

Aus der Frauenklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. J. Dietl

**Interleukin-1 beta in Follikelflüssigkeit und Embryo-Kulturmedium und  
dessen Zusammenhang mit der Entwicklung menschlicher  
Präimplantationsembryonen bei der künstlichen Befruchtung**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Theresa Hofmann  
aus Bamberg

Würzburg, Februar 2006

**Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Ursula Zollner**

**Koreferent: Prof. Dr. med. Tiemo Grimm**

**Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2006**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

**Für Thorsten, meine Eltern und meine Schwester Juliane**

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Abkürzungen**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Ovarstimulation und Zykluskontrolle</b>	<b>8</b>
<b>2.3</b>	<b>Follikelpunktion</b>	<b>9</b>
<b>2.4</b>	<b>Ejakulatanalyse und Spermienpräparation</b>	<b>10</b>
2.4.1	Ejakulatuntersuchung	10
2.4.1.1	pH-Wert	11
2.4.1.2	Volumen	11
2.4.1.3	Konzentration	11
2.4.1.4	Gesamtzahl der Spermien	11
2.4.1.5	Leukozyten und Rundzellen	11
2.4.1.6	Bakterien und Detritus	12
2.4.1.7	Motilität a+b	12
2.4.1.8	Vitalität	12
2.4.1.9	Morphologie	12
2.4.2	Spermienpräparation mit Hilfe des swim-up-Verfahrens	14
<b>2.5</b>	<b>Eizellkultur und Insemination oder Intrazytoplasmatische Spermieninjektion</b>	<b>15</b>
<b>2.6</b>	<b>Fertilisationskontrolle und Zygotenbeurteilung</b>	<b>16</b>
<b>2.7</b>	<b>Embryokultur und Embryonenbeurteilung</b>	<b>18</b>
<b>2.8</b>	<b>Blastozystenkultur und Blastozystenbeurteilung</b>	<b>19</b>
<b>2.9</b>	<b>Embryotransfer</b>	<b>21</b>
<b>2.10</b>	<b>Lutealphasenstützung und Schwangerschaftsnachweis</b>	<b>21</b>
<b>2.11</b>	<b>Zytokin- und Hormonmessungen</b>	<b>23</b>

2.11.1	Lagerung und Vorbereitung der Proben	23
2.11.2	Enzymimmunologische Bestimmung von IL-1beta in Follikelflüssigkeit und Kulturmedien	23
2.11.2.1	Testprinzip	23
2.11.2.2	Reagenzien und Materialien	24
2.11.2.3	Praktische Durchführung	24
2.11.3	Hormonbestimmungen in der Follikelflüssigkeit unter Anwendung der Chemilumineszenz-Methode	27
2.11.3.1	Östradiol-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit	27
2.11.3.1.1	Testprinzip	27
2.11.3.1.2	Reagenzien und Materialien	27
2.11.3.1.3	Praktische Durchführung	28
2.11.3.2	Progesteron-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit	28
2.11.3.2.1	Testprinzip	28
2.11.3.2.2	Reagenzien und Materialien	29
2.11.3.2.3	Praktische Durchführung	29
2.11.3.3	LH-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit	29
2.11.3.3.1	Testprinzip	30
2.11.3.3.2	Reagenzien und Materialien	30
2.11.3.3.3	Praktische Durchführung	30
2.11.3.4	FSH-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit	31
2.11.3.4.1	Testprinzip	31
2.11.3.4.2	Reagenzien und Materialien	31
2.11.3.4.3	Praktische Durchführung	31
<b>2.12</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>32</b>
	<b>Bildbeilage</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Fertilisationsdaten</b>	<b>41</b>

<b>3.2</b>	<b>Zygoten-, Embryo- und Blastozystenbeurteilung</b>	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>Zahl der transferierten Embryonen und Schwangerschaftsrate</b>	<b>48</b>
<b>3.4</b>	<b>Interleukin-1 beta in der Follikelflüssigkeit</b>	<b>50</b>
3.4.1	Interleukin-1 beta-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit	50
3.4.2	Korrelation mit der Zyklusform und der IVF- oder ICSI-Behandlung	51
3.4.3	Korrelation mit den Indikationen zur Kinderwunschbehandlung	53
3.4.4	Korrelation von Interleukin-1 beta mit den Fertilisationsdaten	55
3.4.5	Korrelation von Interleukin-1 beta mit der Embryomorphologie	59
3.4.5.1	Korrelation mit der Zygotenqualität	59
3.4.5.2	Korrelation mit der Embryoqualität am dritten Kulturtag	60
3.4.5.3	Korrelation mit der Blastozystenmorphologie am fünften Kulturtag	62
3.4.6	Korrelation von Interleukin-1 beta mit den Schwangerschaftsdaten	66
<b>3.5</b>	<b>Steroide und Gonadotropine in der Follikelflüssigkeit</b>	<b>68</b>
3.5.1	Konzentrationen von Östradiol, Progesteron, FSH und LH in der Follikelflüssigkeit	68
3.5.2	Korrelation mit der Zyklusform und dem Stimulationsprotokoll	69
3.5.3	Korrelation mit den Fertilisationsdaten	72
3.5.4	Korrelation mit der Embryomorphologie	73
3.5.5	Korrelation mit den Schwangerschaftsdaten	75
<b>3.6</b>	<b>Korrelation zwischen Interleukin-1beta- und Hormonwerten in der Follikelflüssigkeit</b>	<b>76</b>
<b>3.7</b>	<b>Interleukin-1 beta im Embryo-Kulturmedium : 3. Kulturtag</b>	<b>77</b>
3.7.1	Interleukin-1 beta-Konzentrationen im Tag 3-Medium	77
3.7.2	Korrelation von Interleukin-1 beta-Werten im Kulturmedium mit der Embryomorphologie am Tag 3	78
3.7.3	Korrelation von Interleukin-1 beta im Tag 3-Medium mit der	79

	Schwangerschaftsrate	
<b>3.8</b>	<b>Interleukin-1 beta im Embryo-Kulturmedium : 5. Kulturtag</b>	<b>80</b>
3.8.1	Interleukin-1 beta-Konzentrationen im Tag 5-Medium	80
3.8.2	Korrelation von Interleukin-1 beta im Tag 5-Kulturmedium mit der Blastozystenmorphologie	81
3.8.3	Korrelation von Interleukin-1 beta im Tag 5-Medium mit der Schwangerschaftsrate	86
<b>3.9</b>	<b>Zusammenhang zwischen IL-1 beta-Werten im Tag 3- und im Tag 5-Kulturmedium</b>	<b>87</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1	IL-1 beta in der Follikelflüssigkeit und dessen Einfluß auf das IVF-/ICSI- Ergebniss	91
4.2	Einfluß von IL-1 beta auf die Konzentration von Steroiden und Gonadotropinen in der Follikelflüssigkeit	97
4.3	Zusammenhang zwischen dem IL-1-System und der Embryoentwicklung	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>108</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>

## **Anhang**

**Auszug aus dem Gesetz zum Schutz von Embryonen**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abkürzungen

CSF	Colony-stimulating-Faktor
EGF	Epidermal-growth-Faktor
EUG	Extrauterin gravidität
FF	Follikelflüssigkeit
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-CSF
GnRH	Gonadotropin-releasing-Hormon
HCG	humanes Choriongonadotropin
HLA	human leukocyte antigen
hMG	humanes Menopausengonadotropin
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGF-1	Insulin-like-growth-Faktor 1
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1R tl	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1R tII	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
I.E. /IU	internationale Einheiten/international units
IVF	In-vitro-Fertilisation
LH	luteinisierendes Hormon
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
M II	Metaphase II
NO	Stickoxid
PCOS	Syndrom der polyzystischen Ovarien
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PN	Pronucleus
rho	Korrelationskoeffizient der Spearman'schen Rangkorrelation
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha

## **1. Einleitung**

Seitdem vor mehr als 25 Jahren in England das erste Kind nach einer In-vitro-Fertilisation (IVF) geboren wurde (Steptoe und Edwards, 1978), hat die Reproduktionsmedizin immer mehr an Bedeutung gewonnen und sich zu einem eigenen Fachgebiet entwickelt. In den westlichen Industrienationen sind mehr als 10% aller Paare von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2003 mehr als 89.000 IVF-Behandlungen durchgeführt und 9197 Kinder nach künstlicher Befruchtung geboren (Deutsches IVF-Register [DIR], 2003). Aber nicht nur Techniken und Indikationen der assistierten Reproduktion haben sich stark gewandelt, auch die Erforschung des Fortpflanzungsprozesses auf molekularer Ebene hat in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse gebracht. Es wurde gezeigt, dass zwischen dem Immunsystem und dem Reproduktionssystem enge Verbindungen bestehen und nahezu alle bekannten Zytokine in den Fortpflanzungsprozess involviert sind.

Zytokine und Wachstumsfaktoren sind Polypeptide und dienen als Signalstoffe zur Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen. Es handelt sich um kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 100.000 Dalton, die an den Zielzellen an transmembranäre Rezeptoren binden und dort spezifische intrazelluläre Wirkungen ausüben. Zytokine wirken auf parakriner und autokriner Ebene, also im Gegensatz zu Hormonen auf kurzer Distanz. Primär wurden Zytokine als immunmodulatorische Proteine beschrieben, die an der Abwehr von Mikroorganismen, an Entzündungsreaktionen und der Elimination entarteter Zellen beteiligt sind. Im Laufe der Zeit wurde aber deutlich, dass Zytokine noch viele andere Prozesse im Körper, wie zum Beispiel Stoffwechselfvorgänge und die Hämatopoese beeinflussen. Im Reproduktionsprozess nehmen Zytokine einen besonderen Stellenwert ein, denn neben Zellwachstum und Zelldifferenzierung regulieren sie die Immunfunktion, und sind damit auch wichtig für die Duldung des semiallogenen Embryos im mütterlichen Organismus.

Interleukine bilden eine Untergruppe von Zytokinen und wurden primär als Stoffe beschrieben, die der Kommunikation zwischen Leukozyten dienen. Mittlerweile ist aber bekannt, dass Interleukine ihre Wirkung auch auf andere Zellen ausüben.

Interleukin-1 (IL-1) wurde 1972 erstmals von Géry und Waksman (Géry und Waksman, 1972) als „Lymphozyten-aktivierender Faktor“ beschrieben und 1979 in IL-1 umbenannt. IL-1 wird von vielen Körperzellen gebildet (B-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen) und liegt im Blut gesunder Menschen in Konzentrationen unter 60 pg/ml vor. Eine der Hauptwirkungen von IL-1 besteht in der Förderung von Entzündungsreaktionen. Es stimuliert Lymphozyten, wirkt neutrophil und kann Fieberschübe auslösen. Unter dem Einfluss von IL-1 werden in der Leber vermehrt Akute-Phase-Proteine gebildet und in der Hypophyse die ACTH-Ausschüttung stimuliert. IL-1 verstärkt auch die Prostaglandin-Synthese und die Freisetzung anderer Zytokine.

Das IL-1-System besteht aus zwei Liganden, dem IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie einem natürlichen Antagonisten, dem IL-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) (Dinarello, 1994). IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  kommen beim Menschen (March et al., 1985) und bei verschiedenen Säugetierarten vor (Lomedico et al., 1984; Nishida et al., 1988; Furutani et al., 1985, Howard et al., 1998). Zwischen den beiden Liganden beim Mensch und bei Mäusen besteht große strukturelle Ähnlichkeit (March et al., 1985).

Die Gene für alle Komponenten des IL-1-Systems finden sich beim Menschen auf Chromosom 2. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden zunächst als Vorläufer-Proteine synthetisiert, von denen dann mittels des *IL-1 converting enzyme* die reifen Proteine mit einer Größe von 17 kDa abgespalten werden (Cerreti et al., 1992). Auf Aminosäureebene besteht zwischen den beiden Agonisten nur eine Übereinstimmung von 26 %. Trotzdem üben IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die selben biologischen Wirkungen auf ihre Zielzellen aus (Dower et al., 1986).

Der physiologisch vorkommende Antagonist des IL-1-Systems, der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1 ra), ist ein glykosiliertes Protein von 22 kDa und wird von einer Vielzahl von Zellen gebildet. IL-1 ra bindet mit der selben Affinität an die IL-1-Rezeptoren wie die beiden Liganden (Arend und Guthridge, 2000) und

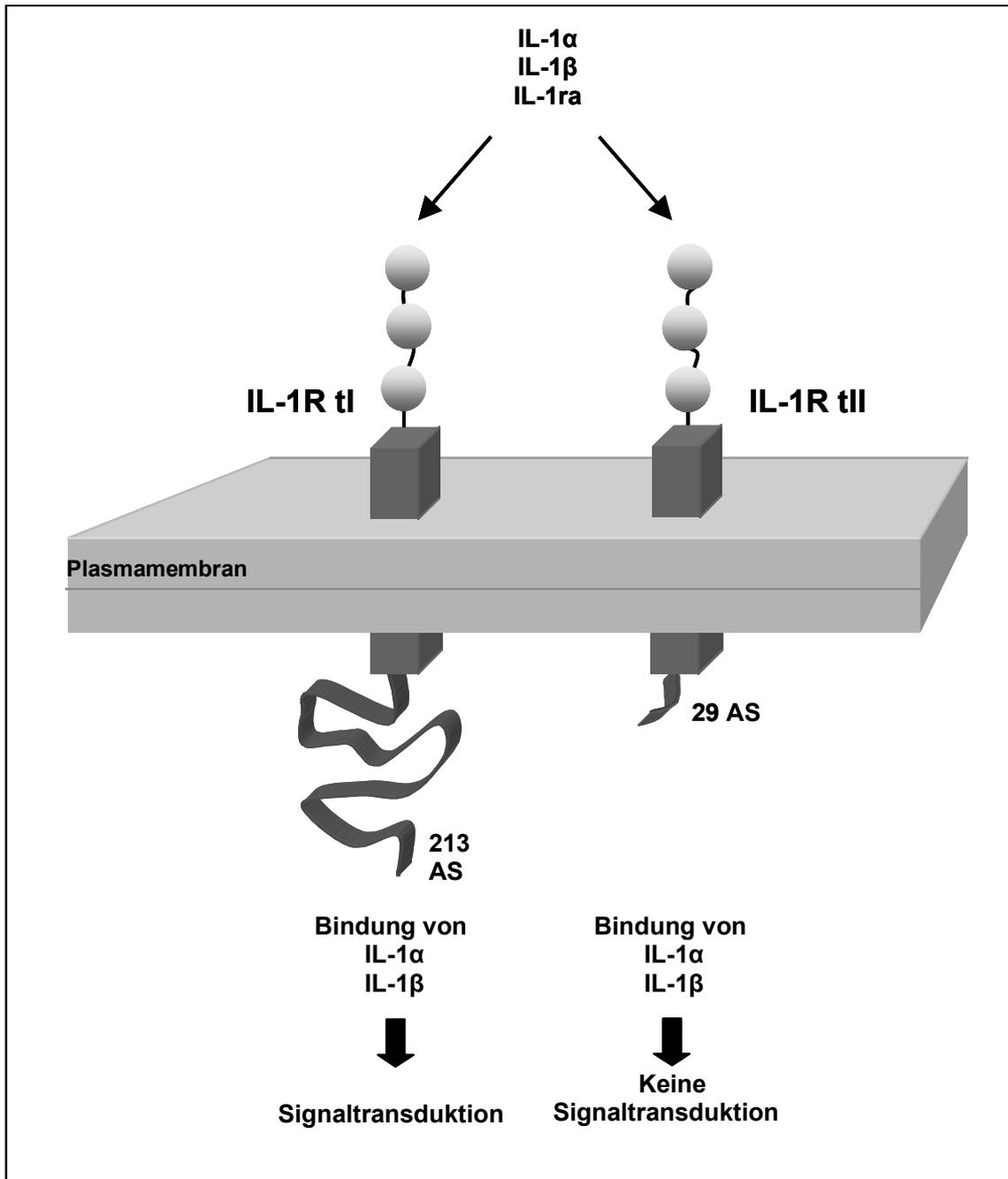
verhindert dort die Signaltransduktion (Hannum et al., 1990). Seine Hauptfunktion besteht also darin, die biologische Wirkung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu blockieren. IL-1ra kann schützend gegen IL-1-induzierte Krankheitsmanifestationen wirken und zum Beispiel die Schwere eines septischen Schocks abmildern (Ohlsson et al., 1990). Auch andere IL-1-vermittelte Reaktionen wie die Freisetzung von IL-6, die Produktion von Kortisol und die Auslösung einer Hypoglykämie können beim Menschen durch IL-1ra in vivo blockiert werden (Granowitz et al., 1992).

Es wurden zwei verschiedene Rezeptoren für IL-1 nachgewiesen (Abb. 1.1): der IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1R tI; Sims et al., 1988) und der IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1R tII; Horuk und McCubrey, 1989). Der Typ I Rezeptor befindet sich vor allem auf T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und fast allen anderen Körperzellen (Dower et al., 1990), der Typ II Rezeptor dagegen auf B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Knochenmarkzellen. Die extrazellulären Anteile der zwei Rezeptoren sind homolog und besitzen beide eine kurze transmembranäre Domäne (Martin und Falk, 1997). Der intrazelluläre Anteil des IL-1R tI besteht aus 213 Aminosäuren. Beim Typ II Rezeptor ist dieser mit nur 29 Aminosäuren deutlich kürzer (Dinarello, 1994). Auch funktionell unterscheiden sich beide Rezeptoren: zu einer Signaltransduktion kommt es nur dann, wenn IL-1 an den Typ I Rezeptor bindet, nicht dagegen bei einer Interaktion mit dem Typ II Rezeptor (Sims et al., 1993). Der IL-1R tII trägt daher am ehesten dazu bei, die Bioverfügbarkeit von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu regulieren und deren biologische Effekte zu reduzieren (Colotta et al., 1994; Dower et al., 1994). Symons et al. (1991) konnten zeigen, dass auch lösliche Rezeptorformen in verschiedenen Körperflüssigkeiten vorkommen.

Im Reproduktionstrakt nimmt das IL-1-System einen besonderen Stellenwert ein: es kommt dort in zahlreichen Zellen und Geweben vor und scheint an verschiedenen Fortpflanzungsprozessen maßgeblich beteiligt zu sein.

In ovariellern Gewebe wurde das komplette IL-1-System mit Liganden, Rezeptoren und Rezeptor-Antagonist nachgewiesen (Hurwitz et al., 1992).

Spätere Studien konnten Komponenten des IL-1-Systems in der Follikelflüssigkeit, in Cumuluszellen, Granulosa- und Thecazellen aufzeigen (Gérard



**Abb. 1.1:** Schemazeichnung der zwei verschiedenen IL-1-Rezeptoren: die extrazellulären und transmembranären Anteile sind homolog. Die intrazelluläre Domäne des IL-1 Rezeptor Typ I ist mit 213 Aminosäuren aber deutlich länger als die des IL-1 Rezeptor Typ II. Nur bei Bindung von IL-1 an den Rezeptor Typ I kommt es zu einer Signaltransduktion (modifiziert nach Krüssel, 2001).

et al., 2004). Außerhalb des Ovars induziert IL-1 $\beta$  die Prostaglandin-Synthese, fördert die Aktivierung von proteolytischen Enzymen wie Kollagenasen und Plasminogen-Aktivatoren, stimuliert die Glykosaminoglykanbildung und erhöht die Gefäßpermeabilität. Alle diese Phänomene kommen auch im Ovulationsprozess vor, dessen Ablauf dem einer Inflammationsreaktion ähnelt (Espey et al., 1994). Da IL-1 ein entzündungsförderndes Zytokin ist, liegt eine Beteiligung an der Ovulation nahe (Adashi et al., 1996 und Adashi et al., 1997). Diese Hypothese wird durch verschiedene Studien bestätigt: in menschlichen Granulosazellen stimuliert IL-1 $\beta$  in vitro die Prostaglandin E<sub>2</sub>- und Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> -Produktion (Watanabe et al., 1993) sowie die Expression von COX-2 mRNA (Narko et al., 1997). In Follikelflüssigkeit werden die NO-Produktion (Tao et al., 1997) und die Aktivität der Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1 und 2 (PAI-1, -2) unter dem Einfluß von IL-1 $\beta$  erhöht (Piquette et al., 1994). Auch an der Steroidsynthese scheint IL-1 beteiligt zu sein (Gérard et al., 2004). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Eizellreifung und Ovulation beim Menschen durch IL-1 beeinflusst wird.

Im menschlichen Endometrium kommt sowohl IL-1 $\beta$  (Kauma et al., 1990) als auch der IL-1 Rezeptor Typ I vor (Simón et al., 1993), wobei dessen Expression in der Lutealphase ein Maximum erreicht. Für die Entstehung einer intakten Schwangerschaft müssen zwei Hauptbedingungen erfüllt sein: zum Einen muss der Embryo während seiner Wanderung durch den Eileiter verschiedene Reifungsschritte durchlaufen und zum Anderen muss das Endometrium für die Anheftung und die Implantation der Blastozyste „empfänglich“ sein. Diese beiden Voraussetzungen müssen zeitlich koordiniert werden und erfordern eine Interaktion zwischen Embryo und mütterlichem Gewebe. Es ist bekannt, dass die Kommunikation zwischen Embryo und Endometrium zumindest zum Teil durch Zytokine und Wachstumsfaktoren gesteuert wird (Chard, 1996; Tazuke et al., 1996). Simón et al. (1994b) fanden Hinweise, dass das IL-1-System an einer solchen autokrin-parakrinen Regulation zwischen Embryo und Uterusschleimhaut beteiligt ist. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass IL-1 $\beta$  eine wichtige Rolle für die embryonale Implantation spielt. Der entscheidende Hinweis dafür gelang ebenfalls Simón et al. (1994a): die Blockade

endometrialer IL-1-Rezeptoren durch IL-1ra verhindert bei Mäusen die Implantation von Blastozysten.

Vor Jahren wurde festgestellt, dass sich bei der In-vitro-Fertilisation Embryonen in Kultur besser in kleinen als in großen Tropfen entwickeln (Biggers, 1971; Paria et al., 1990). Dies war bereits ein Hinweis, dass Embryonen durch para- und autokrine Faktoren die Beschaffenheit ihres eigenen Mediums beeinflussen können. Mittlerweile ist bekannt, dass menschliche Präimplantationsembryonen bereits ab dem 4-Zell-Stadium zur IL-1 $\beta$ -Produktion fähig sind. IL-1 $\beta$  wurde sowohl im Kulturmedium gefunden (Zolti et al., 1991) als auch mittels immunhistochemischer Untersuchungen (De los Santos et al., 1996) und PCR (Krüssel et al., 1998a und b) direkt in den Embryonalzellen nachgewiesen.

Ziel dieser Arbeit ist, die IL-1 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit von IVF- und ICSI-Patientinnen zu bestimmen und einen möglichen Zusammenhang mit der Fertilisationsrate, der Embryomorphologie sowie der Schwangerschaftsrate zu überprüfen. Neben IL-1 $\beta$  werden die Gonadotropine FSH und LH sowie Östradiol und Progesteron in der Follikelflüssigkeit gemessen. Desweiteren soll durch die Messung von IL-1 $\beta$  im Kulturmedium am Tag 3 und 5 nach Befruchtung dessen Einfluss auf die Entwicklung von Präimplantationsembryonen überprüft werden.

