Embryonen nach dem Auftauen anscheinend nicht unbedingt beeinträchtigt und eine normale embryonale Entwicklung nach Transfer ist nicht ausgeschlossen (Rall u. Polge 1984).

1.4.6 Auftauprozess

Eine große Bedeutung kommt dem Auftau-Vorgang zu, weil es hier besonders leicht zu irreversiblen Zellschäden kommen kann. Es galt lange Zeit die Regel, dass umso schneller aufgetaut werden muss, je schneller eingefroren wurde, was inzwischen widerlegt worden ist.

Die nach langsamem Kühlen verbleibende konzentrierte intrazelluläre Flüssigkeit geht beim Umsetzen in flüssigen Stickstoff in einen glasartigen Zustand über. Beim langsamen Auftauen ist genügend Zeit zur Kristallisation der glasartigen intrazellulären Flüssigkeit. Dies führt zu niedrigeren Überlebensraten. Beim schnellen Auftauen bleibt keine Zeit zur Kristallisation.

Das schnelle Auftauen geschieht, indem die Pailletten unmittelbar nach deren Entnahme von Stickstoffbehälter in ein Wasserbad von +20°C gelegt werden. Anschließend wird die Kryoprotektive Substanz aus den Zellen ausgewaschen.

1.4.7 Gefriergutgeräte

Zur Kryokonservierung und Lagerung von Zellen stehen als Gefäße **Pailletten** und kleinste Reagenzglaschen, sog. **Minitubes** zur Verfügung.

Das automatisierte „geschlossene System“

Das geschlossene System besteht aus einer rundum isolierten Gefrierkammer, die mit einem Steuerungsgerät und einem Stickstofftank verbunden ist. Das Gefriergut wird in speziellen Röhrchen (Pailletten) und Halterungen in die Kammer eingesetzt. Durch Einblasen von flüssigem Stickstoff wird die Kammer und damit die Probe bis zur gewünschten Temperatur kontrolliert abgekühlt. (Geschlossenes System Planer, Messer-Griesheim)

Das automatisierte „offene System“

Das Prinzip des „offenen Systems“ besteht darin, dass sich über flüssigem Stickstoff, der sich in einem oben offenen Behälter befindet, durch Verdunstung eine Gasphase entwickelt, deren Temperatur mit zunehmendem Abstand von der Stickstoffoberfläche ansteigt. Dadurch kommt es zu einem Temperaturgefälle von der Raumtemperatur bis auf -196°C .

Der Vorteil dieses Systems ist hauptsächlich die automatisierte Regelung des Gefriervorgangs, der nach Auslösung des Seedings einen vollkommen selbsttätigen Ablauf ermöglicht („Erlanger System“ Al-Hasani, 1994).

1.5 Ursachen, Diagnostik und Therapie der Sterilität

1.5.1 Ursachen der Sterilität

Die ungewollte Kinderlosigkeit betrifft ca. 12 –15 % der Paare mit Kinderwunsch, das sind etwa 2 Millionen Paare in Deutschland.

In etwa 45% liegt die Ursache der Sterilität bei der Frau, in 40% beim Mann, in 30% bei Mann und Frau und in 15% lässt sich keine Ursache feststellen. Man bezeichnet dies auch als idiopathische Sterilität

Die weiblichen Sterilitätsursachen verteilen sich wie folgt:

33% funktionelle (hormonelle) Störungen (Amenorrhoe, Anovulation, Corpus-luteum-Insuffizienz, Hyperprolaktinämie),

20% Tubenfaktor,

23% Endometriose, teilweise gekoppelt mit Tubenfaktor,

12% immunologisch,

15% idiopathisch.

Da die hormonellen Störungen auch vom allgemein tätigen Gynäkologen häufig behandelt werden können, ergibt sich für ein spezielles Kinderwunschzentrum eine andere Verteilung, wobei die organischen Ursachen, insbesondere der Tubenverschluss, im Vordergrund steht. Hier sind etwa 35 % der

weiblichen Ursachen durch mechanische Faktoren wie Tubenverschluss oder peritoneale Adhäsionen bedingt, weitere 25% durch hormonelle Faktoren, also Zyklusstörungen im weitesten Sinn.

Ein schlechtes Spermogramm, also morphologische und funktionelle Störungen der Spermien, verursachen etwa 60 – 70% der männlichen Sterilität, der Rest verteilt sich auf Defekte der ableitenden Samenwege, Sperma-Autoimmunologie, Infektionen, Impotentia Coeundi u.a.

1.5.2 Diagnostik der Sterilität

Wie jede ärztliche Konsultation beginnt auch die Sterilitäts-Abklärung mit einer ausführlichen Anamnese die beide Partner einbezieht.

Zunächst ist es wichtig zu wissen ob das Paar oder jeder für sich schon einmal eine Schwangerschaft erzeugt hat, hiernach unterscheidet man eine *primäre Sterilität* ohne vorausgehende Schwangerschaft von einer *sekundären Sterilität* mit vorausgegangener Schwangerschaft. Es ist nicht nötig, dass die Schwangerschaft zu einem Kind geführt hat, insofern unterscheidet man im deutschen Sprachraum auch die *Sterilität* von der *Fertilität* (die ein geborenes Kind voraussetzt).

Eine orientierende Zyklus-Diagnostik ist nach täglicher Messung der Basaltemperatur über einen Zyklus durch die so aufgezeichnete Basaltemperatur-Kurve möglich. Da bei Hyperprolaktinämie trotz normaler Basaltemperatur-Kurve eine Sterilität vorliegen kann, gehört die Messung dieses Hormons zu den ersten Maßnahmen eine Sterilitäts-Diagnostik. Eine leicht erhöhte Prolaktinsekretion wird häufig im Rahmen von präklinischen Hypothyreosen beobachtet und kann durch L-Thyroxin-Gabe normalisiert werden (Gerhard et al., 1991). Eine genaue Schilddrüsendiagnostik gehört somit neben der Prolaktinbestimmung mit zu den ersten diagnostischen Maßnahmen.

Welche Untersuchungen kommen vielleicht auf Sie zu?



Postcoitaltest
Ausschluß von Infektionen



Aufwachtemperaturmessung

Hormonbestimmung

Ultraschall

Eileiterdurchgängigkeitsprüfg.

Bauchspiegelung

Gebärmutter Spiegelung

Samenuntersuchung

(=Spermiogramm)

Hodenuntersuchung

Hormonuntersuchung

Hodenbiopsie

Es schließt sich die klinische Untersuchung, einschließlich Vaginalsonographie, an, um eine organische Ursache für eine Sterilität schon frühzeitig ausschließen zu können.

Wenn bei der Frau keine funktionelle Störungen vorhanden ist und der Partner fertil ist, kann eine invasive Diagnostik bei der Frau durchgeführt werden. Hierzu gehört eine diagnostische Laparoskopie mit Chromo-Hydro-Pertubation um die Beweglichkeit und Durchgängigkeit der Eileiter festzustellen, und eventuell, wenn sich aus der Vaginal-Sonographie hierfür eine Indikation ergibt eine Hysteroskopie, um ggf. Polypen, submuköse Myome oder Synechien entfernen zu können. Die Fertilität des Mannes muss durch ein Spermiogramm nach WHO-Kriterien nachgewiesen werden.

1.5.3 Therapie der Sterilität, Assistierte Reproduktive Techniken (ART)

Von ART spricht man dann, wenn die Vereinigung der Gameten außerhalb des Körpers der Frau in einem Kulturmedium erfolgt. Wenn sich das Spermium selbst den Weg in die Eizelle suchen kann spricht man von **In-Vitro-Fertilisierung (IVF)**, wenn es künstlich mittels einer ultrafeinen Glaspipette durch das Oolemm in das Zytoplasma der Eizelle verbracht wird, von **Intra-Zytoplasmatischem Spermien-Transfer (ICSI)**

Grundsätzlich muss vor der Therapie mit dem Ehepaar besprochen werden, inwieweit die zur Verfügung stehenden Methoden Erfolg versprechend sind. Eine wichtige Rolle hierbei spielt das Alter der Frau da die biologisch vorgegebene Möglichkeit schwanger zu werden mit zunehmendem Alter, etwa ab 35 Jahren, sehr schnell sehr deutlich abnimmt.

Natürlich werden vor Beginn einer ART die Möglichkeiten der Therapie ohne ART ausgeschöpft. Hierzu gehört die Behandlung hormoneller Störungen und die Beseitigung von mechanischen Hindernissen, soweit dies möglich ist. Die Domäne der ART ist es dann, nicht zu beseitigende Hindernisse auf dem Weg der Spermien zur Eizelle in vitro zu umgehen.

1.5.3.1 In-vitro-Fertilisation (IVF)

Unter der IVF-Methode mit Embryotransfer versteht man die Befruchtung von Oozyten, die durch vaginale ultraschallgesteuerte Punktion gewonnen werden und dann im Reagenzglas mit dem Spermia des Partners in vitro inseminiert und fertilisiert werden. 24 bis 72 Stunden später werden sie dann als Frühembryos im zwei- bis vier- bis acht-Zell Stadium in das Cavum uteri übertragen. Seltener werden aber auch schon die Eizellen im Pro-Nucleus-Stadium oder als Zygote übertragen.

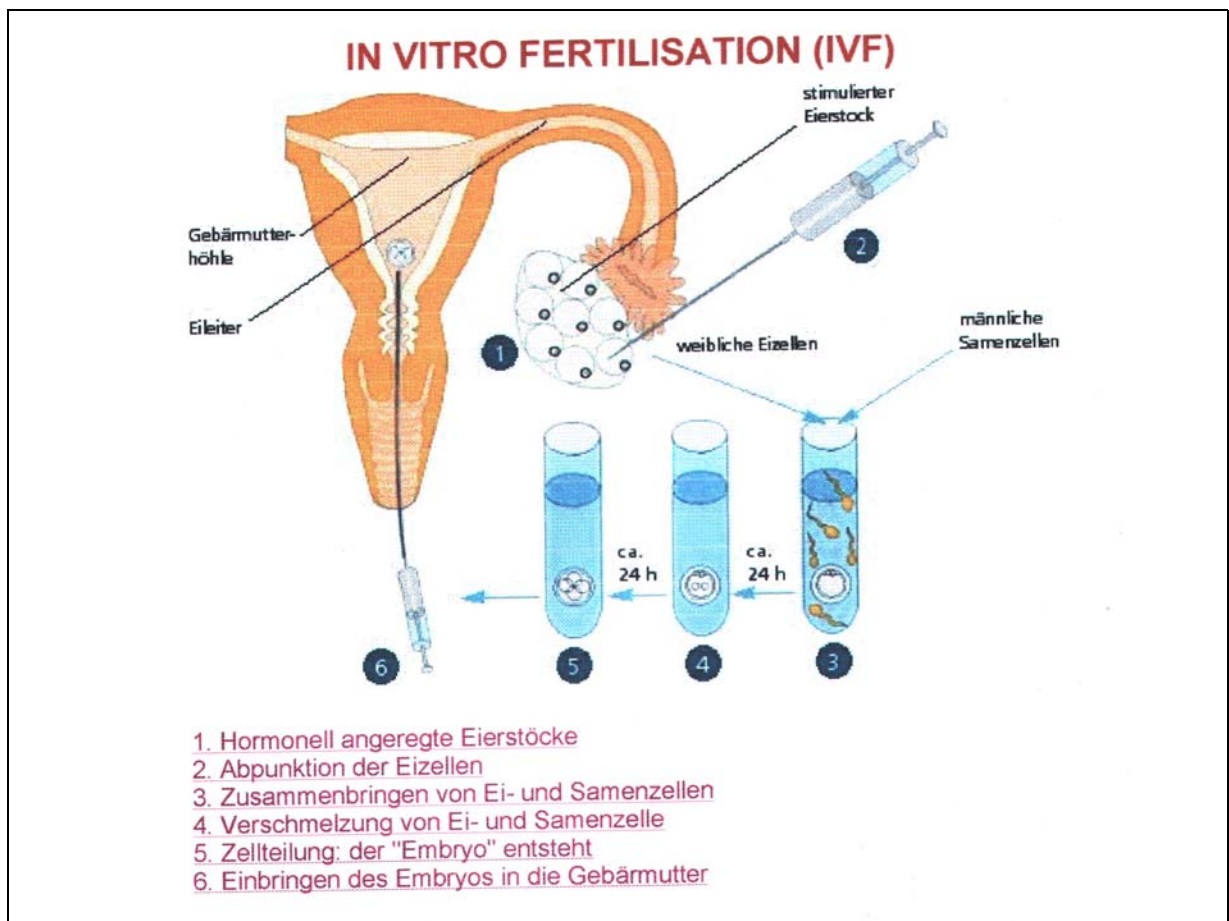


Abb. 1 Bildliche Darstellung der einzelnen Schritte bei der IVF (aus: Microsoft Encarta 2006)

Die Oozyten werden mit 50 000 bis 100 000 frei beweglichen Spermatozoen in den Petrischalen befruchtet. Der Erfolg wird 14-18h nach Befruchtung durch das Vorhandensein von 2 Pronuclei in einer Oozyte dokumentiert.

Die Patientengruppen, die von der seit Ende der 70 er Jahre angewandeten In-vitro-Fertilisation profitieren, waren Patientinnen mit tubarer Sterilität und Patienten mit geringer Subfertilität.

1.5.3.2 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

1992 berichteten Palermo et al. über Fertilisationen mit nachfolgenden Schwangerschaften durch die direkte Injektion eines Spermiums in das Zytoplasma, eine Technik, welche den medizinischen Durchbruch bei der Behandlung der ausgeprägten männlichen Infertilität brachte.

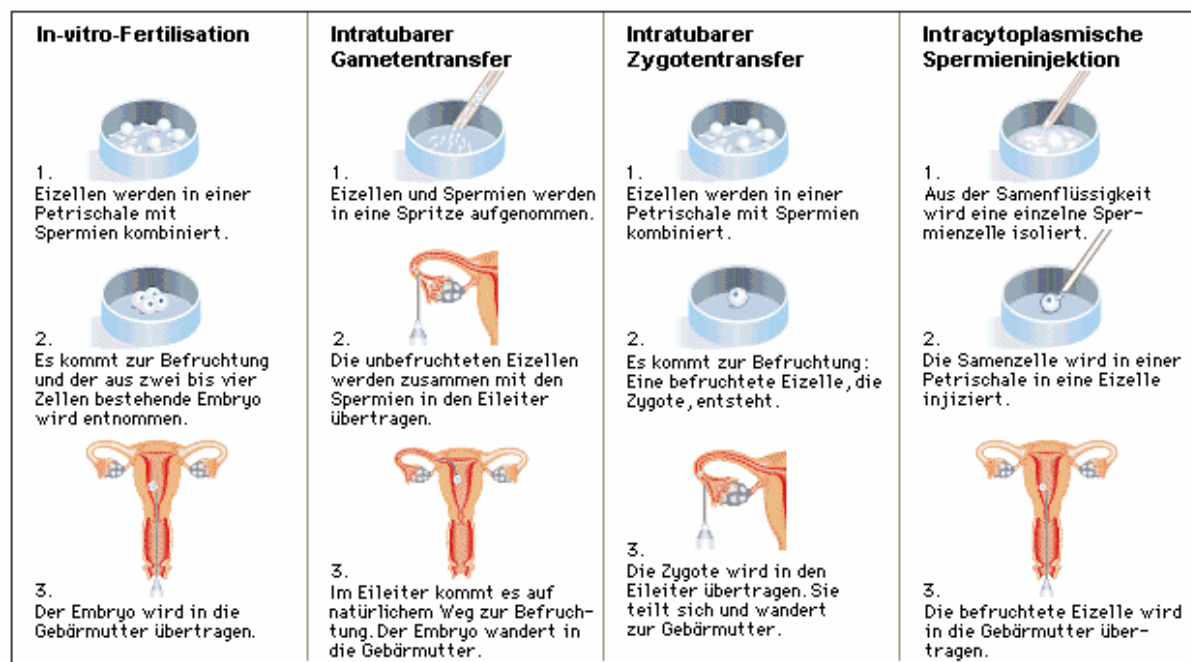


Abb. 2 Bildliche Darstellung der Methoden der ART (aus: Microsoft Encarta 2006)

Inzwischen unterscheidet man bei den **Assistierten Reproduktiven Techniken (ART)** grundsätzlich die spontane Fertilisierung im Inkubationsmedium von der assistierten Fertilisierung mittels **intrazytoplasmatischer Spermien-Injektion (ICSI)** (Palermo et al. 1992)

Die Entwicklung der Mikroinjektion resultiert aus den schlechten spontanen Fertilisationsraten insbesondere bei deutlicher männlicher Subfertilität.

Die Indikationen für die Mikroinjektion nach den *Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der Assistierten Reproduktion* (1998) sind:

- 1. Oligo- Astheno- Teratozoospermie,
- 2. Obstruktive oder nicht-obstruktive Azoospermie,

- 3. Fertilisierungsraten <10% nach konventioneller IVF,
- 4. Immunologische Sterilität
- 5. Retrograde Ejakulation und Anejakulation.

Bei eingeschränkter Samenqualität scheitert die Fertilisation der Oozyte häufig bereits daran, dass das Spermatozoon nicht die Zona Pellucida durchdringen kann. Bei der ICSI wird die letzte Barriere zum Zytoplasma der Eizelle, das Oolemma, überwunden. Bei einer 200- fachen Vergrößerung wird eine Samenzelle immobilisiert und mittels einer Injektionspipette aufgenommen. Die Eizelle wird mit der Haltepipette angesogen, so dass der Polarkörper entweder oben oder unten zu liegen kommt (Kazem et al. 1995).

Die ICSI wird an allen Eizellen durchgeführt, die morphologisch unauffällig sind und das erste Polkörper als Zeichen der zweiten meiotischen Reifeteilung exprimiert haben. Die höhere Fertilisationsrate nach ICSI ergibt eine größere Anzahl von Embryonen, dadurch können mehr imprägnierte Eizellen kryokonserviert werden.

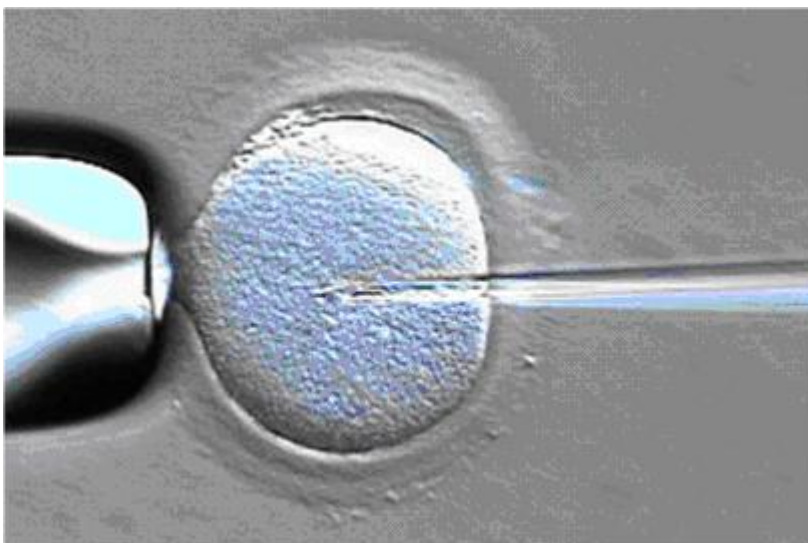


Abb. 3 Die Injektionspipette wird in das Zytoplasma eingestochen und die Samenzellen injiziert.

Der intratubare Gametentransfer und der intratubare Zygotentransfer spielen heute im Rahmen der Sterilitätsbehandlung keine Rolle mehr.

1.5.3.3 Entwicklung der Embryonen

Embryologie und funktionelle Anatomie

Im 4 Wochen alten Embryo sind die entodermalen Keimzellen (Oogonien) zur Gonadenleiste, einer Zölomepithelverdickung neben der Urniere (Mesonephros), gewandert.

Sie vermehren sich durch mitotische Teilung von einigen Hundert auf 6 Millionen Zellen und bilden im 7-8 Wochen alten Embryo die in Ovar und Testes differenzierbare Gonadenanlage. Nach Abschluss der Teilung, spätestens in der 20. Embryonalwoche, heißen die Oogonien primäre Oozyten (Durchmesser 50 μm), die nach Replikation ihrer DNS in die Meiose eintreten. Es finden keine Mitosen mehr statt, da alle primären Oozyten bereits die erste Meiose begonnen haben. Sie sind jetzt von einer Schicht aus flachen Epithelzellen umgeben und werden als Primordialfollikel bezeichnet. Die meisten gehen bis zur Geburt zugrunde, die verbliebenen 300.000 primären Oozyten finden sich in der Prophase der 1. Reifeteilung und verharren in ihr bis zur Geschlechtsreife. Unter dem Einfluss von FSH entwickeln sich die Primordialfollikel zum Teil schon vor, im Wesentlichen aber erst nach Beginn der Pubertät zu Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln.. Auf eine FSH- Stimulation hin wandeln solche Follikel sich in Sekundärfollikel um, in dem sie eine Flüssigkeitsgefüllte Höhle, ein Antrum, bilden (Antrafollikel).

Die Primordialfollikel (Oogonie) haben einen diploiden Chromosomensatz und durchlaufen eine mitotische Vermehrungsphase. Von der 13. Schwangerschaftswoche an werden an der inneren Rindengrenze Oozyten 1. Ordnung sichtbar, die in die 1. Prophase der Meiose eingetreten sind. Die Meiose hat zum Ziel in 2 aufeinander folgenden Teilungsschritten die Chromosomenzahl vom doppelten (diploiden) auf den einfachen (haploiden) Chromosomensatz zu reduzieren und gleichzeitig den Austausch von väterlichen und mütterlichen Genen zu ermöglichen (Brandau und Lehmann 1970). Dies geschieht in der Prophase der 1. meiotischen Teilung, die im Vergleich zur Prophase einer normalen Mitose besonders lang ist und in vier Stadien eingeteilt wird. Nach der prolongierten Prophase kommt es zur Meta-, Ana - und Telophase, wobei die homologen Chromosomen eines Chromosomenpaares getrennt und auf die Tochterzellen, Oozyten 2. Ordnung, gleichmäßig verteilt werden. Oozyten 2. Ordnung besitzen also einen haploiden Chromosomensatz. In der nachfolgenden 2. Meiotischen Teilung wird jedes Chromosom des haploiden Satzes noch einmal der Länge nach in Chromatiden geteilt, so dass dann auch der DNA – Gehalt auf die Hälfte reduziert ist.

Das Besondere der Eizellentwicklung besteht nun darin, dass während der Fetalzeit die Vermehrungsphase abgeschlossen wird, und alle Oogonien die Differenzierungsstufe der Oozyte 1. Ordnung erreichen, d.h. sich in der Prophase der 1. Reifeteilung befinden. Indem sie an Größe zunehmen, durchlaufen sie die 4 Phasen der Prophase und verharren dann in einem Ruhestadium, dem Diktotän. Die 1. Reifeteilung wird somit zunächst nicht abgeschlossen.

Das Ruhestadium dauert 1 bis mehrere Jahrzehnte. Erst mit Einsetzen der Geschlechtsreife wird die Entwicklung fortgesetzt, so dass jeweils einzelne Oozyten in jedem Ovarialzyklus die 1. Reifeteilung vollenden, indem des 1. Polkörpers in den perivitellinen Raum ausgestoßen wird.

Die 2. Reifeteilung (zweite meiotische Teilung), die zur Abschnürung des 2. Polkörpers und zur Bildung des haploiden Chromosomensatzes führt, wird nur abgeschlossen, wenn es nach der Ovulation zur Befruchtung durch ein Spermatozoon kommt. Andernfalls geht die Eizelle zugrunde ohne die Teilung zu vollenden. Samenzellpenetration in die Eizelle kondensieren die männlichen Chromatiden

schnell, während die Eizelle die Meiose wieder aufnimmt und das zweite Polkörperchen aussondert. Männliche und weibliche Pronuclei werden sichtbar und wandern ab, bis sie in der nahen Apposition sind. In diesem Stadium verschwinden die Membranen des Pronucleus und die männlichen und weiblichen Chromosomen verschmelzen.

Eine anormale Befruchtung ist durch das Vorhandensein von mehr als 2 Pronuclei oder von nur einem Pronucleus gekennzeichnet

16 bis 18 h nach Insemination bzw. Mikroinjektion werden die Oozyten auf das Vorhandensein von Vorkernen, d.h. männliche und weibliche Genome, untersucht.

Falls mehr als drei Oozyten Vorkerne zeigen, können die überzähligen Oozyten im Pronucleusstadium kryokonserviert werden.



Abb. 4 Imprägnierte Eizelle im Pronucleus-Stadium

Unterstütztes Ausbrüten (Assisted Hatching)

Bestimmte Patientinnen produzierenden Embryonen, die nach allen morphologischen Kriterien gut in der Lage zu sein scheinen, sich zu teilen und dann einzupflanzen, die dies aber nicht tun, weil die Zona pellucida nicht durchbrochen werden kann. Dies betrifft insbesondere Frauen über 38 Jahre. Unterstütztes Brüten bedeutet, dass die Zona pellucida an einer Stelle durch eine kleine Öffnung durchbrochen wird, so dass der Embryo diese Hülle abstreifen kann um sich im Endometrium einzunisten (Montag und Baukloh 1998).

Im Mittel teilt sich die Zelle nach 35 Std. zum ersten mal (2-Zell-Stadium) und nach 45 Std. zum zweiten Mal (4-Zell-Stadium, Tag 1 und 2)

Die unterschiedlichen Blastomeren sind gut erkennbar und ihre Größe und Form können regelmäßig sein oder nicht. Extrazelluläre Fragmente können vorhanden sein.

Die 3. Teilung erfolgt im Mittel nach 54 Stunden (Tag 3)

1.5.3.4 Stimulationsmedikamente und -Protokolle

Medikamente zur Stimulation

Um möglichst viele punktierbare Follikel zu erhalten werden zur Stimulation der Ovarien die gleichen Medikamente verwendet, die auch zur Zyklusoptimierung benutzt werden, allerdings in höherer Dosis.

1. Humanes Menopausales Gonadotropin (HMG)

Humanes menopausales Gonadotropin (HMG) ist eine Mischung der Proteohormone FSH und LH, die in relativ hoch gereinigtem Zustand aus dem Harn postmenopausaler Frauen gewonnen werden. Die einzelne Ampulle ist auf je 75 Internationale Einheiten (IE) für FSH- und LH-Aktivität eingestellt

2. Rekombinante Gonadotropine (rec. FSH und rec. LH)

Das rekombinante FSH ist für alle Formen der ovariellen Superovulation mit und ohne Downregulation einsetzbar. Es enthält keinerlei urinäre Fremdproteine und ist chemisch genau definiert. Es wird subcutan injiziert. In den klinischen Studien von Fisch et al. (1995), wurden im Vergleich mit urinärem FSH durchweg bessere Ergebnisse mit rekombinantem FSH erzielt, ganz im Gegensatz zu Ludwig und Rabe (2004). In letzter Zeit wird auch die Kombination von rekombinantem FSH und rekombinantem LH gegeben um die Zusammensetzung von HMG (ein Gemisch von urinärem FSH und urinärem LH) zu imitieren.

3. Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)

Bei den **Gonadotropin-Releasing-Hormonen** (GnRH-Analoga) unterscheidet man GnRH- Agonisten (Suprecur-Spray®, Decapeptyl®, Enantone-Gyn®) von den erst später in die Therapie eingeführten GnRH-Antagonisten (Cetrotide®). Die GnRH-Agonisten führen zu einer kurzzeitigen Stimulation der Ovarien („Flare-up-Effekt“), die bei der so genannten Downregulation, die vor der Simulation mit Gonadotropinen durchgeführt wird, stören könnten. Da die GnRH- Antagonisten diese intrinsische Aktivität nicht besitzen wird bei ihrer Anwendung der „Flare-up-Effekt“ vermieden. Sie führen zu einer sofortigen Downregulation.

Stimulationsprotokolle

1. Das „Long“- Protokoll

Das lange Protokoll wird im Rahmen der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation am häufigsten angewandt. Bei diesem Protokoll wird die Hypophyse durch GnRH-Agonisten komplett ruhig gestellt, bevor die ovarielle Stimulation begonnen wird.

Das lange Protokoll wird in der mittleren Lutealphase des vorangehenden Zyklus begonnen, vor allem um den so genannten Flare-up-Effekt bei GnRH-Agonisten, der zu einem vorübergehenden Anstieg

der Gonadotropine mit Stimulation der Ovarien einhergeht, nicht innerhalb des Simulationszyklus zu erzeugen (Daya 1997).

Es hat sich bewährt im Vorzyklus zusätzlich einen Ovulationshemmer zu geben, da hiermit die Bildung von Ovarialzysten verhindert und möglicherweise die Ansprechrate bei den „poor Respondern“ verbessert werden kann. (Damario 1997)

2. Das „Short“-Protokoll:

Beim kurzen Protokoll beginnt die GnRH-Agonisten- Gabe gleichzeitig mit der Gonadotropin Injektion (Macnamee et al 1989). Vergleichsstudien haben gezeigt, dass das kurze Protokoll dem langen Protokoll eindeutig unterlegen ist, weshalb es auch kaum mehr verwendet wird.

3. Das Antagonistenprotokoll:

Die GnRH- Antagonisten blockieren die GnRH- Rezeptoren kompetitiv und verhindern so die Einwirkung des endogenen GnRH- auf die gonadotropen Zellen. Da die Antagonisten keine intrinsische Aktivität besitzen, wird das initiale Flare up der Agonisten komplett vermieden. Unter GnRH- Antagonisten geht die Gonadotropinsekretion innerhalb von Stunden zurück, weshalb es auch erst einige Tage vor dem drohenden endogenen LH Anstiegs gegeben werden muss. Dieses Protokoll ist dem Lang- Protokoll gleichwertig oder sogar überlegen, wie entsprechenden Studien (Ludwig et al. 2000, Ludwig et al. 2002) ergeben haben. Es wurde im vorliegenden Patientenkollektiv nur bei einigen Behandlungszyklen verwendet. Nach Olivennes et al. (2000) hat das Antagonistenprotokoll die gleichen Erfolgsaussichten wie das Long-Protokoll.

