

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

DISSERTATION

Einfluss gonadotroper Hormone auf die morphologische
Entwicklung primärer und sekundärer humaner Oozyten – Ihre
klinische Bedeutung für den Befruchtungsprozess im Rahmen
einer Fertilitätstherapie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simone Winkler

aus Lobenstein/Thüringen

Gutachter: 1. : Prof. Dr. med. W. Lichtenegger
2. : Prof. Dr. sc. Agr. H. W. Michelmann
3. : Prof. Dr. med. H. Kentenich

Datum der Promotion: 29. 02. 2008

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	08
1.1	Epidemiologie der ungewollten Kinderlosigkeit	08
1.2	Rechtliche Rahmenbedingungen der assistierten Reproduktion in Deutschland	08
1.3	Physiologische Grundlagen der assistierten Reproduktion	09
1.3.1	Regulation der Ovarfunktion	09
1.3.2	Einfluss der Gonadotropine auf den physiologischen ovariellen Zyklus	12
1.4	Einsatz von Gonadotropinen in der Reproduktionsmedizin	15
1.4.1	Historische Entwicklung	15
1.4.2	Kontrollierte Überstimulation der Ovarfunktion	17
1.4.2.1	Stimulation mit GnRH-Agonisten	17
1.4.2.2	Stimulation mit GnRH-Antagonisten	18
1.4.2.3	Ovulationsinduktion und Lutealphasenunterstützung	19
1.5	Mikroskopische Beurteilung der Kumulus-Oozyte-Komplexe	20
1.6	Aspekte der Eizellreifung	21
1.7	Mikroskopische Beurteilung der Oozytenmorphologie	22
1.8	Fertilisationskaskade und Befruchtungparameter	23
2	Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Studiendesign	27
3.2	Patientenklientel	27
3.3	Datenerfassung	29
3.4	Statistische Verfahren	29
3.5	Anwendung von GnRH-Analoga	30
3.6	Gonadotropinapplikation zur ovariellen Stimulation	30
3.7	Ovulationsinduktion	31
3.8	Gewinnung der Kumulus-Oozyte-Komplexe durch transvaginale Follikelaspiration	32
3.9	Oozytenpräparation	32
3.10	Ejakulatpräparation für die Durchführung der intrazytoplasmatischen	

	Spermatozoeninjektion (ICSI)	33
3.11	Lichtmikroskopische Beurteilung des Oozytenstadiums (Kernreife)	33
3.12	Morphologische Charakterisierung der Metaphase II – Oozyten	34
3.13	Durchführung der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion	40
3.14	Kulturbedingungen	40
3.15	Morphologische Charakterisierung der Vorkernstadien	41
3.16	Klassifizierung der Embryonen	42
3.17	Embryotransfer und Endometrium	43
3.18	Lutealphasenunterstützung	44
3.19	Zyklusausgang	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Einflussfaktoren auf die Anzahl gewonnener Kumulus-Oocyte-Komplexe (COC)	45
4.1.1	Alter	45
4.1.2	Body-Mass-Index	46
4.1.3	Vorbehandlung	46
4.1.4	Ovarielle Stimulation	47
4.1.4.1	GnRH-Protokoll	47
4.1.4.1	GnRH-Agonistenpräparate	47
4.1.4.3	Gonadotropinmedikation	48
4.1.4.4	Stimulationsschema	49
4.2	Einflussfaktoren auf den Reifestatus gewonnener Oozyten	51
4.2.1	Alter	51
4.2.2	Body-Mass-Index	52
4.2.3	Vorbehandlung	52
4.2.4	Ovarielle Stimulation	53
4.2.4.1	GnRH-Protokoll	53
4.2.4.1	GnRH-Agonistenpräparate	53
4.2.4.3	Gonadotropinmedikation	54
4.2.4.4	Stimulationsschema	55
4.3	Einteilung der Metaphase II-Oozyten anhand morphologischer Parameter	56
4.4	Einflussfaktoren auf die Ausprägung morphologischer Eizelldefekte	57

4.4.1	Alter	57
4.4.2	Body-Mass-Index	58
4.4.3	Vorbehandlung	59
4.4.4	Ovarielle Stimulation	59
4.4.4.1	GnRH-Protokoll	59
4.4.4.1	GnRH-Agonistenpräparate	60
4.4.4.3	Gonadotropinmedikation	61
4.4.4.4	Stimulationsschema	62
4.5	Einfluss der Gonadotropinmedikation auf die Ausprägung definierter morphologischer Formen/Anomalien in den Oozyten	63
4.5.1	Extrazytoplasmatische Parameter	63
4.5.2	Zytoplasmatische Parameter	65
4.6	Einflussfaktoren auf den Befruchtungsstatus bzw. die Fertilisations- raten nach Durchführung der Intrazytoplasmatischen Spermatozoen- Injektion	66
4.6.1	Alter	66
4.6.2	Body-Mass-Index	67
4.6.3	Vorbehandlung	67
4.6.4	Ovarielle Stimulation	68
4.6.4.1	GnRH-Protokoll	68
4.6.4.1	GnRH-Agonistenpräparate	69
4.6.4.3	Gonadotropinmedikation	70
4.6.4.4	Stimulationsschema	71
4.7	Einfluss der Eizelldysmorphismen auf die Fertilisationsrate bzw. den Befruchtungsstatus	72
4.7.1	Anzahl morphologischer Eizelldefekte	72
4.7.2	Extrazytoplasmatische Parameter	73
4.7.3	Zytoplasmatische Parameter	74
4.8	Einfluss der Eizelldysmorphismen auf die Fertilisationsraten in Abhängigkeit von der ovariellen Stimulation	75
4.8.1	Gonadotropinmedikation	75
4.8.2	Stimulationsregime	78
4.9	Einflussfaktoren auf den Entwicklungsstatus der Embryonen	81
4.9.1	GnRH-Protokoll	82

4.9.2	Gonadotropinmedikation	83
4.9.3	Stimulationsregime	84
4.10	Einflussfaktoren auf die Schwangerschaftsrate	85
4.10.1	Alter	85
4.10.2	Body-Mass-Index	85
4.10.3	Vorbehandlung	86
4.10.4	Ovarielle Stimulation	86
4.10.4.1	GnRH-Protokoll	86
4.10.4.1	GnRH-Agonistenpräparate	87
4.10.4.3	Gonadotropinmedikation	88
4.10.4.4	Stimulationsregime	88
4.11	Einfluss der Eizeldysmorphismen auf die Schwangerschaftsrate	90
4.11.1	Anzahl morphologischer Eizelldefekte	90
4.11.2	Extrazytoplasmatische Parameter	90
4.11.3	Zytoplasmatische Parameter	91
4.12	Einfluss der Eizeldysmorphismen auf die Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der ovariellen Stimulation	92
4.12.1	Gonadotropinmedikation	92
4.12.2	Stimulationsregime	95
4.13	Einflussfaktoren auf die Abort- und Geburtenrate	98
4.13.1	Alter	98
4.13.2	Body-Mass-Index	98
4.13.3	Vorbehandlung	99
4.13.4	Ovarielle Stimulation	99
4.13.4.1	GnRH-Protokoll	99
4.13.4.2	GnRH-Agonistenpräparate	100
4.13.4.3	Gonadotropinmedikation	100
4.13.4.4	Stimulationsschema	101
4.14	Einfluss der Zahl implantierter Embryonen auf die Zahl geborener Kinder	103
4.15	Zusammenfassung zum Einfluss wesentlicher Parameter dieser Studie	105

5	Diskussion	106
5.1	Mögliche prädiktive Einflussfaktoren auf den Maturations- und Entwicklungsprozess humaner Oozyten – Ihre Auswirkungen auf den Verlauf einer Kinderwunschtherapie	106
5.1.1	Alter	106
5.1.2	Body-Mass-Index	109
5.1.3	Vorbehandlung	110
5.2	Einfluss der kontrollierten ovariellen Stimulation (KOS) auf den Maturationsprozess und die morphologische Entwicklung humaner Oozyten	112
5.2.1	Reifungsprozess und Häufigkeiten von Eizellabnormitäten	112
5.2.1.1	GnRH-Protokoll / GnRH-Agonistenpräparate	113
5.2.1.2	Gonadotropinmedikationen / Stimulationsschemata	115
5.2.2	Einfluss gonadotroper Hormone auf die Ausprägung definierter Formen und Anomalien in den Oozyten	120
5.2.3	Klinische Parameter für den Verlauf einer Fertilitätstherapie nach KOS in Abhängigkeit von extrazytoplasmatischen und zytoplasmatischen Merkmalen	127
5.2.3.1	morphologische Eizellparameter	127
5.2.3.2	GnRH-Protokoll / GnRH-Agonistenpräparate	130
5.2.3.3	Gonadotropinmedikationen / Stimulationsschemata	133
6	Zusammenfassung	144
7	Inhaltsverzeichnis der Tabellen, Abbildungen und Übersichten	146
8	Abkürzungsverzeichnis	151
9	Literaturverzeichnis	152
10	Anhang	171
11	Lebenslauf	172
12	Ehrenwörtliche Erklärung	173

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der ungewollten Kinderlosigkeit

Die Reproduktionsmedizin („Fortpflanzungsmedizin“) stellt ein junges Teilgebiet der Gynäkologie dar, das in den vergangenen 20 Jahren eine rasche Entwicklung erfahren hat. In Deutschland sind etwa 15% der Paare ungewollt kinderlos. Als ungewollte Kinderlosigkeit wird allgemein das Ausbleiben einer Schwangerschaft über einen Zeitraum von 12 Monaten bei regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr definiert. Die Gründe für das Ausbleiben einer Schwangerschaft können zu 30-40% bei der Frau, zu 10-30% beim Mann und zu 15-30% bei beiden Partnern liegen. In 10-20% lässt sich keine Ursache finden [1]. Man unterscheidet die primäre Infertilität, wenn ein Paar noch nie eine Schwangerschaft erzielt hat, und die sekundäre Infertilität, wenn bei erneutem Kinderwunsch die Schwangerschaft ausbleibt. Nicht nur medizinische, sondern auch sozioökonomische Faktoren spielen hierbei eine Rolle. Seit den 1950er Jahren ist eine deutliche Verschiebung der reproduktiven Phase der Frau in das höhere Lebensalter festzustellen. Die Veränderungen der Umwelt und steigende Umweltbelastungen könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Fertilität haben. Die Therapiemöglichkeiten konnten in den vergangenen Jahren deutlich verbessert werden, was zu einer Zunahme der Akzeptanz einer diagnostischen Abklärung der Ursachen einer Kinderlosigkeit geführt hat.

1.2 Rechtliche Rahmenbedingungen der assistierten Reproduktion in Deutschland

Die Reproduktionsmedizin umfasst folgende Teilbereiche: die hormonelle Stimulation und Substitution des weiblichen Zyklus, das Monitoring des stimulierten Zyklus und der Ovulation, die Spermatozoenaufbereitungstechniken und die Intrauterine Insemination, die In-vitro-Fertilisation und Embryonenkultur, die intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion und die Kryokonservierung von Gameten. Zu den Methoden der assistierten Reproduktion nach den Richtlinien der Bundesärztekammer (1998) zählen der intratubare Gametentransfer (GIFT), der intratubare Zygotentransfer (ZIFT) und -Embryotransfer (EIFT), die In-vitro-Fertilisation mit Embryonentransfer (IVF und ET) und die intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI). Art und Umfang der künstlichen Befruchtung werden in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz [2] geregelt. Die derzeitige Fassung des deutschen Embryonenschutzgesetzes (EschG) ermöglicht es im Rahmen der künstlichen Befruchtung bei der Frau mehrere Follikel zur

Reifung zu bringen [2]. Die durch eine Follikelpunktion gewonnenen Kumulus-Eizell-Komplexe (englisch „cumulus oocyte complex“, COC) werden dann entsprechend der diagnostizierten Therapie weiter verwendet. Dieser Komplex bildet eine funktionelle Einheit, die maßgeblich den Maturationsprozess der Eizelle bestimmt. Durch die Zugabe der Samenzellen wird die Befruchtungskaskade initiiert. Das Erreichen definierter Entwicklungsstadien innerhalb dieser Kaskade ist im Rahmen des Gesetzes von kritischer Bedeutung. Das sogenannte Vorkernstadium, die Bildung des männlichen und des weiblichen Pronukleus, zeigt an, dass ein Spermatozoon in die Eizelle eingedrungen und den Befruchtungsprozess regulär in Gang gesetzt hat. Dieses Stadium der Eizelle wird nach dem EschG als „imprägniert“ bezeichnet. Die Vereinigung des väterlichen und mütterlichen Erbgutes, die sogenannte „Verschmelzung“ beider Vorkerne, wird laut EschG als Beendigung der Befruchtungskaskade definiert. Dieses Stadium wird als Zygote bezeichnet und erst der Beginn der ersten Zellteilung beendet den Befruchtungsvorgang [3].

Nach dem deutschen EschG und den Richtlinien der Bundesärztekammer dürfen nur maximal drei „imprägnierte“ Eizellen zu Embryonen weiter kultiviert werden [2,4]. Frauen unter 35 Jahren wird angeraten, nur zwei Embryonen zurückzunehmen. Begründet wird diese Empfehlung mit der Reduzierung der Mehrlingsrate, insbesondere der Drillingsgeburten. Die Auswahl der imprägnierten Eizellen für den späteren Embryonentransfer basieren auf morphologischen Kriterien, im Wesentlichen auf der Betrachtung der Anordnung und der Anzahl der Nukleoli innerhalb der Vorkernstadien [5,6,7]. Die zusätzlich befruchteten Eizellen können auf Wunsch des Paares kryokonserviert oder müssen verworfen werden [3].

1.3 Physiologische Grundlagen der assistierten Reproduktion

1.3.1 Regulation der Ovarfunktion

Bereits zur Geburt ist der Oozytenpool von ca. 7 Millionen in den Ovarien angelegt. Im Laufe der Jahre verringert sich diese Zahl kontinuierlich durch fortschreitende Atresie (Abb.1; [8]). Von 1 bis 2 Millionen Oozyten zur Geburt lassen sich zu Beginn der Pubertät noch ca. 400.000 Primordialfollikel und einzelne Follikel unterschiedlicher Reifegrade nachweisen. In der reproduktiven Lebensspanne der Frau kommen nur ungefähr 500 Eizellen zum Eisprung.

Im Ovar lassen sich morphologisch mehrere Schichten, die sogenannten Rinden-, Mark- und Hilusschicht, nachweisen. Die Primordialfollikel befinden sich vorwiegend in

der Ovarialrinde und bestehen aus einer Oozyte, umschlossen von einer Schicht von abgeflachten Granulosazellen und einer Thekazellenschicht. Die Entwicklung zum Primärfollikel ist charakterisiert durch die Vergrößerung der Oozyte und eine kubisch geformte Granulosazellschicht. Während der Follikelreifung werden weiter die Stadien des Sekundär- und des Tertiärfollikels (Graaf-Follikel) durchlaufen (Abb. 2; [9]).