Ein besseres Verständnis für die komplexen Vorgänge während des Fortpflanzungsprozesses ist sowohl aus wissenschaftlicher Sicht für Reproduktionsmediziner und Embryologen, als auch aus praktischer Sicht für Paare mit unerfülltem Kinderwunsch und deren behandelnde Ärzte von Interesse. Inwieweit sich neue Erkenntnisse über den Einfluss von Zytokinen klinisch umsetzen lassen, ist noch ungeklärt. Denkbar wäre die Entwicklung neuer Stimulationsprotokolle und eine Verbesserung der Kulturbedingungen für die Embryonen, um die Schwangerschaftsraten nach assistierter Reproduktion zu erhöhen. Ob ein Zusatz von Zytokinen zu Kulturmedien zu einer besseren embryonalen Entwicklung führt, muss in weiteren Studien gezeigt werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

An dieser Untersuchung nahmen 256 Paare teil, die in der Zeit von Oktober 1999 bis Dezember 2000 das IVF/ICSI-Programm der Universitäts-Frauenklinik Würzburg durchliefen. In die Studie wurden nur Fälle eingeschlossen, bei denen im Rahmen der Follikelpunktion ausreichend Follikelflüssigkeit zur Zytokinmessung asserviert werden konnte. Alter und Indikation zur Kinderwunschbehandlung spielten als Einschlusskriterium keine Rolle. Auch Fälle ohne Embryotransfer oder ohne erfolgreiche Befruchtung wurden in die Untersuchung einbezogen.

Bei 160 Paaren (62,5 %) erfolgte die Durchführung der konventionellen IVF-Methode, bei 96 Paaren (37,5 %) wurde die ICSI-Methode angewandt.

Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 33 (23-42) Jahre, das der Ehemänner 35 (26-56) Jahre.

Die durchschnittliche Dauer der Kinderlosigkeit lag bei 4,0 Jahren.

Die Teilnahme am IVF/ICSI-Programm erfolgte aufgrund folgender Indikationen:

- |                                       |                    |
|---------------------------------------|--------------------|
| • Tubenfaktor                         | 109 Paare (42,6 %) |
| • Endometriose                        | 40 Paare (15,6 %)  |
| • pathologischer Zyklus / PCOS        | 24 Paare (9,4 %)   |
| • leichte andrologische Subfertilität | 130 Paare (50,8 %) |
| • schwere andrologische Subfertilität | 114 Paare (44,5 %) |
| • idiopathische Subfertilität         | 26 Paare (10,2 %)  |
| • Sonstiges                           | 15 Paare (5,9 %)   |

Normale Zyklen fanden sich bei 89,8 % der Patientinnen, bei 1,6 % lag eine Polymenorrhoe, bei 6,3 % eine Oligomenorrhoe und bei 1,6 % eine Amenorrhoe vor.

13,3 % der Patientinnen litten unter Hyperandrogenämie bzw. Hirsutismus. Bei 120 Paaren (46,9 %) wurde der erste IVF/ICSI-Versuch durchgeführt, bei 73 Paaren (28,5 %) der zweite, bei 36 Paaren (14,1 %) der dritte und bei 27 Paaren (10,5 %) waren es vier oder mehr IVF/ICSI-Zyklen.

## **2.2. Ovarstimulation und Zykluskontrolle**

Die Ovarstimulation erfolgte in den meisten Fällen nach dem „long protocol“ in Form einer FSH- oder hMG-Stimulation in Kombination mit GnRH-Agonisten: Mit Beginn am 20. bis 22. Tag des vorausgehenden Zyklus wurde eine Vorbehandlung mit einem GnRH-Agonisten durchgeführt, um eine hypophysäre Downregulation zu erzielen. Hierzu wurde entweder Triptorelinacetat (Decapeptyl Gyn<sup>®</sup>, Ferring Arzneimittel, Kiel) intramuskulär als Depotpräparat oder Nafarelinacetat (Synarela<sup>®</sup>, Heumann, Nürnberg) intranasal in Form von 2 bis 4 Hüben pro Tag mit je 0,2 mg verabreicht.

Die Ovarstimulation mit dem Ziel der Erzeugung eines polyfollikulären Wachstums erfolgte ab dem 3. Zyklustag mit 2 bis 4 Ampullen FSH oder hMG pro Tag. Die verwendeten FSH-Präparate (Follitropin  $\alpha$ , Gonal F<sup>®</sup>, Serono, Unterschleißheim oder Follitropin  $\beta$ , Puregon<sup>®</sup>, Organon, Oberschleißheim) enthielten 75 I.E. FSH pro Ampulle, die verwendeten hMG-Präparate (Meno-gon<sup>®</sup>, Ferring Arzneimittel, Kiel oder Pergonal<sup>®</sup>, Serono, Unterschleißheim) bestanden aus 75 I.E. FSH und 75 I.E. LH pro Ampulle. Je nach Ansprechen der Patientinnen auf die Stimulationsbehandlung (Follikelreifung und Estradiol-Anstieg im Serum) wurde die Dosis auf bis zu 4 Ampullen pro Tag erhöht. Pro Patientin wurden im Durchschnitt 27 Ampullen FSH oder hMG pro Zyklus verbraucht. Die durchschnittliche Stimulationsdauer betrug 12 Tage.

Das Zyklusmonitoring mit Blutentnahmen zur Estradiol-Bestimmung und Ultraschalluntersuchungen zur Follikulometrie begann am 6. Zyklustag und wurde dann in regelmäßigen 2 bis 3-tägigen Abständen durchgeführt.

Am Abend des Tages, an dem der Leitfollikel einen Durchmesser von 18 mm erreichte und nach einem kontinuierlichem Anstieg des Serumestradiols

während der vorausgegangenen 6 bis 7 Tage, wurden 10 000 I.E. hCG (Pregnesin<sup>®</sup>, Serono, Unterschleißheim) zur Ovulationsinduktion subkutan verabreicht.

In 0,8 % der Fälle erfolgte die hypophysäre Downregulation mittels eines GnRH-Antagonisten.

### **2.3 Follikelpunktion**

Die sonographisch gesteuerte transvaginale Eizellentnahme erfolgte 34 bis 36 Stunden nach hCG-Applikation. Die Punktion muss vor der erwarteten Ovulation der Eizellen aus den Follikeln durchgeführt werden, da die Oozyten sonst nicht mehr gewonnen werden können. Bei zu früher Follikelpunktion besteht andererseits die Gefahr, dass die noch unreifen Oozyten zu fest an der Follikelwand haften und nicht gelöst werden können.

Die Eizellentnahme erfolgte mit Hilfe einer Punktionsautomatik mit konstanter Warmhaltung der abpunktierten Flüssigkeit.

Die für die Zytokin- und Hormonmessungen verwendete Follikelflüssigkeit stammte aus dem ersten aufgesuchten, dominanten Follikel. Dieser wurde getrennt und ohne Spülvorgang punktiert.

Im IVF-Labor wurde die enthaltene Eizelle abpipetiert und die Follikelflüssigkeit bei 1006 g für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände aus den Zentrifugenröhrchen wurden in 2ml-Kryogefäße mit Schraubverschluss gegeben und zunächst bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach drei bis fünf Tagen erfolgte die Umlagerung der Gefäße in die endgültige Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Alle weiteren Follikel wurden mit Hilfe der Punktionsautomatik abgesaugt und gespült.

Im IVF-Labor wurde die restliche abpunktierte Flüssigkeit in mehrere sterile Petrischalen gegeben und die Anzahl der gewonnenen Cumuluskomplexe lichtmikroskopisch überprüft.

## **2.4 Ejakulatanalyse und Spermienpräparation**

### **2.4.1 Ejakulatuntersuchung**

Nach einer sexuellen Karenzzeit von 2 bis 5 Tagen erfolgte die Ejakulatgewinnung durch Masturbation in ein steriles Plastikgefäß.

Die Standard ejakulatparameter wurden nach den Richtlinien der WHO von 1999 bestimmt. Es wurden sowohl die Nativejakulate als auch die aufgearbeiteten Proben untersucht.

Nach den WHO-Kriterien von 1999 galten für die Ejakulatparameter folgende Normalwerte:

- **Volumen:** 2,0 ml oder mehr
- **pH:** 7,2 oder mehr
- **Spermien-Konzentration:**  $20 \times 10^6/\text{ml}$  oder mehr
- **Gesamt-Spermien-Zahl:**  $40 \times 10^6$  pro Ejakulat oder mehr
- **Motilität:**  $\geq 50 \%$  mit Vorwärtsbeweglichkeit (d.h. Kategorien „a“ und „b“) oder  $\geq 25 \%$  mit schneller linearer Beweglichkeit (d.h. Kategorie „a“ innerhalb von 60 Minuten nach Probengewinnung)
- **Morphologie:**  $\geq 15 \%$  mit normaler Form \*
- **Anteil der lebenden Spermien:**  $\geq 75 \%$  vitale Zellen, d.h. Zellen ohne Farbstoffaufnahme
- **Leukozyten:** weniger als  $1 \times 10^6/\text{ml}$

\* Im Laborhandbuch von 1999 wird kein direkter Grenzwert für die normale Morphologie genannt. Die WHO weist darauf hin, dass in verschiedenen Studien Werte von weniger als 15% normal geformten Spermien mit einer Abnahme der Befruchtungsrate einhergingen.

Nach Liquefizierung der Ejakulatproben bei Raumtemperatur erfolgte die Analyse folgender Parameter:

#### 2.4.1.1 pH-Wert

Ein Ejakulattropfen wurde auf pH-Indikatopapier aufgetropft und der Farbumschlag mit dem zugehörigen Teststreifen verglichen.

#### 2.4.1.2 Volumen

Das Volumen der Ejakulatproben wurde mittels einer 10-ml-Pipette bestimmt. Die Angabe erfolgte in Milliliter.

#### 2.4.1.3 Konzentration

Die Zählung der Spermien erfolgte mit Hilfe eines Neubauer-improved-Hämozytometers in 10  $\mu$ l der verdünnten Ejakulatprobe. Je nach Spermiedichte wurden 5 bis 25 große Quadrate im Phasenkontrastmikroskop bei 500-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden nur Spermatozoen, also morphologisch ausgereifte Keimzellen mit Schwanz, mitgezählt.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnete sich die Spermienkonzentration in Mio./ml.

#### 2.4.1.4 Gesamtzahl der Spermien

Die Menge der in der Ejakulatprobe enthaltenen Spermien berechnete sich durch Multiplikation des Volumens (ml) mit der Konzentration (Mio./ml)

#### 2.4.1.5 Leukozyten und Rundzellen

Die Konzentration anderer zellulärer Elemente wurde bei Auszählung der Spermien in der Zählkammer mitbestimmt und in Mio./ml angegeben.

Es handelt sich unter Anderem um Leukozyten, Epitheloidzellen aus dem Urogenitaltrakt und Spermatogonien. Diese Zellen werden kollektiv als Rundzellen bezeichnet.

#### 2.4.1.6 Bakterien und Detritus

Bei 500-facher Vergrößerung wurde der Gehalt von Bakterien und Detritus grob abgeschätzt und nach einem Vier-Punkte-System bewertet: 0-1-2-3.

#### 2.4.1.7 Motilität a+b

Zur Motilitätsevaluierung wurde ein Tropfen der Ejakulatprobe im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die Bewertung basierte auf folgenden Kriterien:

- a, schnelle progressive Beweglichkeit
- b, langsame oder träge progressive Beweglichkeit
- c, nicht progressive Beweglichkeit
- d, Immotilität

Nach der Beurteilung von 100 aufeinander folgenden Spermien wurde der Prozentsatz von Spermien mit einer Motilität der Kategorie a-d in Prozent berechnet. Die Summe der progressiv motilen Spermien (a+b) wurde dabei gesondert angegeben.

#### 2.4.1.8 Vitalität

Mit Hilfe einer Vitalfärbung (0,5 %ige Eosin-Lösung in 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung) konnte zwischen lebensfähigen immotilen und toten Spermien unterschieden werden. Aufgrund geschädigter Plasmamembranen färben sich tote Spermien selektiv an. Der Anteil lebensfähiger, also nicht angefarbter Spermien wurde ausgezählt und in Prozent angegeben.

#### 2.4.1.9 Morphologie

Zur Beurteilung der Morphologie nach den WHO-Kriterien von 1999 erfolgte die Untersuchung von 100 Spermien im Phasenkontrastmikroskop bei 500-facher Vergrößerung. Der Prozentsatz normal geformter Spermatozoen wurde bestimmt, wobei alle Grenzformen als morphologisch abnormal klassifiziert wurden.

Die Untersuchung der Samenproben brachte folgende Ergebnisse:

- Normozoospermie: 21 Fälle (8,2 %)
- Oligozoospermie: 3 Fälle (1,2 %)
- Asthenozoospermie: 34 Fälle (13,3 %)
- Teratozoospermie: 4 Fälle (1,6 %)
- Oligoasthenozoospermie: 3 Fälle (1,2 %)
- Asthenoteratozoospermie: 50 Fälle (19,5 %)
- Oligoteratozoospermie: 4 Fälle (1,6 %)
- Oligoasthenoteratozoospermie: 84 Fälle (32,8 %)

Bei IVF-Zyklen lag die Spermienkonzentration im Durchschnitt bei 23 Mio./ml (2,5 - 30), die Motilität a+b bei 36 % (0 - 71), die Vitalität bei 70 % (4 - 88) und der Anteil morphologisch normaler Spermien bei 14 % (0 - 41).

Bei ICSI-Behandlungen war die Ejakulatqualität hinsichtlich Konzentration, Menge, Gehalt von Bakterien/Detritus, Motilität, Vitalität und Morphologie signifikant schlechter. Die durchschnittliche Spermienkonzentration betrug in diesen Fällen 5,0 Mio./ml (0 - 45), die Motilität a+b 21 % (0 - 72), die Vitalität 63 % (0 - 84) und der Prozentsatz normal geformter Spermien 8 % (0 - 41).

### **2.4.2 Spermienpräparation mit Hilfe des swim-up-Verfahrens**

Nach der Untersuchung der Nativejakulate wurden diese mittels Pure Sperm Kissen-Zentrifugation aufgereinigt und durch eine konventionelle swim-up-Methode aufbereitet. Diese Präparationstechnik basiert auf der Spermienmotilität und lässt progressiv bewegliche Spermien aus dem aufgereinigten Pellet in eine darüberliegende Schicht aus Kulturmedium wandern, um anschließend zu pelletieren und zu waschen.

Zur Vorbereitung des eigentlichen swim-up-Verfahrens wurden die Pellets auf 2 Spitzbodenröhrchen verteilt und mit Kulturmedium verdünnt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 62 g für 5 Minuten.

Die Niederschläge („Pellets“) der letzten Zentrifugation wurden nun für das eigentliche swim-up-Verfahren verwendet, das sich in drei Schritte gliederte:

1. Erneutes Überschichten mit 1,0 ml Kulturmedium.
2. Inkubation für 20 Minuten bei 37°, wobei die Röhrchen in einem Winkel von 45° zur Horizontalen aufgestellt wurden.
3. Gewinnung der motilen Spermien durch wiederholt vorsichtiges Abheben des Überstandes.

Nach einer letzten Zentrifugation bei 62 g über 3 Minuten wurden die gewonnenen Pellets in 0,25-0,5 ml Kulturmedium resuspendiert.

## **2.5 Eizellkultur, Insemination und Intrazytoplasmatische Spermieninjektion**

Für die Eizellkultur wurde IVF-Medium (Scandinavian IVF, Göteborg, Schweden) verwendet. Die Cumuluskomplexe wurden für eine Präinkubationszeit von 4 Stunden bei 37° in 5 % CO<sub>2</sub> bei einem pH-Wert von 7,4 kultiviert.

Wurde eine konventionelle In-vitro-Fertilisation (IVF) durchgeführt, so erfolgte die Insemination durch Zugabe von 40.000 bis 80.000 motilen Spermien in das die Oozyte umgebende Medium.

Bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), die bei der schweren männlichen Subfertilität zur Anwendung kommt, wird dagegen nur ein Spermium direkt in das Ooplasma der Eizelle eingebracht. Zur Denudation der Cumulus-Oozyten-Komplexe wurde der Cumulus oophorus mechanisch und enzymatisch in gepufferter Lösung mit verdünnter Hyaluronidase entfernt. Nach mehrmaligem Waschen in Kulturmedium wurde die Corona radiata mechanisch durch Auf- und Abpipettieren abgelöst und die Oozyten in neues Medium überführt.

Danach erfolgte die Beurteilung des Reifezustands der Eizellen bei 200-facher Vergrößerung unter dem Inversionsmikroskop. Für die ICSI wurden nur Oozyten in der Metaphase II ausgewählt, die durch die Ausstoßung des ersten Polkörperchens erkennbar sind.

Die Spermieninjektion erfolgte am Inversionsmikroskop mit beheizten Arbeitsflächen bei 37°C. Die Eizellen mit Kulturmedium und die Spermien mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) befanden sich in kleinen Petrischalen in Tropfen unter Öl. Das PVP verlangsamt die Eigenbeweglichkeit der Spermien und erleichtert somit deren Aufsuchen und Immobilisation.

Nach Auswahl eines möglichst vitalen Spermiums mit normaler Morphologie wurde dieses mit der Injektionskapillare mechanisch immobilisiert und mit dem Schwanz voraus in das vordere Drittel der Kapillare aufgezogen.

Nach Fixierung der jeweiligen MII-Oozyte mit der Haltekapillare wurde der Polkörper auf 6- oder 12-Uhr-Position gebracht und das Spermium dann in der äquatorialen Ebene der Eizelle vorsichtig in das Zytoplasma injiziert.

Nach der Injektion folgten mehrmaliges Waschen der Oozyten, die Überführung in frisches Kulturmedium (IVF 50, Scandinavian IVF) und die Weiterkultivierung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

## **2.6 Fertilisationskontrolle und Zygotenbeurteilung**

14 bis 18 Stunden nach der Insemination bzw. intrazytoplasmatischen Spermieninjektion erfolgte die Fertilisationskontrolle mit dem Nachweis von Vorkernen als Zeichen der eingetretenen Befruchtung.

Bei IVF-Zyklen wurden zuerst verbliebene Cumulus oophorus- und Corona radiata-Zellen von den Oozyten entfernt, um eine sichere Beurteilung der Vorkerne zu ermöglichen. Dann wurde jede Zygote einzeln in einen Mikrotropfen (5-10 µl) mit IVF-Medium in eine Petrischale gegeben. Am Inversmikroskop wurden die Zygoten bei 400-facher Vergrößerung nach dem von Zollner et al. (2002, siehe Tabelle 2.6.1) entwickelten Zygoten-Score beurteilt. Folgende morphologische Kriterien wurden geprüft und mit 1-4 bewertet:

Anzahl und Position der Pronuclei, Größe der Pronuclei, Halo-Effekt, Anzahl und Position der Nucleoli getrennt für jeden Pronucleus, Vorhandensein von Vakuolen und Erscheinungsbild des Ooplasmas.

Tabelle I zeigt das Beurteilungsschema des Zygoten-Scores, der durch Addition der Werte für die einzelnen Parameter berechnet wird. Der bestmögliche Score beträgt hierbei 10, der schlechteste 31 für Zygoten mit 2 PN und 37 für Zygoten mit 1 PN. Vorkernstadien mit mehr als 2 Pronuclei wurden verworfen.

Je nach individuellem Fall wurden bis zu 3 Zygoten mit den niedrigsten Pronucleus (PN)-Scores ausgewählt und weiterkultiviert. Überzählige Vorkernstadien wurden je nach Wunsch und mit schriftlichem Einverständnis des betreffenden Paares kryokonserviert oder verworfen.

Der mittlere PN-Score errechnete sich aus der Summe der PN-Scores der zur Weiterkultivierung ausgewählten Zygoten geteilt durch deren Anzahl.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Anzahl der Pronuclei</b>	2 PN	-	-	1 PN
<b>Position der Pronuclei</b>	eng zusammen	nahe beieinander	getrennt	nur ein Pronucleus
<b>Größe der Pronuclei</b>	gleich groß	ungleich groß	-	nur ein Pronucleus
<b>Halo Effekt</b>	normal	leicht	extrem	kein Halo Effekt
<b>Position der Nucleoli im PN 1</b>	Reihe	beginnende Reihe	verstreut	keine Nucleoli oder kein Pronucleus
<b>Position der Nucleoli im PN 2</b>	Reihe	beginnende Reihe	verstreut	keine Nucleoli oder kein Pronucleus
<b>Zahl der Nucleoli im PN 1</b>	3-5	> 5	< 3	keine Nucleoli oder kein Pronucleus
<b>Zahl der Nucleoli im PN 2</b>	3-5	> 5	< 3	keine Nucleoli oder kein Pronucleus
<b>Vorhandensein von Vakuolen</b>	keine Vakuolen	schwach vakuolisiert	stark vakuolisiert	-
<b>Erscheinungsbild des Ooplasmas</b>	homogen granuliert	stark granuliert	-	-

Tabelle 2.6.1: Zygoten-Score nach Zollner et al. (2002).

## **2.7 Embryokultur und Embryonenbeurteilung**

Nach der Fertilisationskontrolle wurden die maximal drei ausgewählten Zygoten für weitere 48 Stunden in G1.2<sup>TM</sup>-Medium (Scandinavian IVF) in Mikrotropfen unter Öl kultiviert.

Am Tag 3 erfolgte dann die Beurteilung der Embryonen-Entwicklung anhand des Embryo-Scores nach Steer et al. (1992):

Der morphologische Grad der Embryonen wird dabei nach folgendem Schema beurteilt:

- Grad 4: gleich große, symmetrische Blastomeren
- Grad 3: verschieden große Blastomeren mit < 10 % Fragmentation
- Grad 2: 10-50 % Fragmentation der Blastomeren
- Grad 1: > 50 % Fragmentation der Blastomeren

Der Embryo-Score nach Steer errechnete sich durch Multiplikation des morphologischen Grades mit der Anzahl der Blastomeren des jeweiligen Embryos. Der kumulative Embryo-Score entsprach der Summe der Scores der kultivierten und transferierten Embryonen. Der kumulative Embryo-Score geteilt durch die Anzahl der transferierten Embryonen ergab den mittleren kumulativen Embryo-Score.

Bestanden die Embryonen am Tag 3 aus mindestens sechs Blastomeren, so wurden sie zur weiteren Kultivierung in G2.2<sup>TM</sup>-Medium (Scandinavian IVF) überführt. Embryonen mit weniger als sechs Blastomeren verblieben für nochmals vier Stunden in G1.2<sup>TM</sup>-Medium, wurden erneut kontrolliert und nach Erreichen des 6-Zell-Stadiums in G2.2<sup>TM</sup>-Medium umgesetzt.