4. Vorbereitung des Kryo-Transfer-Zyklus

Wenn ein normaler ovulatorischer Zyklus vorhanden ist, muss nicht unbedingt eine gesonderte Simulation oder Vorbereitung für den Kryo-Transfer erfolgen. Bei anovulatorischem Zyklus oder Oligomenorrhoe wird eine niedrig dosierte Stimulierung mit Clomifen oder FSH / LH bzw. HCG durchgeführt. Bei ausgeprägten Zyklusstörungen ist ein künstlicher Endometriumsaufbau, die Methode der Wahl. Dies geschieht nach Downregulation mit einem GnRH-Analogen in der Lutealphase des Vorzyklus durch Verabreichung von Östrogenen oral in ansteigender Dosierung und der zusätzlichen Gabe von Progesteron um die Corpus-Luteum-Phase im Kryo-Transfer-Zyklus zu imitieren.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Der Wunsch nach einem Kind ist dem Menschen von Natur aus gegeben und so alt wie die Menschheit selbst. Unerfüllter Kinderwunsch ist deshalb, unabhängig von seiner Ursache, eine große seelische Belastung, und einer schweren Erkrankung gleichzusetzen.

Die Behandlung des unerfüllten Kinderwunsches hat in den letzten 50 Jahren eine stürmische Entwicklung genommen und zu bis vor kurzem noch unvorstellbaren Erfolgen geführt. Waren es zunächst die hormonellen Störungen bei der Frau, die einer Therapie zugänglich wurden, so konnten seit den siebziger Jahren auch organische Störungen der Eileiter, die bis dahin nur unzureichend mit mikrochirurgischen Operationen beseitigt werden konnten, durch die Umgehung des tubaren Eitransportes außerhalb des Körpers, die so genannte In-vitro-Fertilisation, umgangen und damit behoben werden. Die männliche Sterilität, die im wesentlichen auf zahlenmäßig und funktionell unzureichender Spermienqualität beruht, kann seit den neunziger Jahren erfolgreich durch die ICSI Methode, die intrazytoplasmatische Spermieninjektion, erfolgreich behandelt werden.

Als weiterer Meilenstein ist die Entwicklung der Kryopreservation menschlicher Eizellen, PN-Stadien (befruchtete Eizellen im Pro-Nucleus-Stadium) und Embryonen anzusehen, da es durch diese Methode ermöglicht wird, einmal gesammelte, befruchtete Eizellen beliebig lange aufzubewahren, um sie zur gegebenen Zeit der Frau ohne die aufwändige und belastende hormonelle Simulation des Zyklus, also im Laufe eines spontanen Zyklus, zu transferieren (Queenan et al. 1997).

Sie ist aber auch ein Segen für jene unglücklichen jungen Leute, die an einer bösartigen Krankheit leiden und die entweder eine Chemotherapie oder / und Strahlentherapie benötigen, woraufhin sie meist steril werden.

Die klassische Embryologie verwendet den Begriff „Embryo“ erstmalig dann, wenn die Blastogenese abgeschlossen ist und aus der befruchteten Oozyte über die Morula und die Blastozyste der Keimling mit seinen Eihäuten und dem kindlichen Anteil der Plazenta entstanden ist.

In der Reproduktionsmedizin hingegen werden auch die Präimplantationsstadien der Keimentwicklung als Embryonen bezeichnet (Priegl G. et al., 1987).

In dieser Arbeit wurden 399 Paare mit unerfülltem Kinderwunsch erfasst, die in der Zeit vom November 1996 bis November 2004 die Sterilitätssprechstunde aufgesucht hatten. Aufgabe der Untersuchung war es, zu untersuchen, ob die Behandlungsmethoden der In-vitro-Fertilisation und intrazytoplasmatischen Spermieninjektion das Ergebnis der Kryokonservierung von imprägnierten Eizellen beeinflussen und ob weitere Faktoren wie das Alter der Paare, das Stimulationsprotokoll, die Sterilitätsursachen, die Anzahl transferierter PN-Stadien oder Embryonen, das Embryoteilungsstadium vor Transfer oder die Zyklusvorbereitung vor dem Kryotransfer sich auf die Befruchtungsfähigkeit der Ei-

zellen und die Schwangerschaftsraten auswirken. Die Ergebnisse konnten mit einigen ausgewählten Ergebnissen des Primärtransfers, der ja zunächst bei jeder Patientin angestrebt wird, verglichen werden. So war es möglich den Einfluss einiger klinischen Parameters in beiden Verfahren zu beurteilen.

3 Material und Methodik

3.1 Studienaufbau und Auswertungsziel der Ergebnisse

Zunächst wird die übliche Methodik des Einfrierens und Auftauens bei der Kryokonservierung menschlicher Pronucleusstadien dargestellt. Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine retrospektive Studie, die sich auf einen Zeitraum von November 1996 bis November 2004 bezieht.

Die Datenerfassung erfolgte mit MS-Excel. Die Daten wurden mit SPSS ausgewertet.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5\%$ festgesetzt.

Die Diskussion bezieht sich auf die untersuchten Faktoren

3.2 Patientengut

Tab. 1 Basistabelle für alle Kryozyklen

| | Gewonnene Eizellen | Befruchtete Eizellen | Primär transferierte Embryonen |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| M±SD | 12,75±5,49 | 8,02±3,56 | 2,06±0,83 |
| N | 5496 | 3456 | 890 |
| % | 100% | 63% | 25,80% |
| 539 Kryozyklen | | | |
| | PN Kryo | PN Aufgetaut | PN Überlebend |
| M±SD | 5,56±3,69 | 3,18±1,09 | 2,13±0,72 |
| Anzahl N | 2494 | 1714 | 1150 |
| % | 100% | 68,72% | 67,09% |

Es wurden 431 Punktionszyklen und 539 Kryozyklen ausgewertet

Die Tab.1 zeigt im oberen Abschnitt die Ergebnisse nach Follikelpunktion gewonnenen Eizellen, deren Befruchtungsrates die Anzahl der direkt transferierter Embryonen und die Schwangerschaftsrates beim Primärtransfer. Im unteren Abschnitt sind die Ergebnisse der Kryokonservierung dargestellt: Eingefrorene Pronucleusstadien (PN-Kryo), aufgetaute (PN-Aufgetaut) und überlebende (PN-Überlebend) Pronucleusstadien und die kumulative Schwangerschaftsrates nach Kryotransfer.

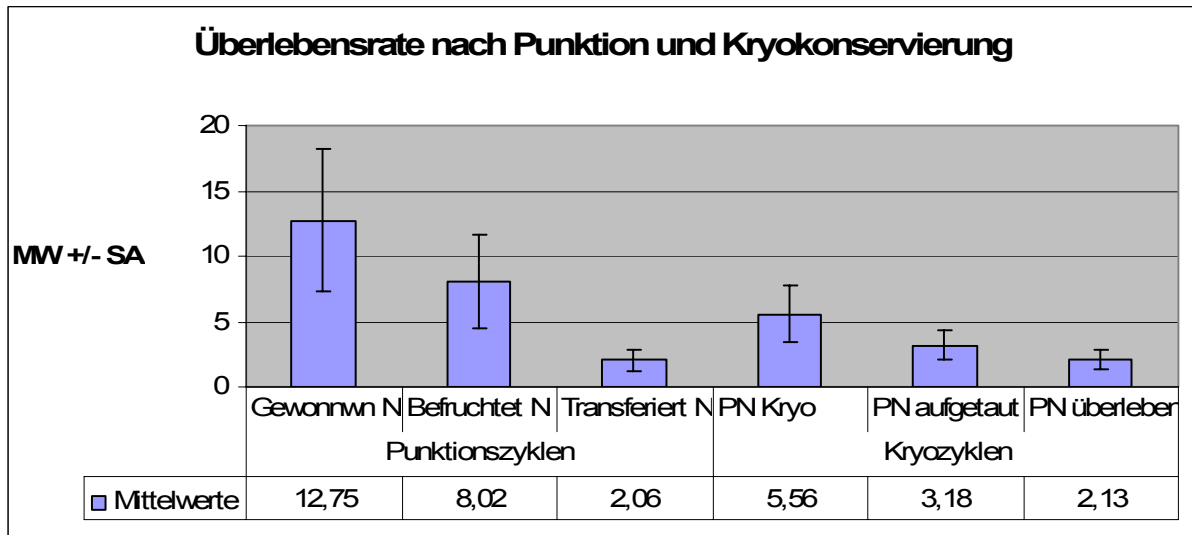


Abb. 5 Bearbeitung der Eizellen. Grafische Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus Tabelle 1.

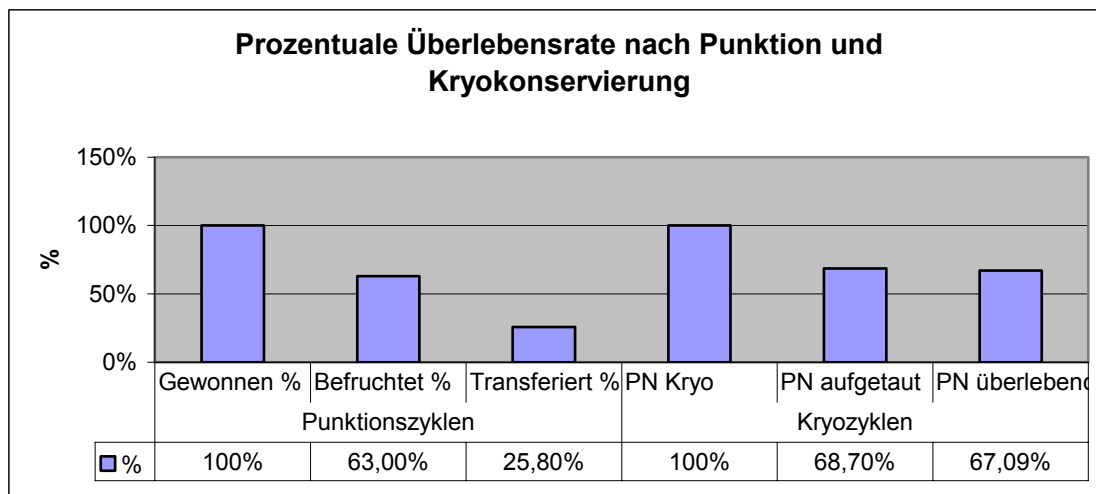


Abb. 6 Ergebnisse der Eizell-Behandlung in Prozent

Es wurden 62,9% der gewonnenen Eizellen befruchtet und 25,8% der befruchteten Eizellen primär transferiert. Weiterhin wurden 68,7% der eingefrorenen PN-Stadien aufgetaut, davon haben 67% überlebt.

Das mittlere Alter der Patientinnen war 32,3 Jahre.

Die Patientinnen wurden zur Auswertung in vier Altersgruppen geteilt:

GI: ≤ 30 J, GII: 31-35 J, GIII: 36-40 J, GIV: > 40 J

Zur Stimulation der Ovarien wurde fast ausschließlich das so genannte Long-Protokoll verwendet. Die wenigen Fälle mit GnRH- Antagonisten oder „Short“-Protokoll bleiben im Folgenden außer Betracht.

Im Vorzyklus wurde ein orales Kontrazeptivum verabreicht. Ungefähr 14 Tage nach Beginn der GnRH-Agonisten Behandlung wurde mit der Gonadotropinstimulation begonnen.

Das Follikelwachstum wurde regelmäßig mittels Ultraschall und dem Plasma-Östradiolspiegel überwacht.

Die Ovulation wurde per HCG- Injektion (Predalon 10.000 IE) gezielt ausgelöst, wenn der Leit-Follikel eine Größe von mindestens 18 mm erreicht hatte.

Die Lutealphase wurde mit zusätzlichen HCG- Injektionen und Progesterontabletten oder Vaginalkapseln (3 x 2 Kapseln zu 100 mg tgl. für 14 Tage) unterstützt.

3.3 Follikelpunktion und Inkubation

Die Follikelpunktion erfolgt 36 Stunden nach der HCG-Gabe; etwa ein bis zwei Stunden vor der erwarteten Ovulation; und in Ham's F10- Medium asserviert.

Die Follikelpunktion erfolgte transvaginal sonographisch gesteuert (unter Analgo-Sedierung) oder seltener durch eine Bauchspiegelung.

Im Operationsraum kann dann sofort geprüft werden, ob die Follikelflüssigkeit eine Eizelle enthält. Die Oozyten werden in Petrischalen mit Kulturmedium umgesetzt und verbleiben bis zur Insemination im Brutschrank. Sie werden mikroskopisch beurteilt bevor die Insemination mit Spermien durchgeführt wird.

3.4 Praktisches Vorgehen bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI)

Zur Durchführung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) ist eine Entfernung der Kumulus- sowie der Corona-radiata- Zellen notwendig. Dies geschieht durch Inkubation in einer Hyaluronidase- Lösung (80 IE/ml). Die Hyaluronidase entfernt die Kumuluszellen nach einigen Minuten von den

Eizellen und können mit einer feinen Glaspipette vollständig abgetrennt werden. Dieser Präparationsschritt macht eine direkte Beurteilung des Reifestadiums der Oozyten sowie der Beschaffenheit des Zytoplasmas, der Zona pellucida, und des Polkörperchens möglich, sodass bei der Durchführung der ICSI eine genaue Beurteilung der Oozytenqualität vorgenommen werden kann.

Dann wird in alle reifen Eizellen je einem Spermium des Partners 4-6 Stunden nach der Gewinnung injiziert.

Die Aufbereitung des Spermias erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation.

Für die Mikroinjektion (ICSI) einzelner Spermien wird ein Mikromanipulationssystem (Fa. Narishige) verwendet. Sie erfolgt unter Kontrolle mittels eines Phasenkontrastmikroskops (Fa.. Nikon). Das zu injizierende Spermium wird mit der Spitze der Injektionspipette durch Verletzung der Geißel im Zentraltropfen immobilisiert.

Nachdem die Eizellen mehrmals im Kulturmedium gewaschen werden folgt eine Inkubation von 18- 20 Stunden bei 37° C unter 5% CO₂ Begasung. Die Fertilisation wird dann durch das Vorhandensein von zwei Vorkernen bestätigt.

Im Vorkernstadium werden bis zu drei Eizellen randomisiert separiert, die sich im Brutschrank zu Embryonen weiterentwickeln, bevor sie am Folgetag in die Gebärmutter transferiert werden.

Die restlichen befruchteten Eizellen werden je nach Wunsch der Patientin entweder eingefroren oder vernichtet, bevor die Vorkerne verschmolzen sind.

3.5 Technisches Vorgehen bei der Kryokonservierung von Eizellen im Vorkernstadium

Als Gefrierschutzmittel wurde in der vorliegenden Studie PBS (Biochrom) mit Penicillin, Streptomycin, Sucrose sowie 1,2 Propandiol (PROH) in einer Konzentration von 1,5 Mol benutzt. Als Gefrierbehälter dienten Minipailletten der Fa MTG.

Das Einfrieren erfolgte im Drei-Stufen-Verfahren.

Im **ersten Schritt** wurden die Zellen von +20°C mit einer Geschwindigkeit von 2°C/min auf -7° C abgekühlt. Diese Temperatur wurde zehn Minuten gehalten, um ein problemloses Seeding zu gewährleisten. Das Seeding erfolgt durch Berührung der Gefäßwand der Tiefgefrierpailletten mit den Branchen einer in flüssigem Stickstoff abgekühlten Pinzette. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Nukleationsstelle frei von Oozyten ist, ansonsten bilden sich wegen der starken Unterkühlung an dieser Stelle innerhalb der dort befindlichen Eizellen unerwünschte bzw. zellschädigende Kristalle aus.

Zweiter Schritt: Die Pronuclei wurden mit einer Geschwindigkeit von 0,3°C /min auf -30°C abgekühlt.

Im dritten Schritt werden die Pailletten von -30°C bis -175°C abgekühlt und anschließend in einem Hänger in flüssigen Stickstoff bei (-196°C) getaucht und gelagert

Verwendete Gefrierschutzmittel und Gefrierpuffer

a Gefrierlösung

Lösung 1: 100ml PBS -(Dulbecco Phosphat Buffer Saline)

Lösung 2: 1.5 M, 1,2 Propandiol in PBS.

(86.3 ml PBS+ 13.7 ml Propandiol (Propylenglycol, 1.5M))

Lösung 3: 1.5 M, 1,2 Propandiol und 0.1M Sucrose

(86.3 ml PBS + 13.7 ml Propandiol + 4.2 g Sucrose)

Jede Lösung wurde mit 10% inaktiviertem Patientenserum verdünnt

b Schrittweises Vorgehen

- 1.- Mechanische Entfernungen der Granulosazellen bei Pronucleusstadien nach IVF.
- 2.- Äquilibration bei Raumtemperatur für 10 Minuten in Einfrierlösung 1.
- 3.- Äquilibration bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei Einfrierlösung 2.
- 4.- Äquilibration bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei Einfrierlösung 3 und Einfüllen (jede Eizelle) in eine Paillette mit Gefrierlösung 3. und schließen mit einer Metallkugel oder einem Stöpsel.
- 5.- Einbringen der Pailletten in einem Hänger senkrecht in der Einfrierapparatur (Planer10 Fa. Messer Griesheim) im automatisierten offenen System.
- 6.- Das Einfrierprogramm wird dann innerhalb von 5. Minuten gestartet: (Stufen- Verfahren)
 - a. Abkühlung um $2^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ von Raumtemperatur bis -7°C
 - b. Seeding und Konstanthalten der Temperatur bei -7°C für 10 min.
 - c. Abkühlung um $0.3^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ bis -30°C .
 - d. Abkühlung um $20^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ bis unter -175°C .
- 7.-Anschließend werden die Pailletten direkt in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt. Die Lagerzeit ist für maximal. 12 Jahre gedacht.

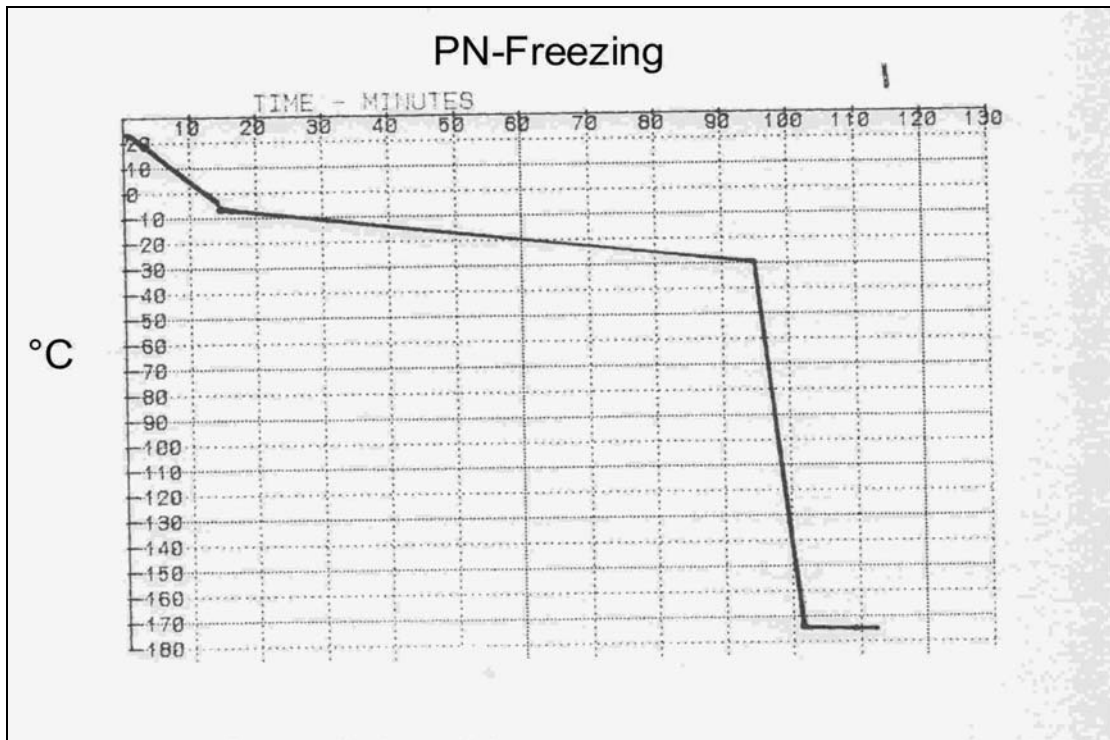


Abb. 7 Gefrierschema für „langsames“ Einfrieren (Original-Ausdruck)

Auftauverfahren

a Verwendetes Auftau- Medium

Auftaulösung 1: 1M 1,2-Propandiol, 0,2 M Sucrose in PBS + 10% Patientenserum

(90.0 ml PBS + 9.1 Propandiol + 8.2 g Sucrose)

Auftaulösung 2: 0.5M 1,2 Propandiol, 0.2 M Sucrose in PBS + 10% Patientenserum

(Mischung aus Lösung 1 und Lösung 3 im Verhältnis 1:1).

Auftaulösung 3: 0.2M Sucrose in PBS + 10% Patientenserum

(100ml PBS + 8.2 g Sucrose)

b Schrittweises Vorgehen

- 1. Überführung der Röhrchen (Pailletten) in eine Kanne mit flüssigem Stickstoff.
- 2. Auftauen des Röhrchens in Raumluft über 30 Sekunden
- 3. Eintauchen des Röhrchens in ein 30°C warmes Wasserbad über 30 Sekunden bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle

- **4.** Öffnen des Röhrchens durch Entfernen des Stöpsels und Aufschneiden der anderen Seite des Röhrchens.
- Unmittelbar nach dem Auftauen der Minitubes wird der Pailletteninhalt in eine Petri-Schale gegeben. Dann, um die Zellen zu rehydrieren, werden sie schrittweise in Einfriermedien mit abnehmender Gefrierschutzmittelkonzentrationen gegeben und nach jeweils 5- minütiger Äquilibrierung bei Raumtemperatur ausverdünnt.
- **5.** Eizellen in Gefrier-Puffer- Auftaulösung 1 und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten.
- **6.** Transfer zur Auftaulösung 2, Inkubation für 5 Minuten.
- **7.** Inkubation in Auftaulösung 3, Inkubation für 5 Minuten.
- **8.** Überführung in PBS und Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten.
- **9.** Die Imprägnierten Oozyten werden unter dem Stereomikroskop untersucht und ihre Vitalität beurteilt. Zellen, die den Prozess des Auftauens und Einfrierens überlebt haben werden in äquilibriertes Kulturmedium überführt und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24-48 Stunden bis zum Embryotransfer kultiviert.
- **10.** Nach einer nochmaligen Untersuchung werden die intakten Oozyten im PN- oder im 2- oder 4-Zellstadium oder mehr im spontanen oder vorbehandelten Zyklus transzervikal in die Gebärmutter übertragen. Es werden maximal drei Embryonen transferiert. Zum Zeitpunkt des Kryoembryotransfers wird die Qualität der Embryonen dokumentiert.

3.6 Vorbereitung des Zyklus zum Kryotransfer

Ovulatorische Zyklen mit einer Länge von 26 bis 35 Tagen wurden unverändert zum Transfer genutzt.

Bei anovulatorischem Zyklen oder bei einer Oligomenorrhoe wurde Clomifen vom 3. – 8. Zyklustag gegeben und fallweise am Ovulationszeitpunkt HCG (5000IE) i.m. injiziert. Alternativ wurde auch mit niedrigen Dosen von HMG oder FSH und HCG stimuliert. Der Transfer wurde jeweils am vierten Tag nach dem LH-Peak oder nach der HCG- Gabe durchgeführt.

Bei Frauen mit Amenorrhoe oder sonstigen schweren Zyklusstörungen wurde folgendes Schema angewendet:

- **1. Downregulation** mit GnRH- Analoga begonnen am 20. Zyklustag im Vorzyklus.
- **2. Beginn der Stimulation** im Folgezyklus ca. 14 Tage später mit Östradiolvalerat (z.B. Progynova) in ansteigender Dosierung
 - Tag 1-5 2x1 Tbl. Östradiolvalerat
 - Tag 6-14 4x1Tbl. Östradiolvalerat
 - Tag 15 bei einer Endometriumsdicke von >8 mm Gabe von Progesteron (Utrogest)- Vaginalkapsel à 100 mg 3x2 Kapsel täglich fortlaufend.
 Am ersten Tag der Progesterongabe werden die PN-Zellen aufgetaut, Östradiolvalerat weiterhin 4 x 1 Tabl. täglich.

- 3. Bei nicht adäquater Endometriumsdicke **Verlängerung** der Proliferationsphase.
- 4. Der **Embryotransfer** erfolgt meist am Tag nach dem Auftauen.
- 5. 12 und 14 Tage nach dem Embryotransfer erfolgt die Blutabnahme zur **HCG- Kontrolle**.

3.7 Embryotransfer

Nach 24-stündiger Kultivierung der aufgetauten PN-Stadien werden diese, nachdem sie sich zum 2- oder 4-Zellstadium entwickelt haben, in einen sehr dünnen Katheter aufgenommen und durch einen dickeren Katheter, der vorher durch die Vagina und Zervix bis zum Cavum uteri geschoben wurde, unter sterilen Kautelen in das Cavum uteri gegeben (Embryo-Transfer Katheter-Set der Fa. Labotect, Göttingen).

3.8 Statistische Methoden

Das Patientenkollektiv mit allen Parametern wurde mit einer Excel-Tabelle erfasst. Die zur Darstellung einzelner Parameter nötigen Tabellen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 10 erstellt und mit MS Excel die Graphiken gebildet.

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.

Die statistische Auswertung erfolgte wiederum mit SPSS unter Nutzung des Chi-Quadrat-Tests (Fisher-Test) für Kreuztabellen und des Boxplot-Tests zum Vergleich von Mittelwerten. 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 0,01 wurde als statistische Tendenz gewertet.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss verschiedener biologischer und klinischer Faktoren auf die Ergebnisse, die mit der Kryotechnik mit menschlichen Eizellen erzielt wurden. Die Eizellen wurden befruchtet und im Pronucleus- Stadium eingefroren. Die mittlere Lagerzeit in dieser Studie betrug 270 Tage. Es wurden durchschnittlich 3,2 Zellen zur weiteren Kultivierung aufgetaut. Diese Ergebnisse nach Kryotransfer werden in den Kapiteln 4.1. bis 4.8. dargestellt. Im Kapitel 4.9. werden ausgewählte Ergebnisse nach Kryotransfer mit den entsprechenden Ergebnissen nach Primärtransfer verglichen

Es wurden nur die Behandlungszyklen ausgewertet, bei denen Eizellen im PN- Stadium auch tatsächlich aufgetaut, kultiviert und transferiert wurden. Die Fälle, bei welchen die kryokonservierter Zellen noch nicht aufgetaut, oder auf Wunsch des Paares verworfen worden sind, wurden hier nicht berücksichtigt.

Bei 431 Behandlungszyklen (Ovarstimulationen) wurden 5496 Eizellen gewonnen, 3456 befruchtet, 890 primär transferiert und dabei 104 Schwangerschaften erzielt. 2494 Zellen wurden im PN-Stadium eingefroren, 1714 aufgetaut und 1150 sekundär transferiert. Ein Kryotransfer fand insgesamt bei 539 Behandlungszyklen statt. (Tab.1a und 1b)

Dabei wurden 56 Schwangerschaften erzielt, das sind im Mittel 10,4% pro Transfer oder 13,0% pro Punktion.

4.1 Alter der Patientinnen

Es wurde untersucht ob das Alter der Patientin einen Einfluss auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate hat.

Die Patientinnen wurden in vier Altersgruppen eingeteilt:

- GI ≤ 30Jahre
- GII 31-35 Jahre
- GIII 36-40 Jahre
- GIV >40 Jahre

Tab. 2 Altersabhängige Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate bei Patientinnen, die anschließend auch einen Kryotransfer erhielten.

| Altersabhängige Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten | | | | | |
|--|-----------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| Altersgruppen | GI ≤30 J | GII 31-35 J | GIII 36-40 J | GIV >40 J | Total |
| Punktionszyklen N | 132 | 206 | 89 | 4 | 431 |
| Gewonnene Eizellen. M± SD | 13,28±5,32 | 12,89±6,03 | 11,58±4,15 | 14,25±6,8 | 12,75±5,49 |
| Gewonnene Eizellen N | 1753 | 2655 | 1031 | 57 | 5496 |
| Befruchtete Eizellen M± SD | 8,23±3,71 | 8,03±3,73 | 7,65±2,89 | 8,25±3,59 | 8,02±3,56 |
| Befruchtete Eizellen N | 1087 | 1655 | 681 | 33 | 3456 |
| Befruchtungsrate % | 62,0% | 62,3% | 66,1% | 57,9% | 62,9% |
| Kryozyklen N | 165 | 249 | 113 | 12 | 539 |
| Eingefrorene PN M± SD | 6,11±4,05 | 5,79±3,7 | 5,3±3,02 | 5,75±4,11 | 5,79±3,69 |
| Eingefrorene PN N | 806 | 1193 | 472 | 23 | 2494 |
| Transferierte Emb. M± SD | 2,12±0,68 | 2,08±0,76 | 2,28±0,66 | 1,08±0,85 | 2,13±0,72 |
| Transferierte Emb. N | 349 | 535 | 253 | 13 | 1150 |
| Schwangerschaften N | 16 | 28 | 12 | 0 | 56 |
| Schwangerschaft % Trans | 9,7% | 11,2% | 10,6% | 0,0% | 10,4% |

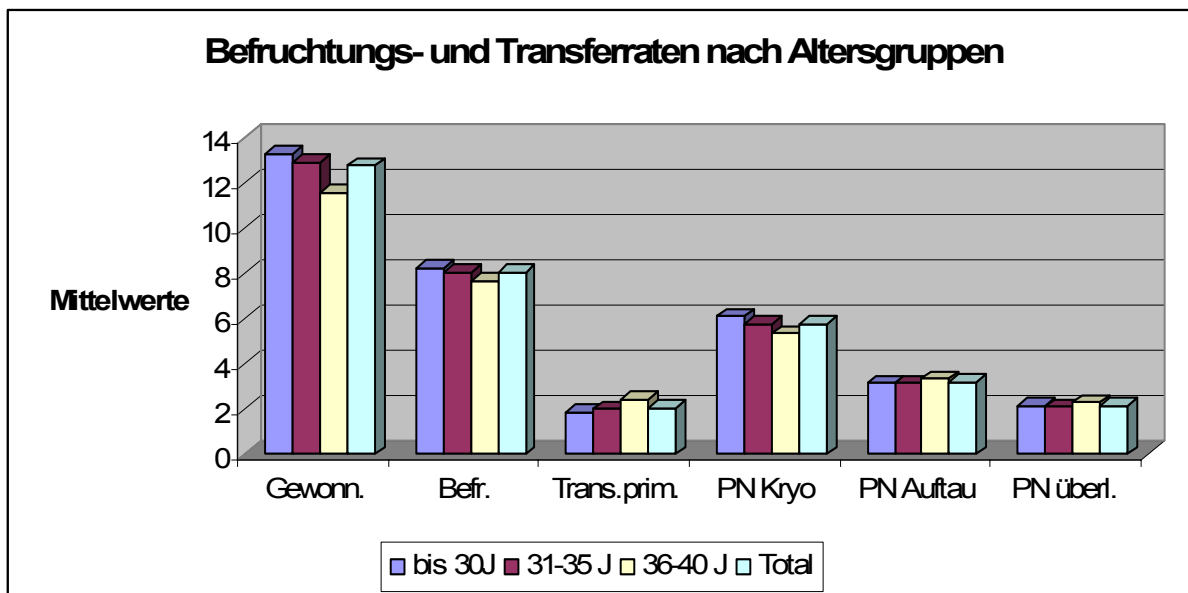


Abb. 8 Zusammenhang zwischen Alter der Patientin und gewonnenen, befruchteten, eingefrorenen (PN Kryo), wieder aufgetauten (PN Auftau) Eizellen und überlebenden = transferierten Embryonen. Verglichen wurden die Mittelwerte.