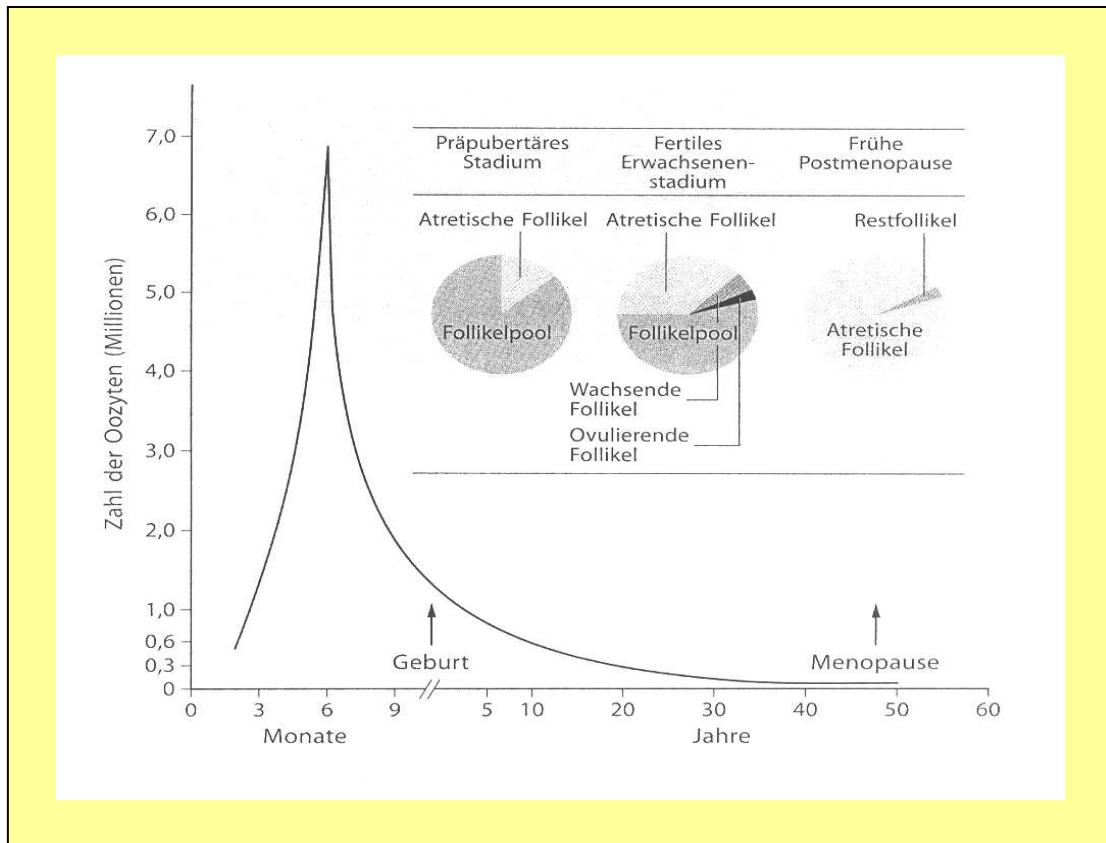


Abbildung 1: Altersabhängigkeit der Oozytenzahl im Ovar (nach Leidenberger 1998).

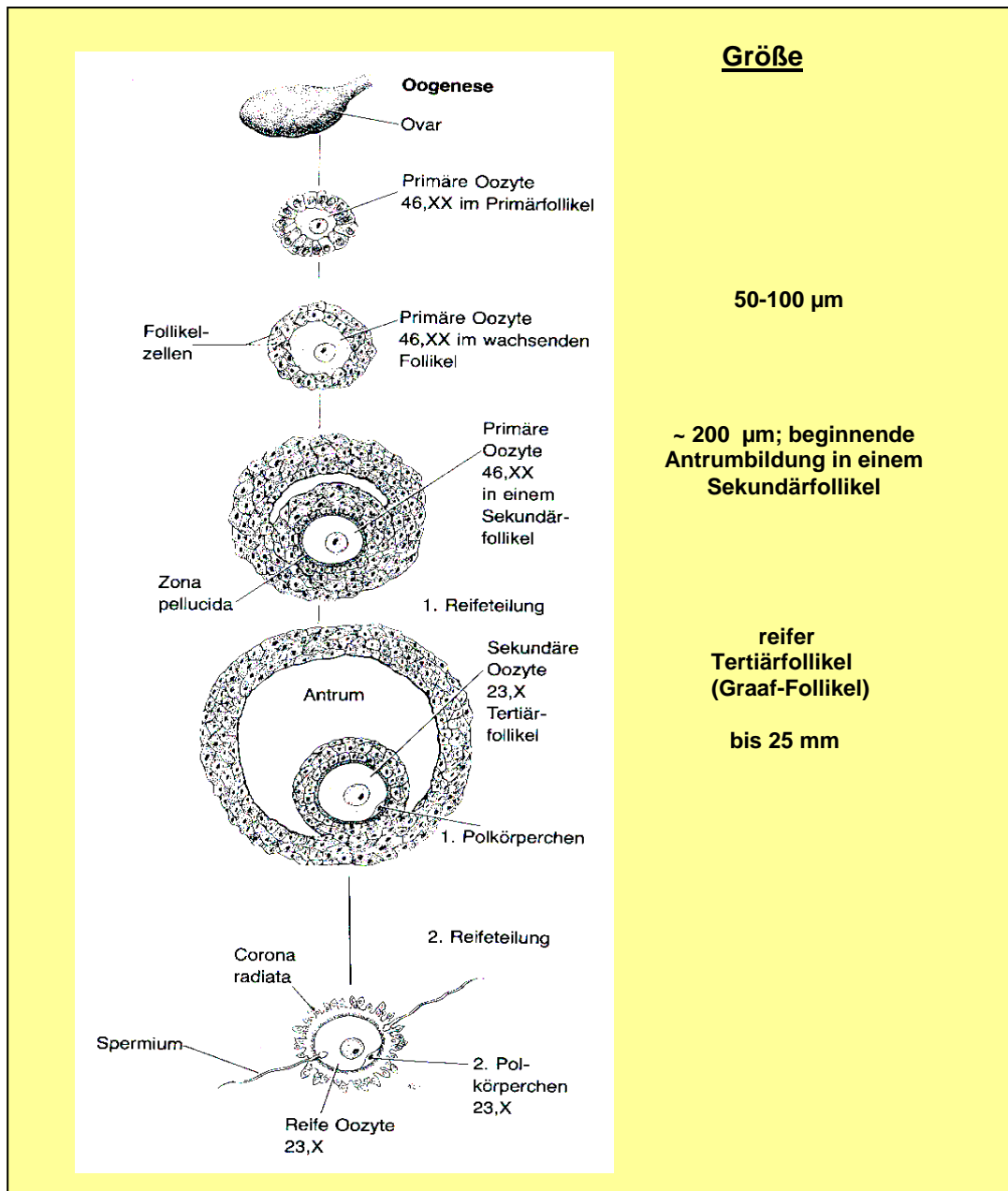


Abbildung 2: Reifungsstadien eines Follikels (nach Moore und Persaud 1996).

Da eine Antrumbildung - das Antrum ist eine flüssigkeitsgefüllte, zystenähnliche Struktur mit einem Durchmesser von 1,5 – 2,5 cm - schon bei der Entwicklung zum Sekundärfollikel erkennbar ist, spricht man von antralen Follikeln. Dieser erste Reifungsprozess ist gonadotropinunabhängig. Die Entwicklung vom Primordialfollikel bis zum antralen, dann gonadotropinabhängigen Stadium dauert 3 Monate. Die Ovarialfunktion mit Follikelreifung, Ovulation, Corpus-luteum-Bildung und Luteolyse wird durch das Hypothalamus-Hypophysen-System und durch intraovarielle Mechanismen gesteuert. In den Kernarealen des Hypothalamus wird das Dekapeptid Gonadotropin -

Releasing-Hormon (GnRH) gebildet, welches über das hypophysäre Pfortadersystem zur Adenohypophyse gelangt. GnRH bindet dort an spezifische Rezeptoren und induziert die Expression und Sekretion des Luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH). Diese Hormonausschüttung ist GnRH-abhängig und erfolgt alle 90 Minuten pulsartig in das periphere Blutsystem [10]. Die Signalweiterleitung erfolgt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und weitere Second-messenger-Systeme, wie z.B. Proteinkinasen, Phospholipase C und Kalzium. Neben endogenen Opiaten spielt die Erhöhung des intrazellulären Kalziums bei der Freisetzung der Gonadotropine durch GnRH eine wichtige Rolle (Abb. 3; [11]).

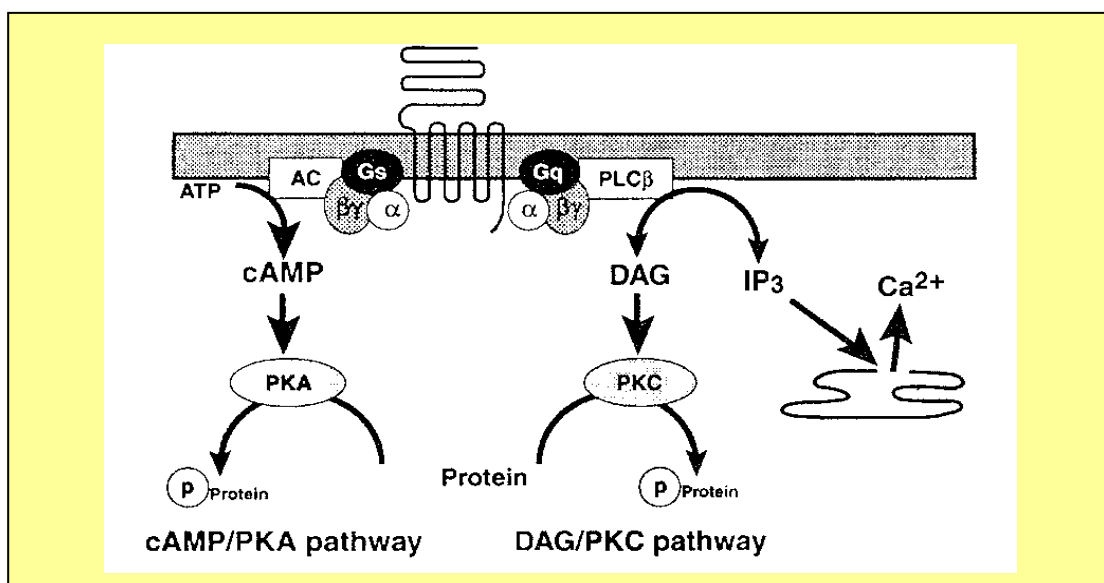


Abbildung 3: Signaltransduktionsweg über den GnRH-Rezeptor (nach Filicori 2000).

1.3.2 Einfluss der Gonadotropine auf den physiologischen ovariellen Zyklus

Die Follikelreifung unter Einfluss von FSH ist gekennzeichnet durch verschiedene Phasen: Rekrutierungs-, Selektions- und Dominanzphase. Übersteigt die Konzentration von FSH im Serum einen bestimmten, individuell unterschiedlichen Schwellenwert, so kommt es zur Rekrutierung einer „Follikelkohorte“ in den Ovarien, die dann in den Follikelreifungsprozess eintritt. Diese Rekrutierungsphase beginnt in der späten Lutealphase und ist am 3. Zyklustag des Folgezyklus abgeschlossen. Aus einer Gruppe heranreifender Follikel erreicht nur einer das Stadium der Dominanz, d.h. er erwirbt die Fähigkeit schneller und früher zu reifen als die anderen (Abb. 4; [12]). Voraussetzung für die Bildung von Sexualsteroiden ist die funktionelle Einheit von Theka- und Granulosazellen.

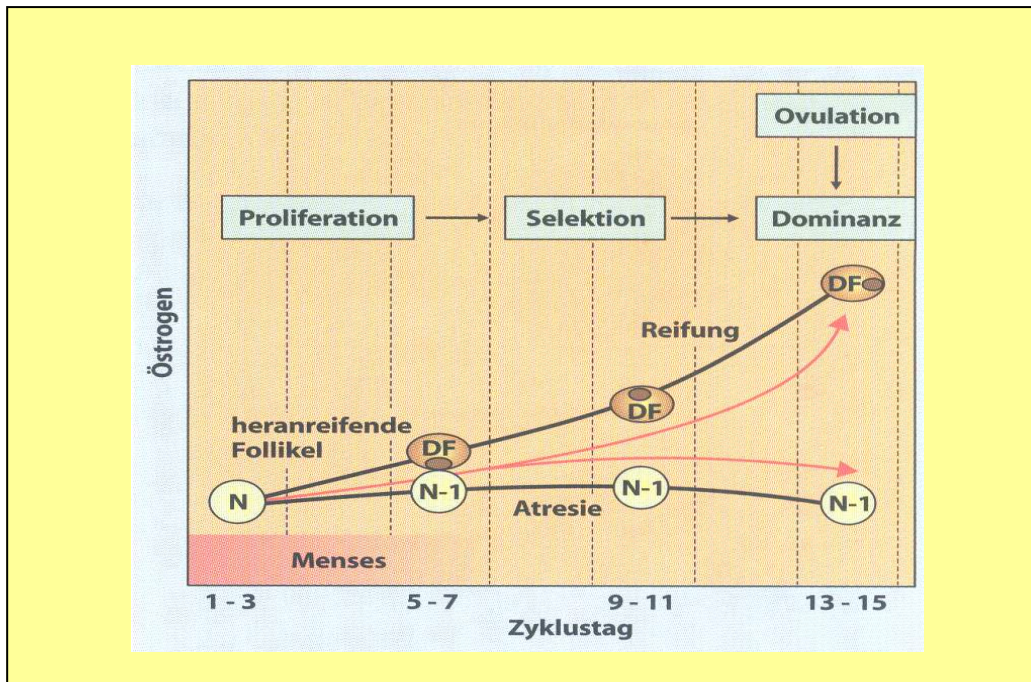


Abbildung 4: Darstellung der Follikelreifung und der Selektion des dominanten Follikels (nach Keck 2002).

Die in den Thekazellen gebildeten Steroide Testosteron und Androstendion gelangen auf dem Diffusionsweg in die Granulosazellen. Dort erfolgt die FSH- abhängige Aromatisierung der Steroide zu Estron und Estradiol (Abb. 5; [15]). In hohen Konzentrationen wird Estradiol in die Follikelflüssigkeit abgegeben und bewirkt über auto- und parakrine Mechanismen gemeinsam mit FSH eine Proliferation der Granulosazellen [13]. Neben den Sexualsteroiden synthetisieren die Granulosazellen auch wichtige Proteohormone und Peptide, welche regulatorisch in die Follikulogenese eingreifen, z.B. Inhibin und Aktivin. Inhibin wirkt stimulierend auf die LH-abhängige Synthese von Androstendion in den Thekazellen, Aktivin fungiert hier als Antagonist [14].