Die Überstände des G1.2<sup>TM</sup>-Mediums vom Tag 3 wurden in 2ml-Kryogefäße pipettiert, um sie für eine spätere Zytokinmessung zu verwenden. Nach drei bis fünf Tagen Zwischenlagerung bei -20°C wurden die Proben bis zu den Messungen bei -80°C aufbewahrt. Es konnte jedoch nicht bei allen Patientinnen ausreichend Material asserviert werden, so dass teilweise keine Messungen möglich waren.

## **2.8 Blastozystenkultur und Blastozystenbeurteilung**

Nach der Embryo beurteilung verblieben die Embryonen für weitere zwei Tage in G2.2<sup>TM</sup>-Medium. Die Entwicklung solcher komplexer Medien ermöglicht die Kultivierung der Embryonen bis zum Stadium der Blastozyste (Tag 5 bis 6). Durch die verlängerte Kultur kann der natürliche Ablauf der Konzeption und Implantation imitiert werden, da sich der Embryo auch unter natürlichen Bedingungen bis zum Tag 4 oder 5 in der Tube befindet und erst dann die Implantation ins Endometrium stattfindet.

Am Tag 5 erfolgte die Blastozystenbeurteilung in Anlehnung an Bongso (1999) nach morphologischen Kriterien und der Entwicklungsgeschwindigkeit (siehe auch Tabelle 2.8.1):

- 1 = voll expandierte Blastozyste
- 2 = expandierende Blastozyste
- 3 = frühe Blastozyste
- 4 = spät kavitierender Embryo mit > 50 % Blastocoel
- 5 = früh kavitierender Embryo mit < 50 % Blastocoel
- 6 = kompaktierter Embryo
- 7 = kompaktierender Embryo
- 8 = arretierter Embryo

Die mittlere Blastozystenbeurteilung entsprach der Summe der einzelnen Blastozystengrade geteilt durch die Anzahl der beurteilten und transferierten Blastozysten bzw. Embryonen.

Nach Beendigung der Kultur wurden die Überstände von G2.2<sup>TM</sup>-Kulturmedien für eine spätere Zytokinmessung aufbewahrt, sofern ausreichend Material vorhanden war.

Die Lagerung der Proben erfolgte wie bei den Überständen des G1.2<sup>TM</sup>-Mediums.

Tag	Stadium	Beschreibung
2	Furchung	2- bis 8-Zeller
3	Furchung kompaktierender Embryo	6- bis 10-Zeller beginnende Fusion der Blastomeren
4	kompaktierender Embryo früh kavitierender Embryo	Blastomeren fusioniert Blastozoeel füllt weniger als die Hälfte des Embryos aus
5	spät kavitierender Embryo  frühe Blastozyste  expandierende Blastozyste	Blastozoeel füllt mehr als die Hälfte des Embryos aus Blastozoeel füllt den Embryo aus innere Zellmasse und Trophektoderm erkennbar Größenzunahme, Ausdünnung der Zona pellucida
6	expandierte Blastozyste schlüpfende Blastozyste  geschlüpfte Blastozyste	dünne Zona pellucida Beginn des Schlüpfens des Trophektoderms durch die Zona pellucida leere Zona pellucida

**Tab. 2.8.1:** Normale embryonale Entwicklung in vitro bis zum Stadium der Blastozyste (Tag 0 = Tag der Eizellentnahme) nach Steck (2001).

## **2.9 Embryotransfer**

Wie im derzeit geltenden Gesetz zum Schutz von Embryonen festgelegt, wurden pro Zyklus höchstens 3 Embryonen übertragen. Der Embryotransfer wurde ambulant durchgeführt. Bei 193 Paaren (75,3 %) erfolgte der Transfer am fünften Tag nach Insemination bzw. Injektion, bei 14 Paaren (5,5 %) bereits nach drei und bei 15 Paaren (5,9 %) nach vier Tagen Kulturdauer. In 34 Fällen (13,2 %) konnte aufgrund Mangel gewonnener Eizellen, fehlender Fertilisation oder anderen Gründen kein Embryotransfer stattfinden.

Die Embryonen wurden in der Drei-Tropfen-Technik mit 3-5 µl Kulturmedium in die Spitze eines weichen Katheters aufgenommen, wobei sich dahinter eine zweite Säule aus Medium befand und das Kathetersystem an eine 1,0 ml-Feindosierspritze angeschlossen war.

Nach Spiegeleinstellung und Abspülen des Muttermundes mit Medium wurde die äußere Führungshülse in den Zervikalkanal eingeführt und der Innenkatheter ins Uteruslumen vorgeschoben. Durch sanften Druck auf den Stempel der Spritze wurden die Embryonen entleert und ungefähr 1 cm unterhalb des Fundus platziert. Der Katheter wurde anschließend mit Kulturmedium gespült, um eventuell noch anhaftende Embryonen zu lösen, unter dem Mikroskop aufzufinden und gegebenenfalls erneut zu transferieren.

Nach einer kurzen Liegeruhe konnten die Patientinnen die Klinik verlassen.

## **2.10 Lutealphasenstützung und Schwangerschaftsnachweis**

Zur obligaten Lutealphasenstützung nach einem Embryotransfer wurde Progesteron in Form von Kapseln (Utrogest<sup>®</sup>, Kade/Besins, Berlin) oder in Form eines Gels (Crinone<sup>®</sup>, Serono, Unterschleißheim) vaginal appliziert. Die Behandlung begann am Tag nach der Eizellentnahme und dauerte 2 Wochen. Zusätzlich erfolgte bei den meisten Patientinnen eine einmalige Gabe von 5000 I.E. hCG 7 Tage nach Punktion.

14 Tage nach dem Embryotransfer wurde zum Schwangerschaftsnachweis eine quantitative hCG-Messung aus dem Serum der Patientinnen durchgeführt, da erst nach dieser Zeit von einer vollständigen Elimination des exogen zugeführten hCG's auszugehen ist. Ein Anstieg des Titers auf >100 IU/l zeigte einen positiven Schwangerschaftstest an.

Eine biochemische Schwangerschaft ist durch einen transitorischen hCG-Anstieg auf Werte >100 IU/l und einen anschließenden Abfall des Spiegels ohne sonographischen Befund gekennzeichnet.

hCG-Werte >100 IU/l mit sonographischem Nachweis einer Fruchthöhle sind Zeichen einer klinischen Schwangerschaft.

Die weitere geburtshilfliche Betreuung richtete sich nach den individuellen Wünschen und der Anamnese der Paare sowie dem Verlauf der Schwangerschaft.

## **2.11 Zytokin- und Hormonmessungen**

### **2.11.1 Lagerung und Vorbereitung der Proben**

Nach drei bis fünf Tagen Zwischenlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erfolgte die endgültige Aufbewahrung der Proben aus Follikelflüssigkeit und Kulturmedien bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Vor den Messungen wurden die Proben im Kühlschrank auf Eis langsam aufgetaut, um die empfindliche Struktur der Zytokine nicht zu zerstören. Einmal aufgetaute Proben wurden nicht wieder eingefroren.

### **2.11.2 Enzymimmunologische Bestimmung von IL-1 beta in Follikelflüssigkeit und Kulturmedien**

#### **2.11.2.1 Testprinzip**

IL-1 $\beta$  wurde mit dem Enzymimmunoassay Quantikine<sup>®</sup> (R&D Systems, Minneapolis, USA) nach dem Sandwich-Prinzip bestimmt.

Es werden Mikrotitrationsplatten verwendet, in deren Vertiefungen spezifische monoklonale Antikörper gegen IL-1 $\beta$  fixiert sind. Nach Zugabe von Standard und Patientenproben bindet vorhandenes IL-1 $\beta$  an die immobilisierten Antikörper. Ungebundene Substanzen werden nach einer festgelegten Inkubationszeit ausgewaschen.

Zur Detektion des gebundenen IL-1 $\beta$  werden in einem zweiten Reaktionsschritt zu den Proben Peroxidase-konjugierte polyklonale Antikörper gegen IL-1 $\beta$  gegeben, die an die freien Determinanten der immobilisierten Antigen-Antikörper-Komplexe binden. Nach Zugabe einer Lösung aus Wasserstoffperoxid und Chromogen erfolgt deren enzymatische Umsetzung durch die Peroxidase. Nach einer definierten Zeit wird die Enzymreaktion mit Hilfe von Schwefelsäure gestoppt. Die der Konzentration von IL-1 $\beta$  proportionale Farbintensität wird photometrisch gemessen.

### 2.11.2.2 Reagenzien und Materialien

#### Verwendete Reagenzien und Materialien:

- Eppendorfpipetten und Pipettenspitzen
- Multipette mit kleinem Waschbecken
- Rundbodenröhrchen aus Polystyrol 10 ml
- Destilliertes Wasser
- 500 ml-Zylinder
- Spektralphotometer, Messwellenlänge: 450 nm
- Quantikine<sup>®</sup> human IL-1 $\beta$  ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)

#### Zusammensetzung:

- IL-1 $\beta$  Mikrotitrationsplatte mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen IL-1 $\beta$
- Nachweisantikörper : polyklonale Antikörper gegen IL-1 $\beta$ , konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
- IL-1 $\beta$ -Standard: rekombinantes menschliches IL-1 $\beta$
- Proben-Verdünnung (RD1C) für Proben aus Follikelflüssigkeit
- Standard-Verdünnung (RD6C) für Proben aus Follikelflüssigkeit
- Standard-Verdünnung (RD5) für Proben aus Kulturmedium-Überständen
- Waschpuffer (Konzentrat)
- Farb-Reagenz A: Wasserstoffperoxid
- Farb-Reagenz B: chromogenes Substrat (Tetramethylbenzidin)
- Stop-Lösung: Schwefelsäure
- Selbstklebende Abdeckfolien für Platte

### 2.11.2.3 Praktische Durchführung

Sofern die mitgelieferten Reagenzien nicht gebrauchsfertig waren, erfolgte die Vorbereitung gemäss den Angaben des Herstellers:

20 ml des Waschpufferkonzentrats wurden in 480 ml destilliertem Wasser gelöst, um 500 ml Waschlösung zu erhalten.

Der mitgelieferte IL-1 $\beta$ -Standard wurde mit 5 ml der entsprechenden Standard-Verdünnung vermischt. Für Proben aus Follikelflüssigkeit verwendete man die Standard-Verdünnung RD6C, für Messungen aus Kulturmedien-Überständen die Verdünnung RD5. Die so hergestellte Standard-Lösung wies eine IL-1 $\beta$ -Konzentration von 250 pg/ml auf.

Nach 15 Minuten Reaktionszeit konnte mit der Erstellung einer Verdünnungsreihe begonnen werden. Zuerst wurden je 500  $\mu$ l der mitgelieferten Standardverdünnung in 6 Reagenzgläser pipettiert. Dann wurden 500  $\mu$ l der vorbereiteten IL-1 $\beta$ -Standard-Lösung (250 pg/ml) in das erste Reagenzglas der Verdünnungsreihe gegeben, um eine IL-1 $\beta$ -Konzentration von 125 pg/ml zu erzielen. Nach Durchmischung pipettierte man jeweils 500  $\mu$ l der neu entstandenen Lösung ins nächste Reagenzglas, um bei jedem Schritt eine Halbierung der IL-1 $\beta$ -Konzentration zu erreichen. Die vorbereitete Standard-Lösung diente als höchster Standard (250 pg/ml) und die mitgelieferte Standardverdünnung als Null-Standard (0 pg/ml).

Bei Bedarf wurden die Patientenproben mit den mitgelieferten Null-Standard-Verdünnungen für Follikelflüssigkeit oder Überstände aus Kulturmedium verdünnt.

- 1) Alle Messungen (Standardlösungen und Patientenproben) erfolgten als Doppelbestimmungen.
- 2) Bei Messung von IL-1 $\beta$  in Follikelflüssigkeit wurde in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte 50  $\mu$ l der Proben-Verdünnung gegeben.
- 3) Zur späteren Erstellung einer Standardkurve pipettierte man in die Vertiefungen A1/A2 bis H1/H2 je 200  $\mu$ l der Lösungen aus der Verdünnungsreihe. In die restlichen Vertiefungen wurden je 200  $\mu$ l der Patientenproben gegeben. Nach Abdecken der Platte mit selbstklebender Folie erfolgte eine Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- 4) Die Folie wurde entfernt, alle Vertiefungen abgesaugt und die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Durch vorsichtiges Ausklopfen über Zellstoff konnten verbliebene Reste des Waschpuffers entfernt werden.

- 5) In jede Vertiefung wurden 200 µl Nachweis-Antikörper pipettiert und die Platte mit Folie abgedeckt. Die Proben aus Follikelflüssigkeit wurden für 2 Stunden, die Proben aus Kulturmedium für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
- 6) Nach Entfernen der Folie und Absaugen erfolgten drei weitere Waschvorgänge.
- 7) Frühestens 15 Minuten vor Verwendung stellte man die chromogene Substrat-Lösung durch Mischen der mitgelieferten Farb-Reagenzien A und B zu gleichen Teilen her. 200 µl der chromogenen Lösung wurden in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte gegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Dunkelheit.
- 8) Durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure in die Vertiefungen der Platte wurde die Farbreaktion gestoppt.
- 9) Innerhalb von 30 Minuten wurde die Extinktionsmessung im Spektralphotometer bei 450 nm durchgeführt. Mit Hilfe der Extinktionswerte der IL-1 $\beta$ -Standards wurde für jede Messreihe eine eigene Bezugskurve erstellt.

Laut Herstellerangaben liegt die unterste Nachweisgrenze des Enzymimmunoassay Quantikine<sup>®</sup> für IL-1 $\beta$  bei Werten unter 1 pg/ml.

### **2.11.3 Hormonbestimmungen in der Follikelflüssigkeit unter Anwendung der Chemilumineszenz-Methode**

#### **2.11.3.1 Östradiol-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit**

Die quantitative Bestimmung von Östradiol in Follikelflüssigkeit erfolgte mit den Automatischen Chemilumineszenz-Systemen ACS:180 von Bayer Diagnostics® (ACS: 180 Östradiol-6 II-Test).

##### **2.11.3.1.1 Testprinzip**

Dem ACS:180 Östradiol-Test liegt ein kompetitiver Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz- Technologie zugrunde. Östradiol in den Patientenproben konkurriert mit Acridiniumester-markiertem Östradiol um eine begrenzte Menge von spezifischen  $17\beta$ -Östradiol-6-Antikörpern (Kaninchen-Anti-Östradiol-Antikörper). In einem zweiten Schritt werden Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper hinzugefügt, die an paramagnetische Partikel gebunden sind und das Kaninchen-Anti-Östradiol einfangen.

Zwischen den vom System gemessenen relativen Lichteinheiten und der Östradiol-Konzentration in den Proben besteht eine umgekehrt-proportionale Beziehung.

##### **2.11.3.1.2 Reagenzien und Materialien**

Es wurden die zum System gehörigen Reagenzien verwendet:

- ACS:180 Östradiol-6 II Lite Reagenz: mit Acridiniumester markiertes Östradiolderivat
- ACS:180 Östradiol -6 II Solid Phase: Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper
- ACS:180 Östradiol-6 II Antikörper-Reagenz: Kaninchen-Anti-Östradiol-Antikörper
- ACS:180 Östradiol-6 II Antikörper-Reagenz Barcode Label
- ACS:180 Östradiol-6 II Basiskurvenkarte
- Kalibrator 6 (niedriger und hoher Kalibrator)
- Multi-Diluent 9

- Verschlusskappen

#### 2.11.3.1.3 Praktische Durchführung

Da die Östradiol-Konzentrationen in den Patientenproben den Messbereich des ACS:180<sup>®</sup>-Systems auch nach automatischer Verdünnung überstiegen, mussten die Proben vor der Messung manuell mit Multi-Diluent 9 1:1000 verdünnt werden.

Alle weiteren Verdünnungs-, Pipettier-, Mess- und Reinigungsschritte wurden vom System automatisch ausgeführt.

Der Messbereich lag zwischen 10 pg/ml als unterer Nachweisgrenze und 1000 pg/ml als höchstem messbaren Wert.

Die Basiskurvenstandards wurden analytisch hergestellt und mit Gaschromatographie/ Massenspektroskopie überprüft.

#### **2.11.3.2 Progesteron-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit**

Die quantitative Bestimmung von Progesteron in Follikelflüssigkeit erfolgte mit den Automatischen Chemilumineszenz-Systemen ACS:180 von Bayer Diagnostics<sup>®</sup> (ACS:180 Progesteron-Test).

##### 2.11.3.2.1 Testprinzip

Beim ACS:180 Progesteron-Test handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz-Technologie. Mit Acridiniumester markierte monoklonale Maus-Anti-Progesteron-Antikörper binden an Progesteron aus den Patientenproben. Nicht gebundene Antikörper reagieren mit daraufhin zugefügtem Progesteron-Derivat, das an paramagnetische Partikel gekoppelt ist.

Zwischen den vom System gemessenen relativen Lichteinheiten und der Menge an Progesteron in den Proben besteht ein umgekehrt-proportionales Verhältnis.

### 2.11.3.2.2 Reagenzien und Materialien

Es wurden die zum System gehörigen Reagenzien verwendet:

- ACS:180 Progesteron Lite Reagenz: Acridinium-markierter Maus-Anti-Progesteron-Antikörper
- ACS:180 Progesteron Solid Phase: Progesteron-Derivat, gekoppelt an paramagnetische Partikel
- ACS:180 Progesteron Releasing Agens
- ACS:180 Progesteron Basiskurvenkarte
- ACS:180 Waschreagenz 2
- Kalibrator E (niedriger und hoher Kalibrator)
- Multi-Diluent 3
- Verschlusskappen

### 2.11.3.2.3 Praktische Durchführung

Da die Progesteron-Konzentrationen in den Patientenproben den Messbereich des ACS:180<sup>®</sup>-Systems auch nach automatischer Verdünnung überstiegen, mussten die Proben vor der Messung manuell mit Multi-Diluent 3 1:1000 verdünnt werden.

Alle weiteren Verdünnungs-, Pipettier-, Mess- und Reinigungsschritte wurden vom System automatisch ausgeführt.

Der Messbereich lag zwischen 0,11 ng/ml als unterer Nachweisgrenze und 60 ng/ml als oberster Grenze.

Die Standardisierung erfolgte wie bei den Östradiol-Bestimmungen.

### **2.11.3.3 LH-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit**

Die quantitative Bestimmung des luteinisierenden Hormons (LH) in Follikelflüssigkeit erfolgte mit den Automatischen Chemilumineszenz-Systemen ACS:180 von Bayer Diagnostics<sup>®</sup> (ACS:180 LH2-Test).

#### 2.11.3.3.1 Testprinzip

Der ACS:180 LH2-Test ist ein chemiluminometrischer Immunoassay nach der Sandwich-Methode. Es werden jeweils konstante Mengen zweier Antikörper eingesetzt. Bei den ersten Antikörpern handelt es sich um Acridinium-markierte Maus-Anti-LH-Antikörper, die an LH aus den Patientenproben binden. Im nächsten Schritt werden Maus-Anti-LH-Antikörper zugefügt, die kovalent an paramagnetische Partikel gekoppelt sind. Diese Antikörperpaarung erkennt spezifisch nur das intakte LH-Molekül.

Zwischen der Menge an LH in den Proben und den gemessenen relativen Lichteinheiten besteht ein proportionales Verhältnis.

#### 2.11.3.3.2 Reagenzien und Materialien

Es wurden die zum System gehörigen Reagenzien verwendet:

- ACS:180 LH2 Lite Reagenz: Acridinium-markierter monoklonaler Maus-Anti-LH-Antikörper
- ACS:180 LH2 Solid Phase: monoklonaler Maus-Anti-LH-Antikörper, gebunden an paramagnetische Partikel
- ACS:180 LH2-Basiskurvenkarte
- Kalibrator B (niedriger und hoher Kalibrator)
- Verschlusskappen

#### 2.11.3.3.3 Praktische Durchführung

Alle Verdünnungs-, Pipettier-, Mess- und Reinigungsschritte wurden vom System automatisch ausgeführt.

Der Messbereich lag zwischen 0,1 mU/ml als unterer Nachweisgrenze und 200 mU/ml als oberster Grenze.

Die Standardisierung erfolgte gegen das Referenzmaterial der 2. IS 80/552 der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

### **2.11.3.4 FSH-Bestimmung in der Follikelflüssigkeit**

Die quantitative Bestimmung des Follikel stimulierenden Hormons (FSH) in Follikelflüssigkeit erfolgte mit den Automatischen Chemilumineszenz-Systemen ACS:180 von Bayer Diagnostics® (ACS:180 FSH-Test).

#### 2.11.3.4.1 Testprinzip

Das Testprinzip der FSH-Bestimmung entspricht dem des ACS:180 LH2-Tests.

#### 2.11.3.4.2 Reagenzien und Materialien

Es wurden die zum System gehörigen Reagenzien verwendet:

- ACS:180 FSH Lite Reagenz: Acridinium-markierter polyklonaler Schaf-Anti-FSH-Antikörper
- ACS:180 FSH Solid Phase: monoklonaler Maus-Anti-FSH-Antikörper, gebunden an paramagnetische Partikel
- ACS:180 FSH-Basiskurvenkarte
- Kalibrator B (niedriger und hoher Kalibrator)
- Verschlusskappen

#### 2.11.3.4.3 Praktische Durchführung

Alle Verdünnungs-, Pipettier-, Mess- und Reinigungsschritte wurden vom System automatisch ausgeführt.

Der Messbereich lag zwischen 0,3 mU/ml als unterer Nachweisgrenze und 200 mU/ml als höchstem messbaren Wert.

Die Standardisierung erfolgte gegen das Referenzmaterial der 2. IS 94/632 der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

## **2.12 Statistische Auswertung**

Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 11.5. durchgeführt.

Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurden bei allen Werten die Mediane sowie Minima und Maxima angegeben und die statistischen Analysen mittels nichtparametrischer Testverfahren durchgeführt.

Um Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu überprüfen, wurde der U-Test nach Mann und Whitney benutzt. Ein  $p < 0,05$  gab an, dass sich die Ausprägungen einer Variablen in den beiden Gruppen signifikant unterscheiden.

Bei Vorliegen von nominalen Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Dieser Test prüft die Abhängigkeit zwischen zwei qualitativen Merkmalen. Ein  $p < 0,05$  belegte eine signifikante Abhängigkeit.