Aus Tabelle 2, besonders anschaulich aber aus Abbildung 8, geht hervor, dass zwischen den einzelnen Altersgruppen kein großer Unterschied in Bezug auf Befruchtungsrate und Transfer besteht. Auch in der Altersgruppe über 40 Jahren konnte überraschenderweise eine gleiche Transferrate erzielt werden wie in den jüngeren Altersgruppen, eine Erklärung hierfür ist die geringe Zahl von Patientinnen in dieser Gruppe (4), von welchen bei zwei nach Überstimulation besonders viele Eizellen punktiert und befruchtet werden konnten (19 bzw. 21 Zellen), was natürlich eine erhebliche Auswirkung auf den Durchschnitt dieser Gruppe hat. Was die Befruchtungsrate betrifft besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen ($p=0,720$).

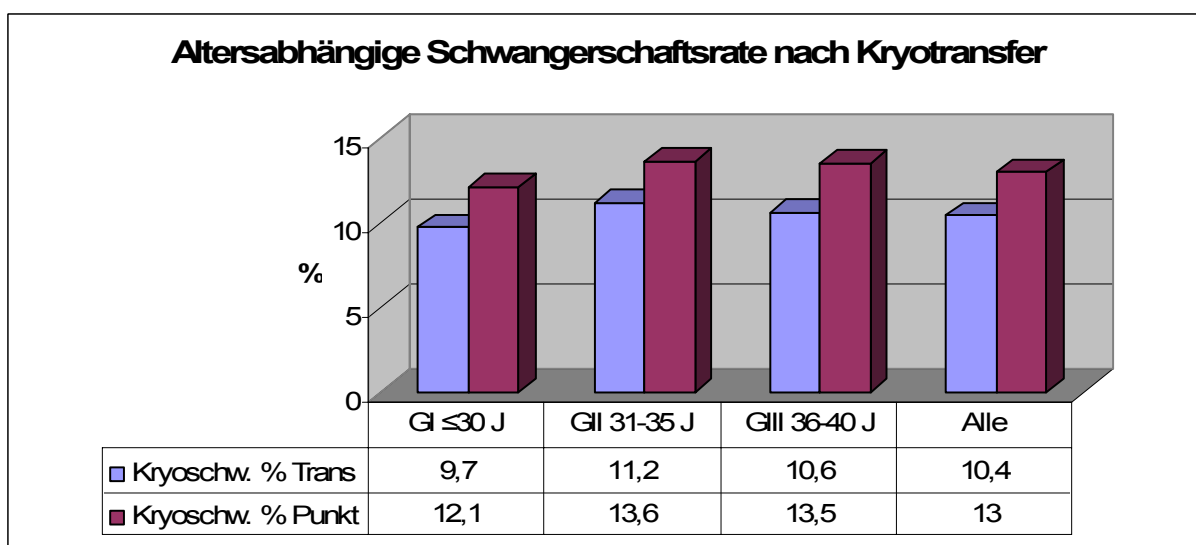


Abb. 9 Schwangerschaftsrate nach Altersgruppen bezogen auf alle Kryotransferzyklen (Kryoschw. % Trans) oder auf die Anzahl der Punktionszyklen (Kryoschw. % Punkt)

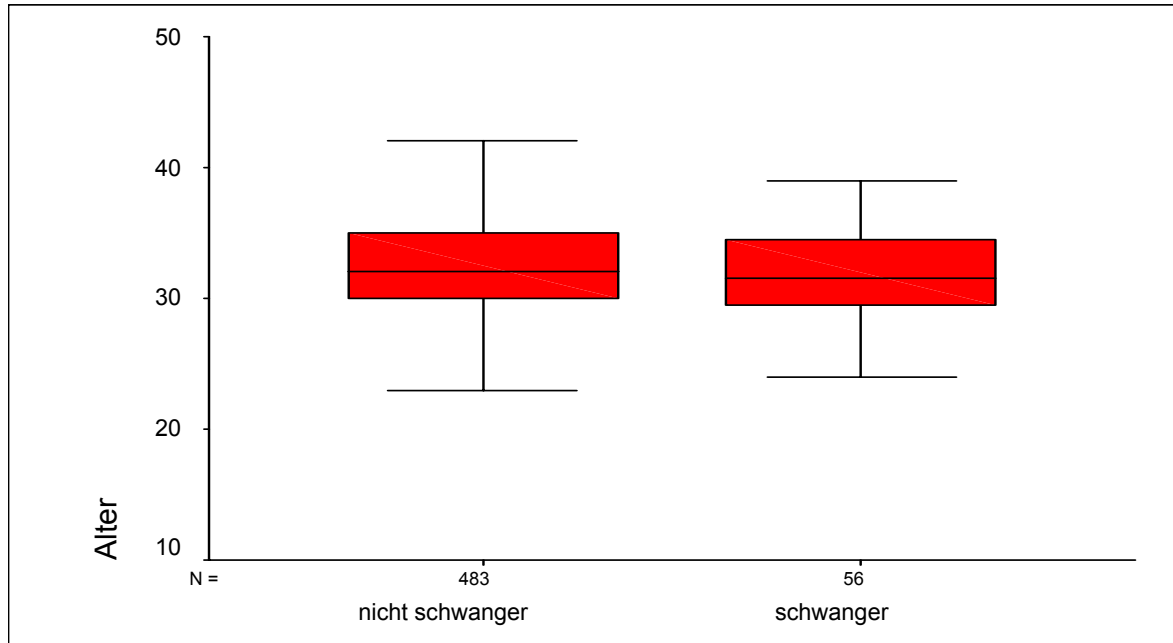


Abb. 10 Altersvergleich schwangerer und nicht schwangerer Frauen über das gesamte Alter berechnet

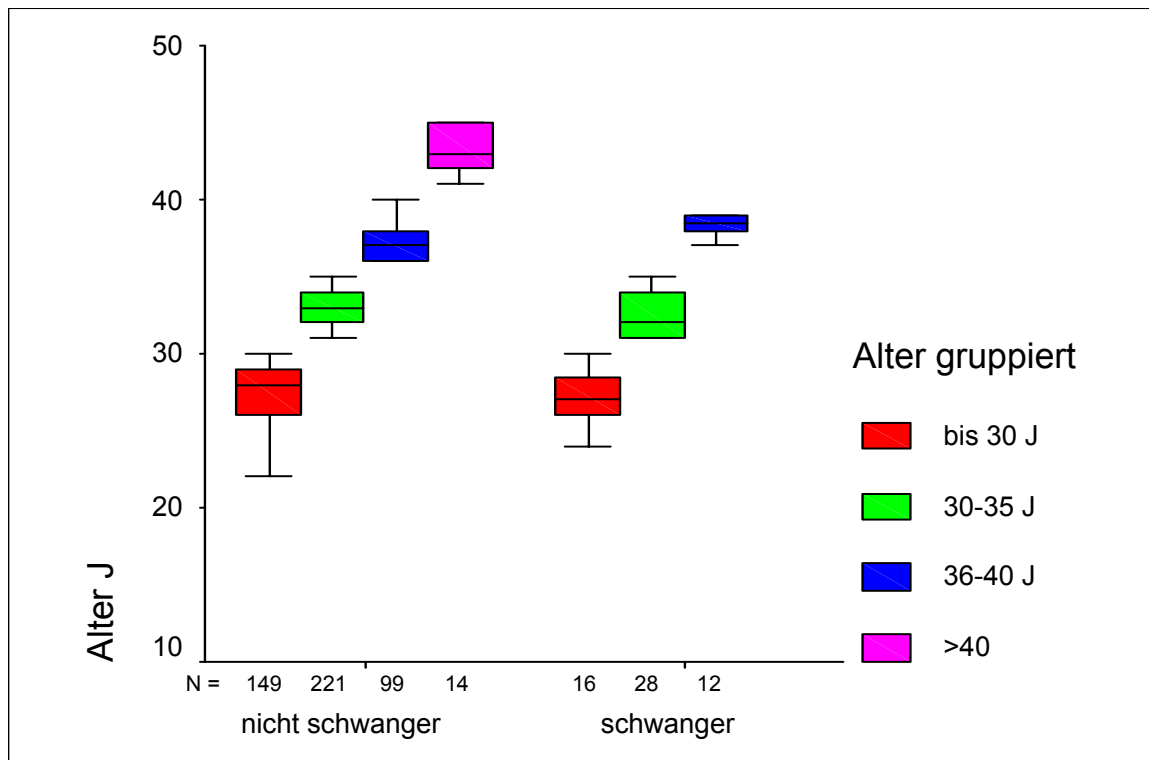


Abb. 11 Altersvergleich schwangerer und nicht schwangerer Frauen in Altersgruppen aufgeschlüsselt.

Der Altersmedian der schwangeren Frauen unterscheidet sich statistisch nicht signifikant vom Altersmedian aller behandelten Frauen (Abb.10), auch in den Untergruppen GI bis GIV nicht (Abb.9 und Abb.11), abgesehen davon, dass in der Gruppe >40 J keine Schwangerschaft erzielt werden konnte. Bezieht man die Schwangerschaftsrate auf die Gesamtzahl der Kryotransferzyklen, so ergibt sich für alle Altersgruppen zusammen eine solche von 10,4%, bezieht man sie auf die Anzahl der Punktionszyklen, dagegen 13%.

Auch bezüglich der Schwangerschaftsrate besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen. ($p=0,64$)

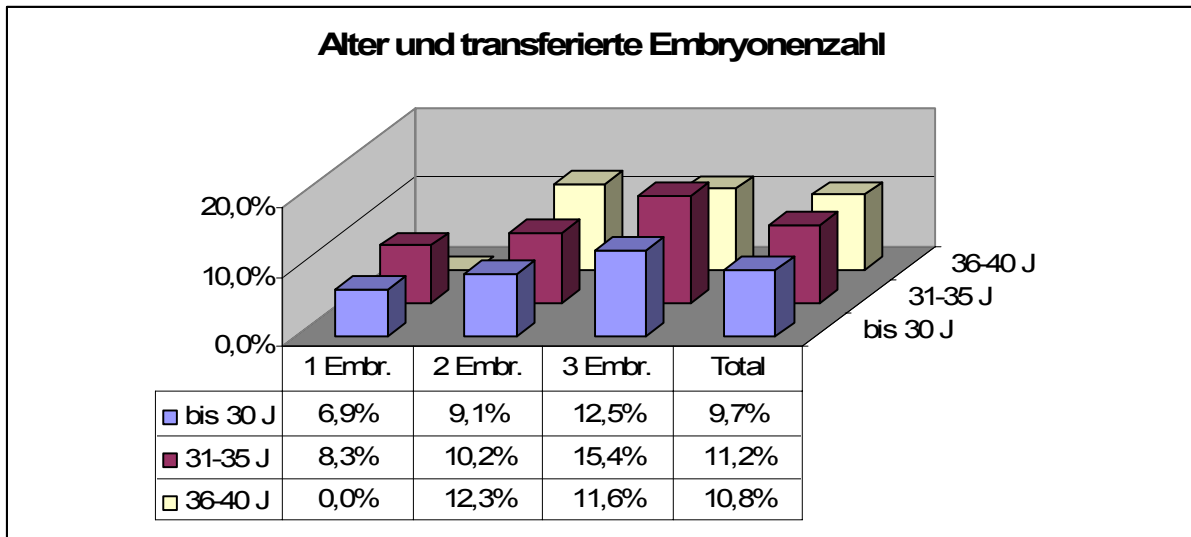


Abb. 12 Schwangerschaftsrate in Prozent in verschiedenen Altersstufen je nach transferierter Embryonenzahl.

Wenn man in der Altersstatistik auch noch die Anzahl der transferierten Embryonen berücksichtigt (Abb.12) ergibt sich für die Altersgruppen bis 35 Jahre ein Anstieg der Schwangerschaftsrate mit zunehmender Embryonenzahl (8,3% - 10,2% - 15,4%), der jedoch bei der Altersgruppe 36 bis 40 Jahren nicht sichtbar ist. In der Altersgruppe über 40 Jahren wurde, allerdings bei geringer Fallzahl, nach einem Kryotransfer keine Schwangerschaft erzielt.

4.2 Sterilitätsursachen

4.2.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Die Sterilitätsursachen wurden in vier Gruppen unterteilt:

- 1. Männliche Ursache
- 2. Weibliche Ursache
- 3. Beiderseitige Ursache
- 4. Idiopathische Sterilität

Tab. 3 Geschlechtsspezifische Sterilitätsursachen: Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten.

Geschlechtsspezifische Sterilitätsursachen

| | Männl. Urs. | Weibl. Urs. | Beide | idiopatisch | insgesamt |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------------|------------------|
| Behandlungszyklen N | 181 | 141 | 75 | 34 | 431 |
| Gewonnene Eizellen M±SD | 13,09±5,55 | 13,03±5,89 | 12,11±5,27 | 11,21±3,4 | 12,75±5,49 |
| Gewonnene Eizellen N | 2370 | 1837 | 908 | 381 | 5496 |
| Befruchtete Eizellen M±SD | 7,49±2,8 | 9,08±4,43 | 7,17±3,17 | 8,32±2,94 | 8,02±3,56 |
| Befruchtete Eizellen N | 1355 | 1280 | 538 | 283 | 3456 |
| Befruchtungsrate % | 57,2% | 69,7% | 59,3% | 74,3% | 62,9% |
| Kryo-Zyklen N | 200 | 187 | 105 | 47 | 539 |
| Eingefrorene PN M±SD | 5,2±2,91 | 6,79±4,65 | 5,33±3,47 | 5,74±2,4 | 5,79±3,69 |
| Eingefrorene PN N | 942 | 957 | 400 | 195 | 2494 |
| Aufgetaute PN MW±SA | 3,19±1,05 | 3,20±1,21 | 3,1±1,02 | 3,21±0,95 | 3,18±1,09 |
| Aufgetaute PN N | 638 | 599 | 326 | 151 | 1714 |
| Transferierte Emb. M±SD | 2,19±0,72 | 2,16±0,75 | 2,08±0,63 | 1,94±0,73 | 2,13±0,72 |
| Transferierte Emb. N | 437 | 404 | 218 | 91 | 1150 |
| Schwangerschaft en N | 19 | 23 | 7 | 7 | 56 |
| Schwangerschaftsrate % | 9,5% | 12,3% | 6,7% | 14,9% | 10,4% |

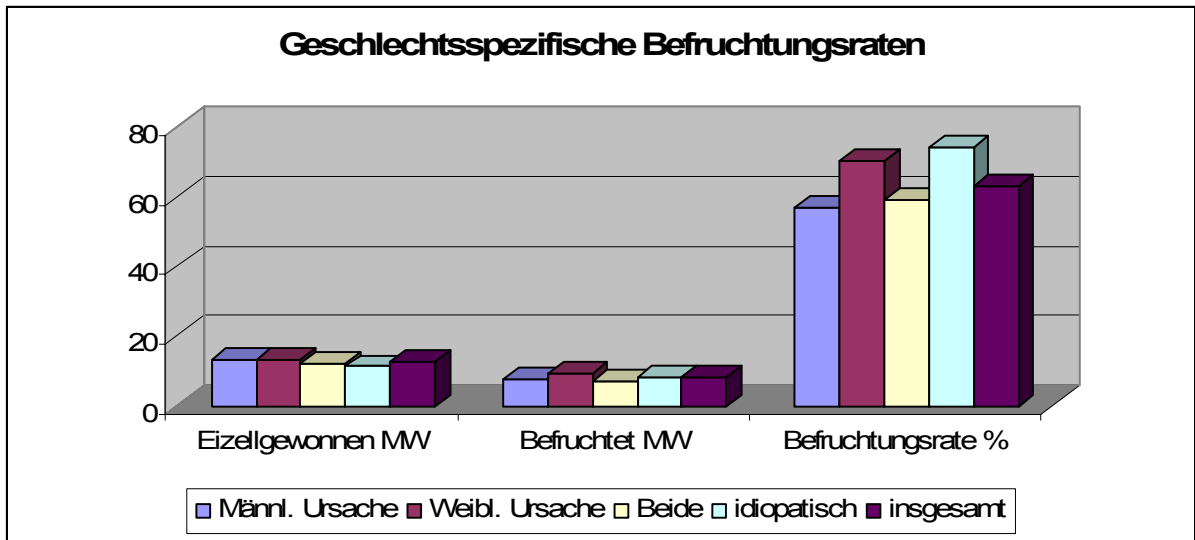


Abb. 13 Geschlechtsspezifische Befruchtungsraten.

Aus Tabelle 3 ist ablesbar, dass bezüglich gewonnener Eizellen, befruchteter Eizellen, Auftaure und Transfer von Embryonen kein Unterschied darin besteht ob die Sterilitätsursache beim Mann, bei der Frau, bei beiden oder ob sie idiopathisch ist. Aus Abbildung 13 geht hervor, dass die Befruchtungsrate bei weiblicher und idiopathischer Ursache etwas höher war als bei männlicher oder wenn beide betroffen waren. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p=0,674$).

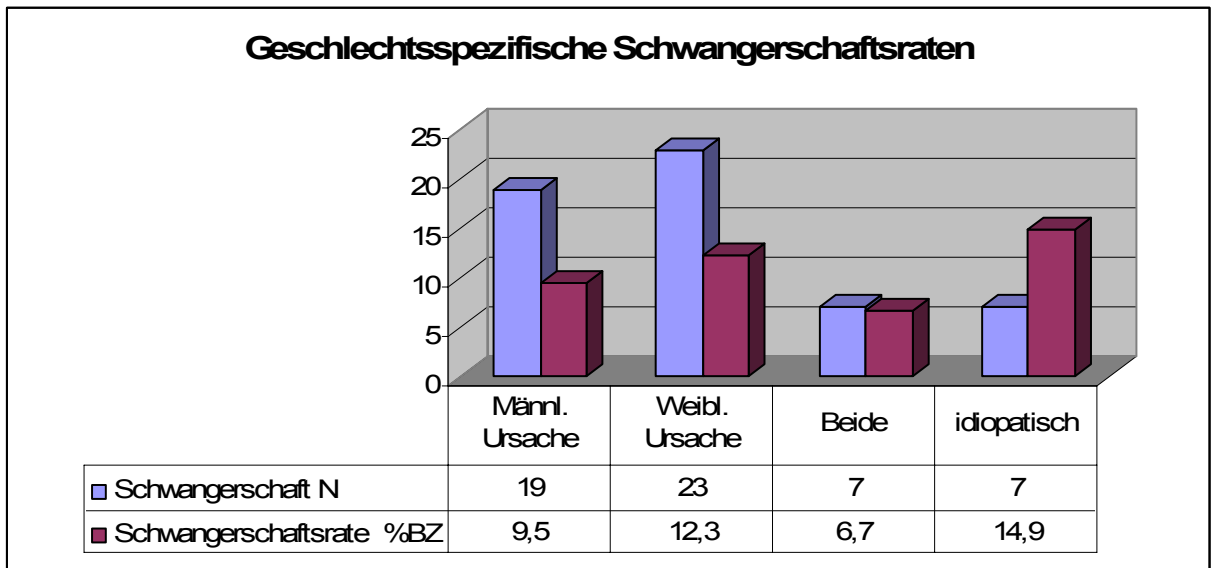


Abb. 14 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Schwangerschaftsrate bezogen auf Behandlungszykle (BZ)

Auch die Schwangerschaftsrate (Abb.14) unterscheidet sich nicht signifikant zwischen männlicher und weiblicher Ursache ($p=0,322$).

4.2.2 Weibliche Ursachen

Die Sterilitätsursachen bei der Frau lassen sich in zwei große Gruppen einteilen: Organische Ursachen und funktionelle Ursachen, das sind im Wesentlichen Zyklusstörungen oder sonstige hormonelle Störungen.

4.2.2.1 Organische Ursachen

Die häufigsten organischen Ursachen waren:

1. Tubenfaktor (74,0 %)
2. Endometriose (19,8%)
3. Uterine Ursachen (6,2 %)

Unter „uterine Ursachen“ fallen Uterus myomatosus, Uterusanomalien und der Cervixfaktor. Hierbei handelt es sich um anatomische Defekte (Cervixstenose) sowie um funktionelle Störungen wie mangelhafte Sekretion, Infektion, Sperma- Antikörper und kombinierte Ursachen.

Tab. 4 Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten für die verschiedenen organischen Sterilitätsursachen bei der Frau

| Organische Sterilitätsursachen bei der Frau | | | |
|--|---------------------|---------------------|--------------------|
| | Endometriose | Uterine Urs. | Tubare Urs. |
| Punktions-Zyklen N | 32 | 10 | 120 |
| Gewonnene Eizellen N | 382 | 113 | 1462 |
| Gewonnene Eizellen M \pm SD | 11,94 \pm 5,32 | 11,3 \pm 4,88 | 12,18 \pm 5,45 |
| Befruchtete Eizellen N | 244 | 80 | 995 |
| Befruchtete Eizellen M \pm SD | 7,62 \pm 3,29 | 8,0 \pm 2,54 | 8,29 \pm 3,91 |

| | | | |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Befruchtungs- Rate % | 63,87% | 70,79% | 68,06% |
| Kryozyklen N | 38 | 17 | 154 |
| Eingefrorene PN N | 210 | 75 | 870 |
| Eingefrorene PN M±SD | 5,53±3,7 | 5,0±2,98 | 5,65±3,86 |
| Aufgetaute PN N | 124 | 46 | 491 |
| Aufgetaute PN M±SD | 5,53±3,7 | 2,71±1,40 | 3,19±1,12 |
| Überlebende PN N | 82 | 30 | 333 |
| Überlebende PN M±SD | 2,16±0,68 | 1,76±0,44 | 2,16±0,75 |
| Überlebensrate % | 66,12% | 65,22% | 67,82% |
| Schwangerschaften N | 6 | 2 | 17 |
| Schwangerschaftsrate % | 15,79 | 11,76 | 11,04 |

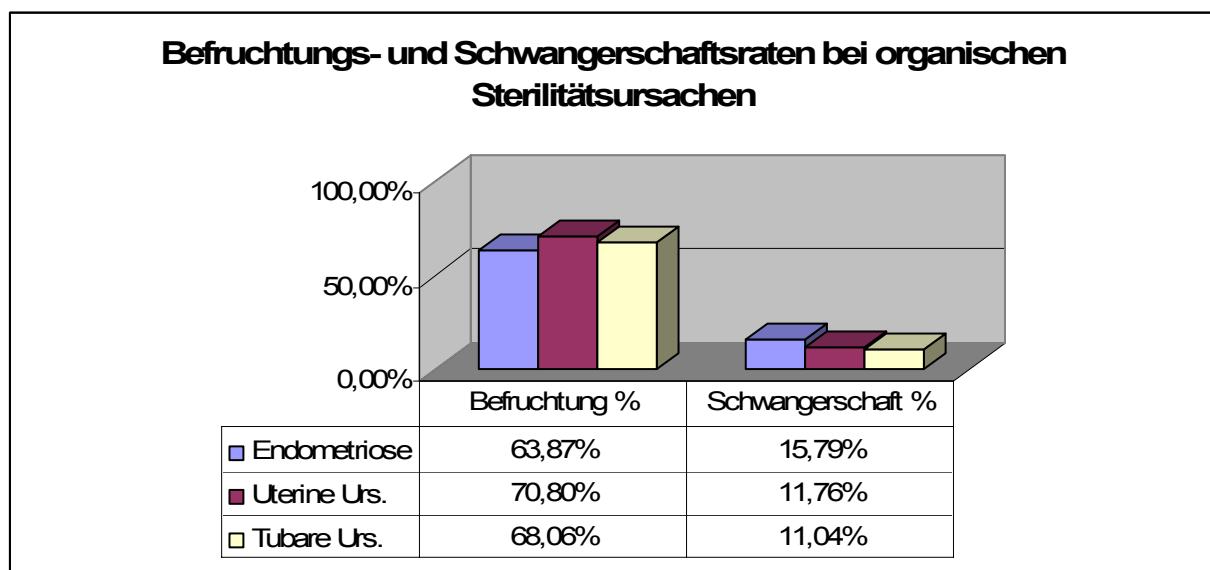


Abb. 15 Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten der größten Gruppen der verschiedenen weiblichen organischen Sterilitätsursachen

Aus Tabelle 4 und Abbildung 15 geht hervor dass die Befruchtungsraten bei den verschiedenen organischen Erkrankungen der Frauen sehr ähnlich waren und keine statistisch signifikanten Unterschiede aufwiesen ($p=0,858$). Die Schwangerschaftsrate war bei Frauen mit Endometriose am höchsten

(15,8%) und entsprach bei dem großen Kollektiv mit tubarer Sterilität (11,04%) etwa dem Mittelwert aller Behandlungsfälle (10,39%) (P=0,651).

4.2.2.2 Hormonelle Ursachen

Diese ließen sich einteilen in:

- 1. Hypogonadotrope Amenorrhoe
- 2. Relative hypergonadotrope Werte (FSH \geq 9mIE/ml)
- 3. Hyperprolaktinämie
- 4. Hyperandrogenämie und PCO-Syndrom

Tab. 5 Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate bei hormonellen Sterilitätsursachen

| Hormonelle Sterilitätsursache bei der Frau | | | | |
|--|------------|------------------------|-----------------|------------|
| | Hypog. Am. | Relat. hypergon. Werte | Hyperprolaktin. | PCO-Synd. |
| Behandlungszyklen N | 4 | 3 | 10 | 33 |
| gewonnene Eizellen M \pm SD | 18,25+6,65 | 15,67+7,56 | 12,9+2,96 | 15,61+7,2 |
| Gewonnene Eizellen N | 73 | 47 | 129 | 515 |
| Befruchtete Eizellen M \pm SD | 11,75+5,32 | 9,0+4,0 | 7,0+1,89 | 10,03+5,86 |
| Befruchtete Eizellen N | 47 | 27 | 70 | 331 |
| Befruchtungsrate % | 64,38% | 57,45% | 54,26% | 64,27% |
| Kryo-Zyklen N | 6 | 5 | 9 | 53 |
| Eingefrorene PN M \pm SD | 8,17+3,76 | 5,0+7,0 | 4,56+1,94 | 7,21+5,22 |
| Eingefrorene PN N | 38 | 20 | 41 | 283 |

| | | | | |
|-----------------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| Transferierte Emb. M± SD | 2,3+0,52 | 2,0+0,71 | 2,11+0,78 | 2,09+0,63 |
| Transferierte Emb. N | 14 | 10 | 19 | 111 |
| Schwangerschaften N | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Schwangerschaftsrate % | 0 | 0 | 22,2% | 3,8% |

Bei 73 Frauen mit funktionell (= hormonell) bedingter Sterilitätsursache stellt die Gruppe mit PCO-Syndrom mit 33 Fällen die weitaus größte dar, gefolgt von Hyperprolaktinämie (10 Fälle) und hypogonadotroper Amenorrhoe (4 Fälle). Die 2 Fälle mit adrenaler Hyperandrogenämie zeigten am Ovar keine Auffälligkeiten, weshalb sie nicht ins PCO-Syndrom eingegliedert wurden. Andererseits finden sich in der PCO Gruppe Virilisierungen und Hyperandrogenämie in unterschiedlicher Ausprägung, allerdings immer vergesellschaftet mit dem typischen Bild des PCO Syndroms am Ovar und entsprechende Laborwerte. Die Frauen mit Hyperprolaktinämie wurden mit einem Prolaktinhemmer behandelt, stellte sich trotz normalem Prolaktinspiegel keine Schwangerschaft ein, folgte die Aufnahme ins ART-Programm (meist begleitet mit anderen Sterilitätsursachen).

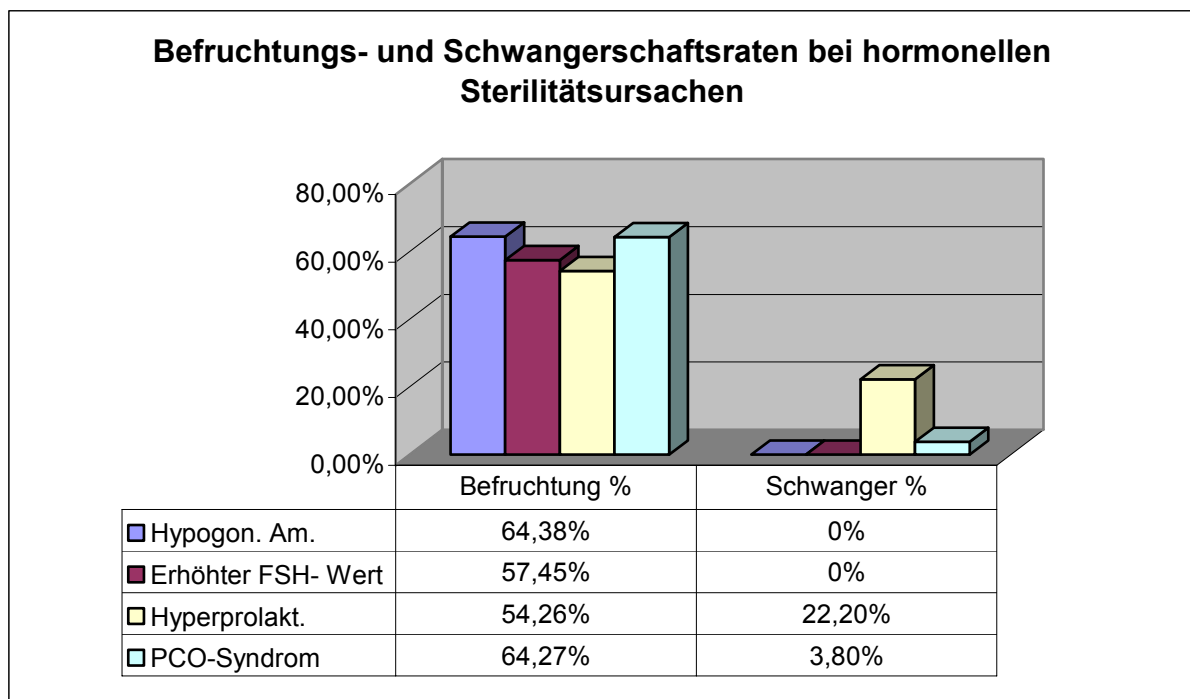


Abb. 16 Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten bei hormonellen Sterilitätsursachen

Innerhalb der hormonellen Gruppe (Abb.16) zeigte sich eine gute Schwangerschaftsrate (22,2 Prozent) bei den Frauen mit Hyperprolaktinämie. Die Frauen mit PCO Syndrom wiesen jedoch nur eine

solche von 3,8 Prozent auf (2 Schwangerschaften bei 53 Behandlungszyklen). Zu den anderen Gruppen ist wegen der kleinen Fallzahl keine Aussage möglich.