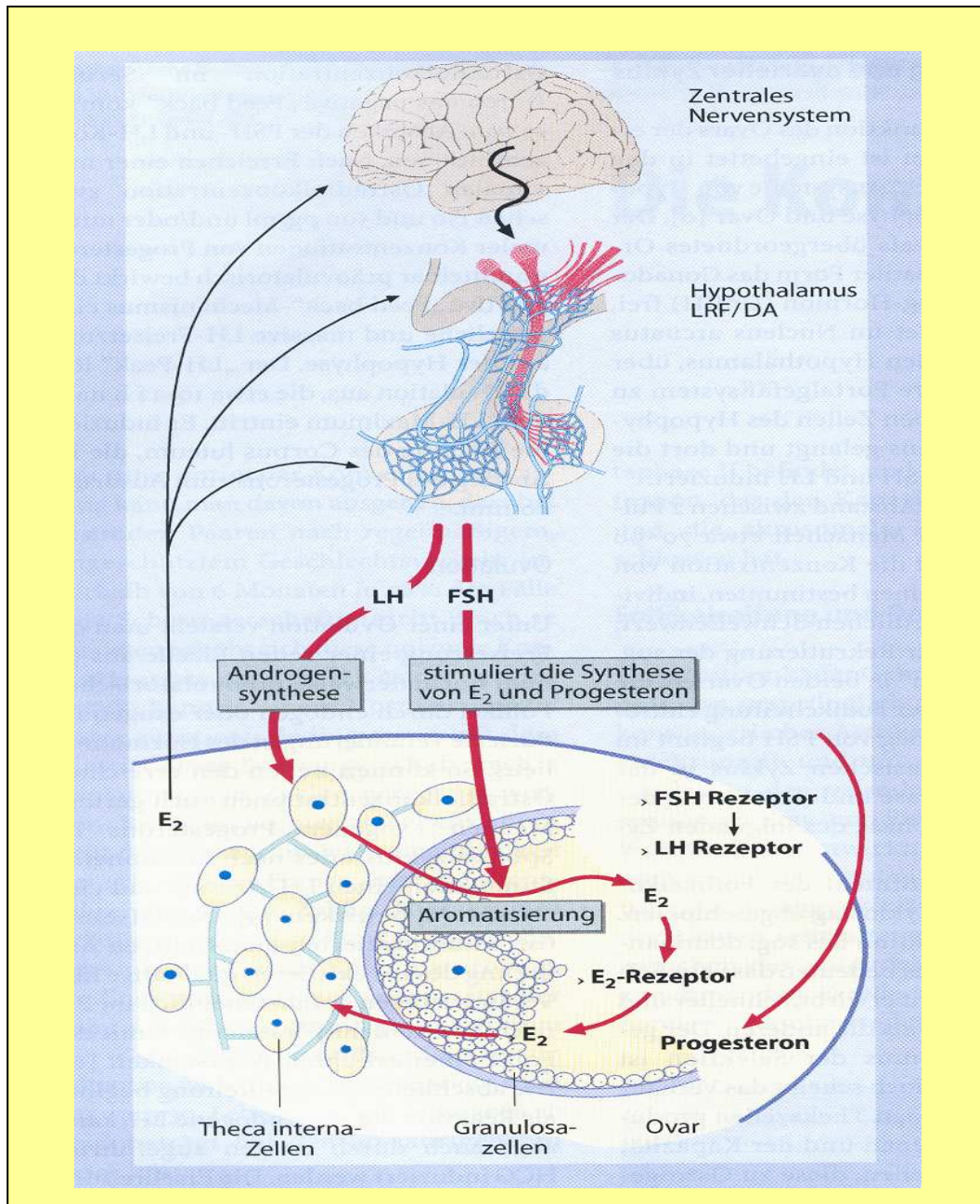


Abbildung 5: Gonadotropinabhängige Steroidsynthese in den verschiedenen Zellgeweben des Tertiärfollikels (nach Felberbaum et al. 2002)

Diese Selektionsphase ist am 7. Zyklustag abgeschlossen. Die Dominanzphase zeigt die Entwicklung zum präovulatorischen Follikel (Graafsche Follikel) und stellt die Quelle der Estradiolbiosynthese dar. Es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Estradiolkonzentration im Serum. Diese negative Rückkopplung führt zum Absinken von FSH- und LH-Konzentrationen. Präovulatorisch beginnt der dominante Follikel auf den Granulosazellen LH-Rezeptoren zu exprimieren. Dieser FSH-abhängige Vorgang führt gleichzeitig zu einer erhöhten Estradiolsekretion, die in der Hypophyse zu einer

Zunahme der LH-Synthese und LH-Speicherung führt. Nach dem Erreichen von Estradiol-Maximalwerten von 150 – 500 pg/ml und minimalen Konzentrationen von Progesteron bewirkt der positive „Feedback“-Mechanismus eine plötzliche und massive Freisetzung von LH aus der Hypophyse. Der sogenannte „LH-Peak“ löst die Ovulation aus. Diese tritt etwa 10-12 Stunden nach dem LH-Maximum ein. Das Intervall zwischen der maximalen Estrogenproduktion des Follikels und der maximalen LH-Ausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen beträgt ungefähr 24 Stunden. Acht bis zehn Stunden später erfolgt die Ovulation. Durch die ansteigenden LH - und FSH-Spiegel beginnt schon vor der Ovulation die Luteinisierung der Granulosazellen: Die Progesteronsynthese setzt ein und der LH-Peak fällt ab. Aus dem rupturierten Follikel entwickelt sich das Corpus luteum. Mit der zusätzlichen Expression von LDL-Rezeptoren sind diese Zellen jetzt in der Lage, angebotenes Cholesterin aus der Peripherie für die Progesteronbiosynthese zu verwerten. Im Falle einer Schwangerschaft wird unter Einfluss von hCG (humanes Choriongonadotropin) das Corpus luteum zu einem funktionsfähigen Corpus luteum graviditatis umgewandelt. Progesteron bewirkt eine sekretorische Umwandlung des estrogenstimulierten Endometriums - Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation. Beim Ausbleiben einer Schwangerschaft geht das Corpus luteum nach 14 Tagen durch Luteolyse zugrunde und es kommt zum Absinken der peripheren Estradiol- und Progesteronkonzentration. Die Folge ist die Abstoßung der Funktionalisschicht des Endometriums.

1.4 Einsatz von Gonadotropinen in der Reproduktionsmedizin

1.4.1 Historische Entwicklung

Die erste In-vitro-Fertilisation (IVF) wurde im sogenannten „natürlichen“ Zyklus durchgeführt, in dem physiologischerweise nur eine Eizelle zur Befruchtung herangereift war. Mit der ersten Geburt nach erfolgreicher IVF 1978 [16] entwickelte sich die Reproduktionsmedizin als eigenes Fachgebiet. Heute stellt die ovarielle Stimulation mit Gonadotropinen eine Grundvoraussetzung für fast alle Verfahren der Reproduktionsmedizin dar. Das Ziel der exogenen Applikation von Gonadotropinen zur Ovar- oder Zyklusstimulation ist das Erreichen einer Ovulation. Abhängig von der gewählten Therapie kann ein mono- oder polyfollikuläres Wachstum induziert werden. Seit den 1960er Jahren wird die Gewinnung von gonadotropen Hormonen aus menopausalem Urin (humanes Menopausengonadotropin, hMG: bestehend zu gleichen

Teilen aus LH und FSH) in Kombination mit humanem Choriongonadotropin (hCG) zur Auslösung der Ovulation und Eizellreifung eingesetzt. Allerdings besteht hMG zu 95% aus mitangereicherten urinären Proteinen, lediglich rund 3% des Proteingehaltes entfallen auf den Wirkstoff. Durch die Herstellung eines hochgereinigten FSH-Monopräparates (highly purified, HP) mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie konnte der Fremdproteinanteil unter 5 % gesenkt werden.

Durch die Strukturaufklärung des menschlichen FSH konnte mit Hilfe gentechnischer Methoden ab 1995 das humane FSH rekombinant als Therapeutikum eingesetzt werden. Die Vorteile gegenüber urinären wie auch hochgereinigten urinären Präparaten liegen in der unbegrenzten Verfügbarkeit, dem fehlenden Infektionsrisiko, der gleichbleibenden Qualität und einer höheren Effizienz und Effektivität innerhalb der Behandlungszyklen. Humanes FSH ist ein Glykoprotein, bestehend aus zwei nicht kovalent gebundenen heterodimeren Proteinketten, den α (alpha) und β (beta)-Untereinheiten. Rekombinantes humanes FSH setzt sich ebenfalls aus einer α – und β -Untereinheit zusammen. Die Aminosäuresequenzen beider Untereinheiten sind identisch mit denen des natürlichen und urinären hFSH. Natürliche Gonadotropine stellen eine Familie unterschiedlich geladener Isoformen dar. Die Zusammensetzungen der Isoformen des natürlichen FSH ändern sich im Zyklusverlauf. Während in der frühen folliculären und in der lutealen Phase „saure“ Isoformen überwiegen, kommt es präovulatorisch zu einem Anstieg „basischer“ Isoformen. Die rekombinanten FSH-Präparate, die heute zum Einsatz kommen, sind Follitropin alpha und Follitropin beta [17], wobei ersteres überwiegend das den physiologischen Bedingungen entsprechende basische Isoformenprofil enthält [18]. Seit Anfang 2003 wird Follitropin alpha als einziges rekombinantes FSH nach Menge durch die Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SE-HPLC) quantifiziert.

Gonadotropin-Präparate urinären Ursprungs werden weiterhin als Therapeutika zur ovariellen Stimulation angewandt. Qualität, Zusammensetzung und Bioaktivität von hMG-Produkten sind chargenabhängig und unterliegen deutlichen Schwankungen. Seit 2002 gibt es hMG in gereinigter Form als hMG- HP. Es enthält drei Hormone: FSH, LH in sehr geringer Menge und humanes Choriongonadotropin (hCG), um die gewünschte LH-Aktivität zu erzielen.

1.4.2 Kontrollierte Überstimulation der Ovarfunktion

Die Gewinnung befruchtungsfähiger Oozyten ist Voraussetzung für einen Behandlungserfolg in der assistierten Reproduktion. Dies erfolgt heute mit Hilfe einer kontrollierten ovariellen Hyperstimulation (KOH). Dazu sind spezielle aufwendige Stimulationstechniken nötig, die auch mit dem Risiko des Überstimulationssyndroms (engl. „ovar - hyperstimulation- syndrome - OHSS) verbunden sind.

Bei normaler Ovarialfunktion werden meist eine FSH-Monotherapie oder die Gabe urinärer Kombinationspräparate zur KOH angewandt. Neben FSH stehen auch LH und hCG als rekombinante Präparate zur Verfügung.

Besonders jüngere Patientinnen reagieren mit einer ovariellen Überreaktion auf die Anwendung von Gonadotropinen („High-Responder“). Low - Responder-Patientinnen zeigen eine geringe Reaktionsbereitschaft der Ovarien gegenüber Gonadotropinen, so dass immer höhere FSH-Gaben notwendig werden, um eine adäquate Follikelreifung zu erzielen. Eine Aussage zur ovariellen Reserve lässt sich durch die FSH-Bestimmung in der frühen Follikelphase (3.- 5. Zyklustag) ableiten. Ist der basale FSH -Wert erhöht, ist die ovarielle Reserve vermindert [19]. Führt man eine ovarielle Stimulation allein mit Gonadotropinen durch, so kann es zu einem vorzeitigen Eisprung kommen und der Zyklus muss abgebrochen werden. Dies wird durch die gleichzeitige Gabe von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten verhindert.

1.4.2.1 Stimulation mit GnRH-Agonisten

Bei dem Großteil aller durchgeführten Behandlungszyklen erfolgt eine sogenannte „Down-Regulation“ mit GnRH-Analoga. Das GnRH-Molekül besteht aus einer Kette von 10 Aminosäuren (Dekapeptyl), hat eine Halbwertszeit von 2 - 5 Minuten und wird durch Peptidasen schnell inaktiviert [20]. 1978 wurde die kritische Relevanz der pulsatile GnRH-Sekretion für die Ovarialfunktion erkannt [21]. Während die pulsatile Sekretion die Synthese und Sekretion von Gonadotropinen in der Hypophyse stimuliert, führt die kontinuierliche Abgabe von GnRH zur reversiblen Inhibition der Gonadotropinsekretion. Dies bedeutet, dass die GnRH-Agonisten zuerst zu einer vermehrten Ausschüttung von FSH und LH aus ihren Speichern und zu einer Zunahme der Rezeptoren führen; sogenannter „Flare - up“-Effekt [22, 23]. Dieser Effekt verursacht einen 5-mal größeren Anstieg des FSH-Spiegels und einen 10-mal größeren Anstieg des LH-Spiegels [24, 25]. Anschließend nimmt die Rezeptorzahl wieder ab und die FSH- und LH-Serumkonzentrationen sinken. Durch die Desensibilisierung der Hormonrezeptoren

unter kontinuierlicher GnRH-Abgabe wird die Wirkung der GnRH-Agonisten als Antagonisten begründet [26]. Durch chemische Modifikation ist die Rezeptoraffinität der GnRH-Agonisten 100 bis 200-mal größer als die des nativen GnRH-Moleküls. GnRH-Agonisten sind nicht nur für die Therapie weiblicher Infertilität [26], sondern auch für die Therapie einer Hyperandrogenämie oder östrogenbedingter Krankheiten, - wie Endometriose, Uterusmyom, Pubertas praecox und rezeptorpositives Mammakarzinom-geeignet.

In der Reproduktionsmedizin haben sich verschiedene Stimulationsschemata zur KOH entwickelt, die in Abhängigkeit von der GnRH-Gabe in sehr kurze, kurze, lange und sehr lange Protokolle („ultra short“, „short“, „long“ und „ultra long“) eingeteilt werden. Das lange Protokoll hat sich als der Standard in der ovariellen Stimulation herauskristallisiert (Abb. 6; [12]). Die Gonadotropinapplikation erfolgt standardgemäß am 2. oder 3. Zyklustag mit einer Anfangsdosis von 150 IE pro Tag.