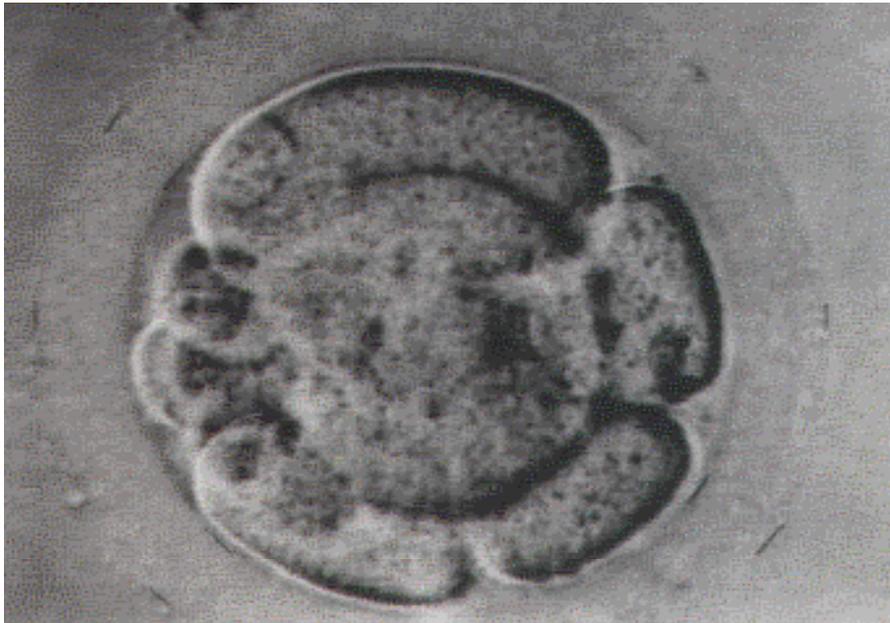
Die Berechnung von Korrelationen zwischen zwei Parametern erfolgte mit der Spearman'schen Rangkorrelation. Der Korrelationskoeffizient rho kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen und ist ein Maß für die Abhängigkeit zwischen zwei Variablen. Ein positives Vorzeichen symbolisiert einen gleichsinnigen, ein negatives Vorzeichen einen gegensinnigen Zusammenhang. Je näher der Betrag von rho bei 0 liegt, desto schwächer ist die Abhängigkeit ausgeprägt. Bei Vorliegen einer signifikanten Korrelation war  $p < 0,05$ .

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Ein  $p < 0,01$  zeigte eine hohe Signifikanz und ein  $p < 0,001$  höchste Signifikanz an.

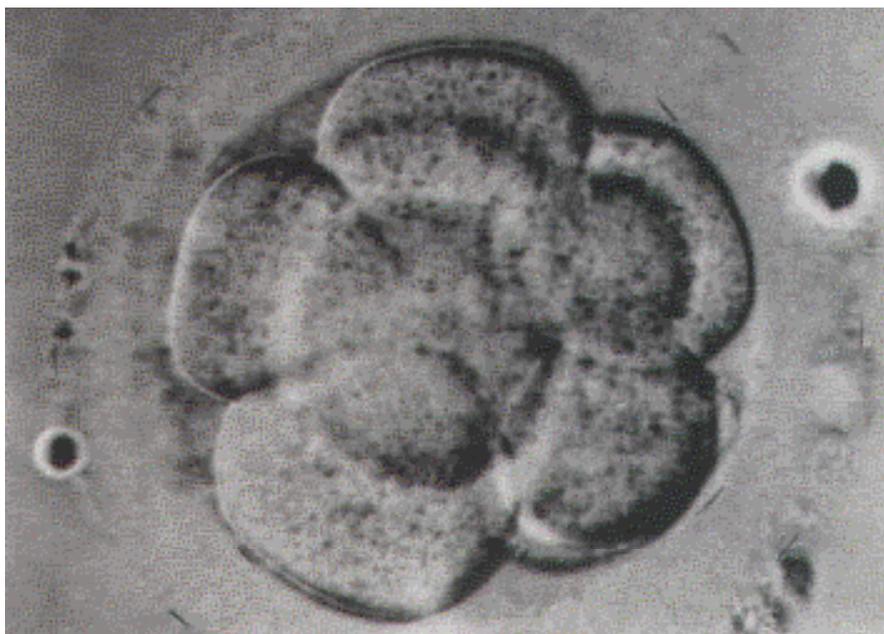
In diesen Fällen wurden die p's mit Sternen hervorgehoben:  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ .

## Bildbeilage

### Normale Entwicklung menschlicher Präimplantationsembryonen in vitro bis zum Stadium der Blastozyste



**Abb. I:** 5-Zeller Grad 4 (nach Steer) mit symmetrischen, gleich großen Blastomeren am 3. Kulturtag



**Abb. II:** 8-Zeller Grad 4 (nach Steer) am 3. Kulturtag



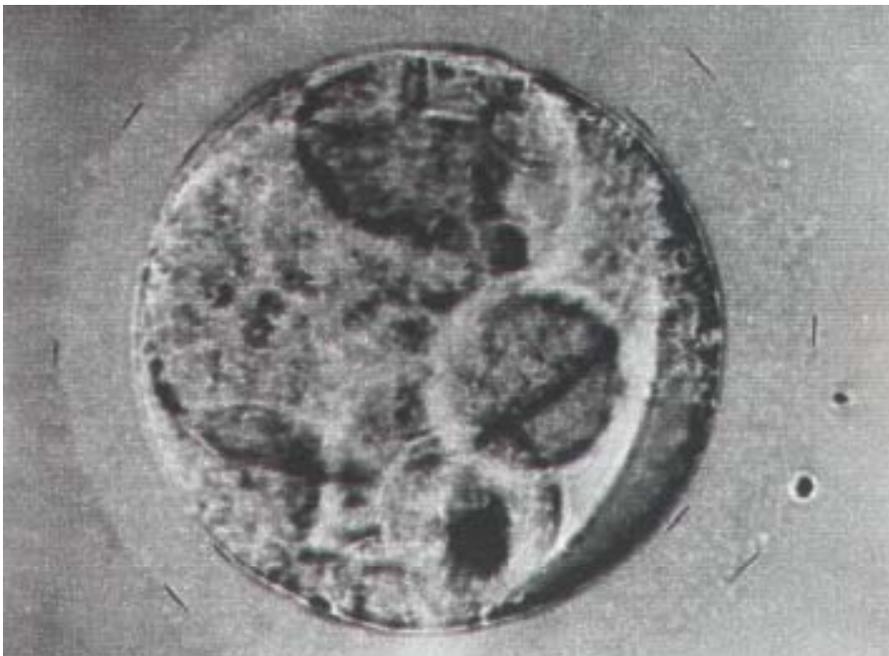
**Abb. III:** beginnend kompaktierender Embryo am 3. Kulturtag



**Abb. IV:** kompaktierter Embryo am 3. Kulturtag



**Abb. V:** kompaktierter Embryo mit beginnender Kavitation am  
3. Kulturtag



**Abb. VI:** früh kavitierender Embryo mit < 50 % Blastocoel am  
4. Kulturtag



**Abb. VII:** spät kavitierender Embryo mit  $> 50\%$  Blastocoel am 4. Kulturtag



**Abb. VIII:** frühe Blastozyste am 5. Kulturtag

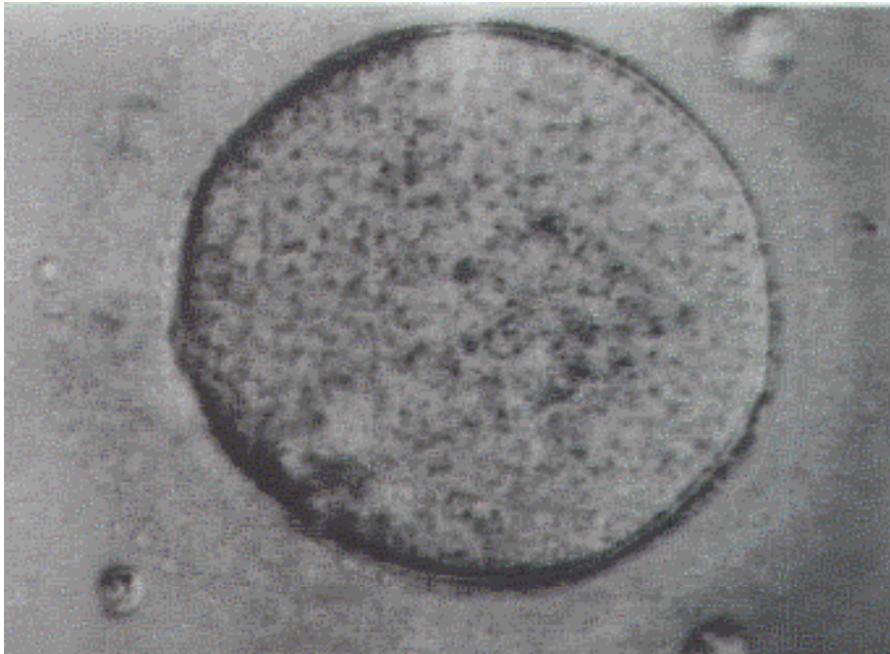


**Abb. IX:** expandierende Blastozyste am 5. Kulturtag



**Abb. X:** voll expandierte Blastozyste am 5. Kulturtag

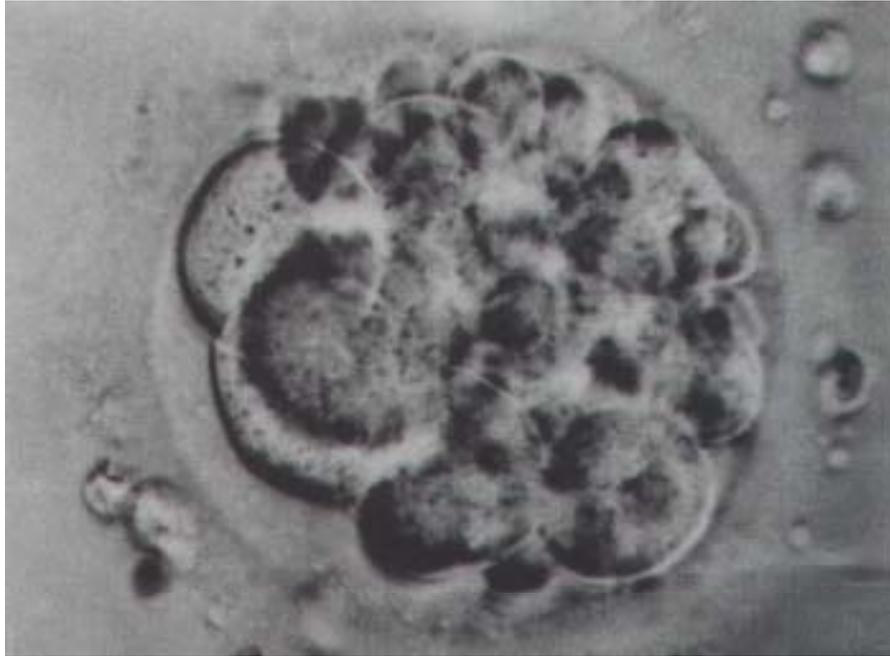
**Suboptimale Entwicklungsformen kultivierter Präimplantationsembryonen**



**Abb. XI:** ungeteilte Eizelle am 3. Kulturtag



**Abb. XII:** 4-Zeller Grad 3 (nach Steer) mit < 10 % Fragmentation der Blastomeren am 3. Kulturtag



**Abb. XIII:** 4-Zeller Grad 2 (nach Steer) mit 10-50 % Fragmentation der Blastomeren am 3. Kulturtag



**Abb. XIV:** 6-Zeller Grad 1 (nach Steer) mit > 50 % Fragmentation der Blastomeren am 3. Kulturtag



**Abb. XV:** arretierter Embryo (2-Zeller) am 5. Kulturtag



**Abb. XVI:** arretierter Embryo am 5. Kulturtag

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Fertilisationsdaten**

In den 256 eingeschlossenen Zyklen wurden insgesamt 2331 Eizellen gewonnen, von denen 1560 befruchtet werden konnten.

Pro Zyklus konnten im Median 8 Eizellen gewonnen und 5 Eizellen befruchtet werden. Die mediane Fertilisationsrate lag bei 83,3 %.

Von den 1560 befruchteten Eizellen wurden 579 weiterkultiviert, 782 kryokonserviert und der Rest verworfen.

In 1,2 % der Fälle (3 Zyklen) konnten keine Oozyten gewonnen werden.

In 6,6 % der Fälle (17 Zyklen) trat keine Befruchtung ein und in 7 Fällen (1,6 %) bildeten sich nur Vorkernstadien mit mehr als 2 Pronuclei.

Tabelle 3.1.1 zeigt die Fertilisationsdaten aller Zyklen, sowie deren Vergleich bei IVF- und ICSI-Behandlung. Wurde eine ICSI-Behandlung durchgeführt, so konnte im Median eine signifikant höhere Anzahl von Eizellen gewonnen und befruchtet werden. Auch die Fertilisationsrate war höher als bei IVF-Zyklen. Da zur Berechnung der Befruchtungsrate nach ICSI-Behandlung die Anzahl der fertilisierten Eizellen durch die Zahl der MII-Oozyten geteilt wird und bei IVF-Zyklen durch die Zahl aller gewonnenen Oozyten, lässt sich dieser Wert nicht direkt vergleichen.

Bei Patientinnen, die schwanger wurden, wurden im Median signifikant mehr Eizellen befruchtet und weiterkultiviert als bei Patientinnen, die nicht konzipierten (Tab. 3.1.2).

Die Fertilisationsdaten zeigten bei Frauen, die gesunde Kinder zur Welt brachten und denen, die einen Abort oder eine EUG erlitten, keine signifikanten Unterschiede.

Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Anzahl gewonnener Eizellen bestand eine signifikante negative Korrelation (Spearman-rho = -0,124, p = 0,047\*).

	<b>Gesamt</b> (n = 256)	<b>IVF</b> (n = 160)	<b>ICSI</b> (n = 96)	<b>p</b>
<b>Anzahl gewonnener Eizellen</b>	8,0 (0 – 28)	7,0 (0 – 23)	10,0 (0 – 28)	0,000***
<b>Anzahl MII-Oozyten</b>	-	-	7,0 (1 – 23)	-
<b>Anzahl fertilisierter Eizellen</b>	5,0 (0 – 22)	4,0 (0 – 20)	6,0 (1 – 22)	0,001**

**Tab. 3.1.1:** Vergleich verschiedener Fertilisationsdaten bei IVF- und ICSI-Behandlung. Es sind die Mediane mit den jeweiligen Standardabweichungen angegeben. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurden im U-Test nach Mann und Whitney überprüft.

Ein  $p < 0,05$  zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den 2 Gruppen im U-Test an.

	<b>Schwanger</b> (n = 44)	<b>Nicht schwanger</b> (n = 212)	<b>p</b>
<b>Anzahl gewonnener Eizellen</b>	10,0 (3 – 28)	7,0 (0 – 24)	0,053
<b>Anzahl fertilisierter Eizellen</b>	6,5 (2 – 22)	5,0 (0 – 20)	0,006**
<b>Fertilisationsrate (%)</b>	88,6 (22,22 – 100,0)	81,8 (0,0 – 100,0)	0,055
<b>Anzahl kultivierter und transferierter Eizellen</b>	3,0 (2 – 3)	2,0 (0 – 3)	0,005**

**Tab. 3.1.2:** Vergleich verschiedener Fertilisationsdaten bei schwangeren und nicht schwangeren Patientinnen.

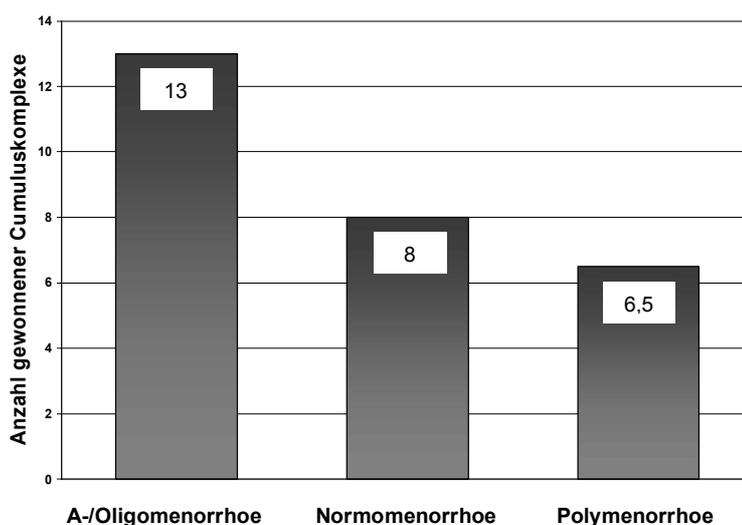
Je älter eine Patientin war, desto weniger Eizellen konnten im Median pro Zyklus gewonnen werden.

Zwischen den Fertilisationsdaten und Indikationen zur Kinderwunschbehandlung ergaben sich folgende Zusammenhänge:

Bei Patientinnen mit Endometriose konnten signifikant weniger Eizellen pro Zyklus gewonnen werden als bei Patientinnen, die nicht an Endometriose litten ( $p = 0,000^{***}$ ). Lag ein PCO-Syndrom vor, so musste im Median eine höhere Anzahl von Eizellen verworfen werden ( $p = 0,047^*$ ). Bei leichter und schwerer andrologischer Subfertilität lagen die Befruchtungsraten in IVF-Zyklen deutlich unter denen von Paaren ohne andrologische Indikation ( $p = 0,003^{**}$  und  $p = 0,004^{**}$ ).

Ein signifikanter Unterschied der Anzahl gewonnener Eizellen fand sich auch zwischen Patientinnen mit Amenorrhoe bzw. Oligomenorrhoe und Patientinnen mit Normo- bzw. Polymenorrhoe. Abbildung 3.1.1 verdeutlicht, dass bei Vorliegen von Amenorrhoe oder Oligomenorrhoe im Median signifikant mehr Oozyten pro Zyklus gewonnen werden konnten, da diese Patientinnen sehr häufig an einem PCO-Syndrom litten:

- Vergleich A-/Oligomenorrhoe – Normomenorrhoe:  $p = 0,005^{**}$
- Vergleich A-/Oligomenorrhoe – Polymenorrhoe :  $p = 0,036^*$



**Abb. 3.1.1:** Vergleich der Anzahl gewonnener Eizellen bei normalen Zyklen und Zyklus-anomalien

### **3.2 Zygoten-, Embryonen- und Blastozystenbeurteilung**

14 bis 18 Stunden nach Insemination bzw. Injektion wurden alle imprägnierten Eizellen mit Hilfe des Zygoten-Scores von Zollner et al. (2002) beurteilt. Der mittlere Zygoten-Score der zur Weiterkultur ausgewählten Eizellen betrug im Median 12,5.

Der mittlere Embryo-Score nach Steer, der am dritten Tag nach Insemination bestimmt wurde, lag bei einem medianen Wert von 26,0 pro Embryo.

Von 579 weiterkultivierten Eizellen erreichten 38,2 % (221) nach fünf Tagen Kulturdauer das Blastozystenstadium. 184 Embryonen (31,8 %) befanden sich am fünften Tag im kompaktierten oder kompaktierenden Stadium und 174 Embryonen (30,1 %) waren in ihrer Entwicklung arretiert.

Bei 5 Paaren entwickelten sich nach fünf Tagen alle drei kultivierten Zygoten zu Blastozysten, bei 16 Paaren waren zwei Blastozysten und bei 43 Paaren eine Blastozyste vorhanden. In 127 Fällen standen keine Blastozysten zur Verfügung. In 31 Fällen fand der Embryotransfer bereits vor dem fünften Kulturtag statt.

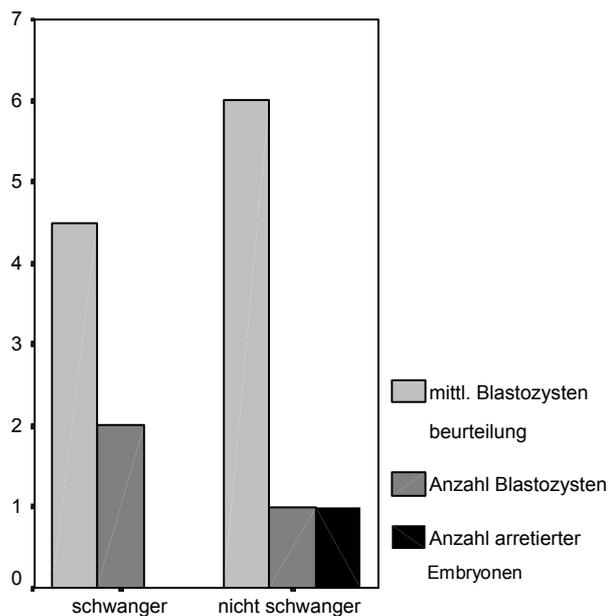
Die Embryonen- und Blastozystenbeurteilungen zeigten zwischen IVF- und ICSI-Behandlungen keine signifikanten Unterschiede. Auch zwischen dem Alter der Patientinnen, den verschiedenen Indikationen zur Kinderwunschbehandlung und den Embryonendaten bestanden keine signifikanten Zusammenhänge.

In Tabelle 3.2.1 sind Zygoten- und Embryonenbeurteilungen sowie deren Vergleich bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen aufgelistet. Die Qualität der Embryonen am dritten sowie am fünften Tag war bei Frauen, die schwanger wurden, signifikant besser. Bei Patientinnen, die nicht konzipierten, entwickelten sich nach fünf Tagen signifikant weniger Embryonen zu Blastozysten und mehr Embryonen arretierten in ihrer Entwicklung (Abb. 3.2.1). Der mittlere Zygoten-Score zeigte zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

Zwischen den Zygoten- und Embryonenbeurteilungen und dem Schwangerschaftsausgang (gesundes Kind oder Abort bzw. EUG) bestand keine signifikante Abhängigkeit.

	<b>Gesamt (n = 256)</b>	<b>Schwanger (n = 44)</b>	<b>Nicht schwanger (n = 212)</b>	<b>p</b>
<b>Mittlerer Zygoten- Score der ausgewählten Eizellen</b>	12,5 (10,0 – 36,0)	12,4 (10,0 – 19,33)	12,5 (10,0 – 36,0)	0,483
<b>Mittlerer Embryo- Score nach Steer</b>	26,0 (4,0 – 50,0)	28,7 (13,67 - 48,0)	25,0 (4,0 – 50,0)	0,017*
<b>Mittlere Blastozysten- beurteilung</b>	6,0 (1,33 – 8,0)	4,5 (1,33 – 7,67)	6,0 (2,0 – 8,0)	0,000***
<b>Anzahl Blastozysten</b>	1,0 (0 – 3)	2,0 (0 – 3)	1,0 (0 – 3)	0,001**
<b>Anzahl arretierter Embryonen</b>	1,0 (0 – 3)	0,0 (0 – 2)	1,0 (0 – 3)	0,009**

**Tab. 3.2.1:** Zygoten- und Embryonen-Beurteilungen und deren Vergleich bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen. Es sind die Medianwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Das p in der letzten Spalte bezieht sich auf den Unterschied zwischen schwangeren und nicht schwangeren Frauen im U-Test nach Mann und Whitney.



**Abb. 3.2.1:** Vergleich der Embryonen-daten nach fünf Tagen Kulturdauer bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen.

Tabelle 3.2.2 zeigt verschiedene Korrelationen zwischen Zygoten- und Embryonenmorphologie und Fertilisationsdaten:

Je mehr Eizellen gewonnen werden konnten und je höher die Fertilisationsrate war, desto niedriger lag der mittlere Zygoten-Score im Durchschnitt. Je mehr fertilisierte Eizellen pro Zyklus zur Verfügung standen, desto wahrscheinlicher war es, dass die Zygoten im Durchschnitt eine gute morphologischer Qualität aufwiesen.

Eine hohe Fertilisationsrate war mit einem guten Embryo-Score nach Steer assoziiert.