Wie aus den Tabellen 4 und 5 und den Abb. 15 und 16 hervorgeht konnten bei den Frauen mit hormoneller Sterilitätsursache durchschnittlich etwas weniger Eizellen befruchtet werden als bei Frauen mit organisch bedingter Sterilität. Die Schwangerschaftsrate war bei Frauen mit organisch bedingter Sterilität (11,04% bis 15,79%) etwas höher als der Durchschnitt aller Behandlungsfälle (10,39%), bei hormonell bedingter Sterilität sehr unterschiedlich und wegen der geringen Fallzahl einzelner Gruppen nicht vergleichbar ($p=0,248$)

4.3 Primäre und sekundäre Sterilität

Von primärer Sterilität spricht man, wenn bei einer Frau, bevor sie die Sterilitätssprechstunde aufsuchte, noch nicht schwanger war.

Von sekundärer Sterilität spricht man dann, wenn sie in der Vergangenheit schon einmal schwanger gewesen ist. Die sekundäre Sterilität wurde noch weiter unterteilt, nämlich nach Unterscheidung zwischen einer Spontanschwangerschaft und der Schwangerschaft nach assistierter Reproduktionstechnik (ART).

Wenn also eine Frau im Laufe der Behandlung durch die ART-Behandlung einmal schwanger geworden war, wurde sie als „schwanger nach ART“ geführt. Im ersten Teil dieses Kapitels wird die sekundäre Sterilität nicht aufgeteilt, im zweiten Teil dieses Kapitels wird diese Unterscheidung aber durchgeführt.

4.3.1 Primäre Sterilität und Sekundäre Sterilität nach Spontanschwangerschaft

Für die Befruchtungsrate können natürlich nur die Punktionszyklen ausgewertet werden.

Zur Berechnung der Schwangerschaftsrate werden dagegen die Kryozyklen herangezogen. 335 Patientinnen mit primärer Sterilität stehen 204 Patientinnen mit sekundärer Sterilität gegenüber. In Tab. 6 und Abbildungen 17 und 18 werden die Ergebnisse der Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten dargestellt.

Tab. 6 Ergebnisse bei primärer und sekundärer Sterilität.

Primäre und sekundäre Sterilität

| | prim. Sterilität | sek. Sterilität | insgesamt |
|---------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|
| Behandlungszyklen N | 251 | 180 | 431 |
| Gewonnene Eizellen M±SD | 13,08±5,55 | 12,29±5,4 | 12,75±5,49 |
| Gewonnene Eizellen N | 3284 | 2212 | 5496 |
| Befruchtete Eizellen M±SD | 7,86±3,37 | 8,24±3,8 | 8,02±3,56 |
| Befruchtete Eizellen N | 1972 | 1484 | 3456 |
| Befruchtungsrate % | 60,0% | 67,1% | 62,9% |
| Kryo-Zyklen N | 335 | 204 | 539 |
| Eingefrorene PN M±SD | 5,68±3,49 | 5,94±3,95 | 5,79±3,69 |
| Eingefrorene PN N | 1425 | 1069 | 2494 |
| Aufgetaute PN M±SD | 3,16±1,1 | 3,21±1,08 | 3,18±1,09 |
| Aufgetaute PN N | 1059 | 655 | 1714 |
| Transferierte Emb. M± SD | 2,13±0,72 | 2,14±0,73 | 2,13±0,72 |
| Transferierte Emb. N | 713 | 437 | 1150 |
| Schwangerschaften N | 25 | 31 | 56 |
| Schwangerschaftsrate % | 7,5% | 15,2% | 10,4% |

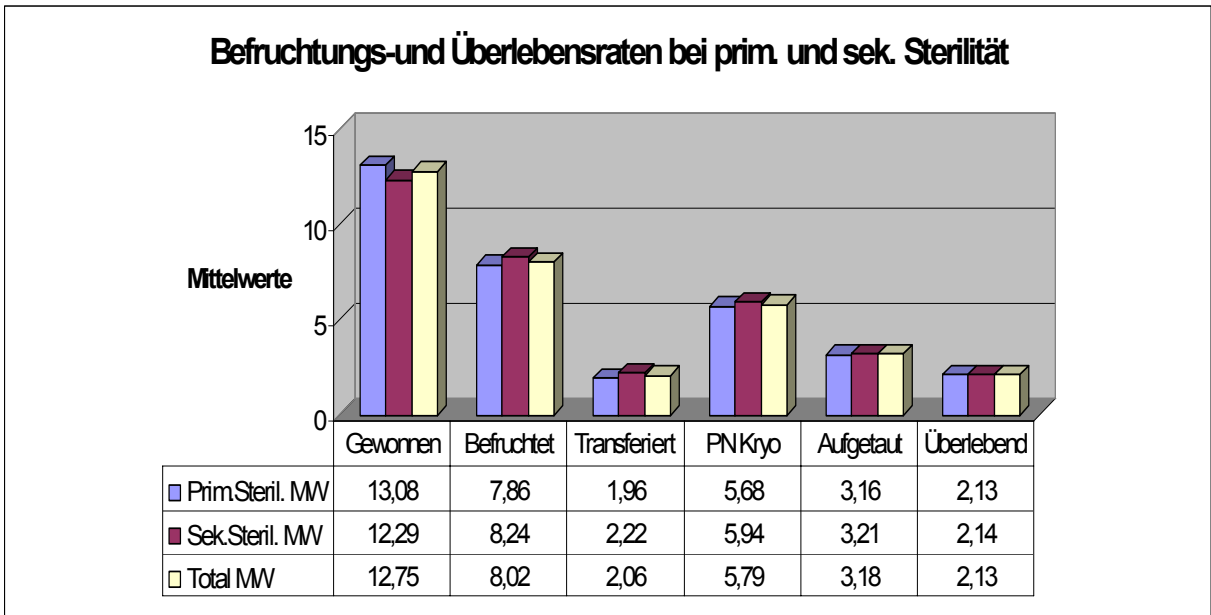


Abb. 17 Ergebnisse der Kryokonservierung bei primärer und sekundärer Sterilität.

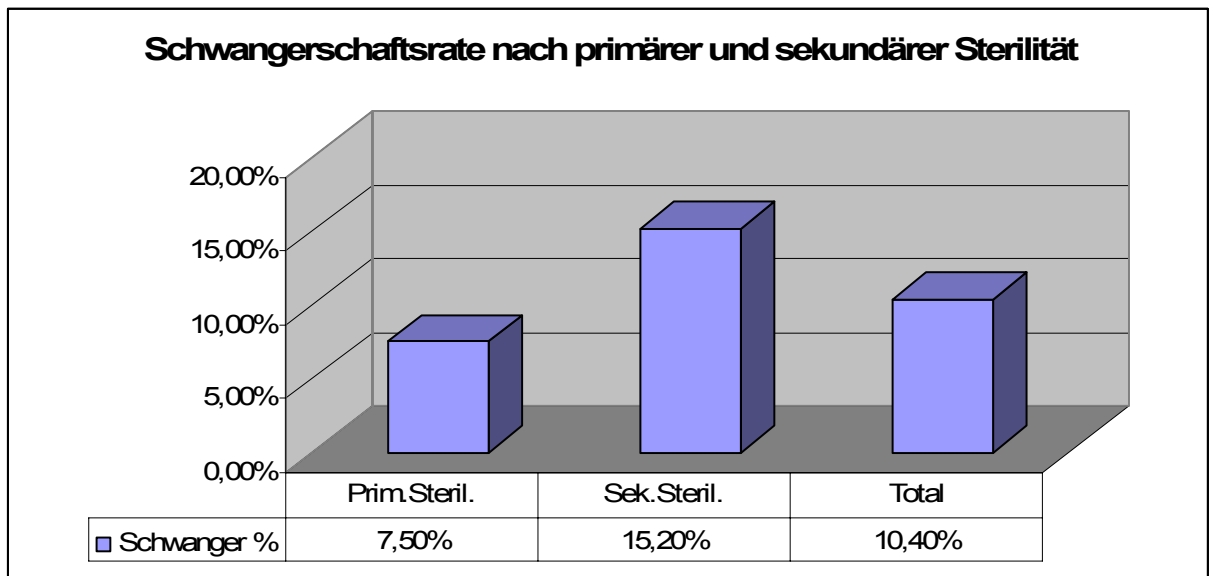


Abb. 18 Schwangerschaftsrate nach primärer und sekundärer Sterilität

Bei den Frauen mit primärer Sterilität wurden etwas mehr Eizellen (Mittelwert 13,1) gewonnen als bei den Frauen mit sekundärer Sterilität (12,3). Prozentual errechnet sich hieraus für die primäre Sterilität eine Befruchtungsrate von 60% gegen über einer solchen von 67,1% bei der sekundären Sterilität, der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p=0,101$)

Sehr deutlich war dagegen der Unterschied in den Schwangerschaftsraten, die bei primärer Sterilität 7,5% und bei sekundärer Sterilität 15,2% betrug.

Dieser Unterschied ist hoch signifikant ($p=0,011$)

4.3.2 Primäre und Sekundäre Sterilität nach spontanen und ART-induzierten Schwangerschaften

Von sekundärer Sterilität spricht man, wenn in der Vergangenheit schon einmal eine Schwangerschaft eingetreten war. Wir haben in unserem Patientenkollektiv eine weitere Gruppe definiert, nämlich diejenigen Frauen mit zunächst primärer Sterilität, die durch eine ART Maßnahme schwanger geworden waren und später noch einmal zu einem Kryotransfer gekommen sind.

Tab. 7 Befruchtungs-, Überlebens- und Schwangerschaftsrate bei primärer und sekundärer Sterilität nach spontaner- und ART-induzierter Schwangerschaft

| Befruchtungsrates bei primärer und sekundärer Sterilität nach Spontan- und ART- Schwangerschaft | | | |
|--|------------------|-----------------|------------------|
| | Prim.Steril. | Sek.Steril/Sp | Sek.Steril./ART |
| Behandlungszyklen N | 218 | 180 | 33 |
| Gewonnene Eizellen M \pm SD | 13,27 \pm 5,62 | 12,29 \pm 5,4 | 11,53 \pm 5,06 |
| Gewonnene Eizellen N | 2892 | 2212 | 380 |
| Befruchtete Eizellen M \pm SD | 7,84 \pm 3,24 | 8,24 \pm 3,80 | 7,88 \pm 4,01 |
| Befruchtete Eizellen N | 1709 | 1484 | 260 |
| Befruchtungsrate % | 59,10% | 67,10% | 68,30% |
| Kryozyklen N | 322 | 204 | 13 |
| Aufgetaute PN M \pm SD | 3,16 \pm 1,09 | 3,21 \pm 1,08 | 3,23 \pm 1,42 |
| Aufgetaute PN N | 1017 | 655 | 42 |
| Überlebende PN M \pm SD | 2,13 \pm 0,72 | 2,14 \pm 0,73 | 2,08 \pm 0,64 |
| Überlebende PN N | 686 | 437 | 27 |

| | | | |
|------------------------|------|------|------|
| Überlebende PN % | 57,5 | 66,7 | 64,3 |
| Schwangerschaften N | 23 | 31 | 2 |
| Schwangerschaftsrate % | 7,14 | 15,2 | 15,4 |

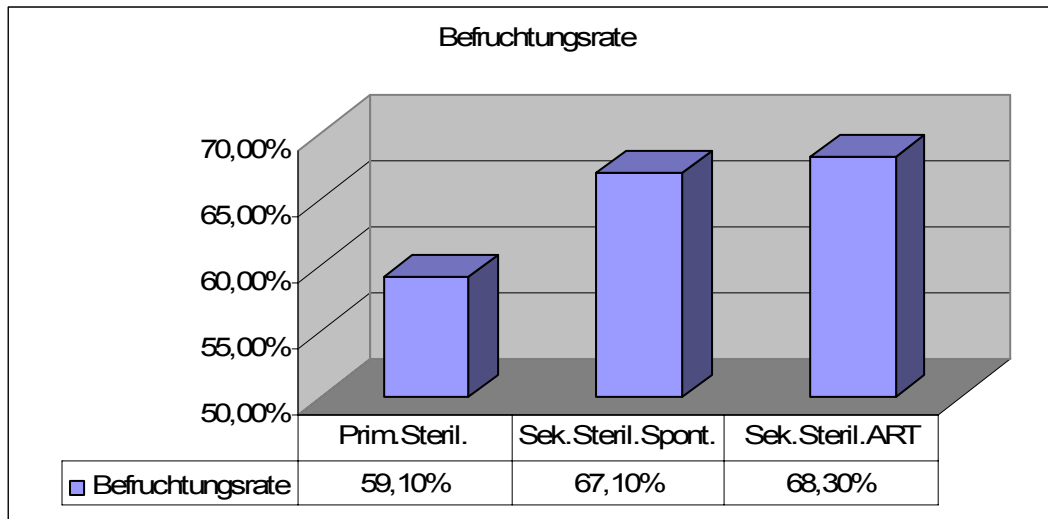


Abb. 19 Befruchtungsrate bei primärer und sekundärer Sterilität nach Spontan- und ART- Schwangerschaft.

Wenn die sekundäre Sterilität nach dieser Definition aufgeteilt wird, so zeigt sich, dass die Erfolgsrate bei der Befruchtung in dieser ART-Gruppe gegenüber der Befruchtungsrate bei primärer Sterilität deutlich höher ist (68,3% gegenüber 59,1%), und nahezu identisch ist mit der Befruchtungsrate der sekundären Sterilität nach Spontan-Schwangerschaften (67,1%).

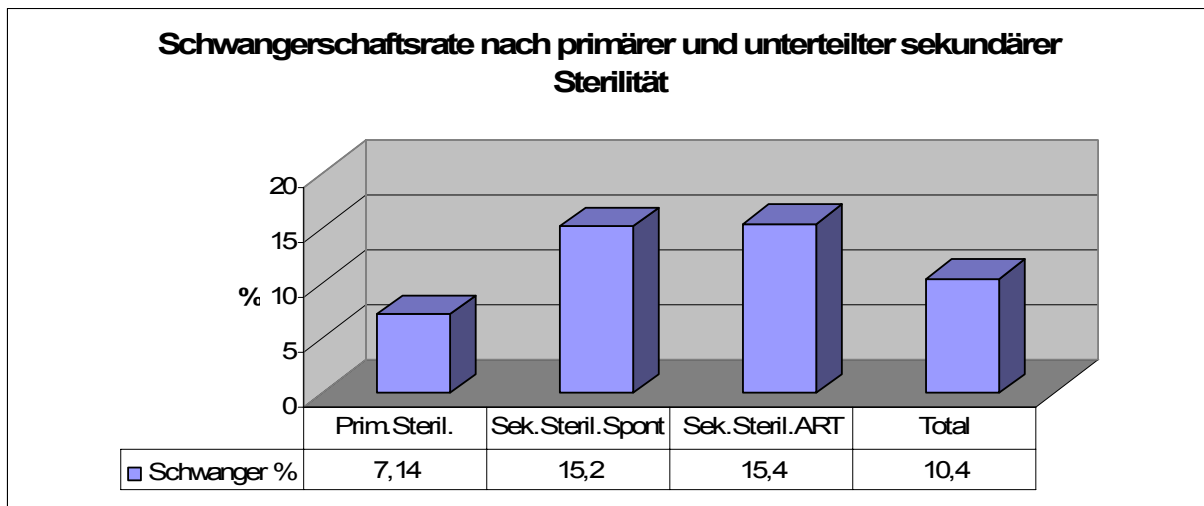


Abb. 20 Schwangerschaftsrate bei primärer und sekundärer Sterilität nach Spontan- und ART-induzierten Schwangerschaften

Auch bei der Schwangerschaftsrate ergeben sich bessere Werte für die Gruppe die schon einmal durch ART schwanger geworden war. Bei den 13 Fällen traten 2 Schwangerschaften auf, was einer Schwangerschaftsrate von 15,4% entspricht. Für die sek. Sterilitäten nach Spontanschwangerschaft verbleibt eine SS-Rate von 15,2 % (Abb.20). Dieser Unterschied zur primären Sterilität ist offenbar wegen der niedrigen Fallzahl der Schwangerschaften nach ART nicht signifikant ($p=0,252$).

4.4 Medikamente zur ovariellen Stimulation

4.4.1 Long- und Short-Protokoll

Zur Stimulation der Ovarien wurde fast ausschließlich das so genannte Long-Protokoll verwendet, welches sich in der Zyklusvorbereitung eines GnRH- Agonisten bedient.

Das Antagonisten-Protokoll wurde neu ins Programm aufgenommen, das erklärt die geringe Fallzahl. Die Fälle mit GnRH- Agonisten im Short-Protokoll bleiben wegen der geringen Fallzahl im Folgenden außer Betracht.

Tab. 8 Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate im so genannten „Long- bzw. Antagonisten-Stimulationsprotokoll

Stimulationsprotokolle

| | Long-Protokoll | Antagonisten-Protokoll |
|------------------------------|----------------|------------------------|
| Stimulationszyklen N | 423 | 8 |
| Befruchtete Eizellen M±SD | 9,00±4,1 | 7,86±3,58 |
| Befruchtungsrate % | 63,6% | 59,14% |
| Eingefrorene PN-Zellen M±SD | 5,40±3,44 | 5,43±2,73 |
| Aufgetaute PN-Zellen M±SD | 3,41±1,72 | 4,43±0,98 |
| Transferierte Embryonen M±SD | 1,77±1,03 | 1,71±0,49 |
| Schwangerschaften N | 55 | 1 |
| Schwangerschaftsrate % | 13,00% | 12,5% |

4.4.2 Medikamente zur ovariellen Stimulation im „Long- Protokoll.

Folgende Medikamente wurden zur Stimulation verwendet:

- 1. **HMG** = Human Menopausal Gonadotrophin (= Menogon der Fa. Ferring bzw. Fertinorm der Fa. Serono)
- 2. **rec. FSH** = recombinantes FSH (= Gonal-F der Fa. Serono)
- 3. Kombination **rec. FSH und HMG**, oder **rec. FSH und rec. LH** (recombinantes LH= Luveris der Fa- Serono)

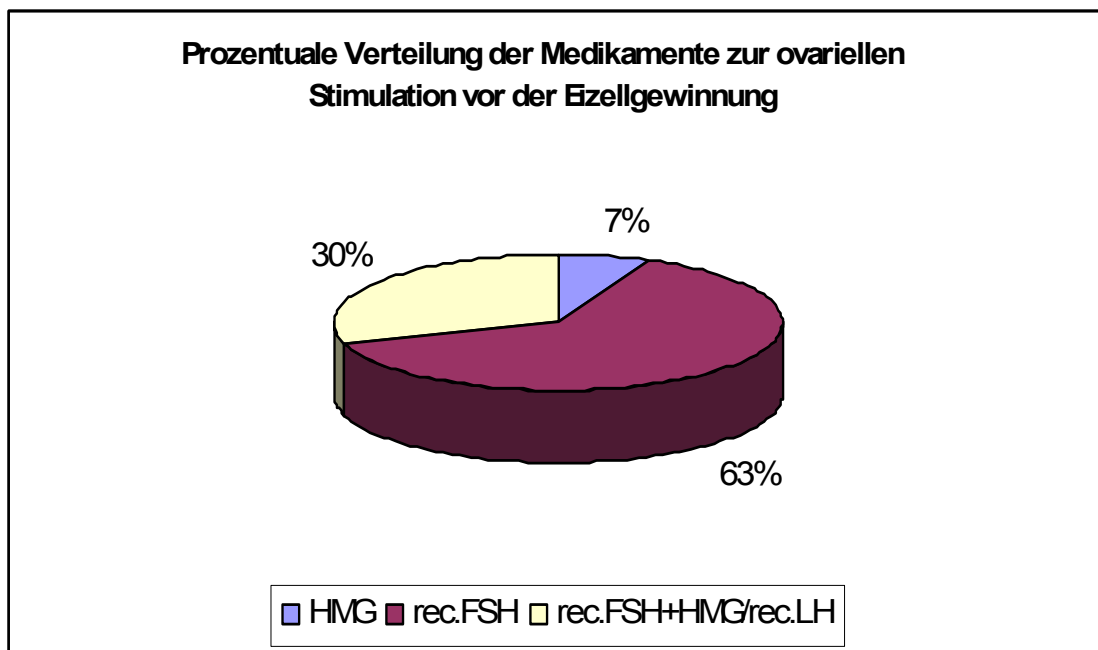


Abb. 21 Prozentuale Verteilung der Stimulations-Protokolle zur Follikelpunktion

Bei Menogon und Fertinorm handelt es sich um hoch gereinigte Gonadotropin-Präparate aus dem Harn menopausaler Frauen. Die FSH Aktivität ist auf 75 Einheiten pro Ampulle eingestellt. Da diese beiden Präparate chemisch und biophysologisch nahezu identisch sind und nur von verschiedenen Firmen stammen, wurden sie bei der Endauswertung zusammengelegt. Die augenscheinlich hohe Schwangerschaftsrate bei Fertinorm ist offensichtlich nur ein Resultat der kleinen Zahl. Gonal-F wird gentechnisch hergestellt und entspricht genau dem menschlichen FSH. Bei „rec. FSH + HMG“ wurde ein gentechnisch hergestelltes reines FSH Präparat mit dem hochgereinigtem HMG kombiniert, in der Vorstellung dass das darin enthaltene LH den Stimulationserfolg verbessern könnte, vor allem dann wenn die Patientinnen mit alleiniger FSH- Stimulation mit einem Low-Response reagierten.

Ähnlich sind die Beweggründe für die Kombination rec. FSH plus rec LH gewesen, besonders bei Patientinnen, die keine endogene LH- Produktion aufweisen oder die extrem supprimiert waren und vor der Stimulation ein LH < 1,0IE/L aufgewiesen hatten.

Die Zusammenlegung der beiden letzten Gruppen ist ebenfalls sinnvoll, da sie biochemisch sehr ähnlich sind und außerdem die Fallzahl sehr unterschiedlich ist. Die Fallzahlen für die verschiedenen Medikamente gehen aus Abb.21 und Tab. 9 hervor.

Tab. 9 Erfolgsraten bei unterschiedlichen Stimulations- Medikamenten

| Medikamente zur ovariellen Stimulation | | | |
|---|------------|----------------|----------------------------|
| | HMG | rec.FSH | rec.FSH+ HMG/rec.LH |
| Behandlungszyklen N | 29 | 273 | 129 |
| Gewonnene Eizellen M±SD | 14,69±5,49 | 12,98±5,8 | 11,84±4,64 |
| Gewonnene Eizellen N | 426 | 3543 | 1527 |
| Befruchtete Eizellen M± SD | 8,17±3,26 | 8,19±3,59 | 7,62±3,43 |
| Befruchtete Eizellen N | 237 | 2236 | 983 |
| Befruchtungsrate % | 55,6% | 63,1% | 64,4% |
| Kryo-Zyklen N | 52 | 344 | 143 |
| Eingefrorene PN M±SD | 5,85±3,6 | 5,73±3,68 | 5,03±2,69 |
| Eingefrorene PN N | 304 | 1971 | 720 |
| Aufgetaute PN M±SD | 3,58±1,23 | 3,14±1,08 | 3,14±1,05 |
| Aufgetaute PN N | 186 | 1079 | 449 |
| Überlebende PN M±SD | 2,15±0,75 | 2,12±0,71 | 2,15±0,73 |
| Überlebende PN N | 112 | 730 | 308 |
| Überlebensrate % | 60,2% | 67,7% | 68,6% |
| Schwangerschaften N | 5 | 37 | 14 |
| Schwangerschaftsrate % | 9,6% | 10,8% | 9,8% |

In Tabelle 9 sind nur diejenigen Simulationszyklen aufgeführt die dann auch für den Kryotransfer verwendet worden sind.

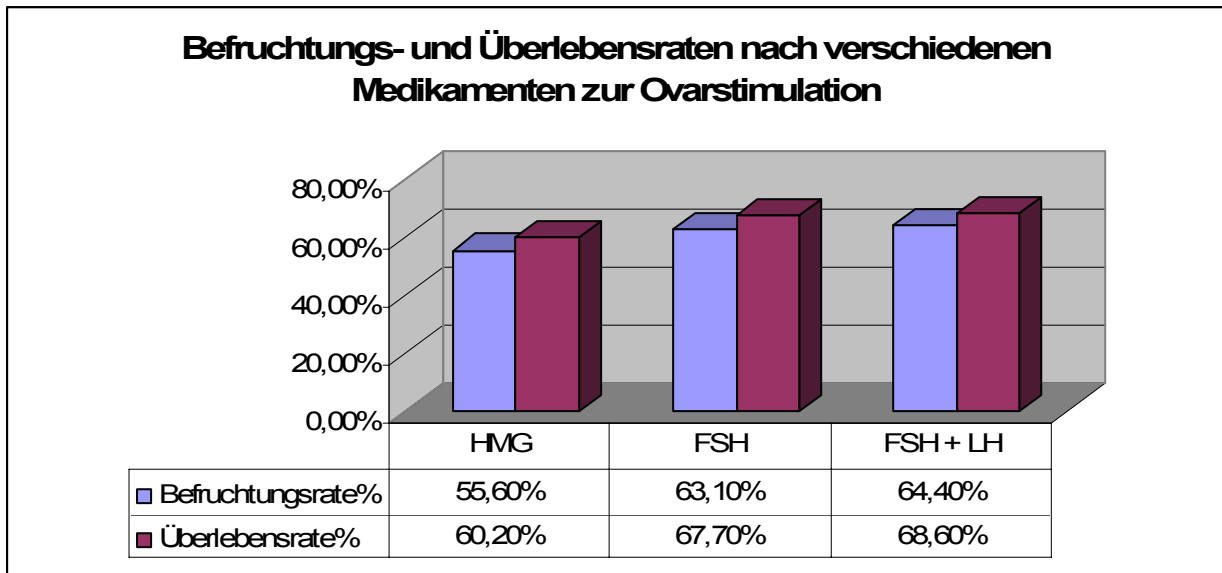


Abb. 22 Befruchtungs- und Überlebensraten nach Ovarstimulation im Primärzyklus mit HMG, FSH und FSH + LH

Aus Tabelle 9 und Abbildung 22 geht hervor, dass die Zahl der gewonnenen Eizellen zwar nach HMG etwas höher war als nach reinem FSH, dass aber die Befruchtungsrate mit 63,1% nach FSH und 64,4 % nach FSH+LH etwas höher war als nach HMG-Stimulation mit 55,6%, was wegen der geringeren Fallzahl aber nicht signifikant ist. Die Schwangerschaftsrate (Abb.23) ist für alle Medikationsvarianten in etwa gleich und liegt zwischen 9,6 und 10,8 %.

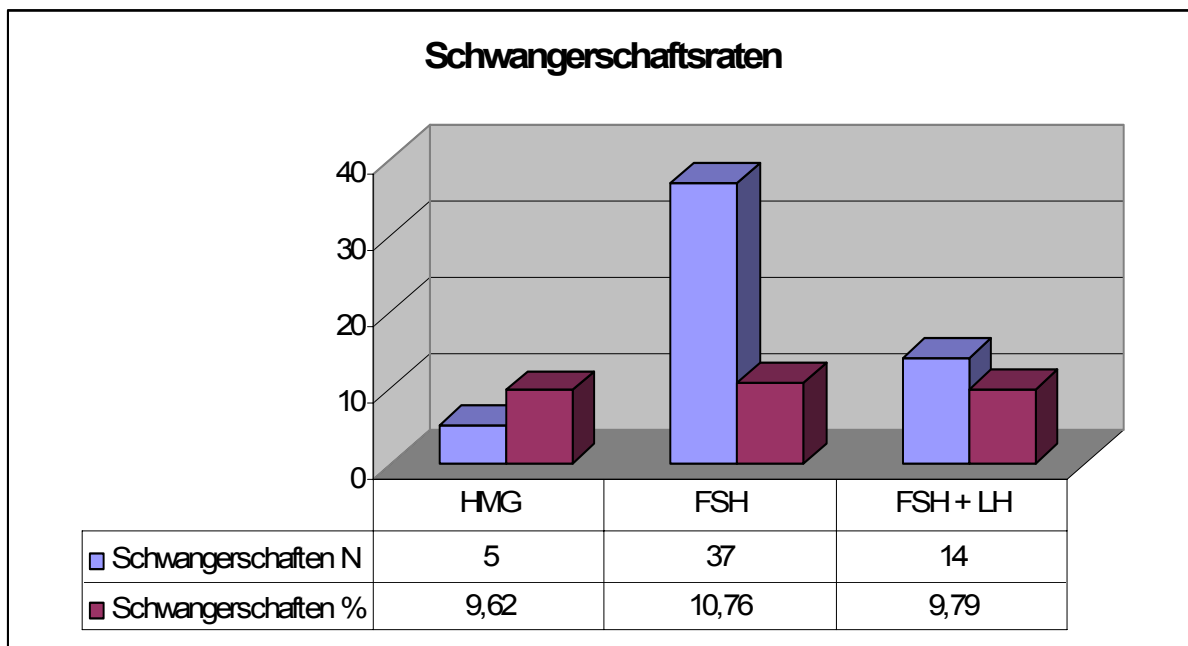


Abb. 23 Schwangerschaftsraten nach Kryokonservierung mit verschiedenen Medikamenten der Ovarstimulation zur Punktion und Eizellgewinnung

4.5 Medikamentöse Vorbereitung des Kryo-Transfer-Zyklus

Die Anwendung von Östradiolvalerat im Transferzyklus dient dem phasengerechten Aufbau des Endometriums für den Kryotransfer. Die Mehrheit der Behandlungszyklen wurden mit dieser Unterstützung durchgeführt und eine Schwangerschaftsrate von 8,6% erzielt (Abb. 25).