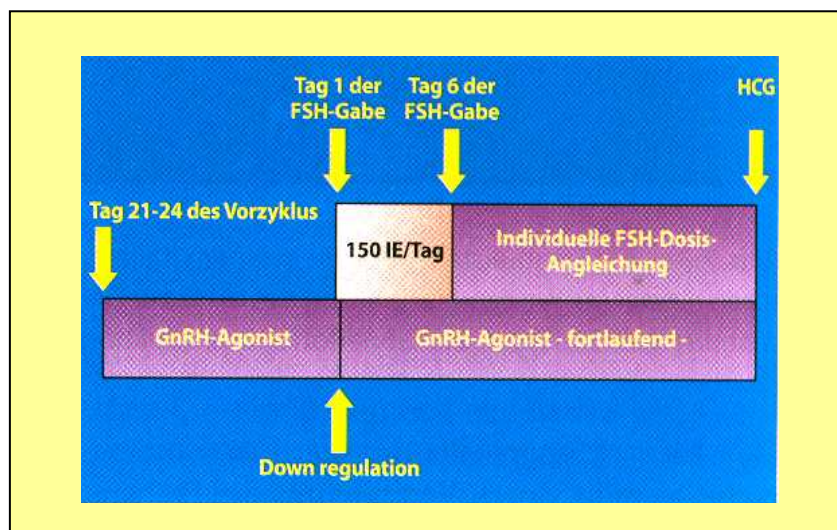


Abbildung 6: Schematische Darstellung des langen Protokolls (nach Keck 2003).

1.4.2.2 Stimulation mit GnRH-Antagonisten

Parallel zur Entwicklung der Agonisten gelang es, Substanzen zu synthetisieren, die ebenfalls am hypophysären Rezeptor für das GnRH-Molekül binden, aber keine Gonadotropinsekretion induzieren, sogenannte GnRH-Antagonisten [27, 28]. Seit 1996 stehen zwei Wirkstoffe (Cetrorelix, Ganirelix) als GnRH-Antagonisten zur Verfügung. GnRH-Antagonisten können als einmalige Gabe oder als mehrfache Applikation verabreicht werden („Single-Dose“ und „Multiple-Dose“; Abb.7; [12]). Die Gabe des Antagonisten erfolgt am 5. oder 6. Tag der Gonadotropinapplikation. Vergleichbar mit

dem langen Protokoll wird mit der Gonadotropingabe am 2. oder 3. Zyklustag mit 150 IE begonnen.

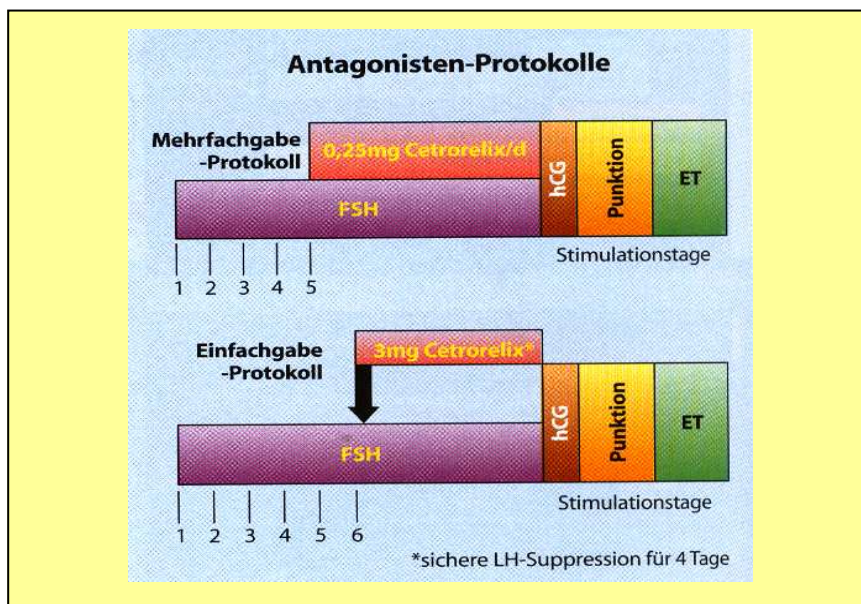


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Antagonisten-Protokolle (nach Keck 2003).

Antagonisten wirken über eine klassische kompetitive Rezeptorblockade an den gonadotropen Zellen ohne zeitliche Verzögerung. Aus diesem Grund werden sie nur während des zu erwartenden LH-Anstiegs verabreicht. Die GnRH-Antagonisten hemmen dosisabhängig die Ausschüttung von LH aus der Hypophyse [29]. Diese Hemmung tritt unmittelbar ohne einen initialen stimulatorischen Effekt ein und wird unter Dauerbehandlung aufrecht erhalten. Nach Beendigung der Applikation normalisiert sich die Funktion der Gonaden innerhalb weniger Tage. Die Vorteile einer Antagonistenbehandlung sind die kurze Behandlungsdauer, keine Vorbehandlung vor der Follikelstimulation, eine niedrige Wirkstoffbelastung und das geringere Risiko eines Überstimulationssyndroms [30].

1.4.2.3 Ovulationsinduktion und Lutealphasenunterstützung

Das externe Auslösen der Ovulation wird durchgeführt, um Behandlungen wie eine intrauterine Insemination, „Verkehr zum Optimum“ oder die Eizellentnahme vor einer IVF oder ICSI planen zu können. Substanzen wie hCG (sowohl urinären Ursprungs oder auch rekombinant hergestellt), GnRH oder LH können zur Induktion der Ovulation angewendet werden. Die hCG-Gabe ist erforderlich, damit die Eizelle sich 34 – 36 Stunden danach aus dem Cumulus oophorus lösen kann. Durch Ultraschallkontrollen

und Hormonanalysen wird der Zeitpunkt der Ovulation festgelegt, für den der Durchmesser des Leitfollikels (im natürlichen Zyklus 20 - 25 mm; im stimulierten Zyklus 17 - 20 mm) entscheidend ist. Zur medikamentösen Unterstützung der Lutealphase stehen eine wiederholte Gabe von hCG und/oder eine orale, parenterale oder vaginale Progesterongabe zur Verfügung, die eine Chance auf eine Implantation und Frühschwangerschaft erhöhen.

1.5 Mikroskopische Beurteilung der Kumulus-Oozyte-Komplexe

Die mikroskopische Beurteilung der Kumulus-Oozyte-Komplexe (COC), der Eizellen, Vorkernstadien und Embryonen stellt derzeit die beste praktische Bewertungsmethode der In-vitro-Fertilisation dar und ermöglicht eine prognostische Aussage über den Behandlungserfolg [31]. Morphologische Kriterien dienen zur Auswahl sogenannter Vorkernstadien für die Weiterentwicklung zu Embryonen. Auffälligkeiten von Eizellen sind nur bei geplanter ICSI-Therapie zu bewerten und zu dokumentieren. Eine vollständige Dokumentation der Weiterentwicklung dieser Eizellen setzt die Einzelkultivierung jeder Eizelle voraus [33]. Der Kumulus-Eizell-Komplex ist als funktionelle Einheit anzusehen. Er setzt sich aus der Oozyte, den Zellen der Corona radiata und den daran anliegenden assoziierten Follikelepithelzellen (Granulosazellen) zusammen. Die Corona radiata wird von Follikelepithelzellen gebildet, die die Eizelle direkt umschließen. Diese Zellen stehen über Zytoplasmafortsätze, die durch die Zona pellucida reichen, mit der Oozyte in direktem Kontakt, wie elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnte [32]. Die Anordnung der Granulosazellen gibt Aufschluss über den möglichen Reifegrad der Oozyte [31]. Über die Zytoplasmafortsätze beeinflussen die Zellen der Corona radiata den Eizellreifungsprozess [34]. Die sowohl bei unreifen als auch reifen Oozyten anliegende Corona radiata bestimmt den Fortgang der Meiose und steuert somit die Zytoplasma- und Kernreifung der Oozyte. Mikroskopisch lassen sich verschiedene Reifegrade der COC unterscheiden. Mit zunehmender Reife der Eizelle nimmt die Dissoziation der Granulosazellen zu und die Eizelle wird sichtbar. Sehr unreife Eizellen erscheinen mikroskopisch durch einen kompakten dichten Cumulus oophorus um die Oozyte. Selten ist der große Zellkern („germinal vesicle“, GV) in der Oozyte zu sehen. Die in der Prophase I befindliche Zelle besitzt noch einen diploiden Chromosomensatz und lässt sich in diesem Zustand weder mit Hilfe der IVF noch der ICSI fertilisieren. Diese COC können in vitro nach einer Kultivierungsdauer über 24 Stunden nachreifen (In-vitro-Maturation), jedoch ist die

Fertilisationsrate deutlich eingeschränkt. Fast ausgereifte Oozyten (Metaphase I-Oozyten) sind durch eine lockere Anordnung der äußeren Kumuluszellen gekennzeichnet. Weder sind ein Polkörper noch ein Zellkern sichtbar. Reife, befruchtungsfähige Oozyten befinden sich im Metaphase II-Stadium und zeigen einen expandierten Kumulus. Die Corona-radiata-Zellen liegen eng an der Zona pellucida an. Der 1. Polkörper ist sichtbar und das Zytoplasma klar und homogen granuliert. Selten erscheinen auch überreife und degenerierte Oozyten im Eizellpool. Das Überreifestadium ist gekennzeichnet durch einen verlorengegangenen Kumulus und meist fehlende Corona radiata. Der Polkörper ist sichtbar, das Ooplasma dunkler bei einer noch rund erscheinenden Oozyte. Im degenerierten Stadium erscheint die Oozyte in einer unregelmäßigen Form, Kumulus- wie Zellen der Corona radiata sind nur noch selten vorhanden. Polkörperchen und Zellkern sind fragmentiert, das Ooplasma ist dunkel. In der täglichen Praxis sind diese Parameter nur nach Entfernung der Kumuluszellen deutlich zu analysieren.

1.6 Aspekte der Eizellreifung

Im Verlauf der Gametenentwicklung stellt die Meiose einen entscheidenden Teilungsvorgang dar, in dem in zwei aufeinanderfolgenden Kern- und Zellteilungen die diploide Chromosomenzahl auf die Hälfte, zum haploiden Satz reduziert wird. Die weibliche Meiose wird im Gegensatz zu der männlichen, die erst in der Pubertät einsetzt, bereits während der Embryonalentwicklung ab dem 5. Fetalmonat initiiert. Bei der Geburt befinden sich alle weiblichen Keimzellen im sogenannten Diktyotän der Prophase I. In diesem Prophasestadium bleiben alle Eizellen arretiert. Ab dem Eintreten in die Pubertät nehmen pro weiblichen Zyklus 10 - 50 Eizellen die Meiose auf. Diese wird angeregt durch die gonadotropen Hormone LH und FSH. Die Prophase I, Metaphase I (Vorliegen homologer Chromosomenpaare in der Spindelebene), Anaphase I und Telophase I wird abgeschlossen. Es kommt zur Abtrennung des 1. Polkörpers. Kurze Zeit später erfolgt die Wiederaufnahme der Prophase II und in der Metaphase II erfolgt erneut eine Arretierung der Eizellen. Jetzt liegen einzelne, in ihre Chromatiden getrennte Chromosomen in der Spindelebene vor. Bei einer erfolgreichen Befruchtung wird die Meiose II beendet und der zweite Polkörper abgeschnürt.

In der extrakorporalen Reifung der Oozyten können Störungen des Meioseprozesses eine der Ursachen für eine reduzierte Befruchtungsrate nach einer IVF- oder ICSI-Therapie sein [35]. Bei der kontrollierten ovariellen Stimulation sind in der Regel 80 %

der gewonnenen Eizellen im Stadium der Metaphase II, die übrigen noch unreif. Im Wesentlichen sind es zwei Prozesse, die dazu führen, dass die Eizelle zum Zeitpunkt der Follikelaspersion reif und entwicklungsfähig ist. Das Reifestadium der Oozyte ist optimal, wenn die Reife des Zellkerns und die des Zytoplasmas synchron vonstatten gegangen sind [36, 37, 40]. Somit lässt sich der Maturationsprozess in die Kern- und in die zytoplasmatische Reifung trennen. Bei der Kernreifung kommt es zum Wiedereinsetzen der Meiose. Morphologisch sichtbar wird dies durch den „Germinalvesicle-Breakdown“ (GVBD), das Auflösen der Kernmembran. Zu Beginn kommt es zu einer peripheren Verlagerung des Germinalvesikels und zur Chromatinkondensation. Nach ungefähr 20-24 Stunden setzt der GVBD ein, das Metaphase I-Stadium ist nach ca. 32 Stunden erreicht. Ungefähr vier Stunden später wird der erste Polkörper ausgestoßen. Die Oozyten befinden sich in der Metaphase II und verbleiben bis zur Fertilisierung in diesem Stadium. Bei der Meiose der weiblichen Keimzellen entsteht eine einzige befruchtungsfähige Eizelle. Das nicht in der Oozyte verbliebene genetische Material wird an die Polkörper weitergegeben. Der 1. Polkörper entsteht nach der 1. Reifeteilung, der 2. Polkörper nach der durch die Befruchtung erfolgten zweiten Reifeteilung. Die Kernreifung repräsentiert nur einen Teil des Eizellreifungsprozesses. Die zytoplasmatischen Veränderungen innerhalb der 1. Reifeteilung sind essentiell für eine optimale Fertilisierung und unterstützen die frühe embryonale Entwicklung [38, 39, 40]. Die Migration kortikaler Granula zum Oolemma und deren Positionierung entlang des Cortex sind bedeutende Schritte für den zytoplasmatischen Reifungsprozess [43]. Sie etablieren das perfekte Abwehrsystem gegen eine Polyspermie [36].

1.7 Mikroskopische Beurteilung der Oozytenmorphologie

In der täglichen Routine eines IVF-Labors wird der Eizellqualität im Vergleich zur Pronukleusbetrachtung wenig prognostische Bedeutung beigemessen. Um so mehr interessiert in dieser Studie, ob anhand spezieller morphologischer Kriterien eine Vorauswahl für den Transfer von Embryonen schon auf der Ebene der Oozyten getroffen werden kann. Zu den allgemeinen Bewertungskriterien von Oozyten zählen die Beurteilung der Form und Größe der Oozyte, die optische Erscheinung der Zona pellucida, der 1. Polkörper und die Beschaffenheit des Zytoplasmas. Eine befruchtungsfähige Eizelle ist charakterisiert durch eine kreisrunde Form mit einem Zelldurchmesser von 100 – 150 µm, einen glatten ovalen 1. Polkörper, eine durchscheinende, unauffällige Zona pellucida und ein homogen hellgrau erscheinendes

Ooplasma. Abweichungen in der Größe ergeben sich im Auftreten von sogenannten Riesenoocyten mit einem Zelldurchmesser von ca. 200 µm.