Zwischen Zygoten-, Embryonen- und Blastozystenmorphologie bestanden folgende Zusammenhänge:

Zeigten bereits die Zygoten eine hohe morphologische Qualität, so war im Mittel auch die der Embryonen am dritten Tag nach Insemination bzw. Injektion hoch.

Auch die Qualität der Embryonen am Tag 3 und am Tag 5 waren positiv miteinander korreliert: je höher die Bewertung im Embryo-Score nach Steer, desto besser, d.h. niedriger war auch die mittlere Blastozystenbeurteilung.

Beim direkten Vergleich der Zygoten- und Blastozystenbewertung konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

	<b>Mittlerer Zygoten-Score der ausgewählten Eizellen</b>	<b>Mittlerer Embryo-Score nach Steer</b>
<b>Anzahl gewonnener Cumuluskomplexe</b>	rho = -0,297 p = 0,000***	rho = 0,048 ns
<b>Fertilisationsrate (%)</b>	rho = -0,217 p = 0,001**	rho = 0,176 p = 0,009**
<b>Mittlerer Zygoten-Score der ausgewählten Eizellen</b>	_____	rho = -0,215 p = 0,001**
<b>Mittlerer Embryo-Score nach Steer</b>	rho = -0,215 p = 0,001**	_____
<b>Mittlere Blastozystenbeurteilung</b>	rho = 0,09 ns	rho = -0,442 p = 0,000***

**Tab. 3.2.2:** Korrelationen zwischen Zygoten- und Embryonenmorphologie und Fertilisationsdaten und Korrelationen zwischen Embryonenbeurteilungen am ersten, dritten und fünften Tag nach Insemination.

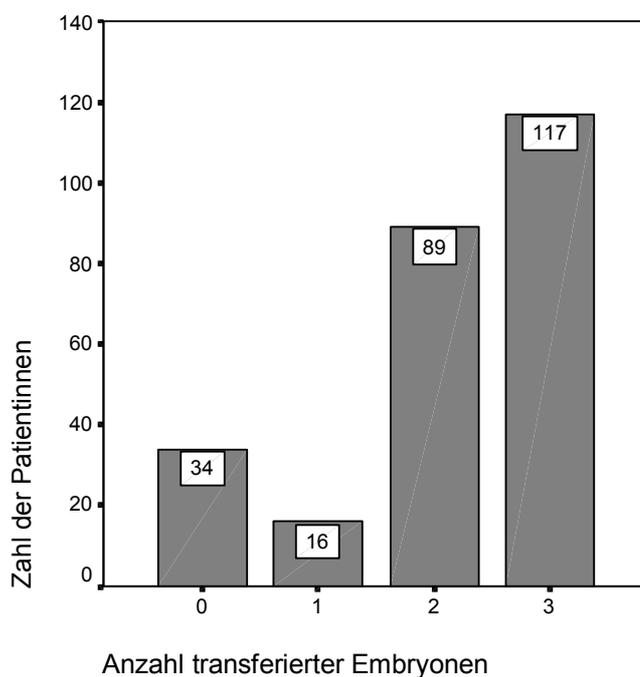
Der Test auf Abhängigkeit wurde mit der Spearman'schen Rangkorrelation durchgeführt. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient rho und die Irrtumswahrscheinlichkeit p. Ein  $p < 0,05$  lässt eine signifikante Korrelation zwischen zwei Parametern erkennen.

ns: nicht signifikant

### **3.3 Zahl der transferierten Embryonen und Schwangerschaftsrate**

In 222 von 256 Zyklen wurde ein Embryo-Transfer durchgeführt. Im Median konnten 2,0 (0-3) Embryonen pro Zyklus transferiert werden.

Abbildung 3.3.1 zeigt die Zahl der Patientinnen, bei denen 0, 1, 2, oder 3 Embryonen intrauterin zurückversetzt wurden. In 34 Fällen (13,3 %) konnte aus Mangel gewonnener Eizellen, wegen ausgebliebener Befruchtung oder anderen Gründen kein Embryo-Transfer stattfinden.



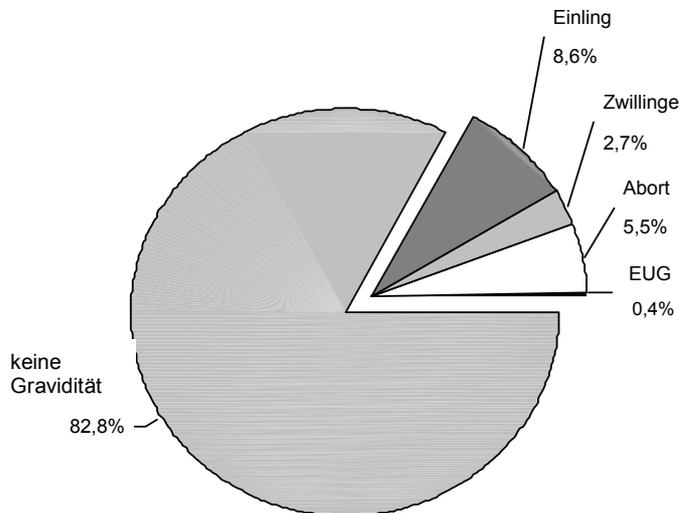
**Abb. 3.3.1:** Zahl der Patientinnen mit jeweiliger Anzahl transferierter Embryonen.

Insgesamt wurden 44 klinische Schwangerschaften erzielt. Dies ergibt eine Schwangerschaftsrate von 19,8 % pro Transfer und 17,2 % pro Punktion.

Es wurden 22 gesunde Einlinge und 7 Zwillingspaare geboren. 15 Schwangerschaften endeten in einem Abort (14 Patientinnen) oder in einer Extrauterin gravidität (eine Patientin), (Abb. 3.3.2).

Die Wahrscheinlichkeit, ein gesundes Kind zu bekommen, lag bei 16,2 % pro Transfer und bei 14,1 % pro Punktion. Die Fehlgeburtsrate betrug 6,8 % pro Transfer, 5,9 % pro Punktion und 34 % pro eingetretener Schwangerschaft.

Die Implantationsrate, d.h. die Anzahl der Fruchthöhlen bezogen auf die Zahl aller transferierten Embryonen, lag bei 9,4 %.



**Abb. 3.3.2:** Schwangerschaftsrate und gesunde Kinder bzw. Aborte pro IVF- oder ICSI-Zyklus.

Wurde eine IVF-Behandlung durchgeführt, so lag die Schwangerschaftsrate mit 16,3 % etwas niedriger als bei ICSI-Behandlung (18,8 %). Der Unterschied war aber nicht signifikant. Bei ICSI-Zyklen wurde im Durchschnitt eine signifikant höhere Zahl von Embryonen transferiert (3,0) als bei IVF-Zyklen (2,0):  $p = 0,003^{**}$ . Die Wahrscheinlichkeit ein gesundes Kind zu bekommen und die Abortrate unterschieden sich nicht zwischen IVF- und ICSI-Behandlungen.

Auch das Alter der Patientin und des Ehemanns, die Dauer der Kinderlosigkeit und der Body Mass Index (BMI) der Patientin zeigten keine signifikanten Korrelationen mit der Schwangerschaftsrate und den Schwangerschaftsausgängen.

Patientinnen, die unter Endometriose litten, erreichten eine deutlich niedrigere Schwangerschaftsrate (7,5 %) als Patientinnen ohne Endometriose (19 %), n.s.

### **3.4 Interleukin-1 beta in der Follikelflüssigkeit**

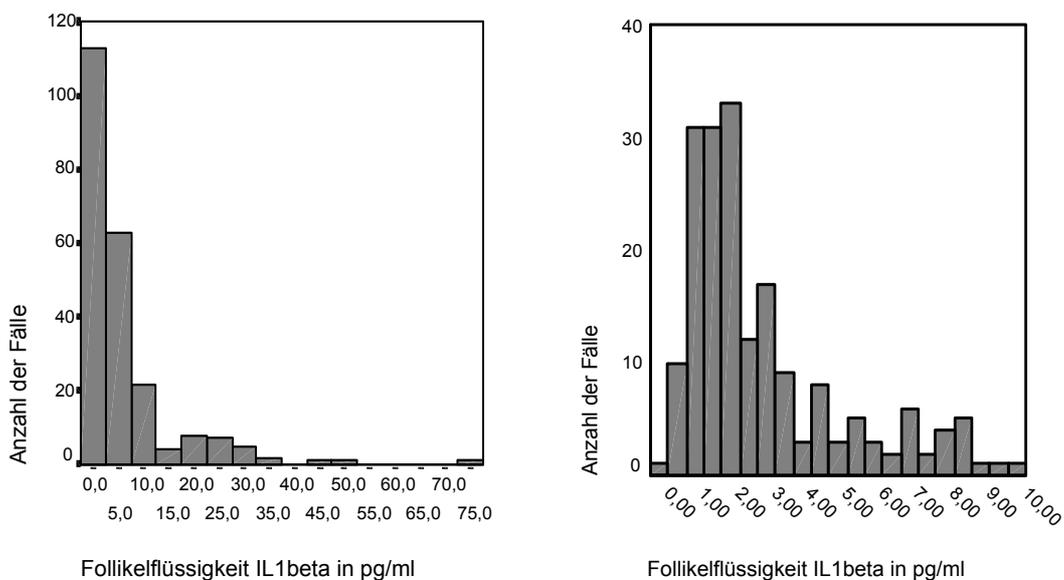
#### **3.4.1 Interleukin-1 beta-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit**

In allen 227 gemessenen Proben aus Follikelflüssigkeit konnte IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden.

Der Median aller IL-1 $\beta$ -Werte lag bei 2,55 pg/ml.

Die minimalste gemessene Konzentration betrug 0,23 pg/ml und das Maximum 74,72 pg/ml.

Abbildung 3.4.1.1 zeigt die Verteilung der gemessenen IL-1 $\beta$ -Werte in der Follikelflüssigkeit:



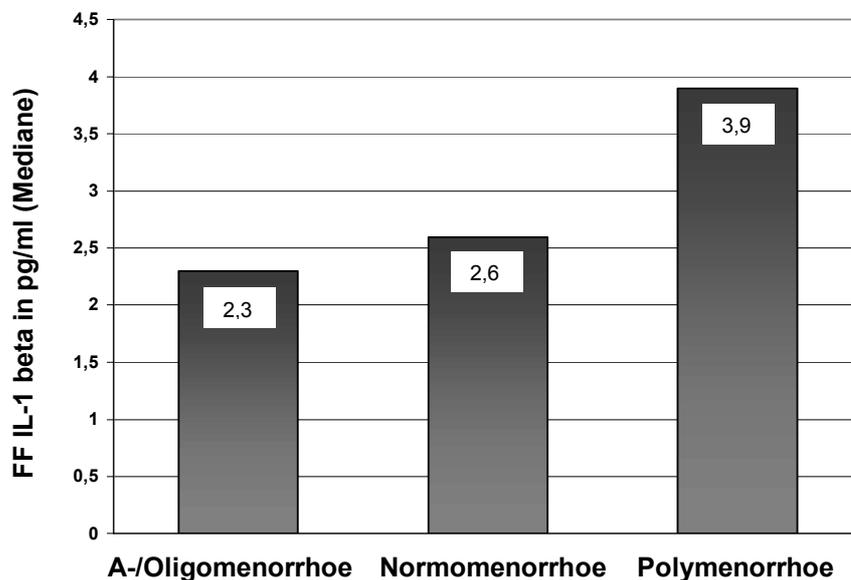
**Abb. 3.4.1.1:** Histogramm der IL-1 $\beta$ -Werte in Follikelflüssigkeit in pg/ml. Das rechte Histogramm zeigt als Ausschnitt die Verteilung der IL-1 $\beta$ -Werte < 10 pg/ml.

### **3.4.2 Korrelation mit der Zyklusform und der IVF- oder ICSI-Behandlung**

Wie Abbildung 3.4.2.1 verdeutlicht, lagen die durchschnittlichen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit bei Patientinnen mit Amenorrhoe oder Oligomenorrhoe niedriger als bei Frauen mit normalem Zyklus. Bei Patientinnen mit Polymenorrhoe dagegen waren die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Median höher als bei Frauen mit Normomenorrhoe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren allerdings nicht signifikant.

Beim Vergleich der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im U-Test nach Mann und Whitney errechneten sich folgende p-Werte:

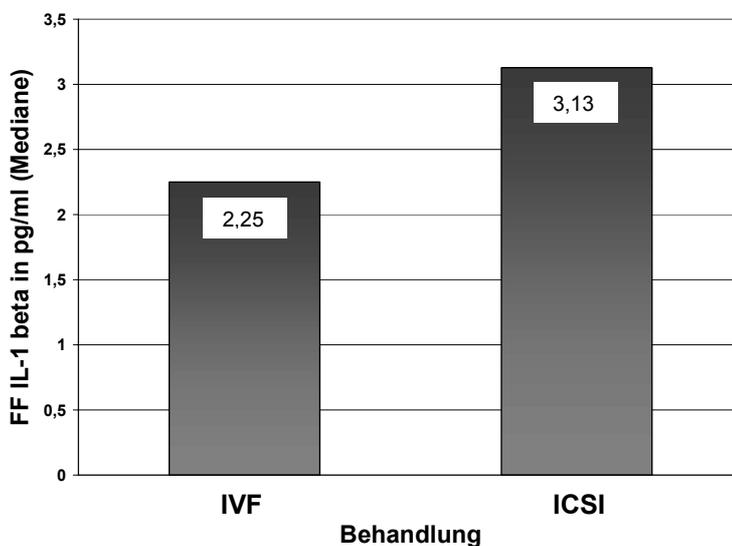
- A-/Oligomenorrhoe – Normomenorrhoe:  $p = 0,625$
- A-/Oligomenorrhoe – Polymenorrhoe:  $p = 0,551$
- Normomenorrhoe – Polymenorrhoe:  $p = 0,588$



**Abb. 3.4.2.1:** Vergleich der medianen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in FF bei Normomenorrhoe bzw. bei Zyklusanomalien.

Bei IVF-Zyklen fanden sich im Durchschnitt niedrigere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit als bei ICSI-Zyklen (Abb. 3.4.2.2). Die Werte unterschieden sich in den beiden Gruppen aber nicht signifikant voneinander:

- IVF-Behandlungen: 2,25 (0,23 – 49,46) pg/ml
- ICSI-Behandlungen: 3,13 (0,31 – 74,72) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,311$  (U-Test nach Mann und Whitney)



**Abb. 3.4.2.2:** Mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration in FF bei IVF- und ICSI-Behandlungen.

Zwischen der Stimulationsbehandlung und den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Weder die Art der ovariellen Stimulation (hMG oder FSH), noch die verwendete Gesamtdosis oder die Stimulationsdauer zeigten eine Abhängigkeit zu den IL-1 $\beta$ -Werten.

Auch Alter und Body Mass Index (BMI) der Patientinnen waren nicht mit den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen korreliert.

### **3.4.3 Korrelation mit den Indikationen zur Kinderwunschbehandlung**

Die Follikelflüssigkeit von Patientinnen mit tubarer Sterilität enthielt im Durchschnitt deutlich niedrigere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen als die Follikelflüssigkeit der Vergleichsgruppe ohne Tubenfaktor (Abb. 3.4.3.1). Im U-Test zeigte der Unterschied der Konzentrationen mit einem p-Wert von 0,064 allerdings nur eine Tendenz zur Signifikanz.

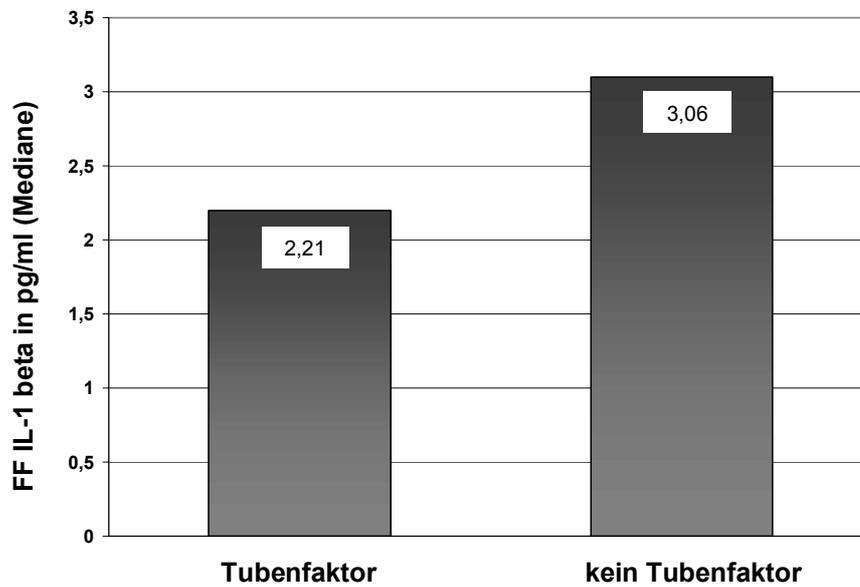
Bei Patientinnen mit Endometriose fanden sich im Median etwas höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit als bei Frauen, die nicht an Endometriose litten.

Die Diagnose eines PCO-Syndroms war mit durchschnittlich niedrigen IL-1 $\beta$ -Werten in der Follikelflüssigkeit assoziiert (Abb. 3.4.3.2). Bei Frauen mit einem PCO-Syndrom lag die mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration bei 1,77 pg/ml, im Vergleichskollektiv ohne PCOS bei 2,74 pg/ml. Der Unterschied war aber nicht signifikant.

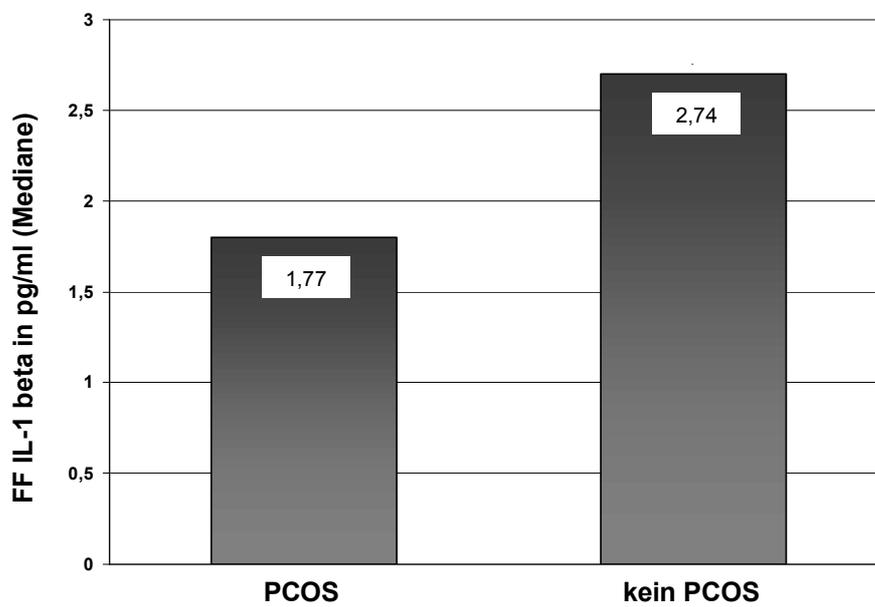
In Tabelle 3.4.3.1 sind Mediane, Minima und Maxima der IL-1 $\beta$ -Werte bei verschiedenen weiblichen Fertilitätsstörungen dargestellt.

	<b>ja</b>	<b>nein</b>	<b>p</b>
<b>Indikation Tubenfaktor</b>	2,21 (0,23 – 74,72)	3,06 (0,31 – 49,46)	0,064
<b>Indikation Endometriose</b>	2,84 (0,23 – 49,46)	2,44 (0,31 – 74,72)	0,801
<b>Indikation PCOS</b>	1,77 (0,36 – 8,52)	2,74 (0,23 – 74,72)	0,160

**Tab. 3.4.3.1:** IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (in pg/ml) in Follikelflüssigkeit bei verschiedenen Indikationen zur Kinderwunschbehandlung.



**Abb. 3.4.3.1:** Durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit bei Patientinnen mit und ohne tubare Sterilität.



**Abb. 3.4.3.2:** Durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentrationen bei Patientinnen mit und ohne PCO-Syndrom.

### **3.4.4 Korrelation von Interleukin-1 beta mit den Fertilisationsdaten**

Bei drei Patientinnen konnten bei der Follikelpunktion keine Cumuluskomplexe gewonnen werden. In diesen Fällen fanden sich durchschnittlich etwas niedrigere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit als beim Vergleichskollektiv. Für die beiden Gruppen konnten folgende IL-1 $\beta$ -Werte (Median, Minimum und Maximum) ermittelt werden:

- Anzahl gewonnener Oozyten = 0: 1,43 (1,134 – 1,731) pg/ml
- Anzahl gewonnener Oozyten > 0: 2,58 (0,23 – 74,72) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,178$  (U-Test nach Mann und Whitney)

In der Spearman'schen Rangkorrelation konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen der Anzahl gewonnener Eizellen und den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen nachgewiesen werden:

- $\rho = -0,052$
- $p = 0,434$

Auch zwischen der Fertilisationsrate und den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit bestand keine signifikante Korrelation:

- $\rho = 0,112$
- $p = 0,097$

In 17 Zyklen fand keine Befruchtung der gewonnenen Eizellen statt. In diesen Fällen lag der Median der IL-1 $\beta$ -Konzentration in der Follikelflüssigkeit etwas unter dem Median von Zyklen mit erfolgreicher Fertilisation.

Die durchschnittlichen Konzentrationen unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander:

- Fertilisationsrate = 0 %: 2,24 (0,70 – 18,91) pg/ml
- Fertilisationsrate > 0 %: 2,60 (0,23 – 74,72) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,950$  (U-Test nach Mann und Whitney)

Bei 160 Paaren wurde eine IVF-Behandlung durchgeführt, wobei die mediane Befruchtungsrate 75 % (0,0 – 100,0) betrug. In 41 Fällen (25,6 %) wurde eine Fertilisationsrate über 90 % erzielt. Die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit wurden zwischen IVF-Zyklen mit sehr hohen Befruchtungsraten von über 90 % und Zyklen mit schlechterer Fertilisation verglichen.