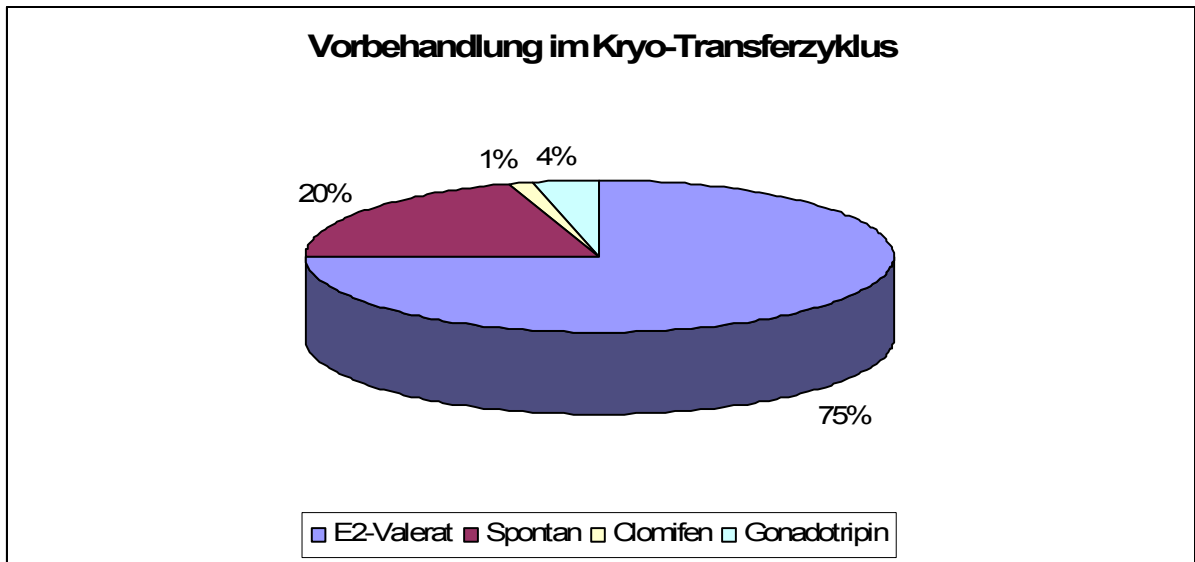


Abb. 24 Zahlenmäßige Verteilung der Patienten je nach Simulation im Transferzyklus

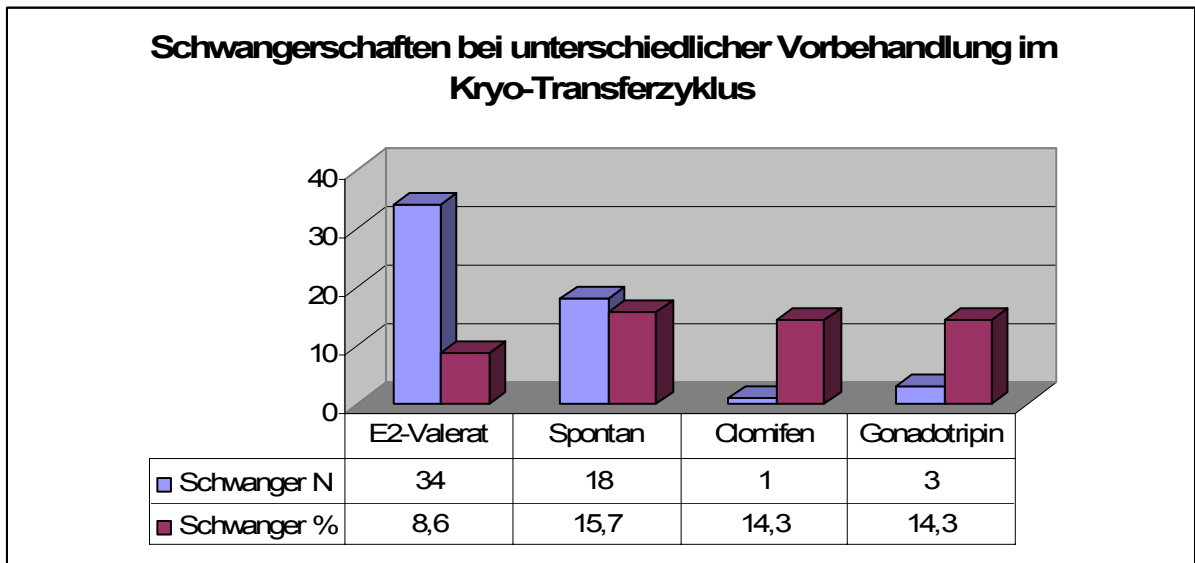


Abb. 25 Schwangerschaftsrate je nach Stimulation im Kryo-Transferzyklus

Deutlich besser schnitten die Spontanzyklen mit einer Schwangerschaftsrate von 15,7% ab. Nach Stimulation mit Clomifen oder HMG war die Schwangerschaftsrate bei sehr geringer Fallzahl jeweils 14,3%.

4.6 Anzahl und Entwicklungsstadium der transferierten Embryonen

4.6.1 Anzahl der transferierten Embryonen

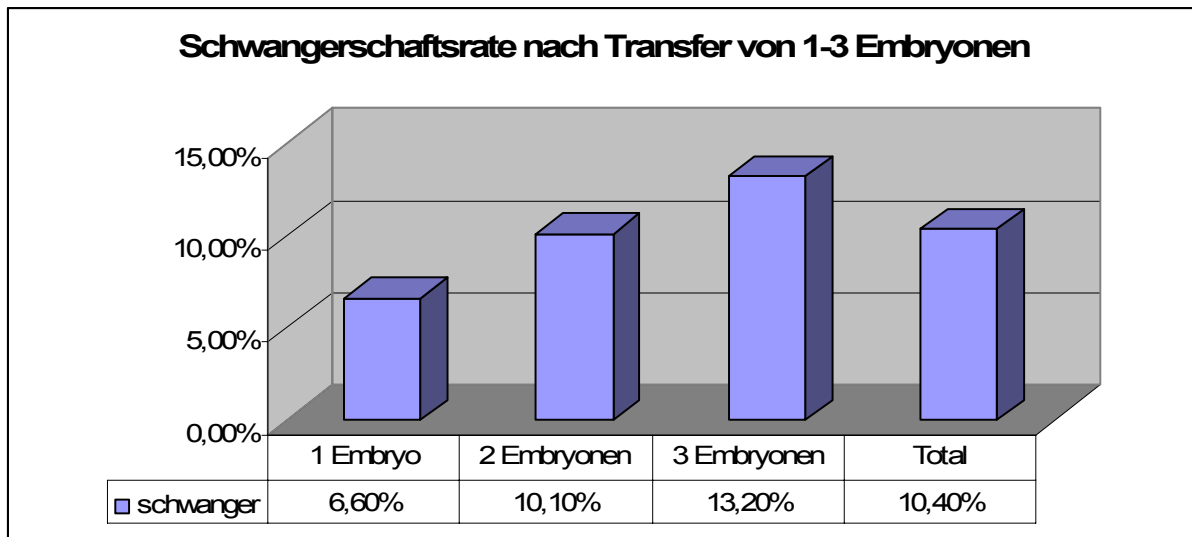


Abb. 26 Schwangerschaftsrate je nach Anzahl der transferierten Embryonen beim Kryotransfer

Aus Abbildung 26 geht hervor, dass die Anzahl der bei einem Transfer übertragenen Embryonen von großer Bedeutung sein kann. Falls nur ein Embryo transferiert wurde war die Schwangerschaftsrate 6,6% bei 2 Embryonen schon 10,1% und bei gleichzeitigem Transfer von 3 Embryonen 13,2%. Die Schwangerschaftsrate stieg also kontinuierlich mit der Anzahl der transferierten Embryonen ($p=0,060$).

4.6.2 Entwicklungsstadium der transferierten Embryonen

Von 1150 aufgetauten überlebenden Eizellen befanden sich nach Kultivierung 314 im PN-Stadium, 406 im 2-Zell-, 371 im 4-Zell und 59 im >4-Zell-Stadium. Im PN-Stadium wurden 158 mal ein bis drei Eizellen übertragen und 9 Schwangerschaften erzielt, entsprechend einer Erfolgsrate von 5,7%. Die niedrige SS-Rate bei PN-Transfer zeigte die Tendenz zur Signifikanz ($p=0,053$)

Tab. 10 Überlebens- Transfer- und Schwangerschaftsrate der verschiedenen Entwicklungsstadien

| Entwicklungsstadien der transferierten Embryonen | | | | | |
|--|---------|--------|--------|---------|------|
| | PN_Zell | 2-Zell | 4-Zell | >4-Zell | Alle |
| Überlebende PN bzw. Embr. N | 314 | 406 | 371 | 59 | 1150 |
| Anzahl der Transfers N | 158 | 252 | 226 | 33 | 669 |
| Schwangerschaften N | 9 | 30 | 29 | 4 | 72 |
| Schwangerschaftsrate pro Transfer % | 5,7 | 11,9 | 12,8 | 12,1 | 10,8 |

Die Schwangerschaftsrate bei 252 Transfers von 1 bis 3 Zwei-Zell-Stadien und 226 Transfers von 1 bis 3 Vier-Zell-Stadien war mit 11,9% und 12,8% nahezu gleich und damit deutlich besser. Embryonen im > Vier-Zell-Stadium wurden 33-mal übertragen wobei 4 Schwangerschaften erzielt werden konnten, also 12,1 %, was wegen der geringeren Gesamtzahl aber statistisch nicht eindeutig verwertbar war ($p=0,304$). Trotzdem lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Erfolgsrate mit steigendem Entwicklungsstadium korreliert (Tab.10 und Abb.27).

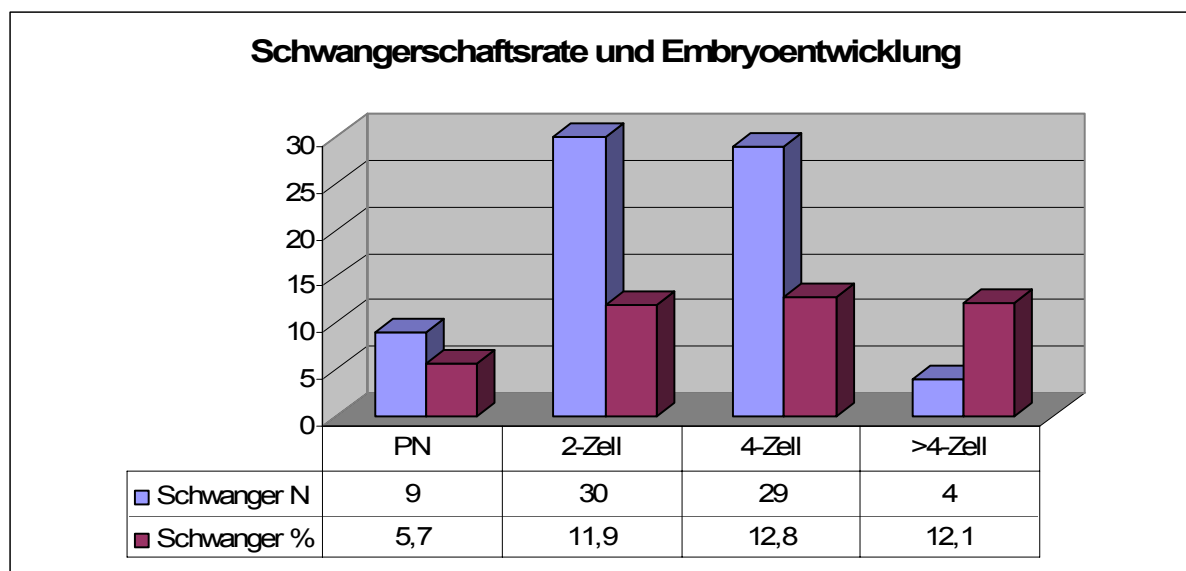


Abb. 27 Schwangerschaften je nach Entwicklungsstadium des Embryos beim Transfer

Aus Abbildung 28 geht hervor dass auch viele Schwangerschaften erzielt wurden wenn ein Embryo im Vier-Zell-Stadium übertragen worden war (N= 16), oder wenn im Zwei-Zell-Stadium ein oder zwei Embryonen übertragen worden waren (N=12 und 13).

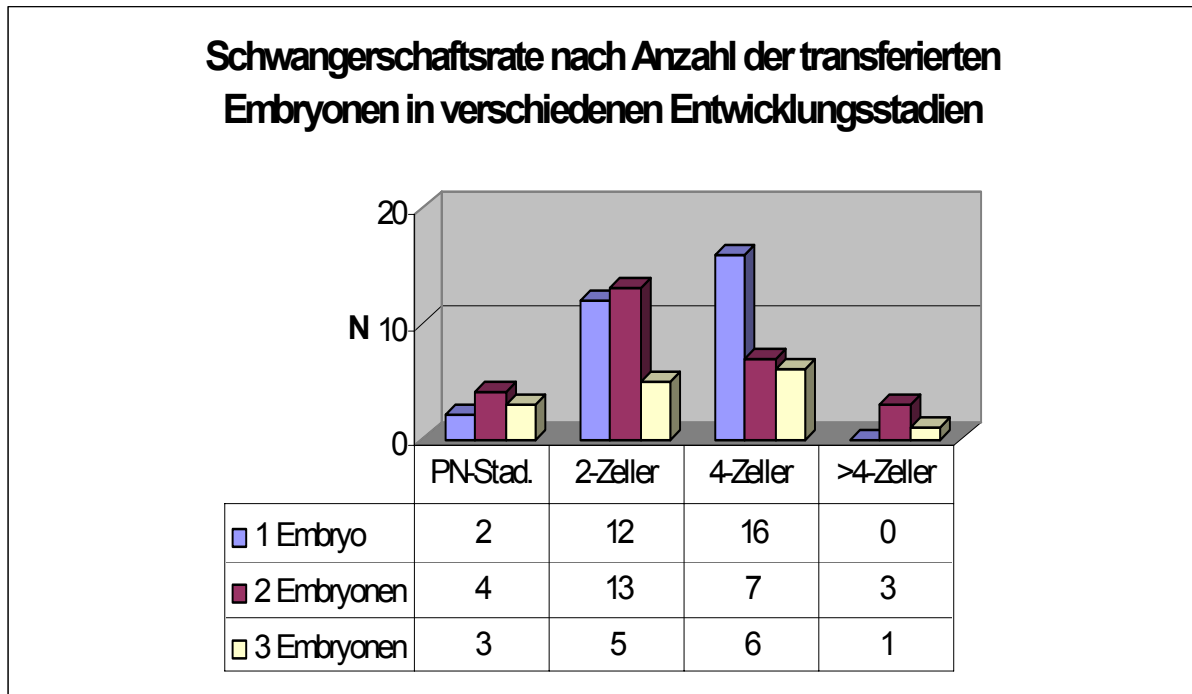


Abb. 28 Anzahl der Schwangerschaften in Bezug zur Anzahl der transferierten Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Die Schwangerschaftszahl ist in dieser Tabelle insgesamt zu hoch, da tatsächlich 56 Schwangerschaften beim Kryotransfer erzielt worden sind. Diese zu hohe Anzahl hat ihren Grund darin, dass bei der Übertragung von zwei oder drei Embryonen unterschiedliche Entwicklungsstadien übertragen worden sind, die erfolgte Schwangerschaft aber jedem dieser Entwicklungsstadien zugeordnet worden ist, da man nicht wissen kann welcher Embryo zur Entwicklung gekommen ist. Diese mehrfache Zählung bedingt die scheinbare Erhöhung der Schwangerschaftszahl.

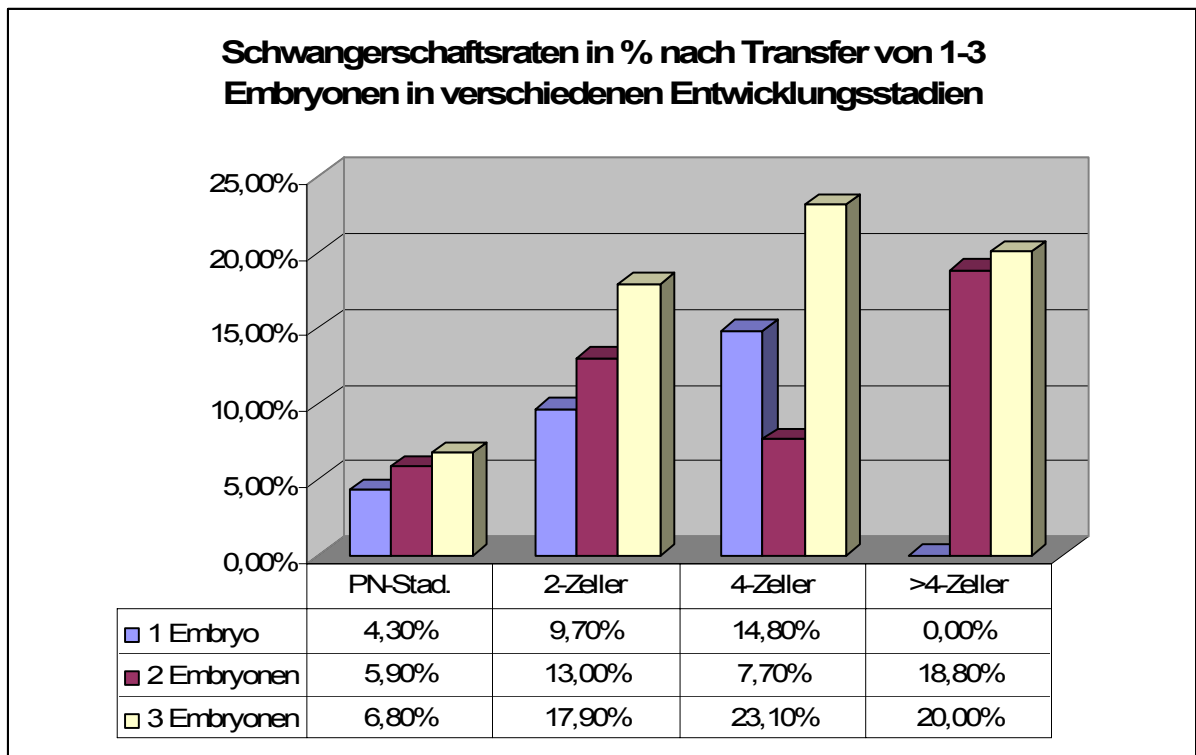


Abb. 29 Prozentsatz der Schwangerschaften im Bezug zur Anzahl der transferierten Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien

Betrachtet man die Abb.28, wird klar, dass die absolute Anzahl von Schwangerschaften keine Bedeutung hat, wenn man nicht gleichzeitig die Anzahl der Behandlungszyklen in Betracht zieht. Die prozentuale Verteilung der Schwangerschaften, wie sie in Abb.29 dargestellt ist, zeigt nämlich deutlich, dass mit zunehmender Anzahl von transferierten Embryonen und mit höherem Entwicklungsstadium der Embryonen auch mehr Schwangerschaften erzielt werden. Das Stadium mit mehr als vier Zellen widerspricht dem nicht, muss aber wegen der geringen Fallzahl außer Betracht bleiben.

4.7 Vergleich IVF und ICSI

Nach 191 IVF- beziehungsweise 240 ICSI- Behandlungen wurden etwa gleich viele Kryotransfers durchgeführt (IVF: N=264, 49, ICSI: N=275, 51 siehe Abb.30).

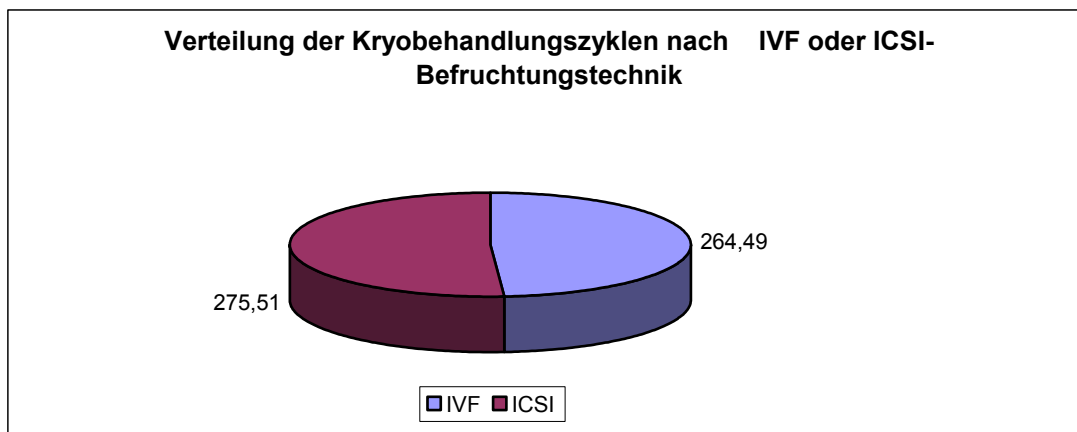


Abb. 30 Verteilung der Fälle nach Befruchtungstechnik (IVF oder ICSI)

Die Behandlungsmethode hing von der Qualität des Spermioграмms ab.

Tab. 11 Durchschnittliche Anzahl gewonnener und befruchteter Eizellen und transferierter Embryonen bei IVF und ICSI

| Eizellgewinnung und Management bei IVF und ICSI | | | |
|--|------------|-------------|--------------|
| | IVF | ICSI | Total |
| Behandlungszyklen N | 191 | 240 | 431 |
| Gewonnene Eizellen M±SD | 12,87±5,71 | 12,66±5,33 | 12,75±5,49 |
| Gewonnene Eizellen N | 2458 | 3038 | 5496 |
| Befruchtete Eizellen M±SD | 8,91±4,18 | 7,31±2,79 | 8,02±3,56 |
| Befruchtete Eizellen N | 1701 | 1755 | 3456 |
| Befruchtungsrate % | 69,2% | 57,8% | 63,5% |
| Primärtransfer Embryonen M±SD | 2,09±0,86 | 2,04±0,8 | 2,06±0,83 |
| Primärtransfer Embryonen N | 400 | 490 | 890 |
| Schwangerschaften N | 51 | 53 | 104 |

| | | | |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Schwangerschaftsrate % | 26,7% | 22,1% | 24,1% |
| Kryozyklen N | 264 | 275 | 539 |
| Eingefrorene PN M±SD | 6,72±4,32 | 5,04±2,9 | 5,79±3,69 |
| Eingefrorene PN N | 1284 | 1210 | 2494 |
| Transferierte Embryonen M±SD | 2,11±0,71 | 2,15±0,73 | 2,13±0,72 |
| Transferierte Embryonen N | 558 | 592 | 1150 |
| Schwangerschaften N | 34 | 22 | 56 |
| Schwangerschaftsrate % | 12,9% | 8,0% | 10,4% |

Zur Berechnung der Befruchtungsrate werden wieder die 431 Punktionszyklen herangezogen während sich die Schwangerschaftsrate auf alle 539Kryotransferzyklen bezieht

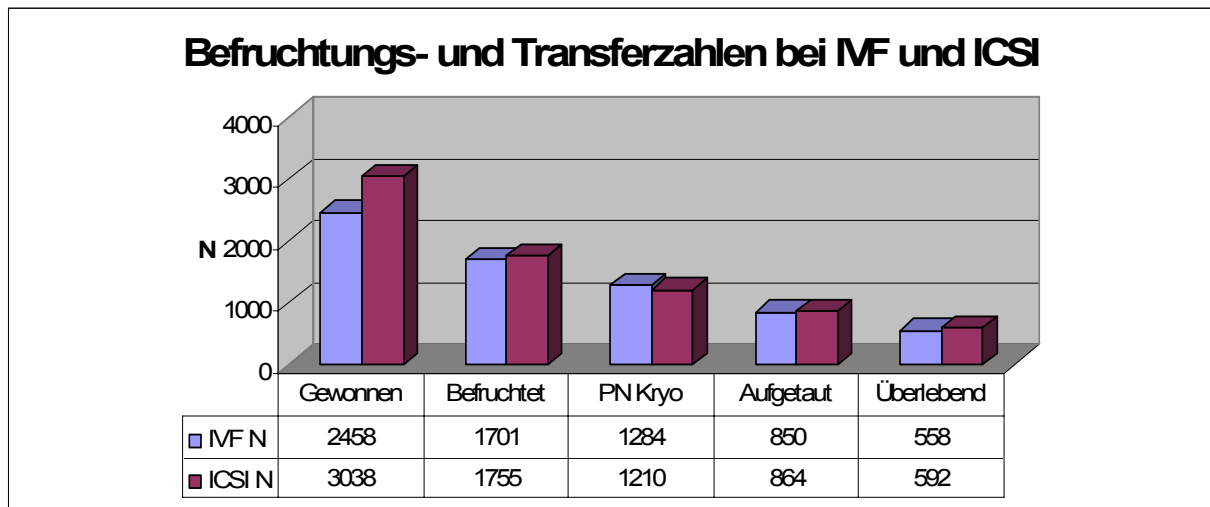


Abb. 31 Absolute Zahlen der Eizellen bzw. Embryonen für Befruchtung und Transfer bei IVF und ICSI

Die Anzahl der gewonnen Eizellen unterschieden sich nicht wesentlich.

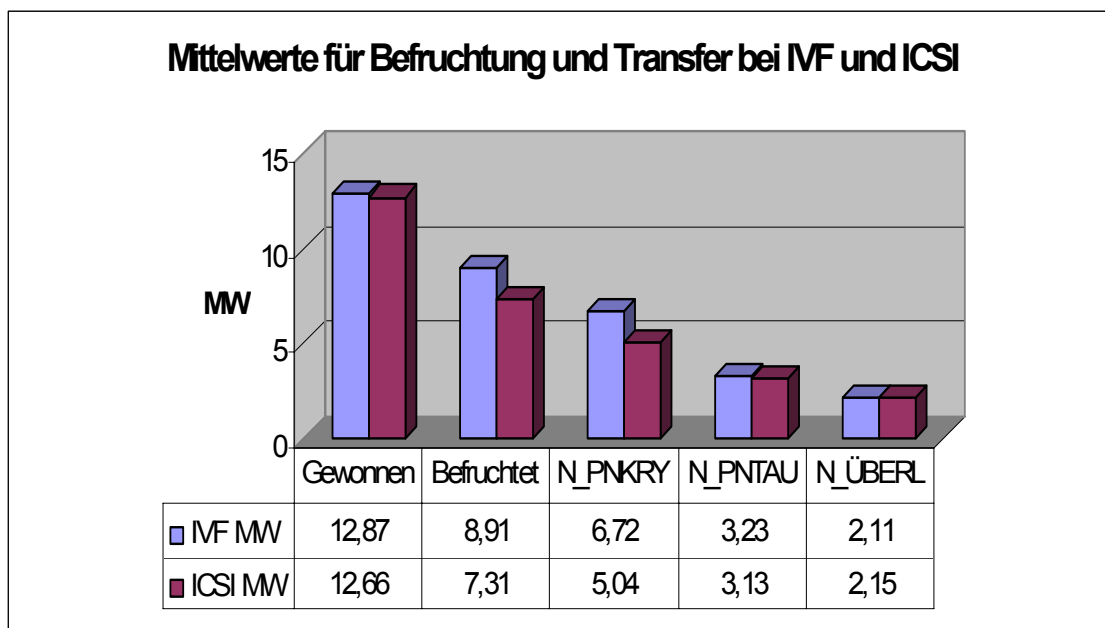


Abb. 32 Mittelwerte der Eizellen bzw. Embryonen für Befruchtung und Transfer bei IVF und ICSI

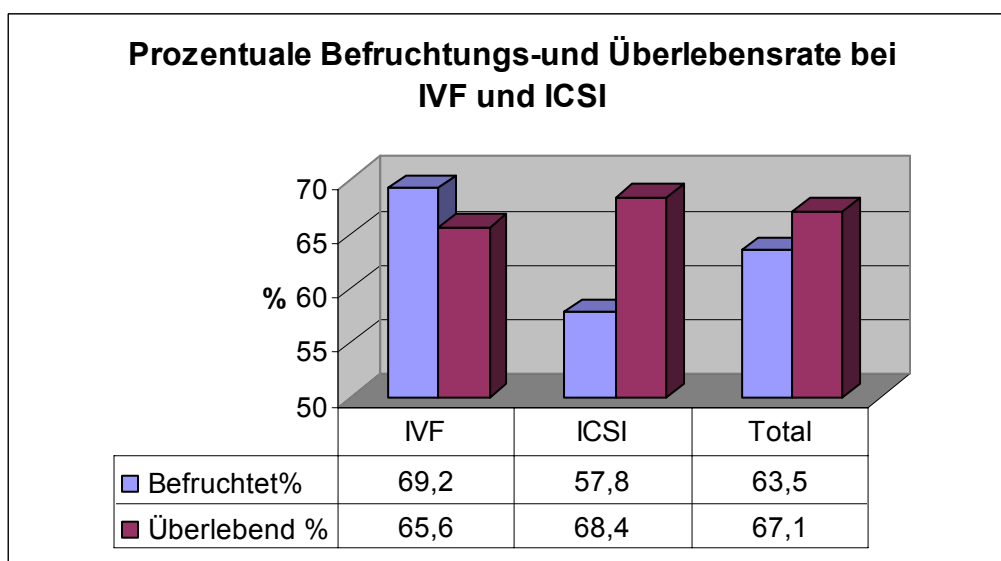


Abb. 33 Prozentuale Befruchtungs- und Überlebensrate bei IVF und ICSI

Deutlich unterschiedlich war allerdings die Befruchtungsrate, nämlich 69,2% bei IVF und 57,8% bei ICSI. Überlebt haben nach dem Auftauen bei beiden Methoden etwa gleich viele, nämlich 2,11 bzw. 2,15 Embryonen pro Behandlung (Tab.11, Abb.32) die dann auch transferiert wurden. Wie aus den Abb.33 und 34 hervorgeht, war die Überlebensrate der PN-Stadien nach beiden Methoden etwa gleich (65,6% und 68,4%).