Die Mehrzahl der punktierten Eizellen nach kontrollierter ovarieller Stimulation befinden sich zum Zeitpunkt der Evaluierung im Metaphase II-Stadium. Es gibt Hinweise, dass die Morphologie des 1.Polkörpers (der ca. 20 Stunden intakt bleiben kann) das postovulatorische Alter der Eizelle widerspiegelt [40, 41]. Die Gestalt des Polkörpers kann oval, flach, fragmentiert oder übergroß sein [45, 46]. Widersprüchliche Daten über den Einfluss der Polkörpermorphologie auf die Befruchtungsrates und Embryoqualität [45, 46, 47, 48] sowie die Implantations- und Schwangerschaftsrates [48, 49] wurden beschrieben. Die zytoplasmatischen Eigenschaften einer Oozyte sind ein weiterer wesentlicher Faktor. Mehr als die Hälfte aller (bei der IVF) punktierten Eizellen weisen eine oder mehrere zytoplasmatische Abnormitäten auf [50]. Ursache könnte eine Störung im zytoplasmatischen Reifungsprozess sein. Markante Anomalien sind eine extensive Zytoplasmagranulierung [51], Einschlüsse [52, 53, 54], Vakuolenbildung [55, 56] oder Aggregationen des glatten endoplasmatischen Retikulums [57]. Weitere morphologische Auffälligkeiten sind Granula oder Ablagerungen im perivitellinen Spalt sowie Abweichungen in der normalen Eizellsymmetrie [44].

1.8. Fertilisationskaskade und Befruchtungsparameter

Folgende Reaktionsschritte charakterisieren den Befruchtungsvorgang: Nach dem Durchdringen der Kumuluszellen erfolgt speziesspezifisch die Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida (extrazelluläre Matrix). Die Bindung des Spermatozoons geschieht über das Zona Protein 3 [58]; nach Beendigung der Akrosomenreaktion führt die Ausschüttung lytischer Enzyme (z.B. Akrosin) zur eigentlichen Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida, verbunden mit dem Durchdringen des perivitellinen Spaltes und der Fusion mit dem Oolemma [59]. Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration wird erhöht und kortikale Granula werden in den perivitellinen Spalt ausgeschüttet [32]. Hierdurch wird eine chemische Veränderung des Oolemmas und eine Transformation der Zona pellucida bewirkt, die eine polysperme Befruchtung verhindert [55]. Mit dem Eindringen des Spermatozoons wird die Metaphase II-Arretierung aufgehoben und die zweite Reifeteilung beendet. In ICSI-Zyklen konnten periodische Rotationen des Zytoplasmas anhand von Videosequenzen beobachtet werden [42], die mit der Dekondensation des Spermatozoonkopfes und dem Sichtbarwerden der Metaphaseplatte einhergehen. Morphologisch korreliert dieser

Entwicklungsschritt mit der Ausschleusung des 2. Polkörpers. Mit Hilfe der Mikrotubuli nähert sich der weibliche Vorkern dem männlichen an, es kommt zur Auflösung der Kernmembran und zur Replikation der DNA. In der Phase der Vorkernvergrößerung kommt es zu einer Dislokation verschiedener Zellorganellen; dies stellt sich randständig in lichtdurchlässigem Plasma dar („Halo-Effekt“).

Während der ersten Furchungsteilung werden die Chromosomen beider Chromosomensätze zufällig verteilt. Die ersten Befruchtungszeichen sind 16-18 Stunden nach Injektion des Spermatozoons zu sehen. Die detaillierte Betrachtung der Vorkerne zeigt zum einen eine normale Befruchtung (zwei Vorkerne) und schließt polypleide Vorkernstadien aus. Vier bis sieben Prozent der injizierten Eizellen weisen drei oder mehr Vorkerne auf und werden von der Kultur ausgeschlossen. Drei Vorkerne sind Zeichen einer Triploidie; diese entsteht entweder durch Polyspermie (IVF) oder nach fehlerhafter Abschnürung des zweiten Polkörpers (ICSI). Injizierte Oozyten mit nur einem Vorkern treten in einer Häufigkeit zwischen 5 und 6% auf [60]. In diesem Falle kann eine parthenogenetische Aktivierung des mütterlichen Chromosoms vorliegen. Auch eine normale Fertilisation mit reduzierter embryonaler Entwicklungspotenz ist möglich [60].

In der Literatur werden morphologische Kriterien an imprägnierten Eizellen (Vorkernstadien) beschrieben, die eine Prognose des Entwicklungspotentials der Eizellen ermöglichen sollen. Hierbei handelt es sich um das „Vorkernscoring“, welches die Anzahl und Anordnung der Nukleoli in den Nuklei beschreibt [5, 6, 7]. In dieser Studie wurde ein solches Scoring nach dem System von Scott et al. [7] durchgeführt.

2 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende prospektive Studie untersucht den Einfluss gonadotroper Hormone im Rahmen einer kontrollierten Überstimulation der Ovarien auf den Reifungsprozess und die Morphologie humaner Oozyten. Dies ist die erste Beobachtungsstudie, die prospektiv mögliche Differenzen verschiedener Stimulationsschemata und Gonadotropinpräparate auf den Entwicklungsstatus durch Follikelpunktion gewonnener Oozyten untersucht. Weiterhin waren die Ausprägung und Häufigkeit morphologischer Anomalien der Oozyten sowie deren Einfluss auf die Fertilisations-, Schwangerschafts- und Geburtenrate Gegenstand dieser Studie.

Grundlage ist ein Patientenkollektiv mit definierten Einschlusskriterien; welches im Rahmen einer Multicenterstudie an vier deutschen IVF-Einrichtungen den jeweiligen standardisierten Therapierichtlinien und Methoden betreut wurde.

Im Einzelnen sollen folgende wesentliche Fragen geklärt werden:

1. Kommt es durch die ovarielle Stimulation mit unterschiedlichen Gonadotropinpräparaten und verschiedenen Stimulationsprotokollen zu erkennbaren Unterschieden in der Morphologie der Oozyten und möglicherweise zu Störungen im Reifungsprozess?
2. Wieviele Oozyten haben in Abhängigkeit vom Gonadotropinpräparat unmittelbar nach der Punktion die Kernreifung vollendet?
3. Wie hoch ist der Oozytenanteil mit auffälligen Veränderungen im extrazytoplasmatischen Bereich - wie der Form des 1. Polkörpers, der Größe des perivitellinen Spaltes und der Symmetrie der Eizelle - durch die Anwendung verschiedener Gonadotropinpräparate und Therapieschemata?
4. Wie hoch ist der Anteil an auffälligen Veränderungen des Zytoplasmas und wie verändern sich die morphologisch erkennbaren zytoplasmatischen Faktoren - Reifung, Granulierung, Vakuolenbildung- durch die Anwendung verschiedener Gonadotropinpräparate und Stimulationsprotokolle?
5. Werden diese Faktoren auch von der Art des GnRH-Protokolls beeinflusst?
6. Haben das Alter der Patientinnen, der Body-Mass-Index und die Zahl vorangegangener Therapieversuche Einfluss auf den Reifungsprozess und die Ausbildung morphologischer Erscheinungsformen der Oozyten?

Ziel dieser Studie war es, Aussagen darüber zu machen, ob die Wahl der Gonadotropinpräparate und Hormonkombinationen wie auch der GnRH-Analoga einen Einfluss auf den Reifegrad und die Morphologie der Eizellen bewirken und ob die mikroskopische Beurteilung dieser Eizellen Hinweise liefert, die letztendlich eine genauere Prognose des Zyklusausgangs und des Behandlungserfolges erlauben. Würde eine Korrelation zwischen der Gabe definierter Therapeutika, bestimmter morphologischer Kriterien einer Metaphase II-Oozyte und dem Therapieausgang bestehen, so wären eine Präselektion der Eizellen nach morphologischen Kriterien schon vor Durchführung der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion und, falls notwendig, eine weitere Therapieempfehlung möglich.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Diese prospektive Beobachtungsstudie umfasst 564 Behandlungszyklen, bei denen das ICSI-Verfahren angewandt wurde. Alle prospektiven Zyklen wurden in einem Zeitraum zwischen Januar 2001 bis Dezember 2004 durchgeführt. Die Untersuchung des Einflusses gonadotroper Hormone auf die morphologische Entwicklung der Oozyten konnte an 5676 durch Follikelpunktion gewonnenen Eizellen vorgenommen werden.

Die Studie wurde parallel in vier verschiedenen Zentren Deutschlands (s. Tabelle 1) bei Patientinnen durchgeführt, die definierte Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten. Jeder Behandlungszyklus erhielt eine fortlaufende zentrumsspezifische Identifikationsnummer und konnte dem jeweiligen Zentrum zugeteilt werden. Die Datenerfassung erfolgte prospektiv, indem an dem Tag der Vorkernbeurteilung ein Meldebogen mit genauen Angaben zur Patientin (ID) und zu jeder ausgewählten imprägnierten Oozyte (*siehe Anhang*) an ein an der Studie teilnehmendes Zentrum versandt wurde.

Zu jeder Patientin erfolgte eine lichtmikroskopische Charakterisierung aller gewonnenen Oozyten-Reifestadien (Germinalvesikelstadium, GV; Metaphase I, MI; Metaphase II, MII und degenerierte Eizellformen). Die zu injizierenden Metaphase II- Eizellen wurden modifiziert nach [40, 45, 47, 67] morphologisch beurteilt. Jede Eizelle wurde einzeln photographisch dokumentiert und nach der Injektion einzeln weiterkultiviert. Die resultierenden Vorkernstadien wurden ebenso photographiert, dokumentiert und nach den Kriterien von [5,6,7] kritisch beurteilt. Die anhand der Eizellmorphologie und Anordnungen der Nukleoli in den Vorkernen ausgewählten imprägnierten Oozyten wurden einzeln weiterkultiviert und die entstandenen Embryonen vor dem Transfer in die Gebärmutterhöhle der Patientin photographisch erfasst.

Grundlage dieses Vorgehens war die Selektion von Eizellen im „Idealzustand“ ohne Abnormalitäten mit anschließender bester Vorkernmorphologie für einen erfolgreichen Embryonentransfer.

3.2 Patientenklientel

Die Datenerhebung erfolgte in Form einer Multicenterstudie, an der vier Zentren in Deutschland beteiligt waren:

Tabelle 1: Teilnehmende Zentren an der Multicenterstudie

Zentrum	ART-Laborleitung	Anzahl der Behandlungszyklen	Kürzel im Erfassungsbogen
Universitäts-Frauenklinik Bonn Abt. Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin	PD Dr. Markus Montag	22	[BN]
Gemeinschaftspraxis Tigges, Friol, Gnoth; Grevenbroich	Dr. Bea Maxrath	72	[GV]
Gemeinschaftspraxis Fritzsche, Reiher, Hoffmann; Jena	Dipl. - Biol. Simone Winkler	226	[JE]
Gemeinschaftspraxis Happel, Thaele, Giebel; Saarbrücken	Dipl. - Biol. Martin Greuner	244	[SB]

In den 564 Behandlungszyklen wurden 528 Paare behandelt. So entfallen 1,07 Zyklen auf ein Patientenpaar. Als Voraussetzungen zur Einbeziehung in die prospektive Studie dienten folgende Ein – und Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien

1. alle standardisierten Stimulationsschemata
2. ICSI - Behandlungszyklus
3. prämenopausale Patientinnen
4. normale Anatomie des Uterus
5. nicht mehr als 3 Vorbehandlungen (IVF oder ICSI)
6. Infektionsscreening: Hepatitis B, C und HIV mit negativem Test
7. antegrade Ejakulation
8. Einteilung des BODY-MASS-INDEX
 - Untergewicht : < 18,5 kg/m²
 - Normalgewicht: 18,5 – 24,9 kg/m²
 - Übergewicht: 25,0 – 29,9 kg/m²

Ausschlusskriterien

1. Extrauterine Gravidität in den letzten 3 Monaten
2. Poor responder (≤ 2 Follikel zum Zeitpunkt der Ovulationsauslösung)
3. basaler FSH-Spiegel >10 IU/L während der frühen Follikelphase (3.-7.Zyklustag)
4. Keine Eizellen gefunden
5. Body – Mass - Index (BMI) ≥ 30 kg/m²
6. Endometriose
7. ausgeprägte Formen der Ovarialinsuffizienz wie die hypogonadotrope oder hypergonadotrope Ovarialinsuffizienz; die hyperprolaktinämische sowie

- hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz (PCO-Syndrom; metabolisches Syndrom)
8. schwere Erkrankungen (z.B. maligne Erkrankungen, Multiple Sklerose, Diabetes mellitus)
 9. submuköse, intramurale und subseröse Myome (führen zur Verschlechterung der Implantationsbedingungen)
 10. Spermatozoenkonzentration < 50 bewegliche Spermatozoen aus dem Ejakulat nach Aufarbeitung zur ICSI
 11. Entzündungsanzeichen im Ejakulat (Bakterien, Leukozyten)

3.3 Datenerfassung

Alle in die Studie einfließenden Parameter bezüglich der morphologischen Charakterisierung jeder Oozyte, der Pronukleusstadien und Embryonen wurden in einem Dokumentationsbogen erfasst. Alle weiteren Parameter betreffend die Anamnese der Patientin, das Stimulationsregime, den Behandlungsablauf und den Behandlungsausgang wurden mit Hilfe des RecDate-Programms (Merck-Serono-Pharma, Deutschland) analysiert und dokumentiert.

3.4 Statistische Verfahren

Die im Beobachtungszeitraum durchgeführten Behandlungszyklen wurden nach bestimmten, ausführlich beschriebenen Einschlusskriterien in die vorliegende Studie einbezogen.

Zur Auswertung der gesammelten Daten wurde ein Schlüssel entwickelt, mit dem die standardisierten Daten aus den Patientenakten, dem RecDate-Programm und aus den Studienbögen in eine Microsoft Excel-Datei (Windows XP, 2002) eingegeben werden konnten. Für die univariaten Analysen wurden die Programme Microsoft Excel (Windows XP, 2002) und das Statistikprogramm SPSS (Version 14.0) verwendet.

Die Mittelwerte der quantitativen Variablen wurden immer mit ihren Standardabweichungen angegeben. Nach Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte der Vergleich der Mittelwerte quantitativer Variablen durch den zweiseitig unverbundenen Student t-Test. Die Ermittlung prozentualer Anteile wurde mit dem Chi-Quadrat-Anpassungstest (χ^2 -Anpassungstest) und dem exakten Fisher-Test durchgeführt. Als signifikant wurde ein p-Wert von < 0,05 angesehen. Somit liegt die Wahrscheinlichkeit einer falschen Signifikanzangabe unter 5%. Als statistische Tendenz

wurden p-Werte zwischen 0,05 und 0,1 eingeordnet. Die Ergebnisse werden tabellarisch dargestellt.

3.5 Anwendung von GnRH-Analoga

Zur Hypophysensuppression kamen GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten zur Anwendung. In 410 Zyklen wurden zur sogenannten „Downregulation“ GnRH-Agonisten eingesetzt, in 154 Zyklen kamen die GnRH-Antagonisten zum Einsatz.