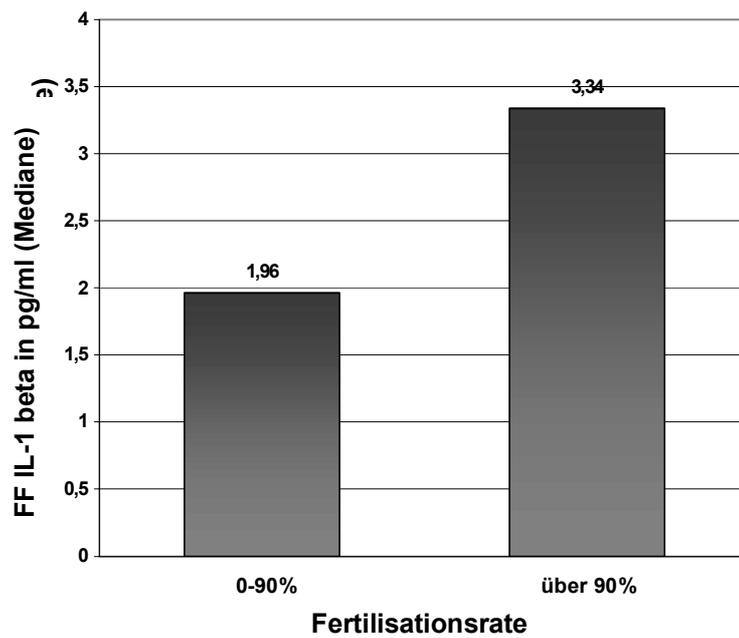
Es zeigte sich, dass die Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen mit Fertilisationsraten über 90 % signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Konzentration enthielt als die der Vergleichsgruppe (Abb. 3.4.4.1). Die medianen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen mit Minimum und Maximum lagen bei folgenden Werten:

- Fertilisationsrate  $\leq$  90 %: 1,96 (0,23 – 35,63) pg/ml
- Fertilisationsrate  $>$  90 %: 3,34 (0,65 – 49,46) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,032$  (U- Test nach Mann und Whitney)

Tabelle 3.4.4.1 zeigt, dass die Qualität der Nativejakulate zwischen IVF-Zyklen mit hohen Befruchtungsraten von über 90 % und Zyklen mit niedrigeren Fertilisationsraten nicht signifikant unterschiedlich war. Auch die Parameter der aufgearbeiteten Ejakulate wichen nicht signifikant voneinander ab.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass gute Befruchtungsraten ( $> 90$  %) in IVF-Zyklen mit signifikant höheren IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit verbunden waren. Die guten Fertilisationsergebnisse ließen sich aber nicht mit einer durchschnittlich besseren Qualität der Spermaproben erklären. Auch die Anzahl der gewonnenen Eizellen unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant voneinander.

Bei ICSI-Behandlungen bestand zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit bei hohen und niedrigeren Befruchtungsraten kein signifikanter Unterschied.



**Abb. 3.4.4.1:** Durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentration in Follikelflüssigkeit bei IVF-Behandlung: Vergleich zwischen Zyklen mit Fertilisationsraten  $\leq 90\%$  bzw.  $> 90\%$ .

	<b>Fertilisationsrate ≤ 90 % (n = 115)</b>	<b>Fertilisationsrate &gt; 90 % (n = 41)</b>	<b>p</b>
<b>pH-Wert</b>	7,6 (6,8 – 8,0)	7,6 (7,2 – 8,0)	0,224
<b>Volumen (ml)</b>	3,2 (0,6 – 13,1)	3,0 (0,2 – 8,0)	0,353
<b>Konzentration (Mio./ml)</b>	22,0 (2,5 – 80,0)	26,0 (4,5 – 130,0)	0,275
<b>Menge (Mio.)</b>	67,5 (2,75 – 340,8)	60,0 (7,2 – 375,0)	0,693
<b>Leukozyten/Rund- zellen (Mio./ml)</b>	1,0 (0,0 – 20,0)	1,0 (0,0 – 4,0)	0,090
<b>Bakterien/Detritus (0-3)</b>	2,0 (0,5 – 3,0)	2,0 (0,0 – 3,0)	0,964
<b>Motilität a+b (%)</b>	36 (0 – 67)	41 (2 – 71)	0,180
<b>Vitalität (%)</b>	69 (4 – 88)	71 (21 – 86)	0,201
<b>Morphologie (%)</b>	14 (0 – 41)	16 (5 – 28)	0,568

**Tab. 3.4.4.1:** Vergleich der Nativejakulate bei IVF-Zyklen mit Fertilisationsraten ≤ 90 bzw. > 90%.  
Der p-Wert steht für die Signifikanz des Unterschieds zwischen den beiden Gruppen.

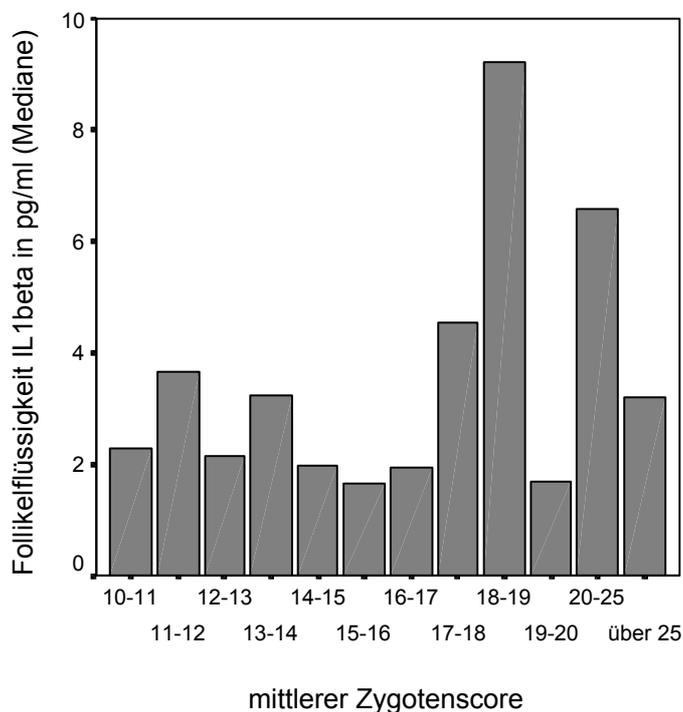
### **3.4.5 Korrelation von Interleukin-1 beta mit der Embryonenmorphologie**

#### **3.4.5.1 Korrelation mit der Zygotenqualität**

Zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit und dem mittleren Zygoten-Score konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Die Spearman'sche Rangkorrelation brachte folgende Ergebnisse:

- $\rho = -0,073$
- $p = 0,309$

Abbildung 3.4.5.1.1 zeigt die durchschnittlichen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen bei verschiedenen mittleren Werten des Zygoten-Scores. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.



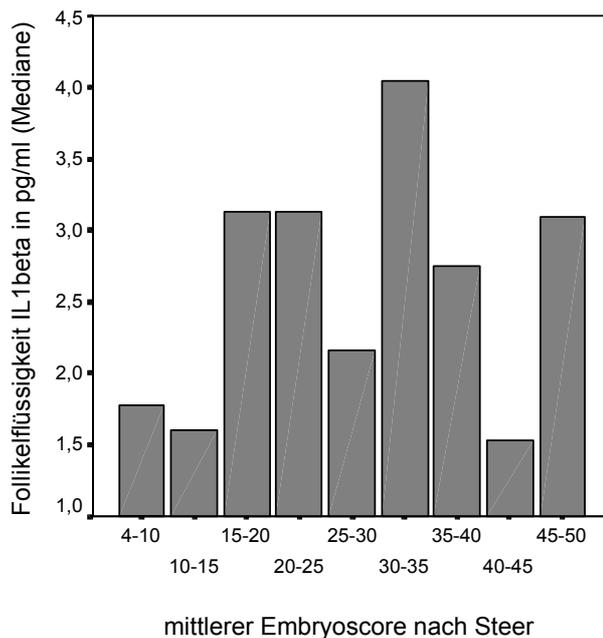
**Abb. 3.4.5.1.1:** Mediane IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit in Abhängigkeit vom mittleren Zygoten-Score.

### **3.4.5.2 Korrelation mit der Embryoqualität am dritten Kulturtag**

In der Spearman'schen Rangkorrelation ergab sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit und dem mittleren Embryo-Score nach Steer:

- rho = 0,043
- p = 0,546

In Abbildung 3.4.5.2.1 sind die medianen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit bei verschiedenen Werten des mittleren Embryo-Scores nach Steer dargestellt. Zwischen den einzelnen Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen.



**Abb. 3.4.5.2.1:** Mediane IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit in Abhängigkeit vom mittleren Embryo-Score nach Steer.

In 13 Fällen hatten alle Embryonen bereits am dritten Kulturtag das kompaktierende oder kompaktierte Stadium erreicht und erhielten bei Bewertung des Embryo-Scores nach Steer den Wert 48. Beim Vergleich der durchschnittlichen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit fiel nur ein geringer, aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen auf:

- Mittlerer Embryo-Score < 48: 2,48 (0,31 – 74,72) pg/ml
- Mittlerer Embryo-Score  $\geq$  48: 2,85 (0,23 – 8,25) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,970$  (U-Test nach Mann und Whitney)

IL-1 $\beta$  in der Follikelflüssigkeit scheint mit der Embryonenmorphologie am dritten Kulturtag nicht in Verbindung zu stehen.

### **3.4.5.3 Korrelation mit der Blastozystenmorphologie am fünften Kulturtag**

Tabelle 3.4.5.3.1 zeigt die Ergebnisse der Spearman'schen Rangkorrelation, mit der eine mögliche Abhängigkeit zwischen IL-1 $\beta$ -Werten in der Follikelflüssigkeit und der mittleren Blastozystenbeurteilung, sowie der Anzahl von Blastozysten und arretierten Embryonen überprüft wurde.

Zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen und den genannten Blastozystendaten bestand kein signifikanter Zusammenhang.

	<b>Mittlere Blastozysten-Beurteilung</b>	<b>Anzahl Blastozysten</b>	<b>Anzahl arretierter Embryonen</b>
<b>IL-1<math>\beta</math>-Konzentration in FF (pg/ml)</b>	rho = -0,097 p = 0,192	rho = 0,022 p = 0,768	rho = -0,044 p = 0,557

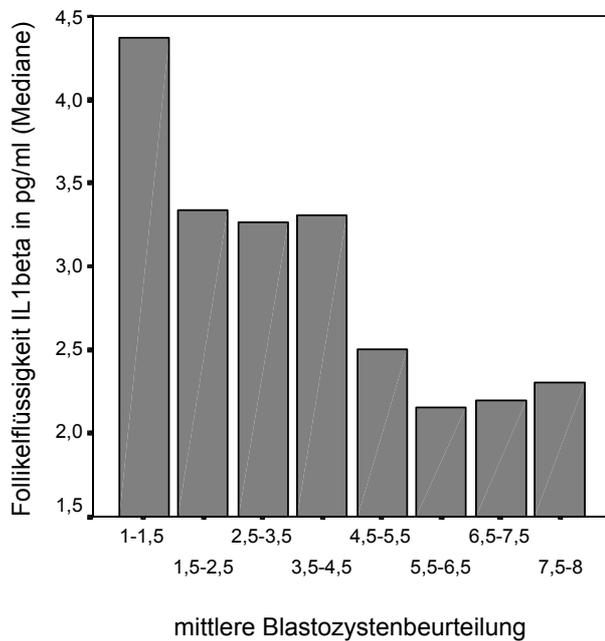
**Tab. 3.4.5.3.1:** Zusammenhang zwischen den IL-1 $\beta$ -Werten in Follikelflüssigkeit und den Blastozystendaten in der Spearman'schen Rangkorrelation.

Aus Abbildung 3.4.5.3.1 wird ersichtlich, dass mit höherer, also schlechterer mittlerer Blastozystenbeurteilung die durchschnittlichen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit immer mehr abnahmen. Je besser die mittlere Blastozystenqualität war, desto höher lagen auch die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit.

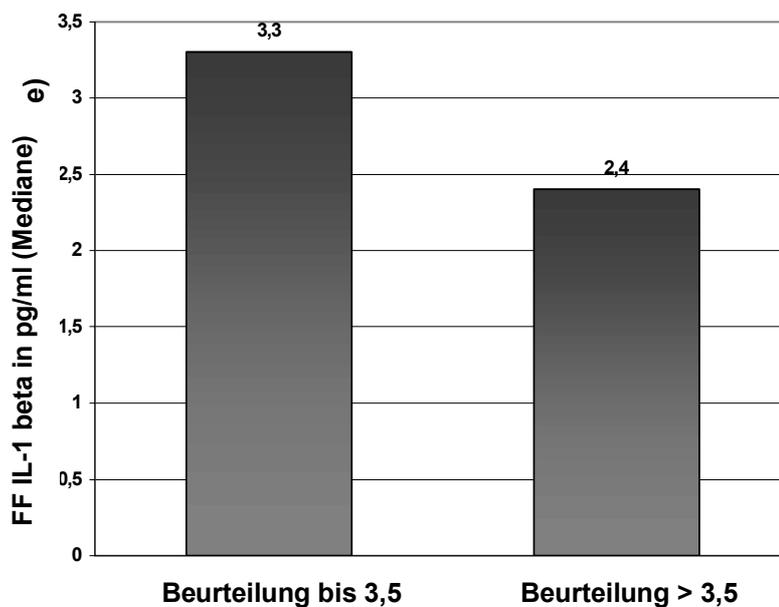
Keine der Gruppen unterschied sich jedoch hinsichtlich der IL-1 $\beta$ -Werte signifikant von einer anderen Gruppe.

Blastozysten mit sehr guter und solche mit schlechterer morphologischer Beurteilung (Grenzwert der mittleren Blastozystenbeurteilung: 3,5) wurden gegenübergestellt. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Follikelflüssigkeit von Frauen, deren Embryonen am fünften Kulturtag mit einem Wert unter 3,5 beurteilt wurden, deutlich höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen enthielt als die der

Vergleichsgruppe (Abb. 3.4.5.3.2). Der Unterschied war allerdings nicht signifikant.



**Abb. 3.4.5.3.1:** Mediane IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit in Abhängigkeit von der mittleren Blastozystenbeurteilung.

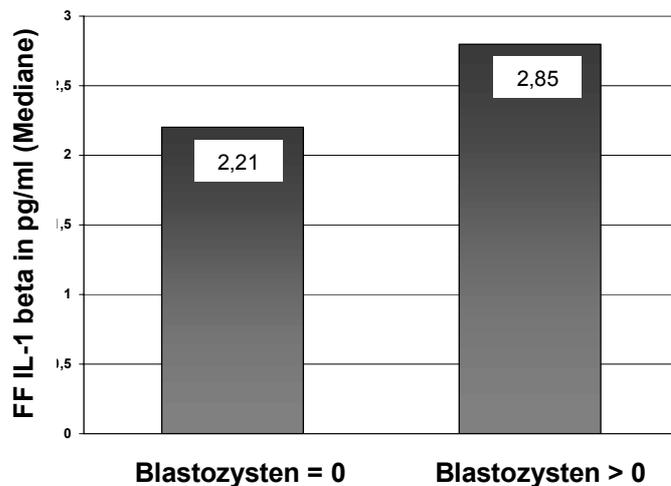


**Abb. 3.4.5.3.2:** IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit bei einer besseren bzw. schlechteren mittleren Blastozystenbeurteilung als 3,5.

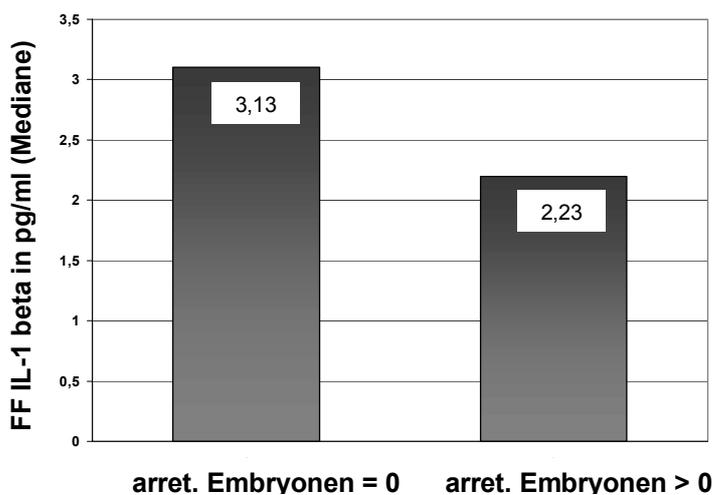
Hatte sich am fünften Kulturtag kein Embryo zu einer Blastozyste entwickelt, so fanden sich in der Follikelflüssigkeit im Durchschnitt niedrigere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen als bei Vorhandensein von Blastozysten (Abb. 3.4.5.3.3).

Die Follikelflüssigkeit von Frauen, bei denen später mindestens ein Embryo in seiner Entwicklung arretiert war, enthielt niedrigere IL-1 $\beta$ -Werte als die der Vergleichsgruppe (Abb. 3.4.5.3.4).

In beiden Fällen konnte allerdings keine Signifikanz des Unterschieds nachgewiesen werden (Tab. 3.4.5.3.2).



**Abb. 3.4.5.3.3:** Mediane IL-1 $\beta$ - Konzentrationen in Follikelflüssigkeit bei späteren Embryokulturen mit und ohne Blastozysten am fünften Kulturtag.



**Abb. 3.4.5.3.4:** Durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit bei Embryokulturen mit und ohne arretierte Embryonen.

	<b>IL-1<math>\beta</math> in FF (pg/ml)</b>	<b>p</b>
<b>Mittl. Blastozysten- beurteilung <math>\leq</math> 3,5 (n = 18)</b>	3,36 (1,12 – 31,0)	0,162
<b>Mittl. Blastozysten- beurteilung <math>&gt;</math> 3,5 (n = 209)</b>	2,42 (0,23 – 74,72)	
<b>Blastozysten = 0 (n = 65)</b>	2,21 (0,23 – 35,63)	0,438
<b>Blastozysten <math>&gt;</math> 0 (n = 116)</b>	2,85 (0,31 - 74,72)	
<b>Arret. Embryonen = 0 (n = 71)</b>	3,13 (0,59 – 74,72)	0,360
<b>Arret. Embryonen <math>&gt;</math> 0 (n = 110)</b>	2,23 (0,23 – 49,46)	

**Tab. 3.4.5.3.2:** durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Follikelflüssigkeit bei verschiedenen Blastozysteneigenschaften. Das p in der letzten Spalte wurde im U-Test nach Mann und Whitney errechnet.

### **3.4.6 Korrelation von Interleukin-1 beta mit den Schwangerschaftsdaten**

Die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit unterschieden sich nicht signifikant zwischen Zyklen, in denen ein Embryotransfer stattfand und Zyklen, in denen kein Embryo transferiert werden konnte.

Auch zwischen der Anzahl der transferierten Embryonen und den IL-1 $\beta$ -Werten bestand kein Zusammenhang. In der Spearman'schen Rangkorrelation zeigten sich folgende Ergebnisse:

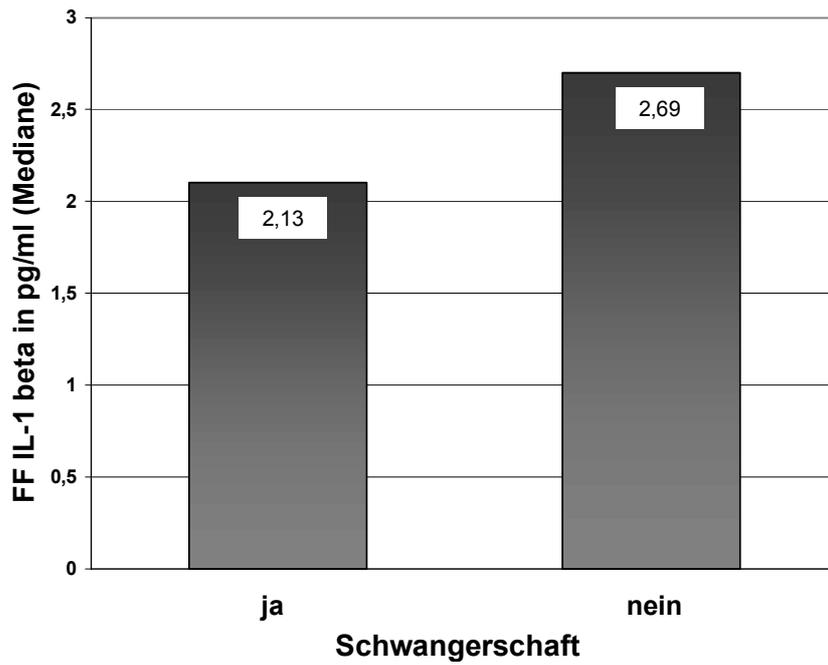
- rho = -0,003
- p = 0,958

Die Follikelflüssigkeit von Frauen, die konzipierten, enthielt im Durchschnitt etwas niedrigere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen als die Follikelflüssigkeit von Patientinnen, die nicht schwanger wurden (Abb. 3.4.6.1):

- spätere Schwangerschaft: 2,13 (0,72 – 27,59) pg/ml
- keine Schwangerschaft: 2,69 (0,23 – 74,72) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz: p = 0,416 (U- Test nach Mann und Whitney)

Zwischen dem Eintritt einer Schwangerschaft und den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit bestand kein signifikanter Zusammenhang.

Bei Vergleich der IL-1 $\beta$ -Werte in Follikelflüssigkeit zwischen Frauen, die ein gesundes Kind zur Welt brachten und Patientinnen, die einen Abort bzw. eine Extrauterin gravidität erlitten, zeigte sich kein Unterschied.



**Abb. 3.4.6.1:** Vergleich der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen bei Frauen, die konzipierten und Frauen, die nicht schwanger wurden.

### **3.5 Steroide und Gonadotropine in der Follikelflüssigkeit**

#### **3.5.1 Konzentrationen von Östradiol, Progesteron, FSH und LH in der Follikelflüssigkeit**

Neben den IL-1 $\beta$ -Werten wurden auch die Konzentrationen der Steroidhormone Östradiol und Progesteron sowie die der Gonadotropine FSH und LH in der Follikelflüssigkeit bestimmt.

Folgende Konzentrationen wurden im Durchschnitt gemessen:

- Östradiol in Follikelflüssigkeit: 566,0 (0,20 - 8930,50) ng/ml
- Progesteron in Follikelflüssigkeit: 13759,8 (7,60 – 34431,70) ng/ml
- LH in Follikelflüssigkeit: 0,0 (0,0 – 2,80) mU/ml
- FSH in Follikelflüssigkeit: 3,5 (0,0 – 22,0) mU/ml

### **3.5.2 Korrelation mit der Zyklusform und dem Stimulationsprotokoll**

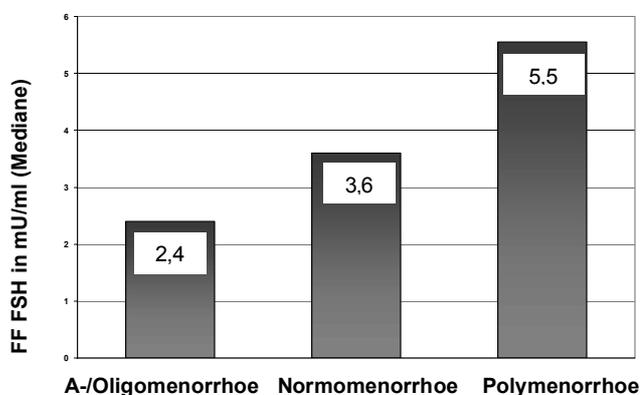
Die durchschnittlichen Hormonwerte in der Follikelflüssigkeit wurden zwischen Patientinnen mit Normomenorrhoe und Patientinnen mit Zyklusanomalien verglichen. Es ließ sich zeigen, dass die Follikelflüssigkeit von Patientinnen mit Amenorrhoe bzw. Oligomenorrhoe signifikant niedrigere FSH- und Progesteron-Konzentrationen enthielt als bei Patientinnen mit Normomenorrhoe (siehe auch Abb. 3.5.2.1). Die LH-Konzentration lag im Durchschnitt jedoch bei signifikant höheren Werten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Amenorrhoe bzw. Oligomenorrhoe häufig durch ein PCO-Syndrom bedingt war.