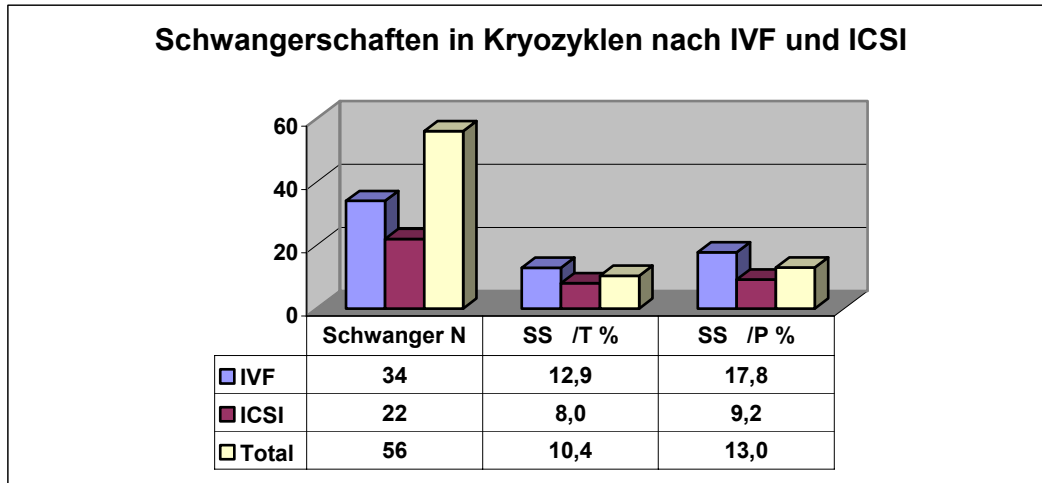


Abb. 34 Absolute Schwangerschaften und prozentuale Schwangerschaftsraten nach IVF und ICSI in Kryozyklen bezogen auf die Anzahl der Transfers und die Anzahl der Punktionszyklen

die Schwangerschaftsrate aber deutlich unterschiedlich zugunsten IVF (12,9 % vs. 8,0%), der Unterschied ist aber nicht signifikant ($p=0,068$).

4.8 Einfluss der Lagerungszeit kryokonservierter PN-Stadien

Die Zeit bis zum Auftauen der kryokonservierter PN-Stadien wurde eingeteilt in:

- 1. bis zu 3 Monate
- 2. 4-12 Monate
- 3. 1-2 Jahre
- 4. 2-4 Jahre und
- 5. 4-7,3 Jahre

Tab. 12 Überlebens- und Schwangerschaftsrate bei verschiedenen Lagerungszeiten

| Überlebens- und Schwangerschaftsraten bei verschiedenen Lagerungszeiten der imprägnierten Eizellen | | | | | | |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| | bis 3 Mon. | 4-12 Mon. | 1-2 Jahre | 2-4 Jahre | 4-7,3 Jahre | Insgesamt |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Behandlungszyklen N | 163 | 297 | 49 | 27 | 3 | 539 |
| Eingefrorene PN M±SD | 6,29±3,86 | 5,55±3,34 | 3,9±2,18 | 4,26±2,49 | 5,0±2,65 | 5,56±3,45 |
| Eingefrorene PN N | 1025 | 1649 | 191 | 115 | 15 | 2995 |
| Aufgetaute PN M±SD | 3,13±1,04 | 3,29±1,11 | 2,84±1,05 | 2,89±1,12 | 3,0±1,0 | 1,18±1,09 |
| Aufgetaute PN N | 510 | 978 | 139 | 78 | 9 | 1714 |
| Überlebende PN M±SD | 2,23±0,63 | 2,16±0,74 | 1,86±0,76 | 1,81±0,68 | 2,00±1,00 | 2,13±0,72 |
| Überlebende PN N | 363 | 641 | 91 | 49 | 6 | 1150 |
| Überlebensrate % | 71,18% | 65,54% | 65,47% | 62,82% | 66,67% | 67,09% |
| Schwangerschaften N | 19 | 27 | 6 | 4 | 0 | 56 |
| Schwangerschaftsrate % | 11,7% | 9,1% | 12,2% | 14,8% | 0,0% | 10,4% |

Die meisten Transfers nach Kryokonservierung wurden 3 bis 12 Monate nach Follikelpunktion durchgeführt (N=297), relativ häufig wurde der Transfer aber auch schon in den ersten drei Monaten nach der Follikelpunktion gemacht (N=163).

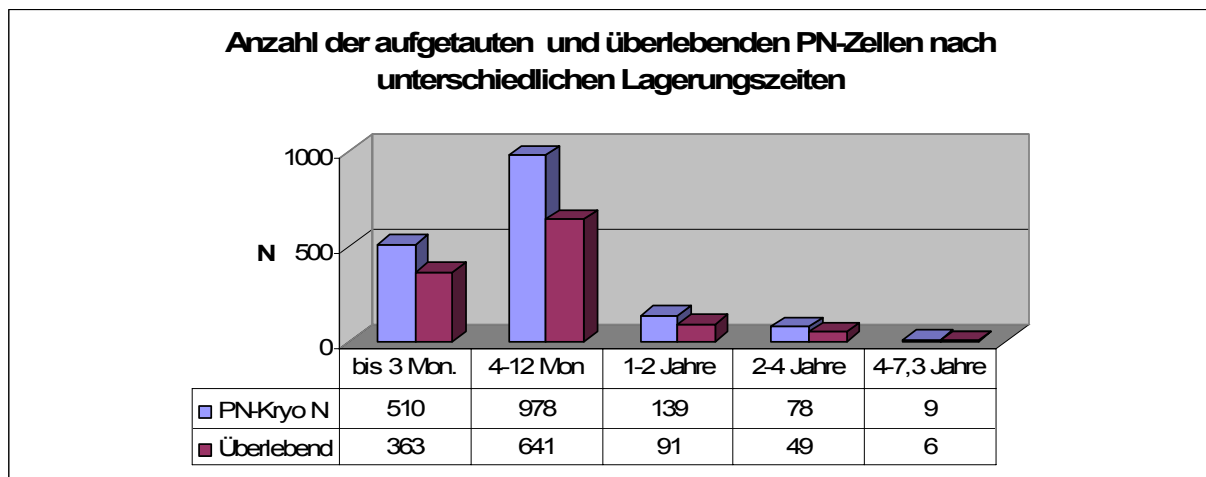


Abb. 35 Anzahl der eingefrorenen und nach dem Auftauen überlebenden und transferierten Embryonen

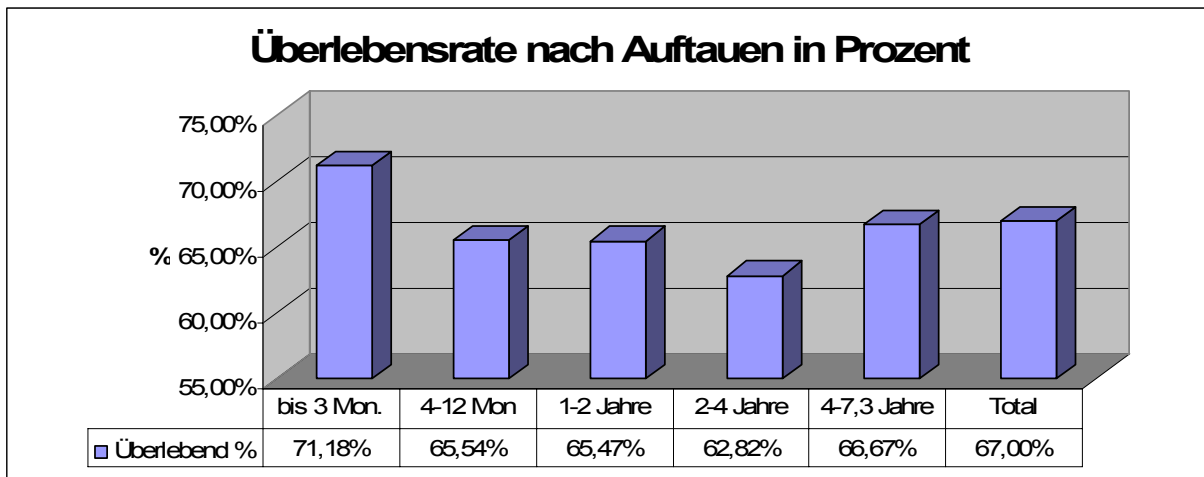


Abb. 36 Überlebensrate der kryokonservierten PN-Stadien nach dem Auftauen nach unterschiedlichen Lagerungszeiten

Die Abbildung 36 zeigt dass innerhalb der ersten drei Monate die Überlebensrate der kryokonservierten PN-Stadien mit 71 Prozent am höchsten ist. Sie nimmt in den nächsten vier Jahren leicht ab und erreicht nach zwei bis vier Jahren etwa 63 Prozent. Der nochmalige Anstieg nach über vier Jahren geht auf hohe Einzelwerte bei insgesamt geringer Fallzahl zurück.

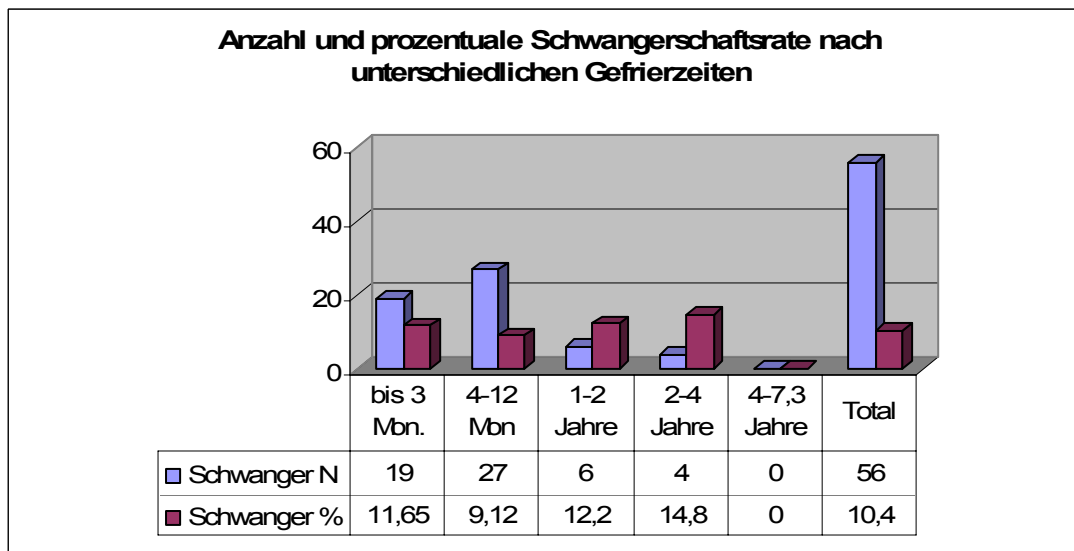


Abb. 37 Schwangerschaftsraten nach unterschiedlichen Gefrierzeiten

Wie aus Tabelle 12 und Abbildung 37 hervorgeht, war die Schwangerschaftsrate mit ca. 11%-12% im untersuchten Kollektiv unabhängig von der Lagerungsdauer.

4.9 Vergleich der Ergebnisse nach Kryotransfer mit den Ergebnissen beim Primärtransfer

Weltweit sind die Schwangerschaftsraten nach Kryotransfer deutlich schlechter als nach dem Primärtransfer also dem Transfer frisch gewonnener und kultivierter Embryonen. Um dies für das untersuchte Kollektiv darstellen zu können werden für einige ausgewählte klinische Parameter auch die Ergebnisse des Primärtransfers dargestellt.

4.9.1 Vergleich der Schwangerschaftsraten beim Primär- und Kryotransfer

Das untersuchte Patientenkollektiv besteht aus 399 Paaren, mit 431 Primärtransfer-Zyklen (= Punktionszyklen) und 539 Kryotransfer-Zyklen, also insgesamt 970 Zyklen.

Tab. 13 Kumulative Schwangerschaftsraten beim Primär- und Kryotransfer bezogen auf die Anzahl der Transfers, die Anzahl der Punktionszyklen und die Anzahl der Paare.

| Schwangerschaftsraten beim Primär- und Kryotransfer | | | |
|--|----------------|----------------|---------------|
| | Schw./Transfer | Schw./Punktion | Schw./Paar |
| Primär N | 104 von 431 | 104 von 431 | 104 von 399 |
| Primär % | 24,13 | 24,13 | 26,07 |
| Kryo N | 56 von 539 | 56 von 431 | 56 von 399 |
| Kryo % | 10,38 | 12,99 | 14,03 |
| Total N | 160 von 970 | 160 von 431 | 160 von 399 |
| Total % | 34,51% | 37,12% | 40,10% |

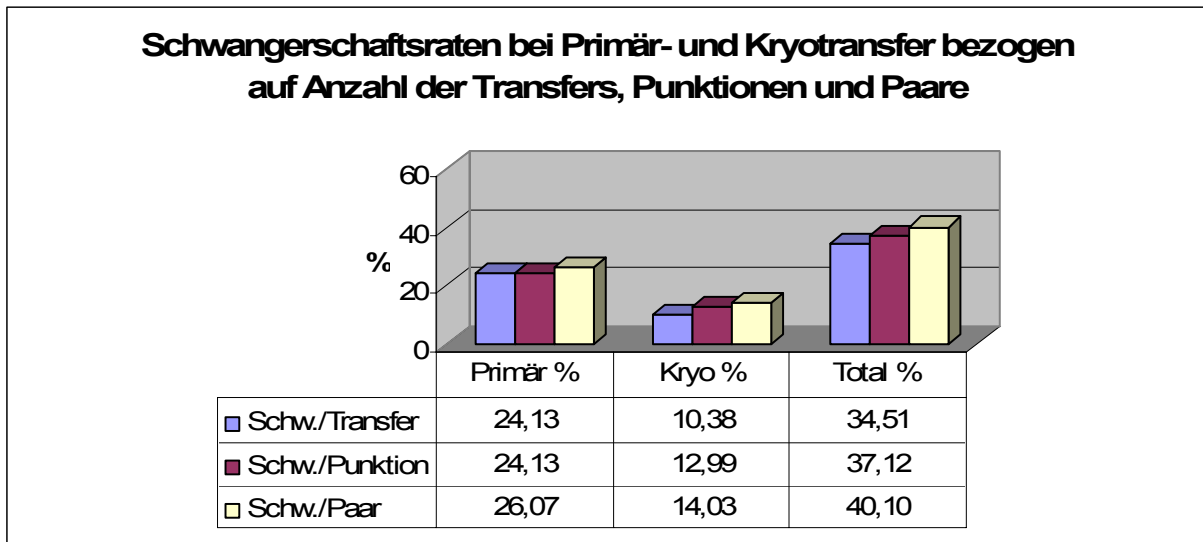


Abb. 38 Schwangerschaftsraten bei Primär- und Kryotransfer, Grafik zu Tab 13

Wie aus der Tab. 13 und Abb. 38 hervorgeht, beträgt die Schwangerschaftsrate nach Kryotransfer 10,38% und nach dem Transfer frischer Embryonen 24,13 %, also mehr als das doppelte. Bezieht man die Anzahl der Schwangerschaften auf die Anzahl der Follikel-Punktionen erhöht sich die Prozentzahl beim Kryotransfer auf 12,99 % und bezieht man sie auf die Anzahl der behandelten Paare so steigerte sie sich beim Primärtransfer auf 26,07 und beim Kryotransfer auf 14,03% so dass letztlich pro Paar eine kumulative Erfolgsrate von insgesamt 40,1% resultiert.

4.9.2 IVF und ICSI

Beim Kryotransfer fällt die Schwangerschaftsrate mit durchschnittlich 10,4% wesentlich geringer aus als beim Primärtransfer (24,13%, Tab.13), und IVF ist mit 12,9% außerdem deutlich erfolgreicher als ICSI mit 8,0%. (Abb.34)

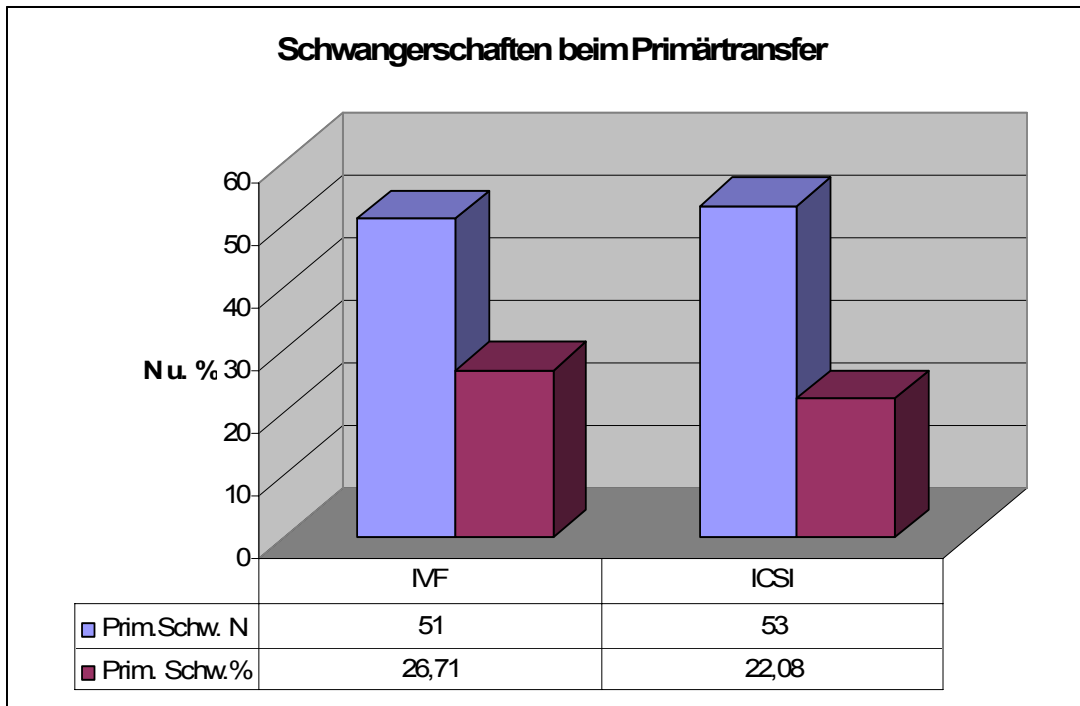


Abb. 39 Erfolgsrate von IVF und ICSI nach Transfer von im Punktionszyklus gewonnener Eizellen und daraus kultivierter Embryonen

Beim Transfer von Embryonen im Primärzyklus betrug die Schwangerschaftsrate von IVF 26,7% und von ICSI 22,1%, ein deutlicher, aber nicht signifikanter Unterschied ($p = 0,159$)

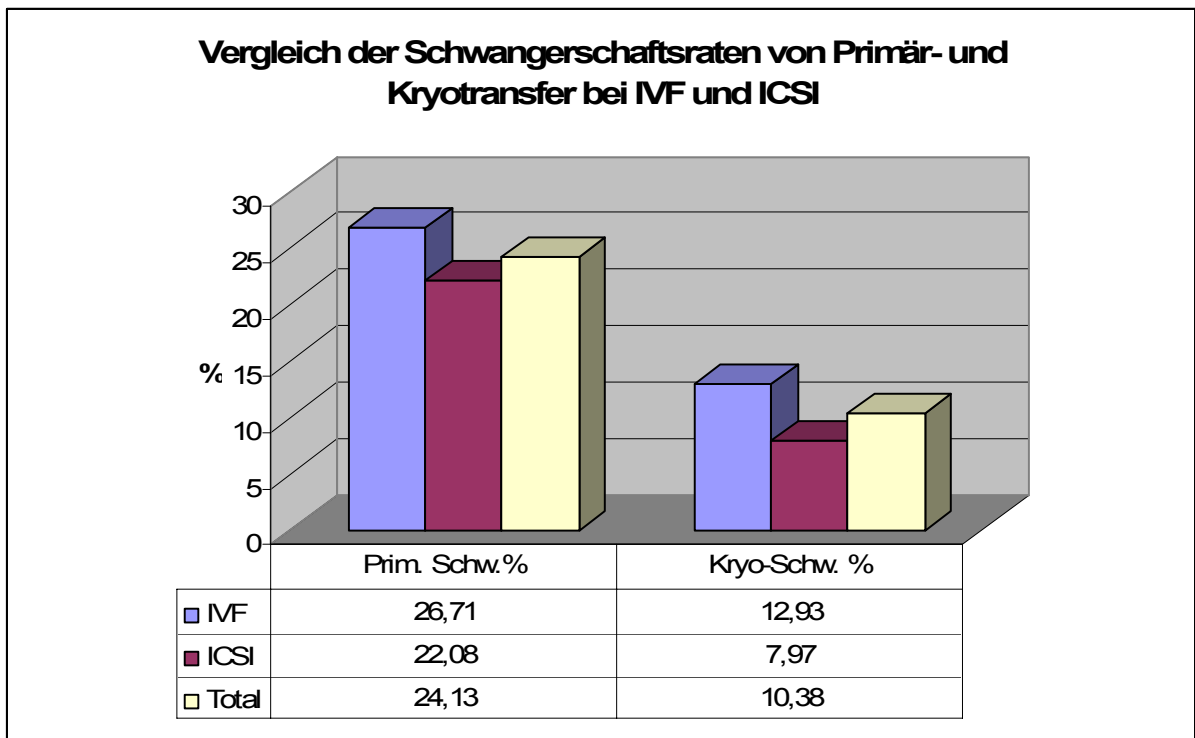


Abb. 40 Vergleich der Schwangerschaftsraten für IVF und ICSI bei Kryo- und Primärtransfer

Wie im Kapitel 4.7 für die Kryo- Schwangerschaften dargestellt wurde und aus Abbildung 39 mit dem direkten Vergleich der beiden Methoden beim Kryo- und Primärtransfer nochmals deutlich wird, ist die Schwangerschaftsrate für IVF bei beiden Transfermethoden, insbesondere aber beim Kryotransfer deutlich höher als für ICSI ($p=0,068$).

4.9.3 Primäre und sekundäre Sterilität

Beim Vergleich der beiden Methoden bezüglich primärer und sekundärer Sterilität ergibt sich wiederum eine wesentlich höhere Schwangerschaftsrate für den Primärtransfer, nämlich von 14,3% bei der primären Sterilität und 37,8% bei der sekundären Sterilität (Abb.41). Demgegenüber war nach Kryotransfer bei der primären Sterilität nur eine Schwangerschaftsrate von 7,5% dagegen bei der sekundären Sterilität eine solche von 15,20% zu erreichen (Tab.6, Abb.42).

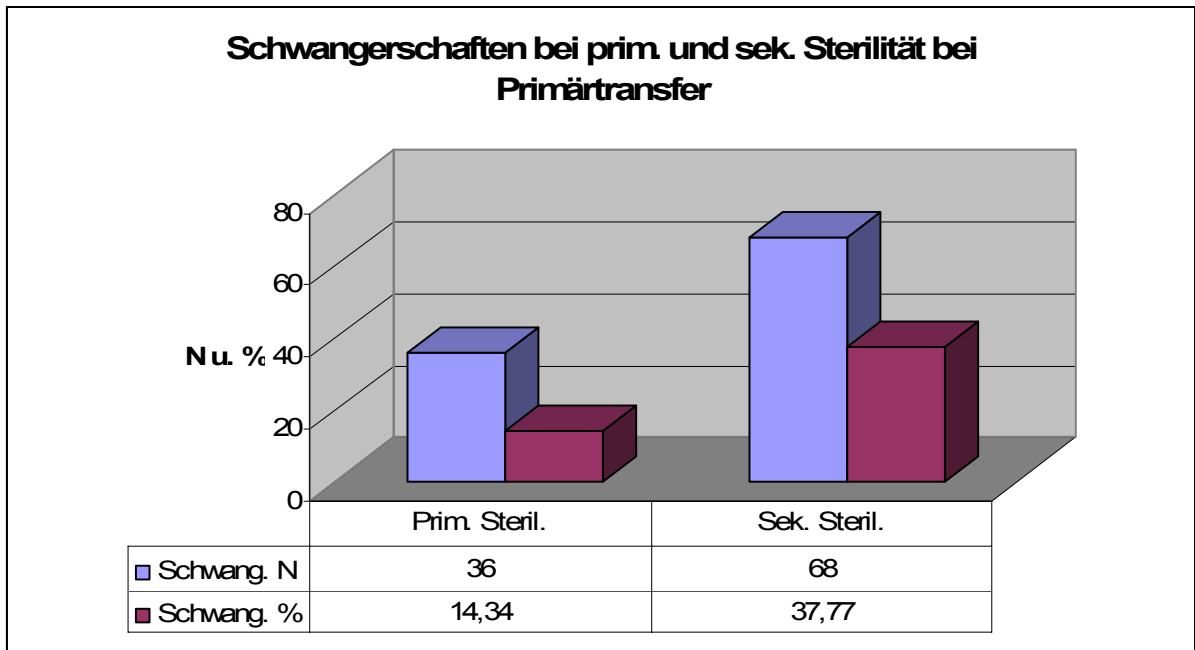


Abb. 41 Schwangerschaftsraten für primäre und sekundäre Sterilität beim Primärtransfer

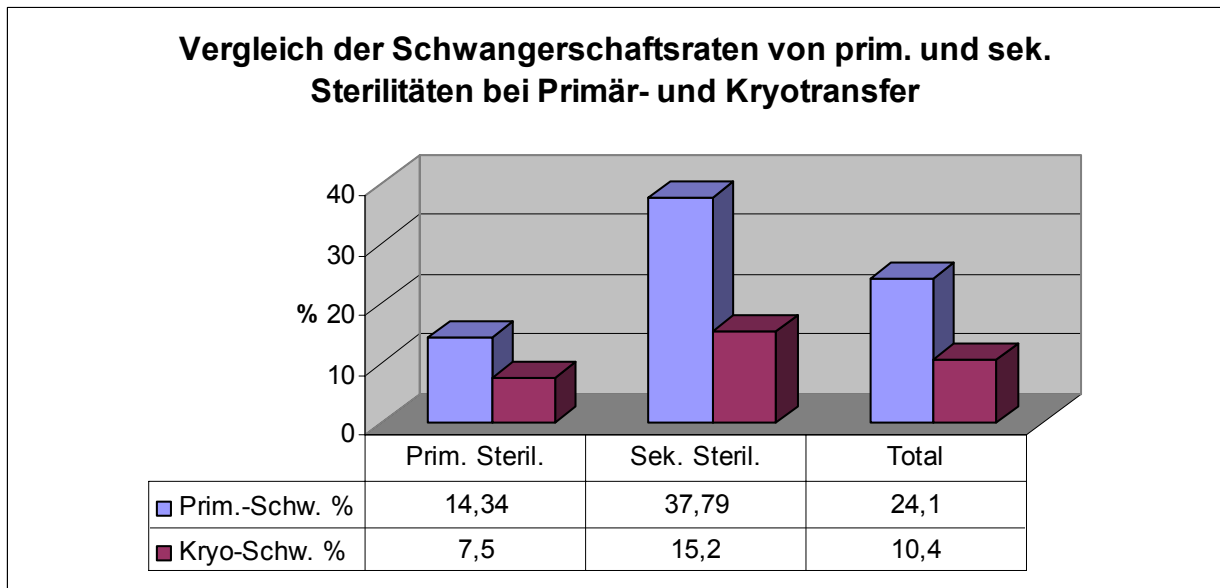


Abb. 42 Schwangerschaftsraten nach Kryotransfer und Primärtransfer bei primärer und sekundärer Sterilität

Patientinnen mit sekundärer Sterilität haben eindeutig eine höhere Erfolgsrate. Sowohl bei der Behandlung im Punktionszyklus (Primärtransfer, $p = 0,001$) als auch im Kryozyklus ($p = 0,002$) ist der Unterschied hoch signifikant.

4.9.4 Alter der Patientin

Tab. 14 Altersabhängige Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten beim Primärtransfer und bei Kryozyklen

| Eizellgewinnung und Behandlung in verschiedenen Altersgruppen | | | | | |
|--|-------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|
| Altersgruppen | 30 J | 31-35 J | 36-40 J | >40 J | Total |
| Punktionszyklen N | 132 | 206 | 89 | 4 | 431 |
| Gewonnene Eizellen M±SD | 13,28±5,32 | 12,89±6,03 | 11,58±4,15 | 14,25±6,8 | 12,75±5,49 |
| Gewonnene Eizellen N | 1753 | 2655 | 1031 | 57 | 5496 |
| Befruchtete Eizellen M±SD | 8,23±3,71 | 8,03±3,73 | 7,65±2,89 | 8,25±3,59 | 8,02±3,56 |
| Befruchtete Eizellen N | 1087 | 1655 | 681 | 33 | 3456 |
| Befruchtungsrate % | 62,0% | 62,3% | 66,1% | 57,9% | 62,9% |
| Primärtransfer Emb. M±SD | 1,88±0,88 | 2,01±0,8 | 2,45±0,67 | 2,5±0,58 | 2,06±0,83 |
| Primärtransfer Emb. N | 248 | 414 | 218 | 10 | 890 |
| Schwangerschaften Prim. N | 34 | 56 | 14 | 0 | 104 |
| Schwangerschaftsrate Prim. % | 25,8% | 27,2% | 15,7% | 0,0% | 24,1% |
| Eingefrorene PN M±SD | 6,11±4,05 | 5,79±3,7 | 5,3±3,02 | 5,75±4,11 | 5,79±3,69 |
| Eingefrorene PN N | 806 | 1193 | 472 | 23 | 2494 |
| Transferierte Emb. M±SD | 2,12±0,68 | 2,08±0,76 | 2,28±0,66 | 1,08±0,85 | 2,13±0,72 |
| Transferierte Emb. N | 349 | 535 | 253 | 13 | 1150 |
| Kryozyklen N | 165 | 249 | 113 | 12 | 539 |
| Schwangerschaften Kryo N | 16 | 28 | 12 | 0 | 56 |
| Schwangerschaftsrate Kryo % | 9,7% | 11,2% | 10,6% | 0,0% | 10,4% |

Anhand der Tabelle 13 und Abb.42 zeigt sich die höchste Schwangerschaftsrate im Punktionszyklus wie auch im Kryozyklus im Altersinterwall zwischen 31-35 Jahren (27,2% bzw. 11,2%).