Das „lange Agonistenprotokoll“ wurde in 400 Zyklen angewandt, 6 Zyklen erfolgten im „Short-Protokoll“ und in 4 Zyklen ging eine 3-monatige Behandlung mit einem Depot-GnRH-Agonisten voraus, sogenannte „Ultralong“-Protokolle. Eine statistische Auswertung konnte aufgrund der Behandlungszahlen nur bei Therapiezyklen mit dem „langen Protokoll“ und bei den Behandlungen mit GnRH-Antagonisten erfolgen.

Die Applikation der GnRH-Agonisten im „langen Protokoll“ begann im Vorzyklus ca. am 20. – 22. Zyklustag und wurde bis zur Ovulationsauslösung beibehalten [62, 63, 64, 65].

Als GnRH-Agonisten wurden Triptorelinacetat (**DECAPEPTYL**[®] 0,1 mg, Ferring, Deutschland) oder Leuprorelinacetat (**Uno-Enantone**[®] 1 mg, Takeda Pharma, Japan) verwendet und täglich subkutan appliziert. Nafarelinacetat wurde als Nasenspray, (**SYNARELA**[®], Pfizer-Pharma, USA) 2- mal 1 Sprühstoß (460µg) täglich verabreicht. Weiterhin fanden zwei Depot-Präparate in dieser Studie ihre Anwendung. Zu einem großen Anteil wurde Leuprorelinacetat (**Enantone**[®], 3,75 mg, Takeda Pharma, Japan) in Form einer Depot-Injektion pro Monat appliziert und nur in 3 Zyklen wurde mit Goserelinacetat (**ZOLADEX Gyn**[®], 3,8 mg, Astra Zeneca, Schweden) behandelt. Mit der Gonadotropingabe wurde meist am 2. oder 3. Zyklustag mit einer Anfangsdosierung von 150 IE begonnen.

Als GnRH-Antagonist wurde Cetrorelixacetat (**Cetrotide**[®], 0,25 mg, Merck-Serono, Deutschland) ab dem 5.- 6. Stimulationstag als tägliche Injektion von 0,25 mg s.c. verabreicht. Diese kontinuierliche Gabe wurde bis zum Tag der Induktion der Ovulation beibehalten [68, 69, 70].

3.6 Gonadotropinapplikation zur ovariellen Stimulation

In dieser Studie kamen verschiedene Gonadotropinpräparate zur Anwendung.

Als Therapeutika urinären Ursprungs wurden folgende Gonadotropine appliziert:

- **Menotropin (hMG), Menogon[®] HP** (75 IE FSH und 75 IE LH; Ferring, Deutschland)
- **Urofollitropin, Fertinorm[®] HP** (FSH-Monopräparat hochgereinigt, 75 IE/150IE; Serono, Deutschland, seit 2003 nicht mehr in Deutschland auf dem Markt).

Die durchgeführten Behandlungszyklen mit Fertinorm-HP wurden dennoch in die Studie aufgenommen, um erstens einen prospektiven statistischen Vergleich zu anderen Stimulationspräparaten zu erzielen und zum zweiten eine Basis an Ergebnissen für ein neues FSH-Monopräparat urinären Ursprungs (Urofollitropin, **BRAVELLE[®]** 75 IE; Ferring, Deutschland) zu liefern, letzteres wurde 2006 neu für den deutschen Markt zugelassen.

Als rekombinante follikelstimulierende Hormonpräparate wurden

- **Follitropin alpha, Gonalf[®]** (z.B. 75 IE, 5,5 µg , Merck-Serono, Deutschland) und
- **Follitropin beta, Puregon[®]** (z.B. 75 IE, Organon, Deutschland)

als Gonadotropine angewandt. In Verbindung mit rekombinantem FSH ist rekombinantes luteinisierendes Hormon (LH) - Lutropin alpha (**Luveris[®]** 75 IE. Merck-Serono, Deutschland) eingesetzt worden. Auch folgende Kombinationsvarianten von Gonadotropinen kamen als Behandlungsschemata zum Einsatz:

1. **Menogon[®] HP und Gonalf[®]** ,
2. **Menogon[®] HP und Fertinorm[®] HP** ,
3. **Menogon[®] HP und Puregon[®]** ,
4. **Gonalf[®] und Luveris[®]** ,
5. **Puregon[®] und Luveris[®]**

Durch transvaginale Sonographie wurde die ovarielle Response anhand der Follikelanzahl und Follikelgröße kontrolliert. Parallel dazu erfolgte ab dem 10. Zyklustag eine Bestimmung der Estradiolspiegel im Serum als weiterer Marker [66, 71]. Die tägliche FSH-Dosierung im Stimulationszyklus wurde entsprechend den Follikelgrößen und den Estradiolkonzentrationen im Serum angehoben, gesenkt oder beibehalten [72, 73].

3.7 Ovulationsinduktion

Liegt nach sonographischer Kontrolle die Follikelgröße zwischen 17 und 20 mm, wird, durch seine LH-Aktivität bevorzugt, mit humanem Choriongonadotropin (hCG) die Ovulation ausgelöst [74]. Diese erfolgte zum einen durch die intramuskuläre Injektion von 10 000 IE aus dem Urin Schwangerer mit **Predalon[®] 5000 IE** (Organon, Deutschland) oder durch eine subkutane Injektion von 10 000 IE mit **Pregnesin[®] 5000**

IE (Serono, Deutschland; seit 2004 nicht mehr auf dem deutschen Markt). Als rekombinantes Präparat stand eine Fertigspritze mit 6500 IE rekombinant hergestelltem Choriongonadotropin alpha (**Ovitrelle**[®] 250 Mikrogramm, Merck-Serono, Deutschland) als Alternative zur Verfügung.

3.8 Gewinnung der Kumulus-Oozyte-Komplexe durch transvaginale Follikelaspiration

Die Follikelpunktion erfolgt 34-36 Stunden nach Ovulationsinduktion unter operativen Bedingungen in Allgemeinnarkose oder Lokalanästhesie. Durch die vollständige Aspiration der Follikelflüssigkeit lässt sich in etwa 85-90 % der Fälle die Eizelle von der Follikelwand ablösen und ist in der abgezogenen Flüssigkeit zu finden. Jeder Follikel mit einer Größe von ca. 18 – 20 mm wurde mit Hilfe einer Punktionskanüle (doppellumig, Gynemed, Deutschland; einlumig, Labotect, Deutschland) durch Unterdruck aspiriert und in einem sterilen, körperwarmen Röhrchen aufgefangen. Dabei sollte ein konstanter negativer Druck von 180 mm Hg nicht überschritten werden. Dies wurde mit Hilfe einer Punktionsautomatik (z. B. Aspirator: Labotect, Deutschland) erreicht. Die Follikelflüssigkeit wurde simultan unter Laborbedingungen mikroskopisch (Stereomikroskop Zeiss Deutschland; Leica, Typ Wild M8) nach Kumulus-Oozyte-Komplexen („cumulus-oocyte-complex“, COC) untersucht, die Kumuluskomplexe in Medium gespült und in neues unter Kulturbedingungen äquilibriertes Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die COC unter Bedingungen, wie unter Abschnitt 3.14 beschrieben, kultiviert.

3.9 Oozytenpräparation

Da in dieser Studie nur ICSI-Behandlungszyklen durchgeführt wurden, war es notwendig, die Eizellen von den sie umgebenden Kumuluszellen zu befreien. Nach einer Ruhephase (sog. Adaptationsphase) von ca. 1-5 Stunden wurden die Eizellen für das ICSI-Verfahren vorbereitet. Die Denudation der Oozyten erfolgte enzymatisch durch das Enzym Hyaluronidase (SynvitroHyadase Medicult, Dänemark; HYASE-10X, Vitrolife, Schweden; Type VIII H3757, Sigma, Deutschland). Nach kurzzeitiger Inkubation (ca. 30-60s) von maximal 5 Kumulus-Eizell-Komplexen pro Patientin in einem Enzymtropfen (30-200µl) wurden die verbliebenen Follikelepithelzellen mechanisch von der Oozyte getrennt. Diese zelluläre Abtrennung erfolgte mit einer feinen Kapillare (Denuding-Pipette mit Durchmesser von 140 –170 µm; Cook,

Australien). Die frei präparierten Eizellen wurden in Hepes-gepuffertem Kulturmedium gespült und in vorbereitete Injektionsschalen transferiert.

3.10 Ejakulatpräparation für die Durchführung der Intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI)

Zur Aufbereitung von Ejakulaten gibt es verschiedene Möglichkeiten der Trennung von Seminalplasma, Prostaglandinen und Spermatozoen. In unserer Studie wurde von allen Teilnehmern das „Swim-up“-Verfahren durchgeführt. Nach Zugabe eines „Spermatozoenwaschmediums“ (Hams F10, Sigma, Deutschland; Sperm-Rinse, Vitrolife, Schweden) wurde das Ejakulat bei 500 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt (Hettich-Zentrifugen). Das Sediment wurde mit frischem Waschmedium resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Danach erfolgte eine vorsichtige Überschichtung des Spermatozoenpellets mit 0,1 ml Kulturmedium und anschließend eine 1-2- stündige Inkubation unter den gleichen Kulturbedingungen wie bei den Kumulus-Oozyte-Komplexen.

Liegen sehr eingeschränkte Spermatozoenbefunde vor, wurde eine modifizierte „Mini-swim-up-Methode“ durchgeführt. Das gesamte Ejakulat wurde einmal aufkonzentriert, in einem 1,5-ml Eppendorf-Gefäß einmal mit Waschmedium versetzt, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das entstandene Pellet wurde mit Volumina zwischen 20 und 40 µl Kulturmedium überschichtet und für 0,5- 2 Stunden inkubiert. Wenige Mikroliter des Spermatozoenüberstandes werden dann in einen Tropfen (10µl) mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) gegeben, der sich im Zentrum eines mit Mineralöl überschichteten Injektionsschälchens befindet (Mineralöl Reproline, Deutschland; Injektionsschalen, Nr: 1006 Falcon, USA). PVP (PVP-Standard, Medicult, Dänemark; ICSI TM, Vitrolife, Schweden) ist eine visköse Flüssigkeit, die ein schnelles Vorwärtsbewegen der Spermatozoen verhindert. Auf diese Weise wird ein leichtes „Einfangen“ der männlichen Gameten für die ICSI gewährleistet (s. Kapitel 3.13 [75, 76, 77]).

3. 11 Lichtmikroskopische Beurteilung des Oozytenstadiums (Kernreife)

Nach der enzymatischen Entfernung der Kumuluszellen erfolgt die mikroskopische Beurteilung des Reifegrades der gewonnenen Oozyten. Das Vorhandensein eines „germinalen Vesikels“ (Zellkern) zeigt an, dass die Eizelle noch unreif ist, sich also noch im Stadium der Prophase I der 1. Reifeteilung (Meiose I) befindet. In diesem Stadium besitzt die Eizelle einen diploiden Chromosomensatz und wird nicht injiziert (Abb. 8).

Eizellen, die keinen germinalen Vesikel und keinen 1. Polkörper aufweisen, werden der Metaphase I (diploider Chromosomensatz) zugeordnet (Abb. 8) und ebenfalls nicht der ICSI zugeführt. Erst das Auftreten eines 1. Polkörpers deutet darauf hin, dass die Eizelle das Stadium der Metaphase II (haploider Chromosomensatz) erreicht und die Kernreifung vollendet hat. Nun ist die morphologische Voraussetzung zur Durchführung der intrazytoplasmatischen Spermatozoen-Injektion erfüllt (Abb. 8). Zu einem geringen Prozentsatz sind auch degenerierte Oozyten in den Follikeln zu finden. Diese Zellen wurden dokumentiert und nicht weiterverwendet.

Abbildung 8 zeigt die morphologischen Erscheinungsbilder der Kernreifung einer Oozyte.

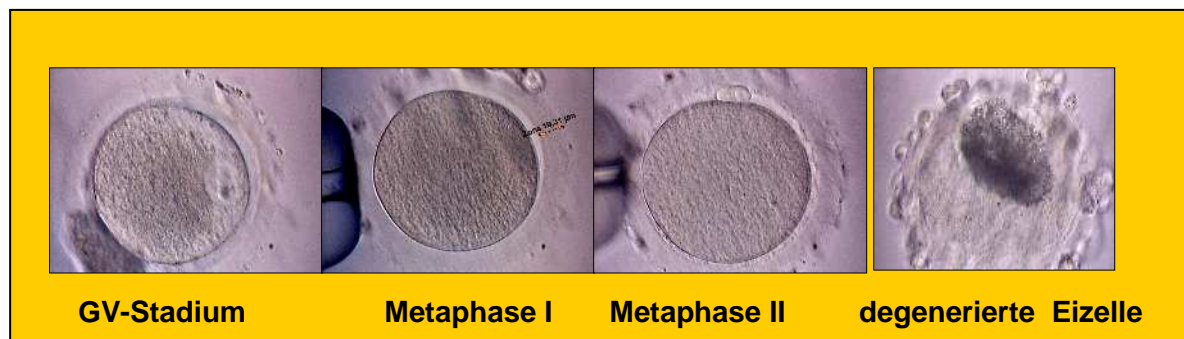


Abbildung 8: Morphologische Stadien der Oozytenkernreifung.

3.12 Morphologische Charakterisierung der Metaphase II -Oozyten

Alle Metaphase II-Oozyten wurden einzeln anhand definierter Qualitätskriterien beurteilt, dokumentiert und photographisch durch einen Printerausdruck oder als Bilddatei hinterlegt. Grundlage des Bewertungsmaßstabes waren die Arbeiten von [40, 43, 45, 47, 51, 55, 67]. Die Eizellen wurden bei 400-facher Vergrößerung mit „Hoffmann Modulation Kontrast“-Optik beurteilt und als Printerausdruck hinterlegt.

Zur Unterteilung der morphologischen Charakteristika wurden extrazytoplasmatische und zytoplasmatische Merkmale bewertet.

→ **Extrazytoplasmatische Parameter**

- Form und Beschaffenheit des 1. Polkörpers
- Größe und Auffälligkeiten des perivitellinen Spaltes
- Symmetrie der Oozyte
- Optische Beschaffenheit der Zona pellucida

→ Zytoplasmatische Parameter

- Homogenität und Granulierung des Zytoplasmas
- Vorhandensein von Vakuolen
- Vorhandensein von refraktilen Körpern
- Aggregation des glatten endoplasmatischen Retikulums (SER)
- Vesikelbildungen im Zytoplasma

Um Abnormalitäten einer Oozyte definieren zu können, sollte zunächst das physiologische Erscheinungsbild einer normal geformten Oozyte charakterisiert werden (Abb.9). Diese zeichnet sich durch eine runde Form, einen ovalen glatten 1. Polkörper, Homogenität des Zytoplasmas, einen schmalen perivitellinen Raum und eine durchscheinende Zona pellucida aus.