Tabelle 3.5.2.1 zeigt die medianen Hormonwerte mit Minimum und Maximum bei verschiedenen Zyklusformen.

Der Vergleich zwischen Patientinnen mit A-/Oligomenorrhoe und Frauen mit Normomenorrhoe im U-Test nach Mann und Whitney ergab folgende Signifikanzen:

- Vergleich der Östradiol-Konzentration in FF:  $p = 0,556$
- Vergleich der Progesteron-Konzentrationen in FF:  $p = 0,000^{***}$
- Vergleich der FSH-Konzentrationen in FF:  $p = 0,030^*$
- Vergleich der LH-Konzentrationen in FF:  $p = 0,000^{***}$

Die Hormonwerte von Patientinnen mit Polymenorrhoe zeigten im U-Test keine signifikanten Unterschiede zu den Werten bei anderen Zyklusformen.



**Abb. 3.5.2.1:** Mediane FSH-Konzentration in FF bei Normomenorrhoe bzw. bei Zyklusanomalie.

	<b>Amenorrhoe/ Oligomenorrhoe (n = 20)</b>	<b>Normomenorrhoe (n = 225)</b>	<b>Polymenorrhoe (n = 4)</b>
<b>Östradiol in FF (ng/ml)</b>	493,5 (95,8 – 2969,5)	572,1 (0,2 – 8930,5)	503,3 (384,3 – 689,2)
<b>Progesteron in FF (ng/ml)</b>	9573,4 (1238 – 17807,7)	14256,2 (7,6 – 34431,7)	11209,5 (8317,9 – 19754)
<b>FSH in FF (mU/ml)</b>	2,4 (0,0 – 11,9)	3,6 (0,0 – 22,0)	5,5 (0,7 – 9,8)
<b>LH in FF (mU/ml)</b>	0,1 (0,0 – 1,0)	0,0 (0,0 – 2,8)	0,1 (0,0 – 0,1)

**Tab. 3.5.2.1:** Mediane Steroid- und Gonadotropinkonzentrationen mit Minimum und Maximum bei Normomenorrhoe und Zyklusanomalien.

Bei 154 Patientinnen (60,2 %) wurde die Ovarstimulation mittels FSH durchgeführt, bei 93 Frauen (36,3 %) mittels hMG und in 8 Fällen (3,5 %) erfolgte eine gemischte Stimulation mit FSH und hMG.

Follikelflüssigkeit von Patientinnen, die mit hMG behandelt wurden, enthielt signifikant höhere Konzentrationen von Östradiol und FSH als Follikelflüssigkeit von Frauen mit FSH-Stimulation.

Die durchschnittlichen Werte von Progesteron und LH unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (Tab. 3.5.2.2).

Die Hormonwerte von Patientinnen mit gemischter Stimulationsbehandlung wichen nicht signifikant von den Werten der Vergleichsgruppen ab.

	<b>hMG-Stimulation</b> <b>(n = 93)</b>	<b>FSH-Stimulation</b> <b>(n = 154)</b>	<b>p</b>
<b>Östradiol in FF</b> <b>(ng/ml)</b>	662,1 (178,6 – 2969,5)	480,3 (0,2 – 8930,5)	0,000***
<b>Progesteron in</b> <b>FF (ng/ml)</b>	13692,7 (2614,4 – 23481,9)	13789,3 (7,6 – 34431,7)	0,543
<b>LH in FF</b> <b>(mU/ml)</b>	0,0 (0,0 – 2,8)	0,0 (0,0 – 2,2)	0,440
<b>FSH in FF</b> <b>(mU/ml)</b>	5,3 (1,6 – 22,0)	2,9 (0,0 – 10,2)	0,000***

**Tab. 3.5.2.2:** Vergleich der Steroid- und Gonadotropinkonzentrationen in FF zwischen Patientinnen mit hMG- bzw. FSH-Stimulation. Das p in der letzten Spalte wurde im U-Test nach Mann und Whitney errechnet.

Die Progesteron- und FSH-Werte in der Follikelflüssigkeit zeigten eine Abhängigkeit mit der zur Ovarstimulation verwendeten Gesamtdosis an Gonadotropinen. Je mehr Ampullen hMG oder FSH im Laufe der Stimulationsbehandlung verabreicht wurden, desto höher waren die durchschnittlichen Progesteron- und FSH-Konzentrationen.

In der Spearman'schen Rangkorrelation errechneten sich folgende Korrelationskoeffizienten und p-Werte:

- Anzahl Ampullen – Progesteron in FF: rho = 0,211  
p = 0,001\*\*
- Anzahl Ampullen – FSH in FF: rho = 0,529  
p = 0,000\*\*\*

### **3.5.3 Korrelation mit den Fertilisationsdaten**

Bei Korrelation der Hormonwerte in der Follikelflüssigkeit mit der Anzahl gewonnener Eizellen ließ sich folgender Zusammenhang erkennen:

Je mehr Oozyten bei der Follikelpunktion gewonnen werden konnten, desto niedriger lagen die durchschnittlichen Progesteron-, FSH- und LH-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit.

Zwischen der Östradiol-Konzentration und der Anzahl gewonnener Oozyten bestand keine signifikante Abhängigkeit.

Wurden die Hormonwerte in der Follikelflüssigkeit mit der Fertilisationsrate korreliert, so ergab sich kein signifikanter Zusammenhang (Tab. 3.5.3.1).

Es fiel lediglich auf, dass die Follikelflüssigkeit von Patientinnen, bei denen sich keine Eizelle befruchtete, im Durchschnitt signifikant höhere LH-Konzentrationen enthielt:

- Fertilisationsrate = 0 %: 0,1 (0,0 – 1,6) mU/ml
- Fertilisationsrate > 0 %: 0,0 (0,0 – 2,8) mU/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,017$  (U-Test nach Mann und Whitney)

	<b>Anzahl gewonnener Oozyten</b>	<b>Fertilisationsrate (in %)</b>
<b>Östradiol in FF (ng/ml)</b>	rho = -0,110 p = 0,084	rho = 0,080 p = 0,214
<b>Progesteron in FF (ng/ml)</b>	rho = -0,177 p = 0,005**	rho = -0,092 p = 0,151
<b>LH in FF (mU/ml)</b>	rho = -0,181 p = 0,004**	rho = -0,032 p = 0,613
<b>FSH in FF (mU/ml)</b>	rho = -0,207 p = 0,001**	rho = -0,002 p = 0,980

**Tab. 3.5.3.1:** Korrelationen zwischen Hormonwerten in der Follikelflüssigkeit und Anzahl der gewonnenen Oozyten bzw. der Fertilisationsrate.

### **3.5.4 Korrelation mit der Embryonenmorphologie**

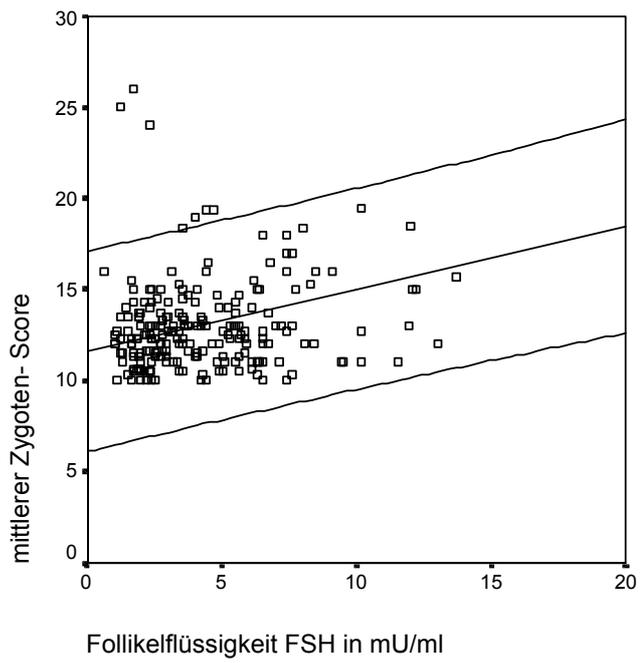
Wie aus Tabelle 3.5.4.1 ersichtlich wird, bestand zwischen den Steroiden und Gonadotropinen in der Follikelflüssigkeit und der Embryonenmorphologie bis auf zwei Ausnahmen kein signifikanter Zusammenhang.

Die FSH-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und der mittlere Zygoten-Score waren aber positiv miteinander korreliert. Hohe FSH-Werte gingen also im Durchschnitt mit einer schlechteren Zygoten-Qualität einher (Abb. 3.5.4.1).

Eine signifikante negative Abhängigkeit konnte zwischen den LH-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit und dem mittleren Embryo-Score nach Steer festgestellt werden. Hohe LH-Werte waren folglich mit einer durchschnittlich schlechteren morphologischen Beurteilung der Embryonen am dritten Kulturtag assoziiert.

	<b>Mittlerer Zygoten-Score</b>	<b>Mittlerer Embryo-Score nach Steer</b>	<b>Mittlere Blastozysten- beurteilung</b>
<b>Östradiol in FF (ng/ml)</b>	rho = -0,026 p = 0,700	rho = 0,004 p = 0,951	rho = -0,560 p = 0,431
<b>Progesteron in FF (ng/ml)</b>	rho = 0,059 p = 0,389	rho = -0,109 p = 0,111	rho = 0,004 p = 0,958
<b>LH in FF (mU/ml)</b>	rho = 0,037 p = 0,589	rho = -0,156 p = 0,022*	rho = 0,027 p = 0,705
<b>FSH in FF (mU/ml)</b>	rho = 0,171 p = 0,012*	rho = -0,430 p = 0,528	rho = 0,064 p = 0,362

**Tab. 3.5.4.1:** Korrelationen zwischen den Hormonwerten in der Follikelflüssigkeit und der Embryomorphologie.



**Abb.3.5.4.1:** Zusammenhang zwischen FSH-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und mittlerem Zygoten-Score.

### **3.5.5 Korrelation mit den Schwangerschaftsdaten**

Weder die Steroid- noch die Gonadotropinkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit zeigten einen Zusammenhang mit der Schwangerschaftsrate.

Die durchschnittlichen Hormonkonzentrationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen Frauen, die konzipierten und Frauen, die nicht schwanger wurden (Tab. 3.5.5.1).

Auch der Schwangerschaftsausgang (gesundes Kind bzw. Abort/EUG) war nicht mit den Hormonwerten in der Follikelflüssigkeit korreliert.

	<b>Schwanger (n = 44)</b>	<b>Nicht schwanger (n = 212)</b>	<b>p</b>
<b>Östradiol in FF (ng/ml)</b>	554,5 (95,8 – 1540,7)	568,9 (0,2 – 8930,5)	0,741
<b>Progesteron in FF (ng/ml)</b>	13054,7 (2614,4 – 22632,8)	13916,7 (7,6 – 34431,7)	0,283
<b>LH in FF (mU/ml)</b>	0,0 (0,0 – 0,4)	0,0 (0,0 – 2,8)	0,284
<b>FSH in FF (mU/ml)</b>	3,1 (1,1 – 11,5)	3,6 (0,0 – 22,0)	0,545

**Tab. 3.5.5.1:** Hormonkonzentrationen (Median, Maximum und Minimum) im Vergleich zwischen Frauen, die konzipierten und Frauen, die nicht schwanger wurden. Das p in der letzten Spalte bezieht sich auf die Signifikanz des Unterschieds im U-Test.

### **3.6 Korrelation zwischen Interleukin-1 beta- und Hormonwerten in der Follikelflüssigkeit**

Eine mögliche Korrelation zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen und den Werten von Östradiol, Progesteron, FSH und LH in der Follikelflüssigkeit wurde mit der Spearman'schen Rangkorrelation überprüft.

Tabelle 3.6.1 zeigt die Korrelationskoeffizienten rho und die zugehörigen Signifikanzen.

Sowohl zwischen den Konzentrationen von Steroiden und IL-1 $\beta$  als auch zwischen den Werten von Gonadotropinen und IL-1 $\beta$  in der Follikelflüssigkeit bestand kein signifikanter Zusammenhang.

	<b>Östradiol in FF (ng/ml)</b>	<b>Progesteron in FF (ng/ml)</b>	<b>LH in FF (mU/ml)</b>	<b>FSH in FF (mU/ml)</b>
<b>IL-1<math>\beta</math> in FF (pg/ml)</b>	rho = 0,117 p = 0,080	rho = 0,060 p = 0,375	rho = -0,090 p = 0,179	rho = 0,062 p = 0,355

**Tab. 3.6.1:** Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$ - und Hormonwerten in der Follikelflüssigkeit.

### **3.7 Interleukin-1 beta im Embryo-Kulturmedium : 3. Kulturtag**

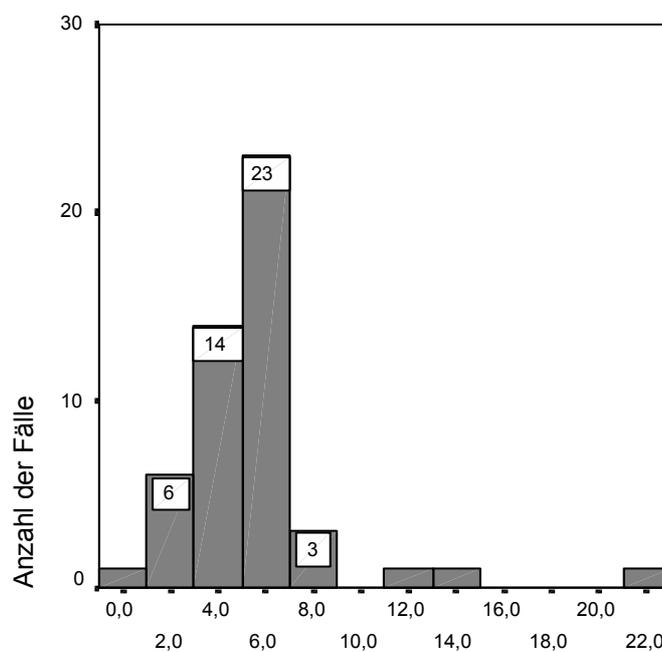
#### **3.7.1 Interleukin-1 beta-Konzentrationen im Tag 3-Medium**

In 50 Fällen wurden die Überstände von Embryo-Kulturmedien am Tag 3 der Kultur gewonnen und die darin enthaltenen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen bestimmt.

Der mediane Wert der IL-1 $\beta$  -Konzentration in Kulturmedium vom Tag 3 betrug 5,03 pg/ml.

Das Minimum der gemessenen Werte lag bei 0,42 pg/ml, das Maximum bei 22,22 pg/ml.

Abbildung 3.7.1.1 zeigt die Verteilung der gemessenen IL-1 $\beta$ -Werte:



**Abb. 3.7.1.1:** Histogramm der IL-1 $\beta$ -Werte in pg/ml. Messung in Überständen von Kulturmedien am Tag 3.

### **3.7.2 Korrelation von Interleukin-1 beta-Werten im Kulturmedium mit der Embryonenmorphologie am Tag 3**

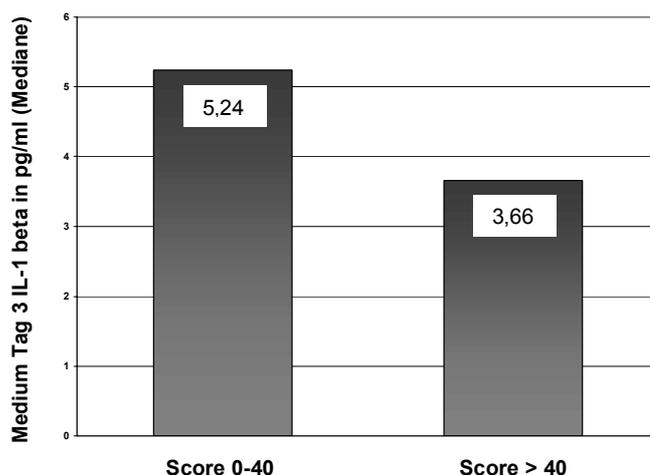
Die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium wurden mit den Werten des mittleren Embryo-Scores nach Steer korreliert. In der Spearman'schen Rangkorrelation ergaben sich folgende Ergebnisse:

- $\rho = -0,145$
- $p = 0,314$

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Embryonenmorphologie am Tag 3 und den zugehörigen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium.

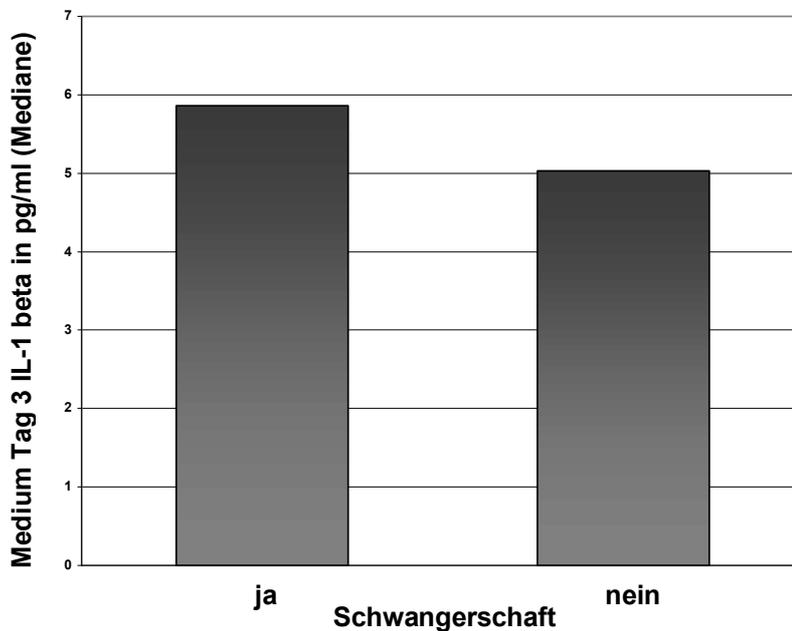
Lag der mittlere Embryo-Score jedoch bei Werten über 40, so war die durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentration im Kulturmedium deutlich niedriger als bei Embryonen mit einem schlechteren Score (Abb. 3.7.2.1). Es wurden folgende IL-1 $\beta$ -Werte gemessen (Median, Minimum und Maximum):

- Mittlerer Embryo-Score  $\leq 40$ : 5,24 (0,42 - 22,22) pg/ml
- Mittlerer Embryo-Score  $> 40$ : 3,66 (1,19 - 8,04) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,060$  (U-Test nach Mann und Whitney)



**Abb. 3.7.2.1:** mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration im Kulturmedium bei Embryo-Score nach Steer mit Werten  $\leq 40$  bzw.  $> 40$ .

### **3.7.3 Korrelation von Interleukin-1 beta im Tag 3-Medium mit der Schwangerschaftsrate**



**Abb. 3.7.3.1:** Mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration im Kulturmedium bei schwangeren Frauen und Frauen, die nicht konzipierten.

Abbildung 3.7.3.1 zeigt die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Vergleich zwischen schwangeren und nicht-schwangeren Patientinnen.

Bei Frauen, die konzipierten, fanden sich am Tag 3 im Durchschnitt höhere IL-1 $\beta$ -Werte im Kulturmedium. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war allerdings nicht signifikant:

- Eintritt einer Schwangerschaft: 5,86 (1,19 – 12,80) pg/ml
- keine Schwangerschaft: 5,03 (0,42 – 22,22) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,540$  (U-Test nach Mann und Whitney)

Weder die Schwangerschaftsrate noch der Schwangerschaftsausgang (gesundes Kind bzw. Abort/EUG) zeigte eine signifikante Korrelation mit den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium am Tag 3.

### **3.8 Interleukin-1 beta im Embryo-Kulturmedium : 5. Kulturtag**

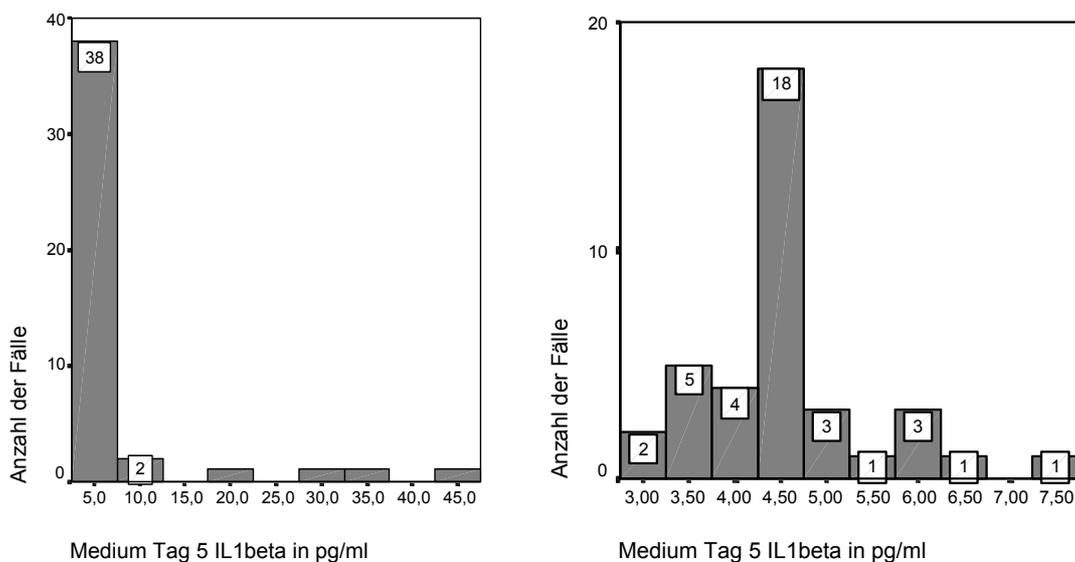
#### **3.8.1 Interleukin-1 beta-Konzentrationen im Tag 5-Medium**

In 44 Fällen wurden die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Überständen von Tag 5-Medien der Blastozystenkultur bestimmt.

Der mediane Wert der IL-1 $\beta$ -Konzentration betrug 4,45 pg/ml.

Das Minimum der gemessenen Werte lag bei 2,88 pg/ml und das Maximum betrug 47,20 pg/ml.

Abb. 3.8.1.1 zeigt die Verteilung der gemessenen IL-1 $\beta$ -Werte im Tag 5-Kulturmedium:



**Abb. 3.8.1.1:** Histogramm der IL-1 $\beta$ -Werte in pg/ml. Messung in Überständen von Kulturmedien am Tag 5. Das rechte Histogramm zeigt als Ausschnitt die Verteilung der IL-1 $\beta$ -Werte < 8 pg/ml.

### **3.8.2 Korrelation von Interleukin-1 beta im Tag 5-Kulturmedium mit der Blastozystenmorphologie**

Die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 5-Kulturmedium wurden mit der mittleren Blastozystenbeurteilung und der Anzahl der Blastozysten und arretierten Embryonen korreliert. Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge ermittelt werden.

Tabelle 3.8.2.1 zeigt den Korrelationskoeffizienten Spearman-rho und den zugehörigen p-Wert.