Mit zunehmendem Alter nimmt die Schwangerschaftsrate in beiden Gruppen ab, jedoch lässt die niedrige Fallzahl der über 40-Jährigen keine statistisch relevante Aussage zu.

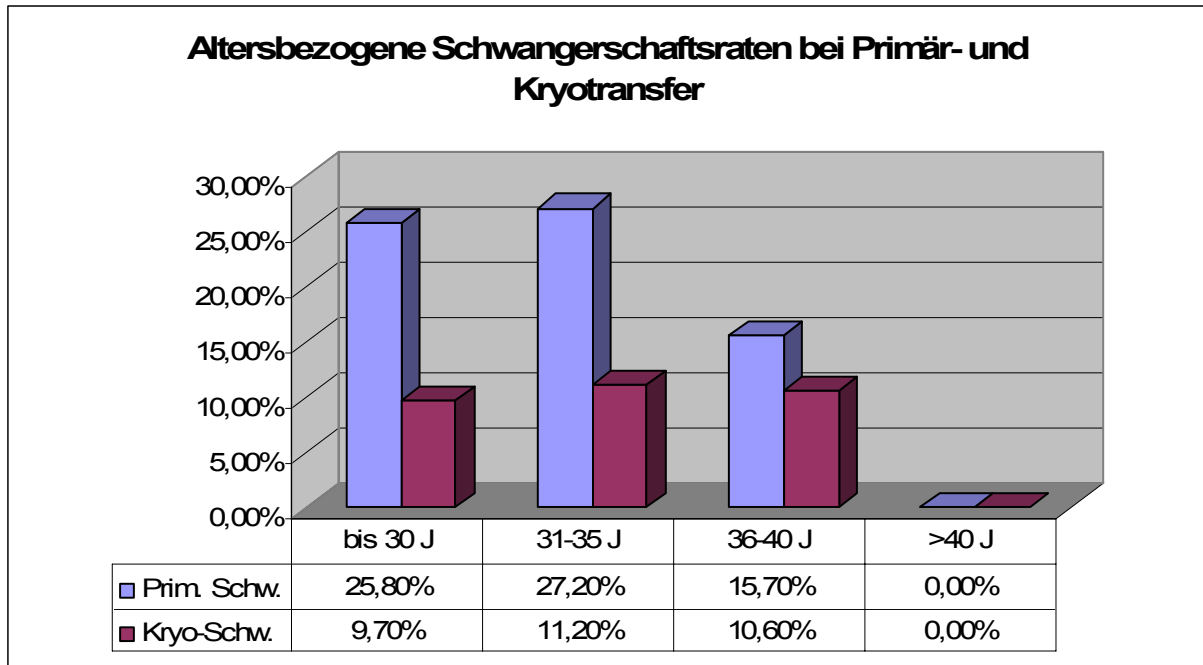


Abb. 43 Schwangerschaftsraten bei Primär- und Kryotransfer in den verschiedenen Altersstufen

Aus Tabelle 13 und Abbildung 44 geht wiederum hervor, dass die Schwangerschaftsraten auf das Alter bezogen beim Primärtransfer in etwa doppelt so hoch lagen als nach Kryotransfer.

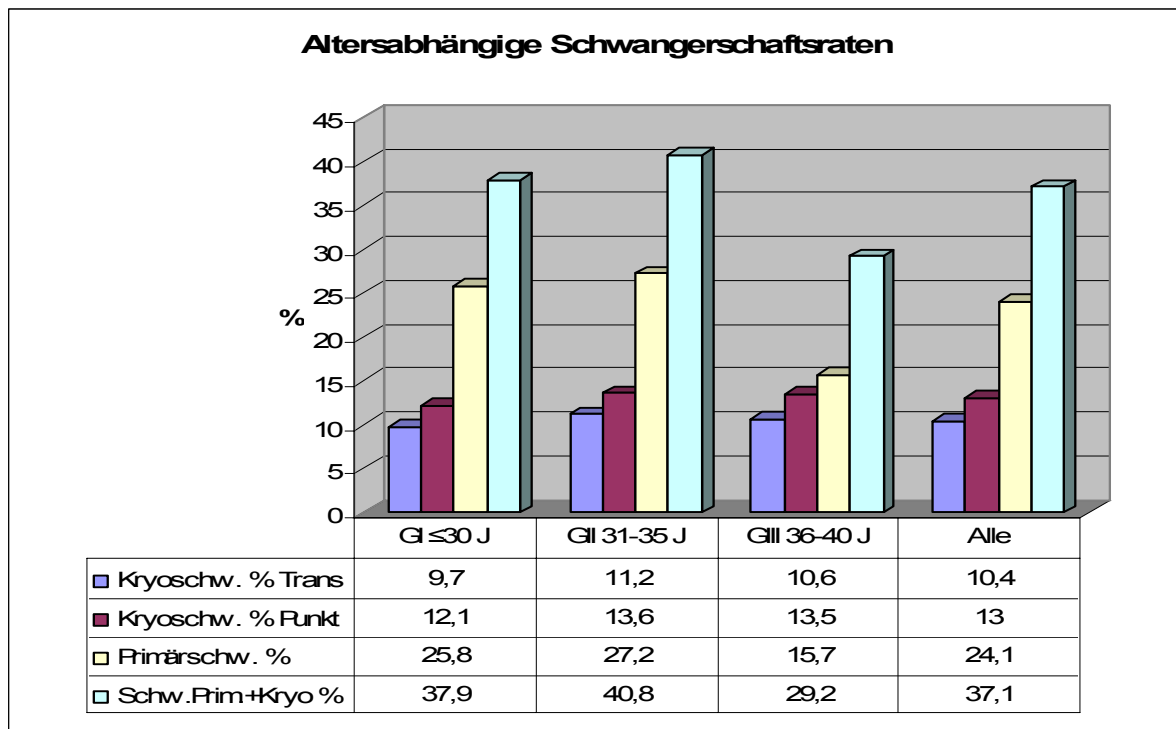


Abb. 44 Schwangerschaftsraten bezogen auf die Anzahl der Transfers, der Punktionen und kumulative Schwangerschaftsrate (Primär + Kryo) pro Punktion.

Jüngere Frauen bis 35 Jahre erreichen insbesondere beim Primärtransfer deutlich höhere Schwangerschaftsraten (25,8% bzw. 27,2%) als über 35-Jährige (15,7%), sodass bei 31-35 Jährigen eine kumulative Rate von 40,8% erreicht wird. Bemerkenswert ist allerdings, dass beim Kryotransfer mit durchschnittlich 13% kaum ein Unterschied zwischen den Altersgruppen besteht.

5 Diskussion

Kryokonservierung von imprägnierten Eizellen ist ein etabliertes Verfahren bei der Kinderwunschtherapie. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methodik ist es, durch eine einmalige Stimulation genügend Eizellen gewinnen zu können, die in späteren Zyklen bei guter Befruchtungsrate dann für die weitere Therapie zu Verfügung stehen, was eine erhebliche körperliche und finanzielle Entlastung für die Patientin bedeutet. Kommt es im Rahmen der hormonellen Behandlung zur Erzeugung einer großen Anzahl von Follikeln zu einer Überstimulierung der Ovarien, so ist dieser Zyklus nicht für einen Transfer geeignet. Durch Kryokonservierung imprägnierter Eizellen kann man diese dann in späteren Zyklen transferieren (Queenan 1997)

5.1 Methodik der Kryokonservierung

Wie im allgemeinen Teil schon dargestellt wurde, gibt es unterschiedliche Methoden des Einfrierens und Auftauens von PN-Stadien bzw. Embryonen. Weltweit sind die besten Ergebnisse bisher mit relativ langsamem Einfrieren und schnellem Auftauen erzielt worden. Die relativ schlechten Ergebnisse des Überlebens aufgetauter Embryonen wird zum Teil auf eine Störung des Spindelapparates zurückgeführt (Rienzi et al. 2004). Obwohl die meisten Spindeln nach langsamem Einfrieren und schnellem Auftauen eine normale Morphologie aufwiesen, konnte er zeigen, dass der Spindelapparat während des Auftauens zunächst zerstört war und sich erst während der Waschprozedur bei 37 Grad im Kulturmedium wieder neu formiert hat.

Eine neue Einfriermethode stellt die Vitrifikation dar, eine Methode, bei der das Gefriergut ultraschnell gefroren wird, so dass eine Kristallisation unterbleibt und der Zellinhalt sich schockartig gläsern verfestigt (Rall and Fahy 1985). Aigner et al. (1992) konnten zeigen, dass die Vitrifikation zumindest bei Mäuse- Oozyten den Spindelapparat größtenteils unversehrt ließ. Da sie aber doch einige abnorme Spindeln und Chromosomen- Dislokationen beobachteten, warnten sie vor dem möglichen genetischen Risiko der Vitrifikation von Oozyten.

Vor kurzem wurden bezüglich der Vitrifikation auch bei menschlichen Oozyten und PN-Stadien deutliche Fortschritte gemacht, im Wesentlichen durch Ersatz der Kryoprotektiva DMSO und Propandiol durch Ethylenglycol. So konnten Orief et al. (2005) nach Vitrifikation von 155 PN-Stadien über eine Überlebensrate von 88% und eine Schwangerschaftsrate von 46% berichten. Wahrscheinlich gehört der Methode der Vitrifikation, nicht zuletzt wegen ihrer technischen Einfachheit, die Zukunft (Liebermann et al. 2003).

5.2 Klinische Parameter

In dieser Studie wurden retrospektiv Fälle in verschiedenen Altersgruppen und mit verschiedenen Sterilitätsursachen untersucht, bei denen nach Follikelstimulation mit unterschiedlichen Stimulationsmedikamenten, die Follikel punktiert wurden. Die gewonnen Eizellen wurden kultiviert und mit dem aufbereiteten Sperma des Ehemannes inseminiert, teils nach klassischer Methode der In-vitro-Fertilisation (IVF), teils mit Hilfe der Intracytoplasmatischen Spermien-Injection (ICSI).

Die befruchteten Eizellen wurden dann beurteilt, zwei bis drei wurden weiter für den Transfer kultiviert und die restlichen imprägnierten Eizellen nach Äquilibration mit dem langsamen Einfrierverfahren (mit computergesteuerten Einfriergeräten) eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Für den Kryotransfer wurden die imprägnierten Eizellen im Schnellverfahren aufgetaut, kultiviert, und in verschiedenen Entwicklungsstadien (in der Regel zwei bis sechs Zellen) nach ihrer Beurteilung transferiert und zwar maximal drei Embryonen pro Behandlungszyklus. Der Transfer fand teils in Spontanzyklen und teils in artifiziellen Zyklen mit künstlichem Endometriumsaufbau statt. Es wurde festgehalten, ob die Patientinnen schwanger wurden oder nicht.

Ziel der Studie war es herauszufinden, ob verschiedene klinische Parameter wie Alter der Patientinnen, Verteilung der Sterilitätsursachen auf Mann und/oder Frau, organische oder funktionelle Störungen bei der Frau, primäre oder sekundäre Sterilität, verschiedene Stimulationsprotokolle zur Follikelpunktion, die Zyklusvorbereitung vor dem Transfer, das Entwicklungsstadium und die Anzahl der Embryonen sowie die Gefrierlagerungsdauer die Schwangerschaftsrate beeinflussen. Bei allen Untersuchungen wurde dem Unterschied zwischen IVF und ICSI eine besondere Bedeutung zugemessen.

Diese Arbeit untersucht den Einfluss verschiedener klinischer Parameter auf die Befruchtungsraten der gewonnenen Eizellen nach Follikelpunktion und die Schwangerschaftsraten nach Transfer von Embryonen, die nach Kryopreservation von Eizellen im PN-Stadium, Wiederauftauen und Bebrüten erzielt worden waren. Darüber hinaus wurden diese Ergebnisse mit ausgewählten Ergebnissen des direkten Transfers von PN-Stadien und Embryonen im Punktions-Zyklus verglichen. Dies wurde für Alter der Patientin, Anzahl der transferierten Embryonen, IVF und ICSI und primäre und sekundäre Sterilität in Kapitel 4.9 ausgeführt.

Als Vergleichsstandard diente das Deutsche IVF-Register aus dem Jahre 2001, weil dieses Jahr der zeitlichen Mitte für den Zeitraum dieser Studie (Nov. 1996 – Nov. 2004) entspricht. Neuere Ergebnisse aus dem deutschen IVF-Register des Jahres 2005 wurden fallweise zum Vergleich angegeben.

5.2.1 Alter der Patientinnen

Bezüglich des Alters der Patientinnen wurde eine Unterteilung in vier Gruppen vorgenommen. In G I wurden die Patientinnen im Alter von 20-30 Jahren, in G II Patientinnen von 31- 35 Jahren, G III von 36 bis 40 Jahren und G IV Patientinnen über 40 J. Die größte Gruppe mit den meisten Patientinnen und meisten Behandlungszyklen war Gruppe II, die kleinste war Gruppe IV.

Die Befruchtungsrate nach Punktion lag am höchsten in der Gruppe III bei 66,1% und am niedrigsten in Gruppe IV bei 57,9%. Die Schwangerschaftsrate in Kryozyklen war in der Gruppe II am höchsten (11,2%).

In allen Altersgruppen ist der Primärtransfer etwa doppelt so erfolgreich wie der Kryotransfer. Bei insgesamt 4 Patientinnen in Gruppe IV hatten 2 eine normale ovarielle Reserve und es konnten von beiden je 22 Eizellen gewonnen werden woraus ein relativ hoher Mittelwert für die Eizellgewinnung resultiert.

Im Kryokollektiv war der Unterschied der Schwangerschaftsraten zwischen den verschiedenen Altersgruppen minimal (GI 9,7%, GII 11,2%, GIII 10,6%). Bei der Patientinnen-Gruppe über 40 Jahren (GIV) ist keine Schwangerschaft erzielt worden, allerdings bei einer geringen Fallzahl (Tab.14 und Abb.44).

Die Schwangerschaftsrate nahm beim Primärtransfer nach dem 35. Lebensjahr ab. In unserem Patientenkollektiv betrug sie für GI 25,8 %, für GII 27,2% und für GIII 15,7 %.

In der kumulativen Statistik des Deutschen IVF-Registers (2001) betrug die Schwangerschaftsrate für den Kryotransfer bei Frauen bis 35 Jahre 18,4 % und über 35 Jahre 14,3%. pro Embryotransfer. Die Daten aus dem Deutschen IVF-Register des Jahres 2005 sind detaillierter nach Altersgruppen aufgeschlüsselt und betragen für das Alter bis 24 J 18,4%, für 25 bis 29 J 17,5%, für 30 bis 34 J 19,2%, für 35 bis 39 J 18% und für 40J und mehr 13,4%.

Für den Primärtransfer werden in der gleichen Publikation für die entsprechenden Altersgruppen folgende Schwangerschaftsraten angegeben: Bis 24 J 32,6%, für 25 bis 29 J 34,4%, für 30 bis 34 J 32,9%, für 35 bis 39 J 26,4% und für 40 J und mehr 16,5%.

In der Studie von Veeck (1996) wurde bezüglich der Befruchtungsrate beschrieben, dass das Alter der Patientinnen zu dem Zeitpunkt der Kryokonservierung eine entscheidende Rolle für die spätere Schwangerschaftsrate nach dem Auftauen der PN-Stadien spielte. Man könnte annehmen, dass bei der ICSI das Alter keine große Rolle spielen müsste weil das Spermium in der Eizelle injiziert wird. Genaue Untersuchungen von Bals-Pratsch und Dietrich (2001) sowie van Zonnefeld et al. (2003) haben ergeben, dass die Qualität der Eizellen mit zunehmendem Alter deutlich nachlässt und dass deshalb die Schwangerschaftsrate abnimmt. Sancken et al. (2005) führen dies auf eine Veränderung des Spindelapparates der Oozyten und die ansteigende Aneuploidierate zurück.

Miller und Smith (2001) berichteten dagegen, dass die Motilität und Spermamorphologie für die Blastocystenteilung eine bedeutende Rolle spielt, so dass auch der paternale Faktor zu berücksichtigen sei, zumal ICSI vorwiegend bei der männlichen Sterilitätsursache angewendet wird.

5.2.2 Anzahl der transferierten Embryonen

Die Anzahl der bei einem Transfer übertragenen Embryonen hat eine große Bedeutung für die Schwangerschaftsrate.

Im vorliegenden Kollektiv ist beim Kryotransfer mit einem Embryo die Erfolgsrate 6,6%, bei 2 Embryonen 10,1% und bei 3 Embryonen 13,2% (Abb.26)

Pandian et al. (2005) wiesen darauf hin, dass die Schwangerschaftsrate bei Transfer von zwei Embryonen genauso groß sei wie bei zweimaligem Transfer von einem Embryo in verschiedenen Behandlungszyklen.

Schroder et al. (2002) berichten über Schwangerschaftsraten von 1,9%, 8,2% und 13,0% nach dem Kryotransfer von 1, 2, oder 3 Embryonen.

Wenn man in der Altersverteilung auch noch die Anzahl der transferierten Embryonen berücksichtigt (Abb. 12), ergibt sich im vorliegenden Kryokollektiv für die Altersgruppe bis 35 Jahre ein eindeutiger Anstieg der Schwangerschaftsrate mit zunehmender Embryonenzahl (GI: 6,9%, 9,1%, 12,5%, GII: 8,3%, 10,2%, 15,4%), der jedoch bei der Altersgruppe über 35 Jahren zwischen GII und GIII nicht sichtbar ist (GI: 0%, GII: 12,3%, GIII: 11,6%).

Im Deutschen IVF-Register (2001) ist beim Kryotransfer ein Anstieg der Schwangerschaftsrate mit zunehmender Embryonenzahl in den Altersgruppen bis 35 J deutlich erkennbar (1 Embryo 8,9%, 2 Embryonen 16,8%, 3 Embryonen 25,0%). In der Altersgruppe über 35 J sind die entsprechenden Raten 4,3%, 15,1% und 17,2%.

Im Deutschen IVF-Register des Jahres 2005 werden für den Kryotransfer folgende Schwangerschaftsraten angegeben: 1 Embryo: 9,9%, 2 Embryonen: 19,2%, 3 Embryonen: 20,0%. Die durchschnittliche Schwangerschaftsrate betrug 18,0%.

Auch beim Transfer frischer Embryonen korrelierte im Deutschen IVF-Register (2001) die Schwangerschaftsrate mit der Zahl der transferierten Embryonen. Sie betrug in der Altersklasse bis 35 Jahre bei Transfer eines Embryos 14% bei zwei Embryonen 32% und bei 3 Embryonen 33%, in der Altersklasse über 35 Jahren waren die entsprechenden Zahlen 9%, 22% und 25%.

Auch in der internationalen Literatur korreliert beim Transfer frischer Embryonen nach Punktion die Schwangerschaftsrate mit der Zahl der transferierten Embryonen. Nach Lancaster (1992) zeigte das australische IVF- Register bei 3836 ausgewerteten Schwangerschaften nach frischem Transfer eines Embryos eine Schwangerschaftsrate von 9,8%, nach 2 Embryonen 21,9% und nach 3 Embryonen 33,8%. Die Erfolgsrate ließ sich durch den Transfer höherer Embryonenzahlen als 3 nicht mehr steigern.

Das deutsche Embryonenschutzgesetz (ESchG, 1990 BGB1 S.2746), schreibt vor, dass keine Selektion der Embryonen für den Transfer vorgenommen werden darf. Es dürfen also nur so viele PN-Stadien kultiviert werden wie anschließend übertragen werden dürfen, also maximal drei. Die Möglichkeiten, die im Ausland mittels der Embryonenauswahl hin zum „single embryo transfer“ (SET) (Gerris et al. 1999) gegeben sind, sind aufgrund des deutschen Embryoschutzgesetzes in Deutschland nicht vorhanden. Ludwig et al (2000) haben nach diesen Gesichtspunkten 2 Gruppen verglichen, nämlich die eine, bei der unselektiert maximal drei PN-Stadien kultiviert und anschließend übertragen wurden und eine andere Gruppe, bei der nach Kultivierung mehrerer PN-Stadien die zwei oder drei besten ausgewählt und transferiert wurden. Die dadurch erzielten Schwangerschaftsraten waren in der unse-

lektierten Gruppe beim Übertrag von 1, 2 oder 3 Embryonen 3,9%, 9,1% und 17,7% und bei der selektierten Gruppe 22,0% und 22,5% wenn zwei oder drei Embryonen übertragen worden waren.

5.2.3 IVF und ICSI

In der vorliegenden Arbeit war für 264 Kryo-Zyklen eine IVF-Therapie im Eizellentnahme- Zyklus durchgeführt worden und in 275 Zyklen eine ICSI.

Die Befruchtungsrate war nach IVF-höher und betrug 69,2%, gegenüber 57,8 % bei ICSI.

Beim Transfer frischer Embryonen unterscheidet sich die Schwangerschaftsrate von IVF (26,7%) und ICSI (22,1%) kaum (Tab.11, Abb.40). Ähnlich liegen die Ergebnisse im Deutschen IVF-Register (2001) mit 28,4% beziehungsweise 27,9%. Vergleicht man diese Ergebnisse dagegen mit der Darstellung in Abbildung 34 so sieht man, dass nach Kryokonservierung von Eizellen im PN Stadium die Schwangerschaftsrate mit durchschnittlich 10,4% wesentlich geringer ausfällt (D. IVF-Register 2001: 17,0%, 2005: 17,9%). Beim Kryotransfer zeigte die klassische IVF mit 12,9% eine deutlich höhere Schwangerschaftsrate als die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) mit 8,0%. Eine eindeutige statistische Signifikanz war allerdings nicht nachzuweisen ($p=0,068$).

Al-Hasani et al. (1996) berichteten in ihrer Arbeit beim Vergleich der Kryokonservierung von PN-Stadien und Zygoten nach IVF- und ICSI- Therapie, dass von 204 ICSI- und 89 IVF- Zygoten-Transfers 34 (17%) und 18 (20%) Schwangerschaften erzielt werden konnten. Hoover et al.(1997) publizierten ähnliche Ergebnisse mit 17% resp. 14% für IVF und ICSI. Die Folgerung ist, dass einerseits die Ergebnisse von Tiefgefrieren und Auftauen zwischen PN-Stadien und Zygoten keine signifikanten Unterschiede zeigten, andererseits aber auch IVF geringfügig erfolgreicher ist als ICSI.

Was den Einfluss der Befruchtungsart auf die Schwangerschaftsrate betrifft, sind die Mitteilungen in der Literatur sehr unterschiedlich. So berichteten Kowalik et al. 1998 dass ICSI keinerlei Einfluss auf die Überlebensrate und die erfolgreiche Implantation aufgetauter Embryonen habe, während Archer et al. noch im Jahre 2003 veröffentlichten, dass ICSI gegenüber IVF mit einer deutlich geringeren Entwicklungspotenz der Embryonen in vitro einhergeht.

Aytoz et al (1999) beschreiben eine Schwangerschaftsrate von 18,8% beziehungsweise 9,8% bei IVF nach Transfer von frischen beziehungsweise kryokonservierten Embryonen. In der ICSI- Gruppe waren diese Zahlen 16,4% und 6,8% und lagen damit etwas unterhalb der Ergebnissen der vorliegenden Studie. Dieser Unterschied geht auch in unserem Kollektiv deutlich aus dem direkten Vergleich beider Methoden, wie er in Abb.40 dargestellt ist, hervor.

5.2.4 Primäre und sekundäre Sterilität

Beim Vergleich des Primärtransfers und Kryotransfers an Hand von primärer und sekundärer Sterilität zeigt sich, dass der Primärtransfer mehr als doppelt so erfolgreich ist und zwar sowohl bei der primä-

ren Sterilität (15,2% gegenüber 7,5%) wie auch bei der sekundären Sterilität (37,8% gegenüber 14,3% Abb.42). Patientinnen mit sekundärer Sterilität haben wesentlich bessere Aussichten schwanger zu werden als Patientinnen mit einer primären Sterilität.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Patientinnen die zunächst primär steril waren, aber nach einem Primärtransfer schwanger geworden sind, bei Wiederholung eines Transfers wegen eines Abortes oder neuem Kinderwunsch, deutlich häufiger schwanger wurden als solche Patientinnen, bei denen es bei vorausgehendem Primärtransfer nicht gelungen war eine Schwangerschaft zu erzeugen. Wenn man die Tabelle 7 oder die Abbildung 20 betrachtet, so sieht man diesen Unterschied sehr deutlich. Die Erfolgsrate ist nämlich bei primärer Sterilität 7,1% und bei sekundärer Sterilität nach ART 15,2%. Auf diesen Zusammenhang haben auch El-Toukhy et al. (2003) hingewiesen, die eine Schwangerschaftsrate von 23% nach einem erfolgreichen vorausgegangenen Transfer erzielen konnten gegenüber einer Rate von 11,2% ohne vorausgehende ART- bedingte Schwangerschaft. Auch Wang et al. (2001) fanden bei einer Untersuchung über den Einfluss klinischer Faktoren auf die Implantationsrate und Mehrlingsgeburten dass die Erfolgsrate nach Kryotransfer von 2 Embryonen bei vorhandenem Tubenfaktor 10-14% und ohne Tubenfaktor 15-19% betrug, wenn in einem vorausgegangenen Primärtransfer keine Konzeption erfolgt war. Mit vorausgehender Konzeption waren die Raten deutlich höher, nämlich jeweils über 20%.

5.2.5 Sterilitäts-Ursachen

Bezüglich der Sterilitätsursachen sind die Unterschiede nach Kryotransfer nicht sehr eindeutig, es lässt sich allenfalls feststellen, dass die idiopathische Sterilität eine relativ günstige Prognose hat. Nach Tabelle 3 und Abbildung 14 liegt sie mit einer Schwangerschaftsrate von 14,9% deutlich über den Ursachen die die Frau oder den Mann oder beide betreffen (12,3%, 9,5% bzw. 6,7%). Innerhalb der weiblichen Ursachen sind die Erfolge bei organisch bedingter Sterilität, also Endometriose (ohne Tubenverschluss), tubarer Sterilität und uteriner Ursache, nicht wesentlich verschieden. Die Befruchtungsraten bei Endometriose ist mit 63,9% zwar niedriger als die bei uteriner oder tubarer Sterilität (70,8% bzw. 68,1%), die Schwangerschaftsraten dagegen mit 15,8% höher als bei den anderen beiden Gruppen (11,8% und 11,0%).

Der Einfluss klinischer Parameter auf die Schwangerschaftsrate wird in der Literatur fast ausschließlich für den Primärtransfer beschrieben. Nur bei Wang et al. (2001) wurden bei einer Untersuchung über den Einfluss klinischer Parameter auf die Implantationsrate und die Gefahr der Mehrlingsschwangerschaften auch eine Gruppe mit Kryotransfer verglichen. Bei Kryotransfer von 2 Embryonen konzipierten 10 – 15% der Frauen mit Tubenverschluss und 15 – 19% ohne Tubenverschluss.

Valentine et al. (2004) berichten nach dem Transfer frischer Embryonen über eine eindeutig verminderte Schwangerschaftsrate beim Vorhandensein auch geringer Endometrioseherde. Ihre Studie beruht auf 192 unfruchtbaren Paaren mit ungeklärter Ursache, wovon 75 Frauen eine minimale oder milde Endometriose ohne Verwachsungen der Eileiter aufwiesen. Die Endometriose-Gruppe hatte

beim Primärtransfer mit 36% eine deutlich geringere Schwangerschaftsrate als die Gruppe ohne Endometriose-Befund mit 55%.

Fahy et al. (1995) und Pandian et al. (2005), gleichlautend auch schon Cahill et al. (1997) und Van Zonneveld et. al. (2003) kamen zu dem Ergebnis, dass nur die eingeschränkte Ovarial- Funktion, wie sie im Klimakterium vorkommt, zu einer verringerten Befruchtungsrate führt und dass diese Einschränkung auch bei Endometriose- Patientinnen häufig zu finden ist. Suzuki (2005) fand dagegen, dass bei vorhandenen Endometriosezysten im Ovar, oder an anderer Stelle im Abdomen, zwar weniger Eizellen heranreifen als bei Patientinnen ohne Endometriose, dass aber das Vorhandensein einer Endometriose oder sonstiger organischer Störungen keinen Einfluss auf die Befruchtungsrate und Schwangerschaftsrate hatte. Er teilte sein Kollektiv in 3 Gruppen ein: Gruppe 1: 80 Zyklen mit Endometriosezysten am Ovar, Gruppe2: 248 Zyklen mit Endometriose im Bauchraum, aber nicht am Ovar, Gruppe 3: 283 Zyklen mit Tubenverschluss ohne Endometriose. Die Schwangerschaftsraten für die drei Gruppen waren: G1: 25,3%, G2: 22,3% und G3: 23,9%

Aus den Abbildungen 15 und 16 lässt sich ableiten, dass bei Frauen mit organischer Sterilitätsursache durchschnittlich etwas mehr Eizellen befruchtet werden können (Befruchtungsrate 63,9% – 70,8 %, Schwangerschaftsrate 11,0%-15,8%) als bei Frauen mit hormonell bedingter Sterilität (Befruchtungsrate 54,3% - 64,4%). Die 10 Patientinnen mit behandelter Hyperprolaktinämie wiesen mit 22,2% zwar eine gute Schwangerschaftsrate auf im Gegensatz zu den 33 Fällen mit PCO Syndrom die nur auf einer Rate von 3,8% kamen (Tab. 5, Abb.16).

Engmann et al. (1999) veröffentlichten eine Studie über ein Kollektiv von 46 Frauen mit PCO Syndrom und 145 Frauen mit normalen Ovarien bei denen sie nach jeweils 3 Kryo-Behandlungszyklen eine kumulative Schwangerschaftsrate von 70,8% bzw. 54,7% erzielten, d.h. die PCO- Gruppe war um 69% besser. Die Fertilisierungsrate war dagegen mit 59,4% bzw. 60,2% nahezu identisch.