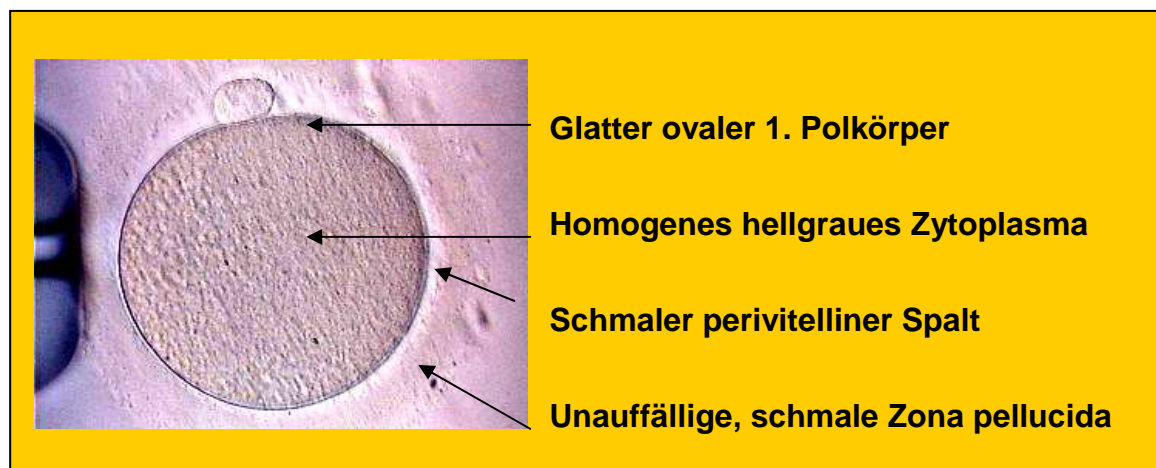


Abbildung 9: Normal geformte Metaphase II- Oozyte.

Extrazytoplasmatische Parameter

1. Form und Beschaffenheit des 1. Polkörpers

Die Mehrzahl der gewonnenen Eizellen nach der Follikelpunktion zeichnen sich zum Betrachtungszeitpunkt durch eine normale Größe und das Vorhandensein eines 1. Polkörpers aus. Der 1. Polkörper kennzeichnet den Reifestatus der Oozyte. Die verschiedenen morphologischen Erscheinungsformen des 1. Polkörpers könnten dessen zeitlichen Zerfall kennzeichnen und Einfluss auf die Weiterentwicklung der Eizelle haben [46, 47, 49].

Wir unterscheiden in dieser Studie 3 Formen (Abb.10):

- ovaler, glatter Polkörper,
- flacher Polkörper,
- fragmentierter Polkörper.

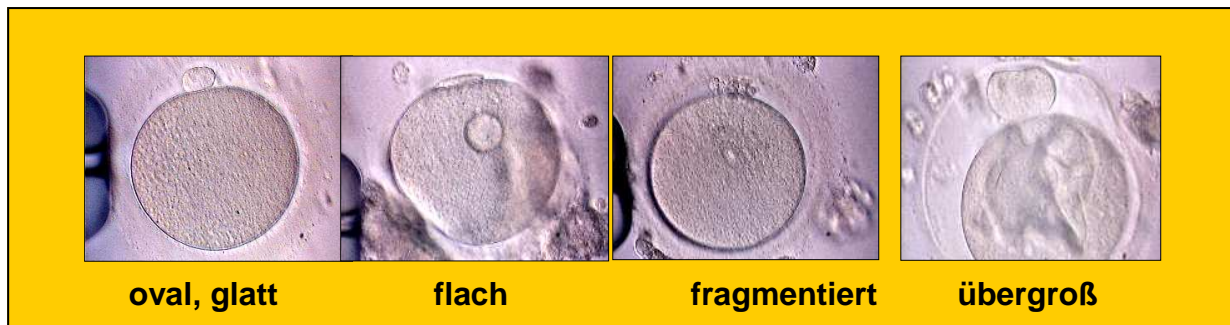


Abbildung 10: Morphologische Charakterisierung des 1. Polkörpers.

Auffällige Formen, wie ein übergroßer Polkörper (Abb.10) wurden nicht für eine ICSI verwendet.

2. Größe und Auffälligkeiten des perivitellinen Spaltes

Der Raum zwischen der Plasmamembran des Ooplasmas und der Zona pellucida bezeichnet man als perivitellinen Spalt (PVS) oder extrazelluläre Matrix [78]. In dieser Studie wurden die Eizellen nach unauffälligem und auffälligem PVS betrachtet. Als Auffälligkeiten wurden

- Eizellen mit Granula und Ablagerungen des Zytoplasmas im PVS [44] oder
- ein sehr großer Zwischenraum gewertet (Abb.11).

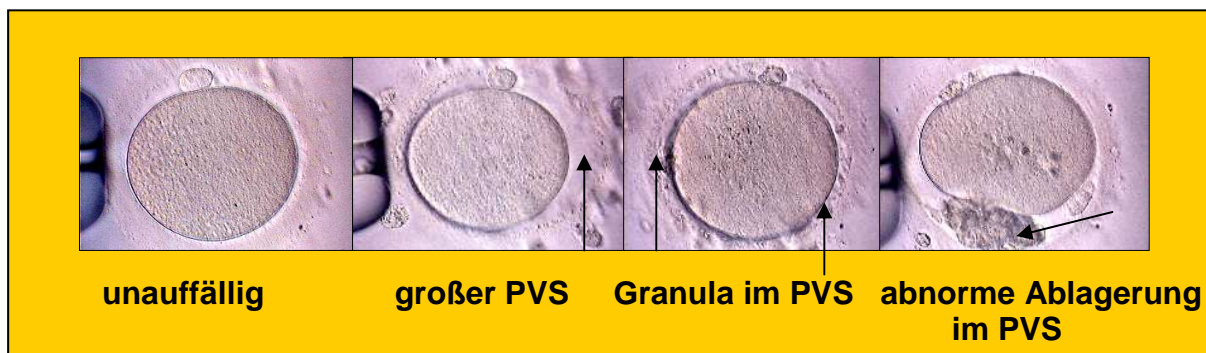


Abbildung 11: Morphologische Charakterisierung des perivitellinen Spaltes.

3. Symmetrie der menschlichen Oozyte

Das Erscheinungsbild einer menschlichen befruchtungsfähigen Oozyte (Metaphase II-Stadium) zeigt sich in einer kugelförmigen Gestalt mit einem Zelldurchmesser von 100 – 150 μm [31, 79]. Die Einteilung der Oozytensymmetrie erfolgte in

- gleichmäßig runde, kugelförmige Gestalt und in
- elongierte, ovale oder abnorme Eizelldarstellungen (Abb.12).

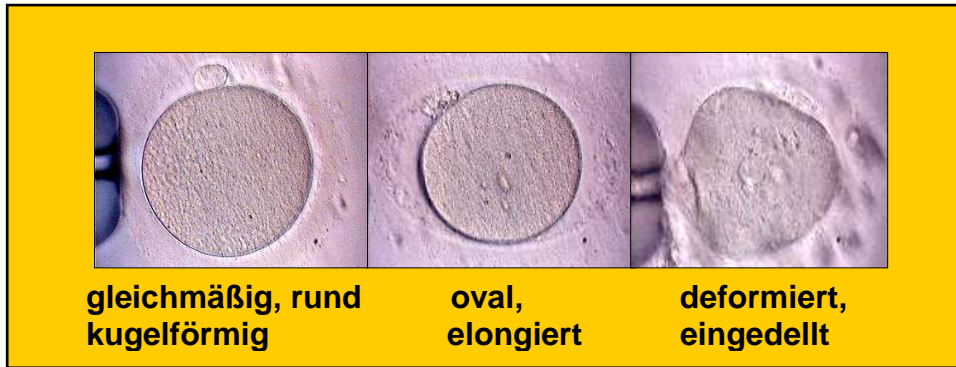


Abbildung 12: Charakterisierung der Oozytensymmetrie.

4. Optische Beschaffenheit der Zona pellucida

Eine normal gestaltete Zona pellucida zeigt sich in ihrem leicht durchscheinenden mikroskopischen Bild mit einer Dicke zwischen 12 und 20µm. Abweichungen dieser Form sind zum einen in einer dunkel, sehr kompakt erscheinenden Eizellhülle oder in meist ovalen Oozyten, deren innere Zonenschicht sich abgelöst hat, zu sehen. Häufig zeigen diese Oozyten auch erhebliche Auffälligkeiten in der gemessenen Dicke. Diese kann zwischen 5 und 40 µm variieren (Abb.13).



Abbildung 13: Charakteristika der Zona pellucida.

Zytoplasmatische Parameter

1. Homogenität und Granulierung des Zytoplasmas

Eine Eizelle guter Qualität sollte ein klares bis leicht granuliertes Ooplasma ohne Einschlüsse aufweisen. Markante Abweichungen zeigen sich in einer extensiven zentralen Granulierung oder seltener in einem komplett granulierten Ooplasma [51] (Abb.14).

Fehler

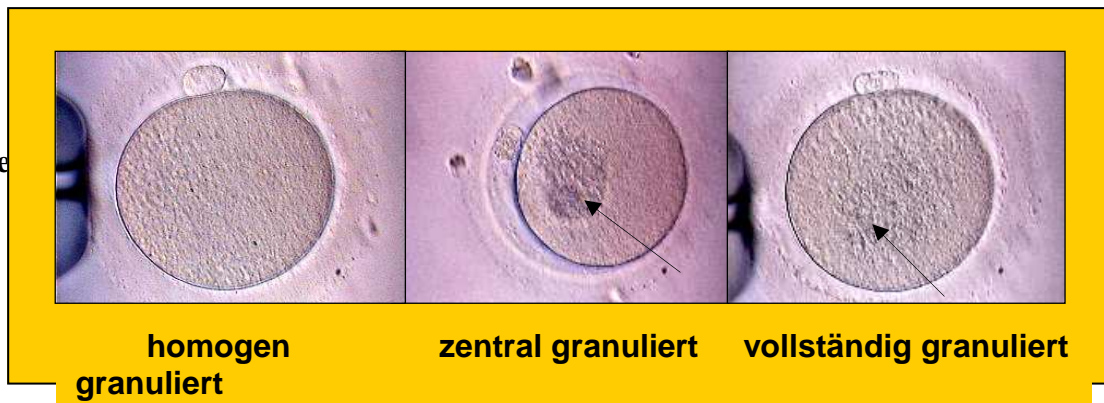


Abbildung 14: Charakteristika des Zytoplasmas.

2. Vorhandensein von Vakuolen

Zu den Dismorphismen im Zytoplasma zählt auch das Vorhandensein von Vakuolen [55, 56]. Unter Vakuolen versteht man kreisrunde, membranumschlossene Inklusionen, die von einer Flüssigkeit ausgefüllt sind. Die Flüssigkeit entspricht in ihrer Zusammensetzung der des perivitellinen Spaltes. Vakuolen können in ihrer Zahl und Größe in den Oozyten variieren. Wir unterscheiden in dieser Studie die Metaphase II-Eizellen mit und ohne Vakuolenbildung, die Größe und Anzahl wurde nicht dokumentiert (Abb.15).

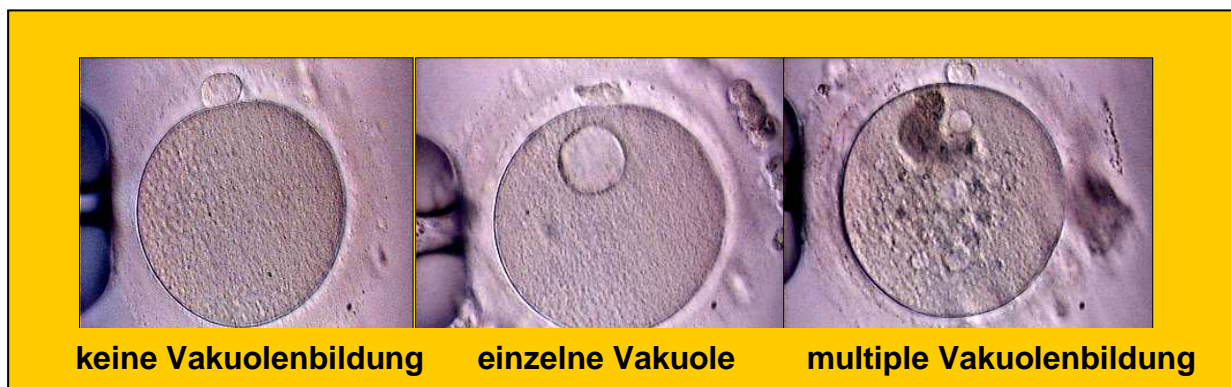


Abbildung 15: Erscheinungsformen von Vakuolen.

3. Refraktile Körper

Refraktile Körperchen sind zytoplasmatische Einschlüsse unterschiedlicher Größe. Wir unterscheiden in Oozyten mit wenigen kleinen Einschlusskörperchen (Inkorporationen) und auffälligen dominanten Einschlüssen (Abb.16; [52, 53, 54]).

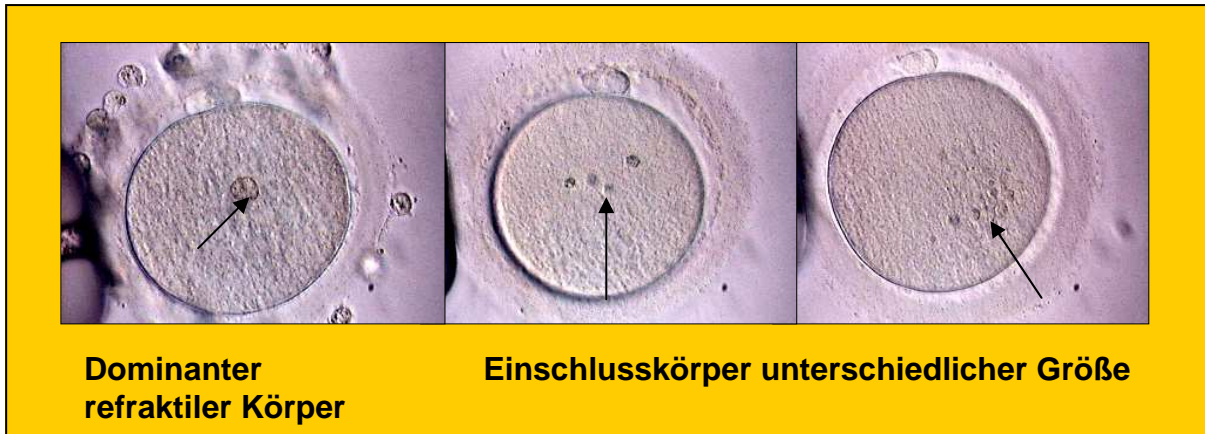


Abbildung 16: Erscheinungsformen refraktiler Körper.

4. Aggregationen des glatten endoplasmatischen Retikulums (SER)

Diese Aggregationen zeigen eine scheibenförmige Struktur, die nicht durch eine Membran vom restlichen Zytoplasma abgegrenzt ist (Abb.17). Wichtig ist die Unterscheidung zur kugelförmigen Vakuolenbildung. Diese Form des Oozytendysmorphismus kann hier nur Erwähnung finden, da die dokumentierte Anzahl der Oozyten zu gering ist [57].



Abbildung 17: Charakteristisches Bild einer SER-Aggregation (RK: refraktiler Körper).

5. Oozyten mit organellenfreien Arealen im Zytoplasma

Im Bereich des kortikalen Zytoplasmas sind vereinzelt Areale zu sehen, die eine Art „Hohlräume“ darstellen. Auch diese Form des Oozytendysmorphismus soll hier nur Erwähnung finden, da die dokumentierte Anzahl der Oozyten zu gering ist (Abb.18; [55]).

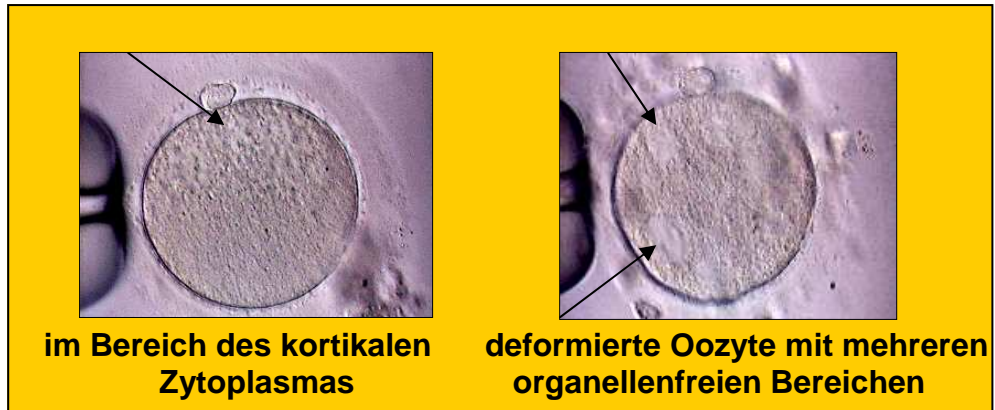


Abb. 18: Erscheinungsformen organellenfreier oder - armer Areale.

3.13 Durchführung der Intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion

Zur Durchführung benötigt man einen vibrationsfreien Tisch, ein Inversionsmikroskop (z.B. Olympus IX 50; Hoffmann-Kontrast; bis zu 400-facher Vergrößerung), zwei identische Mikromanipulatoren mit Halte- und Injektionskapillare (z.B. Research Instruments, Großbritannien) und eine Heizplatte. Sowohl die Oozyten als auch die Spermatozoen werden im gleichen Injektionsschälchen (Nr. 351006; Falcon®) in verschiedene Medien-Mikrotropfen (10 µl) – überschichtet mit Mineralöl- überführt:

- die Oozyten in Hepes-gepuffertem Kulturmedium,
- die Spermatozoen in 8%-igen PVP (s. Kapitel 3.11).

Zur Injektion wird die Oozyte an einer Haltepipette (innerer Ø 15 µm) arretiert, der Polkörper wird wahlweise auf 12.00 Uhr oder 6.00 Uhr positioniert. Der Grund dafür ist, dass sich intrazellulär in unmittelbarer Nähe des Polkörpers normalerweise der Spindelapparat befindet und dieser bei der Injektion auf keinen Fall zerstört werden darf. Mit der Spermatozoeninjektionspipette (innerer Ø 5 µm) wird nun ein kurzer Schlag auf die Geißel des Spermatozoons ausgeführt, um es zu immobilisieren. Das Spermatozoon wird mit der Geißel zuerst in die Pipette aspiriert und exakt bei 3.00 - Uhr- Position in die Eizelle eingestochen. Nach dem Brechen der Zellmembran wird mit geringem Volumen das Spermatozoon in das Zytoplasma der Eizelle injiziert. Nach Beendigung der Injektion werden die Eizellen in Kulturmedium gespült und in Einzelkultur weiter inkubiert.

3.14 Kulturbedingungen

In allen beteiligten Zentren wurden verschiedene Kultivierungssysteme verwendet. Tabelle 2 gibt eine kurze Übersicht der verwendeten Medien.

Tabelle 2: Medienübersicht der beteiligten Zentren

Zentrum	Kultivierungsbedingungen (ohne Angabe der Toleranzbereiche)	Kulturmedium
Universitäts-Frauenklinik Bonn, Abt. Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin	37,3°C ; 6% CO ₂	IVF20, G1.2 , G2.2 der Fa. Vitrolife, Schweden
Gemeinschaftspraxis Tigges, Friol, Gnoth; Grevenbroich	37,3°C ; 6% CO ₂	IVF20, G1.2 , G2.2 der Fa. Vitrolife, Schweden
Gemeinschaftspraxis Fritzsche, Reiher, Hoffmann; Jena	37,2°C; 5% CO ₂	Universal-IVF-Medium, Fa. Medicult, Dänemark und IVF 30, der Fa. Vitrolife, Schweden
Gemeinschaftspraxis Happel, Thaele, Giebel; Saarbrücken	37,0°C; 5% CO ₂	Hams F 10 Basis

3.15 Morphologische Charakterisierung der Vorkernstadien

Die beiden Vorkernstadien lassen sich deutlich 18 - 20 Stunden nach erfolgter Spermatozoeninjektion lichtmikroskopisch nachweisen. Beide Pronuklei sollten zum Zeitpunkt der Evaluierung zentral im Zytoplasma aneinander gelagert sein. Befruchtungszeichen mit einem oder mehr als 2 Vorkernen werden von der weiteren Kultur ausgeschlossen. In dieser Studie wurden mit Hilfe des Vorkernscoring-Systems von Scott [7] die prognostisch besten Vorkernstadien zur Weiterentwicklung (max. 3) ausgewählt und die überzähligen regulär befruchteten Oozyten auf Wunsch des Patientenpaares kryokonserviert oder aus dem Kultursystem entfernt [3, 80]. Da die polare Anordnung der Nukleoli zeitabhängig erfolgt, stellen sich zum Zeitpunkt der Betrachtung verschiedene Vorkernmuster dar. Abbildung 19 zeigt das angewandte Beurteilungssystem für die Pronukleusstadien nach Scott.

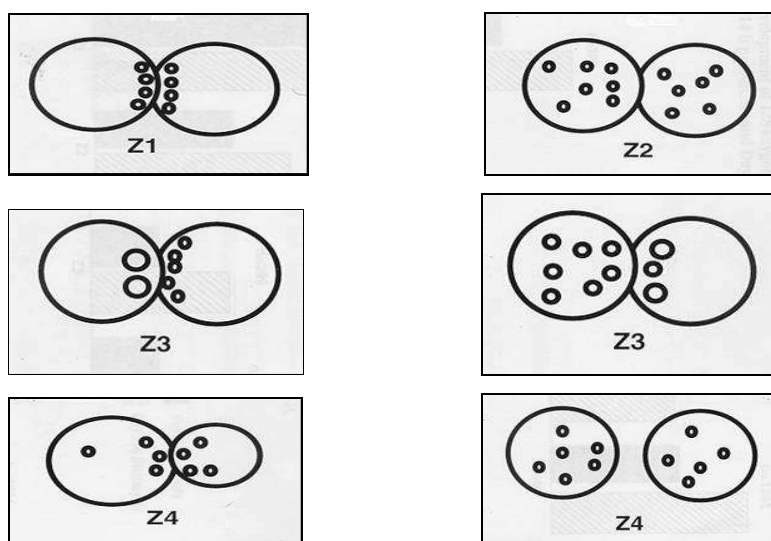


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Vorkernmuster (nach Scott et al. 2000).

- Z1: polarisierte Nukleoli (Nukleolus-Vorläufer-Strukturen, NPB)
in beiden Vorkernen; annähernd gleiche Anzahl
- Z2: nicht polarisierte Nukleoli in beiden Vorkernen
- Z3: auffällig unterschiedliche Anzahl der NPB in den beiden Vorkernen
und /oder keine polarisierten Nukleoli in den Vorkernen
- Z4: Vorkerne sind unterschiedlich groß oder weit voneinander getrennt

3.16 Klassifizierung der Embryonen

Aus den einzeln weiterkultivierten Vorkernstadien entwickelten sich Embryonen, die ebenso anhand morphologischer Kriterien klassifiziert wurden. Diese Beurteilung erfolgte täglich bis zur Übertragung der Embryonen, in der Regel am Tag 3 der Kultivierung, in das Cavum uteri der Patientin. Das Grading der Embryonen wurde modifiziert nach Hill [81] und Steer [82] durchgeführt. Die Embryonen wurden hinsichtlich ihrer Entwicklungspotenz (reguläre Zahl an Blastomeren am Tag 2 oder Tag 3) und nach ihrer Morphologie (Prozentsatz an Fragmenten) beurteilt. Embryonen erscheinen in "regulär Kategorie A", wenn sie am Tag 2 vier gleichgeformte Blastomeren ohne den Nachweis von Fragmenten aufweisen. Ist ein niedrigerer Prozentsatz an Fragmenten vorhanden, erscheinen die Blastomeren ungleich groß. Diese Embryonen entsprechen der Einteilung „Kategorie B, regulär“. Alle Embryonen, die einen prozentualen Anteil an Fragmenten zwischen 20 und 50 % oder >50 % aufweisen, werden als „irregulär“ eingestuft. Embryonen, die sich am Tag 2 nur zu einem Zweizellstadium, auch ohne Fragmentanteil, entwickelt haben, werden als „irregulär“ bezeichnet, da die Entwicklungspotenz als eingeschränkt gilt. Dies gilt auch für Vierzellstadien am Tag 3. Achtzellstadien mit einem Fragmentanteil > 20% werden ebenfalls als „irregulär“ eingestuft. Tabelle 3 verdeutlicht die Klassifizierung der Embryonen.

Tabelle 3: Klassifizierung der Embryonenqualität

Embryo- kategorie	Blastomerenzahl	Entwicklungs- status/% Satz an Fragmentierung	Blastomerenzahl	Entwicklungs- status/% Satz an Fragmentierung
	Tag 2		Tag 3	
A	3 bis 4	Regulär/ 0 %	6 bis 8	Regulär/ 0 %
B	3 bis 4	Regulär/ <20%	6 bis 8	Regulär/ <20%
C	2 bis 4	Irregulär / 20-50%	4 bis 8	Irregulär / 20-50%
D	2 bis 4	Irregulär/ > 50%	4 bis 8	Irregulär/ > 50%

Der Entwicklungsstatus (regulär / irregulär) sowie die Blastomerenzahl am Tag 2 oder Tag 3 des Embryonentransfers wurden in den Erfassungsbogen dokumentiert.

3.17 Embryotransfer und Endometrium

In der Regel erfolgte der Embryonentransfer am 3. Tag, ausnahmsweise auch am 2. oder 4. Tag nach Follikelpunktion in Steinschnittlage der Patientin. Es wurde jeder Embryo einzeln charakterisiert und anhand des Embryoscoringsystems beurteilt. Weiterhin wurde entschieden, ob ein lasergestütztes „assisted hatching“ mit einem kontaktfreien Diodenlaser (1480 nm) erfolgte [83].

Für den Transfer der Embryonen in den Uterus kam ein speziell dafür angefertigter Katheter zum Einsatz (Cook, Australien; Labotect, Deutschland), der sorgfältig mit Transfermedium gespült und dann mit den Embryonen beladen wurde. Der Führungskatheter wurde in den Zervikalkanal eingeführt und der die Embryonen enthaltende Innenkatheter vorsichtig in das Cavum uteri platziert, ca. 1,5 cm unterhalb des Fundus. Danach erfolgte die Einspülung der Embryonen mit wenig Flüssigkeit (maximal 50 µl) und nach einer kurzen Verweildauer die vorsichtige Entfernung des Katheters und die mikroskopische Überprüfung, ob keine Embryonen im Katheter verblieben waren [84]. Anschließend erfolgten die sonographische Kontrolle der platzierten Embryonen anhand der echogenen Luftblase und die Messung der Endometriumdicke. Die Messung wurde immer im Anschluss an den Embryonentransfer durchgeführt.

3.18 Lutealphasenunterstützung

Bei der Stimulationsbehandlung mit GnRH-Agonisten kommt es zu einem Lutealphasendefizit, das medikamentös ausgeglichen werden muss. Dafür stehen mehrere Therapiemöglichkeiten zur Verfügung:

- eine wiederholte Gabe von hCG (am 1., 3., und 6. Tag nach Embryotransfer) und täglicher Progesteronzufuhr oder
- einer alleinigen Gabe von Progesteron täglich.

Beide Varianten wurden als Lutealphasensupport in unserer Studie angewandt. Progesteron wurde in Form von Kapseln (**Utrogest**[®], Dr. Kade Pharma, Deutschland) oder als Vaginalgel 8%-ig (**Crinone**[®], Merck-Serono, Deutschland) verabreicht. HCG wurde in Form von Ampullen i.m. **Predalon**[®] (Organon, Deutschland) oder s.c. **Pregnesin**[®] (Serono, Deutschland; seit 2004 nicht mehr auf dem Markt) appliziert. Die Progesterongabe erfolgte ab 1. Tag nach Ovulation oder ab dem Tag der Follikelpunktion für ca. 15-16 Tage. Wurde durch einen hCG-Test im Blut eine biochemische Schwangerschaft festgestellt, erfolgte der Lutealphasensupport mit Progesteron bis zur 8. Schwangerschaftswoche [25, 85, 86].

3.19 Zyklusausgang

Eine Schwangerschaft wurde definiert mit dem sonographischen Nachweis von mindestens einer intrauterinen Fruchthöhle 3 - 4 Wochen nach der ICSI-Therapie [87, 88, 89]. Beim Nachweis einer extrauterinen Gravidität wurde diese als Schwangerschaft gezählt und gesondert vermerkt. Biochemische Schwangerschaften wurden in diese Studie nicht aufgenommen. Der weitere Schwangerschaftsverlauf wurde durch Feststellung einer positiven Herzaktion des Embryos in der 5.- 6. Schwangerschaftswoche kontrolliert. In der verbleibenden Zeit bis zur Geburt erfolgte die Betreuung der Patientinnen durch ihren „Heimatgynäkologen“. Der Schwangerschaftsausgang wurde, wenn möglich, für jede Patientin erfragt und dokumentiert. Als Parameter wurden das Geburtsgewicht, die Größe des Kindes, die Schwangerschaftswoche und die Angabe von Mehrlingen erfasst. Im Falle eines spontanen oder induzierten Abortes wurde die Woche des Abgangs notiert und in Frühabort (<12. Schwangerschaftswoche) und Spätabort (12.–24. Schwangerschaftswoche) unterteilt. Eventuelle Fehlbildungen wurden erfragt und dokumentiert.