5.3 Medikamente zur ovariellen Stimulation

Das synthetisch hergestellte rekombinante FSH-Präparat Gonal-F erzielte beim Kryotransfer mit 63,1 % und das rec. FSH mit HMG oder rekombinantem LH mit 64,4% höhere Befruchtungsraten als die HMG-Stimulation mit 55,6%, der Unterschied war aber nicht signifikant. Auch die Schwangerschaftsraten unterschieden sich nicht wesentlich (10,8%, 9,8%, 9,6%, Tab.9). Auch Fisch et al. (1995) fanden keinen wesentlichen Unterschied zwischen zwei verschiedenen Stimulationsmethoden, nämlich zwischen urinärem HMG und rekombinantem FSH, verabreicht nach Downregulation mit GnRH-Agonisten, bezüglich Dauer der FSH Behandlung, Gesamtdosis von FSH, Anzahl der reifen Follikel und Anzahl der gewonnenen Eizellen sowie der Fertilisations- und Transfer- Rate. In einer ausführlichen Stellungnahme zur Beurteilung der Äquivalenz von rekombinantem FSH und urinärem HMG (Menotropin) stellten Ludwig und Rabe (2004) die Vorteile des rekombinanten FSH dar, konnten aber mangels stichhaltiger Meta-Analysen den Beweis der Überlegenheit dieses Präparates nicht eindeutig führen. Anlass für diese Arbeit war der Bericht von van Wely et al. (2003) die zu dem Schluss kamen,

dass zwischen recombinantem FSH und urinärem HMG kein wesentlicher Unterschied besteht was die klinische Wirkung, Nebenwirkungen und die Schwangerschaftsrate betrifft.

Zur Klärung der Sachlage werteten Ludwig et al. (2004) nachfolgend 24.764 ART-Zyklen von 74 reproduktionsmedizinischen Zentren in Deutschland aus. Verglichen wurden recombinantes humanes FSH der Firma Serono mit urinärem HMG der gleichen Firma bezüglich verbrauchter Mengen und Schwangerschaftsraten. Es zeigte sich eine leichte aber statistisch signifikante Überlegenheit für recombinantes humanes FSH von dem 39,5 Prozent weniger eingesetzt werden musste zur Erzielung einer Schwangerschaftsrate von 16,9 Prozent gegenüber einer solchen von 14,5 Prozent in der Gruppe mit urinärem HMG.

5.4 Medikamentöse Vorbereitung des Kryotransfer-Zyklus

Die Vorbereitungen des Kryotransferzyklus spielt offensichtlich eine große Rolle für den Erfolg des Transfers. Eindeutig am besten schnitt im vorliegenden Kollektiv der unbeeinflusste Spontanzyklus mit einer Schwangerschaftsrate von 15,7% ab, gefolgt von den mit Clomifen oder HMG leicht simulierten Zyklen (14,3% und 14,3%). Der artifizielle Zyklus mit Estradiolvalerat hatte dagegen eine deutlich niedrigere Schwangerschaftsrate (8,6%). Der artifizielle Zyklus wird insbesondere dann angewandt, wenn eine Zyklusstörung vorliegt und ein suffizienter Spontanzyklus beziehungsweise ein Zyklus mit Spontanovulation nicht zu erzielen ist.

Reeka et al. (2001) haben 208 Transferzyklen retrospektiv analysiert und in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1: Spontanzyklen, Gruppe 2: Zyklen, bei denen die Stimulation mit recombinantem FSH erfolgte und Gruppe 3: Artifizielle Zyklen (GnRH-Analagon, Estradiolvalerat, Progesteron). Die Schwangerschaftsrate lag in Gruppe 1 bei 16,9 % in Gruppe 2 ebenfalls bei 16,9 % und in Gruppe 3 bei 12,0 %. Die Gesamtrate weiterführender Schwangerschaften betrug in Gruppe 1 13,5 % in Gruppe 2 9,2 % und in Gruppe 3 0 %. Die Anzahl transferierter Embryonen betrug durchschnittlich 2,3. Auch hieraus geht hervor, dass Spontanzyklen oder leicht stimulierte Zyklen für den Transfer wesentlich besser geeignet sind als artifizielle Zyklen. Nawroth und Ludwig (2005) haben sich auch mit diesem Problem befasst und weisen der Progesterongabe vor dem Transfer eine große Bedeutung zu. Der Transfer sollte demgemäß nicht vor dem dritten oder vierten Tag der Progesterongabe erfolgen, wobei ein dreischichtiges mindestens acht Millimeter dickes Endometrium, sonographisch gemessen, vorhanden sein soll.

5.5 Entwicklungsstadium des transferierten Embryos

Tabelle 10 und Abbildung 27 zeigen deutlich, dass die Schwangerschaftsrate bei höher entwickelten Embryonen also im Zwei- oder Vier- Zell-Stadium derjenigen überlegen ist, die man bei der Übertragung eines Pronucleus- Stadiums erhält.

Wenn man die Anzahl der übertragenen Embryonen in Relationen zum Entwicklungsstadium setzt, und dabei nur die prozentualen Erfolgsraten vergleicht, wie dies in Abbildung 29 geschehen ist, so

sieht man, dass die Übertragung von drei Embryonen im 4-Zellstadium die höchste Erfolgsrate hat (23,1%) und die Übertragung einer einzigen Zelle im Pronucleusstadium die geringste Erfolgsrate hat (4,3%).

Guerif et al. (2002) berichteten über eine wesentlich höhere Erfolgsrate bei der Übertragung geteilter Embryonen gegenüber ungeteilten Embryonen (Zygote) (19,7 % gegen 3,0%). Andere Autoren beziehen sich dagegen auf die Zeit zwischen Auftauvorgang und Embryotransfer: Salumets et al. (2003) beschrieben keinen signifikanten Unterschied bezüglich klinischer Schwangerschaft, Implantation und Geburtenrate zwischen dem Transfer von Zygoten, und Transfer nach zwei oder drei Tagen. Jaroudi et al. (2004) verglichen die Schwangerschaftsrate nach Transfer am Tag 1 im Pronucleusstadium mit Tag 3 also einem Mehrzell-Stadium das aber nicht genauer charakterisiert wurde. Es wurden jeweils die besten zwei Embryonen für den Transfer ausgewählt. Die Erfolgsrate war beim Transfer am dritten Tag mit 42% deutlich höher als am ersten Tag mit 28%.

In der vorliegenden Studie erfolgte der Transfer überwiegend 24 Stunden nach dem Auftauen,

Es wurden 158 PN-Stadien, 252 2-Zell-Stadien, 226 4-Zell-Stadien und 33 >4Zell-Stadien, oft in Kombination, transferiert und dabei Schwangerschaftsraten von 5,7%, 11,9%, 12,8% und 12,1% erzielt.

In diesem Zusammenhang berichteten Al-Hasani et al. (2000) über ein Kollektiv von 525 Behandlungszyklen mit einem Direkttransfer bei 298 Zyklen im Vergleich zu einem Transfer nach Inkubation über 24 Std. bei 227 Zyklen. Die Schwangerschaftsrate betrug beim sofortigen Transfer nur 7,7%, nach 24-stündiger Kultur dagegen 14,5%. Demgegenüber berichteten Senn et al (2000) nahezu das Gegenteil, nämlich eine Schwangerschaftsrate von 19,5 % bei sofortigem Transfer nach dem Auftauen kryopreservierter PN-Zellen gegenüber 10,9 Prozent beim Transfer von Embryonen in frühen Teilungsstadien.

5.6 Einfluss der Gefrierlagerungsdauer auf die Schwangerschaftsrate

Wie aus Tabelle 12 und den Abbildungen 35, 36 und 37 ersichtlich ist, waren die Schwangerschaftsraten praktisch unabhängig von der Gefrierlagerungsdauer obwohl die Anzahl der überlebenden PN-Stadien mit zunehmender Lagerungsdauer Gefrierzeit abnahm. Überlebten bei bis zu dreimonatiger Lagerung noch 71,2% der Zellen so sank diese Zahl über die Jahre langsam kontinuierlich ab bis 62,8% nach 2-4 Jahren. Über den Einfluss der Gefrierdauer auf das Entwicklungspotential von PN-Stadien oder Embryonen wird in der Literatur sehr wenig mitgeteilt. Veek et al. (1993) berichten dass der Einfluss der Lagerungszeit von Embryonen unbedeutend war.

Machtinger et al. (2002) verglichen 2 Kollektive von je 101 Patientinnen (matched case controlled study) mit einer Lagerungsdauer der Embryonen von 2 – 9 Jahren mit einer Lagerungsdauer unter 6 Monaten. Die Implantationsraten unterschieden sich mit 4,5% bzw. 5,5% (N= 13 bzw. 19) nicht signifikant.

Revel et al (2004) berichteten über eine Zwillingengeburt 12 Jahre nach Kryopreservation eines menschlichen Embryos.

Literaturverzeichnis

1. Aigner S., Van der Elst J., Siebzehnrübl E., Wildt L., Lang N. and Van Steirteghem A.C., 1992, The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte, *Hum. Reprod.*, Band 7, 6, S.857-864
2. Archer J., Gook D.A. and Edgar D.H., 2003, Blastocyst formation and cell numbers in human frozen-thawed embryos following extended culture, *Hum. Reprod.*, Band 18, 8, S.1669-1673
3. Al-Hasani S., Untersuchung zur Kryokonservierung von Kaninchen- Oozyten, menschlichen Oozyten und Oozyten im Vorkernstadium, Habilitationsschrift, Lübeck, 1994
4. Al-Hasani S., Ludwig M., Gasteiger F., Kupker W., Sturm R., Yilmaz A., Bauer O., Diedrich K, 1996, Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilisation, *Hum. Reprod.*, Band 11, 3, S.604-607
5. Al-Hasani S., Sturm R., Diedrich K. Ergebnisse der Kultivierung von eingefrorenen und aufgetauten Oozyten im Vorkernstadium für 24 Std.:führt es zu einer Verbesserung der Schwangerschaftsrate?, Stuttgart, New York, Georg-Thieme- Verlag, 2000
6. Aytoz A., Van den Abbeel E., Bonduelle M., Camus M., Joris H., Van Steirteghem A., Devroey P., 1999, Obstetric outcome of pregnancies after the transfer of cryopreserved and fresh embryos obtained by conventional in-vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection, *Hum. Reprod.*, Band 14, 10, S.26219-26248
7. Bals-Pratsch M., Diedrich K., 2001, Assistierte Reproduktion bei Frauen mit einer beginnenden Perimenopause, *J. Fertil. Reprod.*, Band 1, S.24-34
8. Brandau H. u. Lehmann V., 1970, Histoenzymatic studies of human gonads during intrauterine development, *Z. Geburtshilfe und Perinatologie*, Band 173, 3, S.233-249
9. Cahill D.J., 1997, Ovarian dysfunction in endometriosis-associated and unexplained infertility., *J. Assist. Reprod. Genet.*, Band 14, 10, S.554-557
10. Cohen J., Simons R.F., Edwards R.G., 1985, Pregnancies following the frozen storage of expanding blastocysts., *J. In vitro Fertil. Embryo Transfer*, Band 2, S.59-64
11. Coticchio G., DeSantis L., Rossi G., Borini A., Albertini D., Scaravelli G., Alecci C., Bianchi V., Notola S., and Cecconi S., 2006, Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation., *Hum. Reprod.*, Band 21, 7, S.1771 - 1776
12. Damario MA., Barmat L., Liu HC., Davis OK., Rosenwaks Z., 1997, Dual suppression with oral contraceptives and gonadotrophin releasing- hormone agonists improves in-vitro fertilization outcome in high responder patients, *Hum Reprod.*, Band 12, S.2359-2365

13. Daya S., Optimal protocol for gonadotropin releasing hormone agonist use in ovarian stimulation, Abstract book, Vancouver, Canada, 1997, S.405-410
14. De Leeuw A.M., Rall W.F., den Daas J.H.G., Kruip Th. A. M., Comparative studies of the efficiency of rapid cryopreservation methods for bovine embryos, Reunion A.E.T.E., 1991, S.77-86
15. Diller K.R., Cravalho E.G. u. Huggins C.E., Intracellular freezing in biomaterials, Cryobiology, Hrsg.: . Congress on Future Aspects in Human in-Vitro Fertilisation: Band 9, Vienna, Austria, 1972, S.429-440
16. Diedrich K., Ätiologie der Infertilität, Gynäkologie und Geburtshilfe, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2000, S.90-105
17. Edwards R.G., Steptoe P.C., The freezing of mammalian embryos, Elsevier / Excerpta Medica, Hrsg.: Elliott K., Whelan J. (Eds.): Band Ciba Rndn. Symp. 52 (new series) 235, North- Holland, Amsterdam, 1977
18. Engmann L., Maconochie N., Sladkevicius P., Bekir J., Campbell S., Lin Tan S., 1999, The outcome of in-vitro fertilization treatment in women with sonographic evidence of polycystic ovarian morphology, Hum. Reprod., Band 14, 1, S.167-171
19. El-Toukhy T., Khalaf Y., Al-Darazi K., O'Mahony F., Wharf E., Taylor A., Braude P., 2003, Cryothawed embryos obtained from conception cycles have double the implantation and pregnancy potential of those from unsuccessful cycles, Hum. Reprod., Band 18, 6, S.1313-1318
20. Fahy, U.M., Cahill D.J., Wardle P.G., Hull M.G., 1995, In-vitro fertilization in completely natural cycles, Hum. Reprod., Band 10, 3, S.554-57
21. Farrant J. u. Morris G.J., 1973, Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury, Cryobiology, Band 10, S.134-140
22. Farrant J., Walter C.A., Heather L., MC Gann L.E., 1977, Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing, Cryobiology, Band 14, S.273-286
23. Fisch B., Avrech O.M., Pinkas H., Neri A., Rufus O., Ovadia J., Loumaye E., 1995, Superovulation before IVF by recombinant versus urinary human FSH combined with a long GnRH- analog protocol: A comparative Study, J Assist. Reprod. Genet., Band 12, 1, S.26-31
24. Friedler S., Guides L.C., Lam E.J., 1988, Cryopreservation of embryos and ovaries, Fert. Steril., Band 49, S.743-764
25. Geiger W., Die gestörte Ovarialfunktion, Endokrinologie, Stuttgart, Thieme- Verlag, 1976, S.186-200, ISBN 3-13-509301-8.
26. Gerhard I., Becker T., Eggert- Kruse W., Klinga K., Runnebaum B., 1991, Thyroid and ovarian function in infertile women, Hum. Reprod., Band 6, S.338-345

27. Gerris J., De Neubourg D., Mangelschots K., Van Royen E., Van de Meerssche, Valkenburg.M., 1999, Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial, Hum. Reprod., Band 14, S.2581 - 2587
28. Guerif F, Bidaut R., Cadoret V., Couet M. L., Lansac J., Royere D., 2002, Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation, a reappraisal, Hum. Reprod., Band 17, S.1321-1326
29. Herrler A., Beier H.M., 1998, Die Beurteilung der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung bei der ART, Reproduktionsmedizin, Band 14, S.131-142
30. Hoover L., Baker A., Check J.H., Lurie D., Summers D., 1997, Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection, Fertil. Steril., Band 67, 4, S.621-24
31. Jahrbuch des Deutschen IVF Registers, 2001 und 2005
32. Jaroudi K., Al-Hasani S., Sieck U., Al-Sufyan H., Al-Kabra M., Coskun S., 2004, Zygote transfer on day 1 versus cleavage stage embryo transfer on day 3, a prospective randomized trial,, Hum. Reprod., Band 19, 3, S.645-648
33. Just A., Obruca A., 2002, Die ovarielle Stimulation und Ovulationsinduktion in der ART, Journal für Fertilität und Reproduktionsmedizin, Band 12, 4, Schweiz, S.14-16
34. Kattera S, Shrivastav P, Craft I., 1999, Comparison of pronuclear- and multicellular-stage frozen-thawed embryo transfers, Assist. Reprod. Genet., Band 16, 7, S.358-362
35. Kazem R., Thompson LA., Srikantharajah A., Laing MA., Hamilton M.P.R., Templeton A., 1995, Cryopreservation of human oocytes and fertilisation by two techniques: In-vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection, Hum. Reprod., Band 10, S.2650-2654
36. Kowalik A., Palermo G.D., Barmat L., Veeck L., Rimarachin J., Rosenwacks Z., 1998, Comparison of clinical outcome after cryopreservation of embryos obtained from intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization, Hum. Reprod., Band 13, S.2848-2851
37. Lancaster P., Sydney National Perinatal Statistics Unit (NPSU), Sydney, Australia, 1992
38. Leibo S.P., Mazur P., 1971, The role of cooling rates in low- temperature preservation, Cryobiology, Band 8, S.447-452
39. Leibo, S.P., Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos, Elliott K., Whealan J. (Hrsg.), Hrsg.: Ciba Foundation Symp.: Amsterdam, No52, 1977, S.69-96
40. Leibo S.P., Mazur P., Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing, Methods in mammalian reproduction, Hrsg.: Daniel, J.C. (Hrsg.): New York, San Francisco, London, 1978 S.178-201

41. Leibo S.P., 1989, Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos, *Theriogenology*, Band 31, S.85-93
42. Leidenberger F.A., Die Entwicklung der weiblichen Fortpflanzungsorgane, *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1998, S.25-32
43. Levin R.L., and Cravalho E.G., 1976, A membrane model describing the effect of temperature on the water conductivity of erythrocyte membranes at subzero temperatures, *Cryobiology*, Band 13, S.415-429
44. Liebermann J., Dietl J., Vanderwalmen P., Tucker M., 2003, Recent developments in human oocyte-, embryo- and blastocyst-vitrification: where are we now?, *Reprod. Biomed.*, Band Online 7, S.623-633
45. Lovelock J.E., 1953, The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing, *Biochimica et Biophysica Acta*, Band 10, S.414-426
46. Ludwig M., Katalinic A., Banz C., Schroder A.K., Loning M., Weiss J.M., Dietrich K., 2002, Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients needs in ovarian stimulation for IVF: results of a prospective randomized study, *Hum. Reprod.*, Band 17, 11, S.2842-2845
47. Ludwig M., Schöpfer B., Katalinic A., Sturm R., Al-Hasani S., Diedrich K., 2000, Experience with the elective transfer of two embryos under the conditions of the German embryo protection law: Results of a retrospective data analysis of 2573 transfer cycles, *Hum. Reprod.*, Band 15, 2, S.319-424
48. Ludwig M., Rabe T., 2004, Beurteilung der Äquivalenz von rekombinantem FSH und Menotropin, *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, Band 1, 2, S.82-90
49. Ludwig M., Rabe T., Bühler K., Diedrich K., Felberbaum R., 2004, Wirksamkeit von rekombinantem humanem FSH im Vergleich zu urinärem HMG nach Downregulation im langen Protokoll. Eine Analyse von 24.764 ART- Zyklen in Deutschland., *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, Band 1, 4, S.284-288
50. Machtinger R., Dor J., Levron J., Mashiach S., Levran D., Seidman D.S., 2002, The effect of prolonged cryopreservation on embryo survival, *Gynecol. Endocrinol.*, Band 16, S.293 – 298
51. Macnamee M.C., Howles C.M., Edwards R., Tayler P., Elder K., 1989, Short term luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment: prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in-vitro-fertilization, *Fertil. Steril.*, Band 52, S.264-268
52. Mandelbaum J., Junca A.M., Plachot M., Alnot M.O., Alvarez S., Debache C., Salat-Baroux J., Cohen J., 1987, Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success, *Hum. Reprod.*, Band 2, 8, S.709-715
53. Mazur P., 1963, Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, *The Journal of General Physiology*, Band 47, S.347

54. Mazur P., Causes of injury in frozen and thawed cells Federation proceeding, Band 24, *Suppl. 15*, 1965 S.175-182
55. Mazur P., 1970, Cryobiology: The freezing of biological systems, Science, Band 168, S.939-949
56. Mazur P. Leibo S.P., Chu E.H.Y., 1972, A two-factor hypothesis of freezing injury, *Experim. Cell Research*, Band 71, S.345-355
57. Mazur P., 1977, The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology*, Band 14, S.251-272
58. Mazur P., Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos, 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I, Hrsg.: .: Band Vol.1, Madrid, 1980, S.pp. 99-114
59. Meryman H.T., 1956, Mechanism of freezing in living cells and tissues, Science, Band 124, S.515-521
60. Merymann H.T., The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury, *The frozen cell*, Hrsg.: Wolstenholme G.E.W., Conner M.O.: Churchill, 1970, S.51
61. Meryman, H.T., 1971, Cryoprotective agents, *Cryobiology*, Band 8, S.173-183
62. Miller R.H., Mazur P., 1976, Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities, *Cryobiology*, Band 13, S.404-414
63. Miller J.E.and Smith T.T., 2001, The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro, *Human Reprod.*, Band 16, S.918-924
64. Montag M., Baukloh V., 1998, Verbessert „Assisted Hatching“ die Schwangerschaftsrate?, *Reproduktionsmedizin*, Band 14, S.327-329
65. Nawroth F., Ludwig M., 2005, What is the ideal duration of progesterone supplementation before the transfer of cryopreserved-thawed embryos in estrogen / progesterone replacement protocols?, *Hum. Reprod.*, Band 20, 5, S.1127-1134
66. Nikolettos N., Al-Hasani S., 2000, Frozen pronuclear oocytes: Advantages for the patient, *Mol. Cell. Endocrinol.*, Band 169, 1-2, S.55-62
67. Olivennes F., Belaisch-Allart J., Emperaire J.C., Alvarez S., Moreau L., Nicollet B., Zorn J.R., Bouchard P., Frydman R., 2000, 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*, Band 73, S.314-320
68. Orief Y., Schultze-Mosgau A., Dafopoulos K., Al-Hasani S., 2005, Vitrification: will it replace the conventional techniques?, *Middle East Fertility Society Journal*, Band 10, S.171 – 184

69. Palermo G.D., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C., 1992, Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, *Lancet*, Band 340, S.17-18
70. Pandian Z., Templeton A., Serour G., Bhattacharya S., 2005, Number of embryos for transfer after IVF and ICSI: A Cochrane review, *Hum. Reprod.*, Band 20, 10, S.2681-87
71. Parkening T.A., Tsunoda Y., Chang M.C., 1976, Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs, *J. Exp. Zool.*, Band 197, S.369
72. Prietl G., Al-Hasani S., Van der Ven H., Diedrich K., Krebs D., Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen, Oozyten und Embryonen. In: *Neue Wege in Diagnostik und Therapie der weiblichen Sterilität*, Stuttgart, Enke Verlag, 1987, S.130-145
73. Queenan J.T. Jr., Veek L.L., Toner J.P., Oehninger S., Muasher S.J., 1997, Cryopreservation of all prezygotes in patients at risk of severe hyperstimulation does not eliminate the syndrome, but the chances of pregnancy are excellent with subsequent frozen-thaw transfers, *Hum. Reprod.*, Band 20, 10, S.1573-1576
74. Ragni G., Allegra A., Anserini P., Causio F., Ferraretti A.P., Greco E., Palermo R., Somigliana E., 2005, The 2004 Italian legislation regulating assisted reproduction technology: A multicenter survey on the results of IVF cycles, *Hum. Reprod.*, Band 20, 8, S.2224-2228
75. Rall W.F., Polge C., 1984, Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol, *J. Reprod. Fertil.*, Band 70, S.285-292
76. Rall W.F., Reid D.S., Polge C., 1984, Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods, *Cryobiology*, Band 21, S.106-121
77. Rall W.F., Fahy G.M., 1985, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, *Nature*, Band 313, S.573 - 575
78. Reeka N., Rosenbusch B., Brucker C., 2001, Schwangerschaftsrate nach Kryotransfer in Abhängigkeit von der Zyklusvorbereitung: Eine retrospektive Analyse, *Journal für Fertilität und Reproduktion*, Band 5, S.17-20
79. Renard J.P., Nguyen B., Gamier V., 1984, Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature, *J. Reprod. Fertil.*, Band 71, S.573-580
80. Revel A., Safran A., Laufer N., Lewin A., Reubinov B.E., Simon A., 2004, Twin delivery following 12 years of human embryo cryopreservation: Case report: Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments, *Hum. Reprod.*, Band 19, 2, S.328-329
81. 1998, Richtlinien zur Durchführung der assistierten Reproduktion, *Deutsches Ärzteblatt*, Band 95, 49, S.3156-3166

82. Rienzi L., Martinez F., Ubaldi F., Minasi M.G., Iacobelli M., Tesarik J., Greco E., 2004, Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures, *Hum. Reprod.*, Band 19, 3, S.655-659
83. Salumets A., Tuuri T., Mäkinen S., Vilska S., Husu L., Tainio R., Suikkari A.M., 2003, Effect on developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer, *Hum. Reprod.*, Band 18, S.1890-1895
84. Sanken U., Burfeind P., Engel W., Die Bedeutung des mütterlichen Alters für die Entstehung von numerischen Chromosomenaberrationen, *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, 2, 2005 , S.109-114
85. Sathananthan, A. H., Trounson A., Freeman L., 1987, Morphology and fertilizability of frozen human oocytes, *Gamete Res.*, Band 16, S.343-354
86. Schroder A.K., Banz C., Katalinic A., Al-Hasani S., Weiss J.M., Diedrich K., Ludwig M., 2003, Counselling on cryopreservation of pronucleated oocytes, *Reprod Biomed Online*, Band 6, 1, S.69-74
87. Scott LA., Smith S., 1998, The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval, *Hum. Reprod.*, Band 13, S.1003-1013
88. Seli E., Tangir J., 2005, Fertility preservation options for female patients with malignancies, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, Band 17, 3, S.299-308
89. Senn A., Vozzi C., De Grandi P. and Germond M., 2000, prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: The pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage, *Fertil. Steril.*, Band 74, S.946-952
90. Siebzehnrübl E. R., 1989, Cryopreservation of gametes and cleavage stage embryos, *Hum. Reprod.*, Band 4, S.104-110
91. Siebzehnrübl E., Der Stellenwert der Kryokonservierung in der Reproduktionsmedizin- nur Ergänzung oder fester Bestandteil?, *Kinderwunsch*, Hrsg.: Fischl F (Hrsg): Krause & Pachernegg GmbH, 2.Auflg., 2000 , S.208-209
92. Steer CV., Mills CL., Tan S., Campell S., Edwards RG., 1992, The cumulative embryo score: A predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilisation and embryo transfer programme, *Hum. Reprod.*, Band 7, S.117-119
93. Suzuki T., Izumi S., Matsubayashi H., Yoshikata K., Makino T., 2005, Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in in-vitro fertilisation, *Fertil. Steril.*, Band 83, 4, S.908-913
94. Tesarik J., Greco E., 1999, The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology, *Hum. Reprod.*, Band 14, S.1318-1322

95. Tesarik J., Mendoza C., 2002, Effects of estrogenous LH administration during ovarian stimulation of pituitary down-regulated young oocyte donors on oocyte yield and developmental competence, *Hum. Reprod.*, Band 17, S.3129-3137
96. Trounson A., Mohr L., 1983, Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo, *Nature*, Band 305, S.707-709
97. Valentine A., Akande L., Hunt P., Cahill D.J., Jenkins J.M., 2004, Differences in time to natural conception between women with unexplained infertility and infertile women with minor endometriosis, *Hum. Reprod.*, Band 19, 1, S.96-103
98. Van Steirteghem A.C., Van den Abbeel E., Camus M., Van Waesberghe L., Braeckmans P., Khan I., Nijs M., Smits J., Staessen C., Wisanto A., Devroey P., 1987, Cryopreservation of human embryos obtained after gamete intrafallopian tube transfer and for in-vitro fertilisation, *Hum. Reprod.*, Band 2, 7, S.593-598
99. Van Wely M., Westergaard L.G., Bossuyt P.M.M., van der Veen F., Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles, Hrsg.: *The Cochrane Library*: Band 3, 2003
100. Van Zonneveld P., Scheffer G.J., Broekmans F.J.M., Blankenstein M.A., de Jong F.H., Looman C. W. N., Habbema J.D.F., Velde E.R., 2003, Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women, *Human Reprod.*, Band 18, 3, S.495-501
101. Veek L.L., Cryopreservation of embryos / eggs, *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*, Hrsg.: Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996
102. Veek L.L.; Amundson C.H.; Brothman L.J.; DeScisciolo C.; Maloney M.K.; Muasher S.J.; Jones H.W., 1993, Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes, *Fertil. Steril.*, Band 59, 6, S.1202-1207
103. Wang J.X., Yap Y.Y., Matthews C.D., 2001, Frozen-thawed embryo transfer: Influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception, *Hum. Reprod.*, Band 16, S.2316-2319
104. Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P., 1972, Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -289°C, *Science*, Band 178, S.411-414
105. Whittingham D.G., 1977, Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C, *J. Reprod. Fertil.*, Band 49, S.89
106. Whittingham D.G., Preservation of embryos of the laboratory animals, 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I, Hrsg.: Band Vol.2, Madrid, 1980, S.237-243
107. Willadsen S.M., Factors affecting the survival of sheep-embryos during deep-freezing and thawing. In: *The freezing of mammalian embryos*, Hrsg.: Ciba Foundation: Band Symp. No 52 (new series), Amsterdam, North-Holland, 1977, S.175-202

108. Zech H., Neunteufel W., Stimulationsschemata zur assistierten Reproduktion, Reproduktionsmedizin, Band 14, Springer- Verlag, 1998, S.115-123
109. Zeilmaker G.H., Alberda A.T., van Geest L., 1984, Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos, Fertil. Steril., Band 42, S.293-296

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Werner Mendling, Direktor der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin, VIVANTES Klinikum am Urban, sowie Herrn Prof. Dr. H. Weitzel, deren Unterstützung ganz wesentlich für den Erfolg dieser Arbeit war.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem wertvollen Freundkreis herzlich für alle wertvollen Ratschläge, motivierenden Diskussionen und Hilfe beim Lesen der Korrektur bedanken

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei meinem ehemaligen Chefarzt Herrn Prof. Dr. W. Geiger, der seine Mitarbeiter immer dazu angehalten hat eine Promotion zu erlangen, da sie für ihn ein selbstverständlicher Teil der Ausbildung zum Arzt seien und der mich in der Anfangszeit durch sein persönliches Engagement immer wieder unterstützte und mir hilfreiche Anregungen gab.

Ich bedanke mich auch sehr bei meiner lieben Familie, die mir stets mit der nötigen Unterstützung zur Seite stand.

Mein Dank geht zuletzt an alle, die dazu beigetragen haben diese Arbeit trotz aller Schwierigkeiten auf ihrem Weg zum Abschluss zu bringen.

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Eidstattliche Erklärung

„Ich, Zahraa Kollmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
Einfluss verschiedener klinischer Parameter auf die Erfolgsrate nach Kryokonservierung imprägnierter menschlicher Eizellen, 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.“