	<b>Mittlere Blastozysten-Beurteilung</b>	<b>Anzahl Blastozysten</b>	<b>Anzahl arretierter Embryonen</b>
<b>IL-1<math>\beta</math>-Konzentration in Tag 5-Medium (pg/ml)</b>	rho = -0,242 p = 0,113	rho = 0,153 p = 0,323	rho = -0,162 p = 0,292

**Tab. 3.8.2.1:** Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$ -Werten und Blastozystendaten in der Spearman'schen Rangkorrelation.

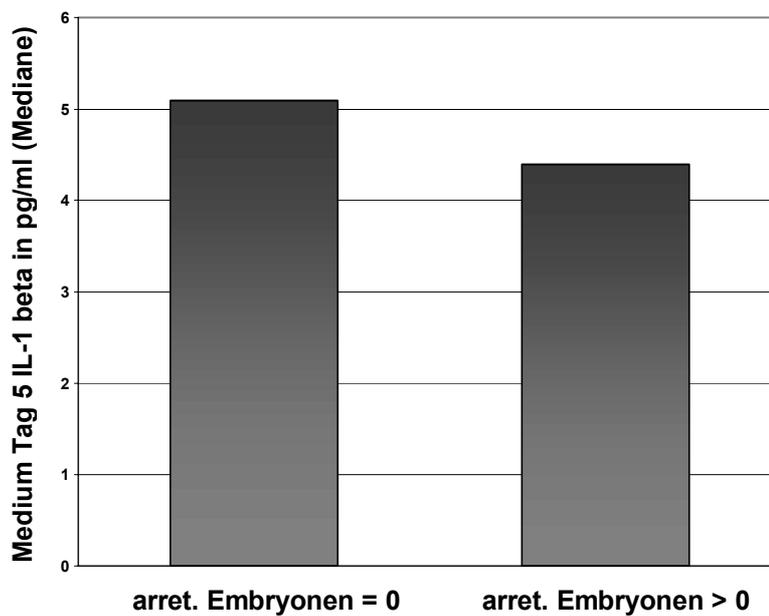
In 39 % der Fälle hatte am fünften Kulturtag kein Embryo das Blastozystenstadium erreicht. Die medianen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen wurden zwischen Zyklen mit und ohne Vorhandensein von Blastozysten am Tag 5 verglichen:

- Anzahl der Blastozysten = 0: 4,36 (3,52 – 9,98) pg/ml
- Anzahl der Blastozysten > 0: 4,54 (2,88 – 47,20) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz: p = 0,688 (U-Test nach Mann und Whitney)

Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

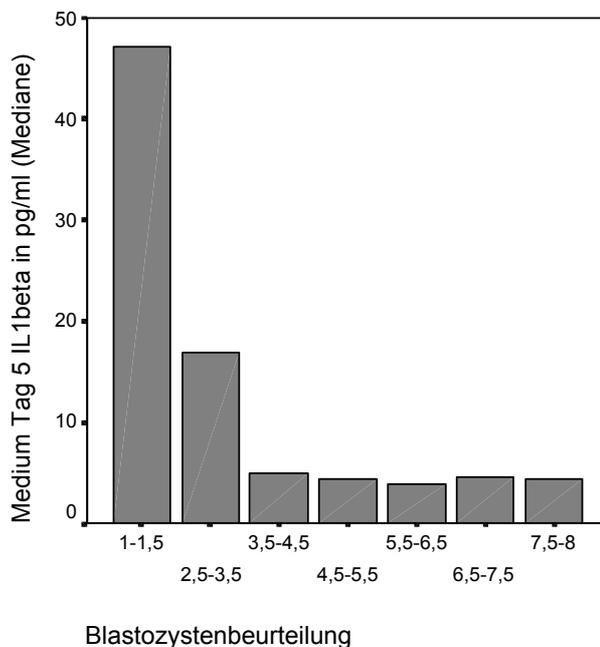
Beim Vergleich von Embryokulturen mit und ohne Vorhandensein arretierter Embryonen am Tag 5 zeigte sich folgender Unterschied der medianen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium:

Es ließ sich feststellen, dass die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium bei Vorhandensein arretierter Embryo-Stadien niedriger waren als in der Vergleichsgruppe. Im U-Test zeigte der Unterschied aber keine Signifikanz.



**Abb. 3.8.2.1:** Vergleich der medianen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Kulturen mit und ohne arretierte Embryonen.

Abbildung 3.8.2.2 zeigt die durchschnittlichen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium bei verschiedenen mittleren Blastozystenbeurteilungen. Es wird deutlich, dass im Medium von Blastozysten mit einer sehr guten morphologischen Bewertung höhere IL-1 $\beta$ -Werte vorlagen als in der Gruppe mit geringerer morphologischer Qualität.

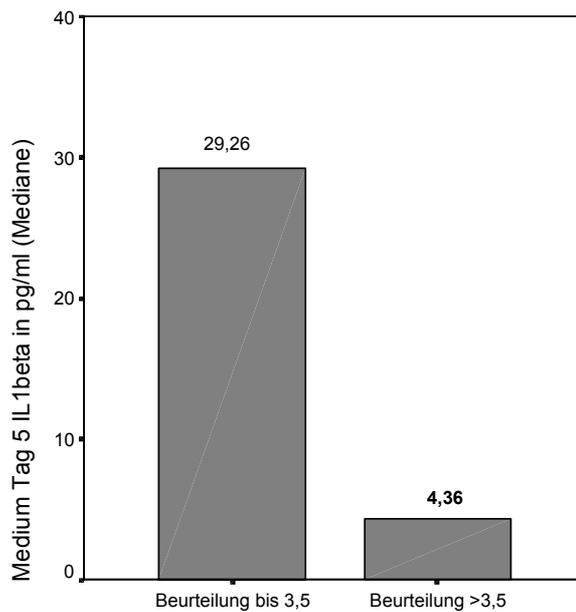


**Abb. 3.8.2.2:** IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Kulturmedium bei verschiedenen mittleren Blastozystenbeurteilungen.

Bei Gegenüberstellung von Blastozysten sehr guter und solcher mit schlechterer morphologischer Beurteilung (Grenzwert der mittleren Blastozystenbeurteilung: 3,5) ergaben sich im Median folgende IL-1 $\beta$ -Werte:

- Blastozystenbeurteilung  $\leq$  3,5: 29,26 (4,54 – 47,20) pg/ml
- Blastozystenbeurteilung  $>$  3,5: 4,36 (2,88 – 36,81) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,041^*$  (U-Test nach Mann und Whitney)

Es ließ sich zeigen, dass im Tag 5-Medium von Blastozysten mit einer hohen morphologischen Qualität und einer mittleren Blastozystenbeurteilung von 3,5 oder besser signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Werte vorlagen als beim Restkollektiv.



**Abb. 3.8.2.3:** IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Kulturmedium bei einer besseren bzw. schlechteren mittleren Blastozystenbeurteilung als 3,5.

Signifikante Unterschiede in der Blastozystenqualität zwischen Embryokulturen mit niedrigen IL-1 $\beta$ -Werten im Tag 5-Medium und Kulturen mit höheren IL-1 $\beta$ -Konzentrationen als 18 pg/ml konnten nachgewiesen werden (Tab. 3.8.2.2).

	IL-1 $\beta$ < 18 pg/ml (n = 40)	IL-1 $\beta$ $\geq$ 18 pg/ml (n = 4)	p
<b>Mittlere Blastozystenbeurteilung</b>	6,0 (3,50 – 8,0)	3,75 (1,33 – 5,0)	0,002**
<b>Anzahl der Blastozysten</b>	1,0 (0 – 3)	2,0 (1 – 3)	0,036*
<b>Anzahl arretierter Embryonen</b>	1,0 (0 – 2)	0,0 (0 – 1)	0,028*

**Tab. 3.8.2.2:** Blastozystendaten bei Kulturmedien mit IL-1 $\beta$ -Konzentrationen < 18 bzw.  $\geq$  18 pg/ml. Das p in der letzten Spalte bezieht sich auf die Signifikanz des Unterschieds im U-Test nach Mann und Whitney.

Es zeigte sich, dass hohe IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Medium vom Tag 5 der Blastozystenkultur mit einer guten morphologischen Qualität der Embryonen assoziiert sind. Es konnten signifikant bessere mittlere Blastozystenbeurteilungen, eine höhere Anzahl von Blastozysten und eine geringere Anzahl arretierter Embryonen nachgewiesen werden. In dieser Studie lag die Grenzkonzentration bei 18 pg/ml.

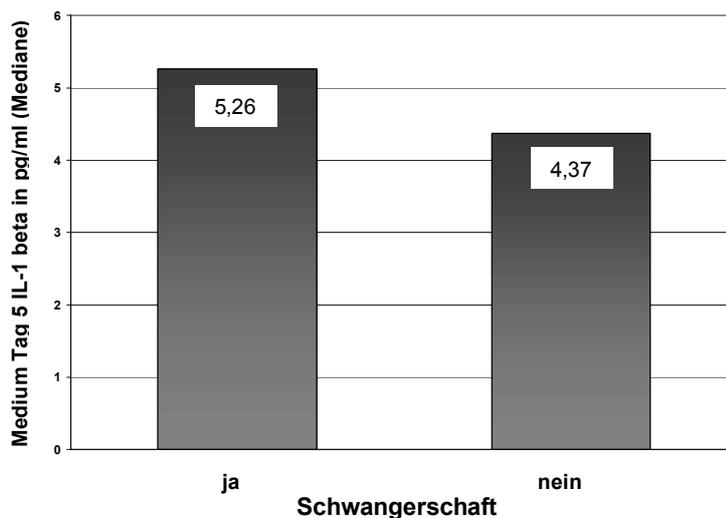
Die Schwangerschaftsrate zeigte zwischen den beiden Gruppen jedoch keinen signifikanten Unterschied.

### **3.8.3 Korrelation von Interleukin-1 beta im Tag 5-Medium mit der Schwangerschaftsrate**

Die mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration im Tag 5-Kulturmedium unterschied sich zwischen Zyklen mit und ohne Eintritt einer Gravidität auf folgende Weise:

- Eintritt einer Schwangerschaft: 5,26 (4,37 – 47,20) pg/ml
- keine Schwangerschaft: 4,37 (2,88 – 36,81) pg/ml
- Prüfung des Unterschieds auf Signifikanz:  $p = 0,205$  (U-Test nach Mann und Whitney)

Bei Frauen, die konzipierten, lagen im Durchschnitt höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium vor als bei Frauen, die nicht schwanger wurden (Abb. 3.8.3.1). Der Unterschied war nicht signifikant.



**Abb. 3.8.3.1:** mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration im Tag 5-Kulturmedium bei schwangeren Frauen und Frauen, die nicht konzipierten.

Auch zwischen Patientinnen, die ein gesundes Kind bekamen und Patientinnen, die einen Abort oder eine EUG erlitten, bestanden keine signifikanten Unterschiede der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 5-Kulturmedium.

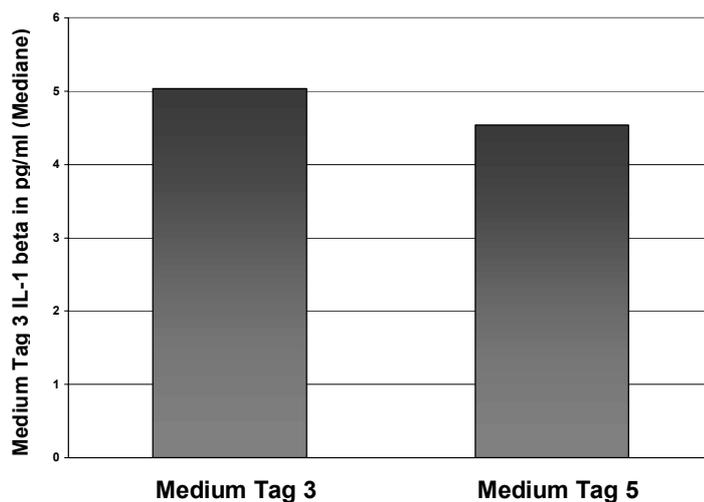
IL-1 $\beta$  im Tag 5-Kulturmedium scheint nicht mit der Schwangerschaftsrate und dem Schwangerschaftsausgang assoziiert zu sein.

### **3.9 Zusammenhang zwischen IL-1 beta-Werten im Tag 3- und im Tag 5-Kulturmedium**

In 39 IVF- oder ICSI-Zyklen wurden die Überstände sowohl vom Tag 3- als auch vom Tag 5-Embryokulturmedium gewonnen.

Die mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration im Tag 3-Kulturmedium betrug in diesen Fällen 5,03 pg/ml. Das Minimum der gemessenen Werte lag bei 1,19 pg/ml, das Maximum bei 13,05 pg/ml.

Wie Abbildung 3.9.1 verdeutlicht, war die durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentration im Tag 5-Medium war niedriger als die im Tag 3-Medium. Der mediane Wert betrug 4,54 pg/ml. Der Messbereich erstreckte sich zwischen 2,88 pg/ml (Minimum) und 47,20 pg/ml (Maximum).

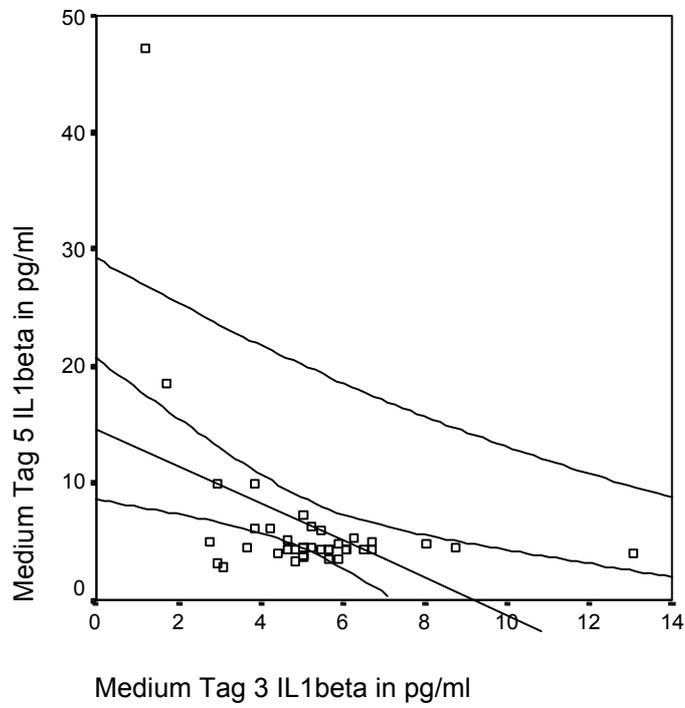


**Abb. 3.9.1:** Mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration in pg/ml im Tag 3- und Tag 5-Kulturmedium des selben Patientenkollektivs.

Der Test auf Abhängigkeit zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 3- und Tag 5-Kulturmedium des selben Patientenkollektivs erfolgte mit Hilfe der Spearman'schen Rangkorrelation:

- $\rho = -0,241$
- $p = 0,139$

Es bestand eine negative, aber nicht signifikante Korrelation zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 3- und im Tag 5-Medium (Abb. 3.9.2).



**Abb. 3.9.2:** Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 3- und Tag 5-Kulturmedium des selben Patientenkollektivs.

Tabelle 3.9.1 zeigt die medianen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 3- und Tag 5-Kulturmedium bei Vorhandensein von Embryonen mit guter bzw. schlechterer Morphologie.

Lag der mittlere Embryo-Score nach Steer bei sehr hohen Werten (> 40), so waren die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 3-Medium niedriger, die im Tag 5-Medium aber höher als in der Vergleichsgruppe mit schlechterer morphologischer Beurteilung.

Hatte sich nach 5 Tagen Kulturdauer mindestens ein Embryo zu einer Blastozyste entwickelt, so zeigten auch hier die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 3-Medium niedrigere, die im Tag 5-Medium aber höhere Werte als in der Vergleichsgruppe ohne Blastozysten.

In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen zeigte sich, dass das Vorhandensein arretierter Embryonen am fünften Kulturtag mit höheren IL-1 $\beta$ -Werten im Tag 3-Medium und mit niedrigeren Werten im Tag 5-Medium als im Vergleichskollektiv ohne arretierte Embryonen vergesellschaftet war.

Eine hohe morphologische Qualität der Embryonen war also mit niedrigen IL-1 $\beta$ -Werten im Tag 3-Kulturmedium und mit hohen Werten im Tag 5-Medium assoziiert.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen von Tag 3 und Tag 5 zeigte sich nur bei Kulturen, bei denen keine arretierten Embryonen vorhanden waren. In diesen Fällen bestand eine signifikant negative Korrelation zwischen den Tag 3- und Tag 5-Werten.

	<b>IL-1<math>\beta</math> in Tag 3- Kulturmedium (pg/ml)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math> in Tag 5- Kulturmedium (pg/ml)</b>	<b>Spearman- rho p</b>
<b>Embryo-Score <math>\leq</math> 40 (n = 36)</b>	5,14 (1,72 – 13,05)	4,36 (2,88 – 18,62)	rho = -0,196 p = 0,252
<b>Embryo-Score &gt; 40 (n = 3)</b>	3,66 (1,19 – 8,04)	4,72 (4,54 – 47,20)	rho = -0,50 p = 0,667
<b>Blastozysten = 0 (n = 16)</b>	5,34 (2,93 – 13,05)	4,45 (3,52 – 9,98)	rho = -0,339 p = 0,20
<b>Blastozysten &gt; 0 (n = 23)</b>	5,03 (1,19 – 8,72)	4,54 (2,88 – 47,20)	rho = -0,198 p = 0,365
<b>Arret. Embryonen = 0 (n = 8)</b>	4,53 (1,19 – 8,72)	4,81 (3,52 – 47,20)	rho = -0,743 p = 0,035*
<b>Arret. Embryonen &gt; 0 (n = 31)</b>	5,23 (2,75 – 13,05)	4,36 (2,88 – 9,98)	rho = -0,063 p = 0,737

**Tab. 3.9.1:** IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (Mediane, Minima und Maxima) im Tag 3- und Tag 5-Kulturmedium bei unterschiedlicher Qualität der Embryomorphologie. Um die Abhängigkeit zwischen Tag 3- und Tag 5-Werten innerhalb der verschiedenen Gruppen zu überprüfen, wurde die Spearman'sche Rangkorrelation gerechnet. In der letzten Tabellenspalte sind der Korrelationskoeffizient rho und die zugehörige Signifikanz p angegeben.

## **4. Diskussion**

### **4.1. IL-1 beta in der Follikelflüssigkeit und dessen Einfluß auf das IVF-/ ICSI-Ergebniss**

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass zwischen dem Immunsystem und dem Reproduktionssystem eine enge Verbindung besteht und neben Hormonen auch Zytokine und Wachstumsfaktoren den Fortpflanzungsprozess maßgeblich beeinflussen. Harkin et al. (1994) konnten zum Beispiel zeigen, dass menschliche Follikelflüssigkeit chemotaktische Anziehung auf neutrophile Granulozyten ausübt, die in ovulatorischen Zyklen deutlich stärker ausgeprägt ist als in nicht-ovulatorischen Zyklen. Andere Autoren vermuteten, dass Veränderungen der Follikelflüssigkeit oder der Funktion folliculärer Zellen das Entwicklungspotential menschlicher Oozyten sowohl auf chromosomaler als auch zellulärer Ebene beeinflussen können (Nayudu et al., 1989; Artini et al., 1994 und Van Blerkom, 1996). Sowohl für IL-1 als auch zahlreiche andere Zytokine sind Interaktionen mit den ovariellen Reproduktionsprozessen bekannt (Best and Hill, 1995).

Khan et al. (1988) wiesen zum ersten Mal IL-1-Aktivität in menschlicher Follikelflüssigkeit nach. Auch Barak et al. (1992b), Wang und Norman (1992), Huyser et al. (1994), Watanabe et al. (1994), Tao et al. (1997), Karagouni et al. (1998), Loret de Mola et al. (1998), Büscher et al. (1999), Mendoza et al. (1999 und 2002), Barrionuevo et al. (2000) und Wang et al. (2002) berichteten in den folgenden Jahren über das Vorkommen von IL-1 in präovulatorischer Follikelflüssigkeit von IVF-/ICSI-Patientinnen und sind somit in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie.

Hurwitz et al. (1992) gelang der Nachweis des kompletten IL-1-Systems mit Liganden, Rezeptor und Rezeptor-Antagonist im Ovar. IL-1-Transkripte konnten vor dem zwölften Zyklustag nur in Gonadotropin-stimulierten Zyklen gefunden werden, nicht dagegen in unstimulierten Zyklen. Die IL-1-Expression im Ovar scheint also hormonabhängig zu sein. In der Zyklusmitte kommt es sowohl im Ovar (Hurwitz et al., 1992) als auch im peripheren Blut (Polan et al., 1994) zu

einem Anstieg der IL-1 mRNA-Expression. Dies weist auf eine Beteiligung von IL-1 an präovulatorischen Ereignissen oder an der Ovulation selbst hin.

Verschiedene Arbeiten beschäftigten sich mit der Herkunft des follikulären IL-1: Makrophagen als typische Immunzellen tragen auch im Ovar zur IL-1 $\beta$ -Produktion bei (Machelon et al., 1995). Sie kommen sowohl in menschlicher Follikelflüssigkeit (Loukides et al., 1990) als auch im Corpus luteum vor (Lei et al., 1991).

Auch das Kulturmedium von unfertilisierten Eizellen enthält in den ersten 24 Stunden in vitro hohe Konzentrationen von IL-1 (Zolti et al., 1991). Im Medium von separat kultivierten Cumuluszellen fanden sich ebenfalls hohe IL-1-Werte. Interessanterweise kam es bei Zugabe von Spermien, die den Corona-Cumulus-Komplex enzymatisch auflösen, zu einem drastischen Abfall der IL-1-Sekretion ins Medium. De los Santos et al. (1998) konnten schließlich durch molekulare Methoden eine IL-1 $\beta$  mRNA-Expression von menschlichen Cumuluszellen nachweisen.

Die Hauptlokalisationen des IL-1-Systems im menschlichen Ovar scheinen aber Granulosazellen zu sein, deren IL-1 $\beta$ -Produktion von zahlreichen Autoren beschrieben wurde (Barak et al., 1992a; Piquette et al., 1994; Machelon et al., 1995; Jasper et al., 1995 und Carberg et al., 2000).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, übt IL-1 im Ovar verschiedene Funktionen aus. Im Folgenden soll aber besonders der Einfluss von IL-1 auf die Eizellreifung und spätere Befruchtungsfähigkeit sowie Embryoentwicklung diskutiert werden. Bereits das Vorhandensein von IL-1 $\beta$  in präovulatorischer Follikelflüssigkeit lässt vermuten, dass dieses Zytokin an der Eizellentwicklung und Ovulation beteiligt ist. Watanabe et al. (1994) berichteten bei IVF-Patientinnen über einen Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$  in Follikelflüssigkeit und der Eizellreifung. Mit zunehmendem Reifungsgrad der Oozyten stiegen die follikulären IL-1 $\beta$ -Konzentrationen immer mehr an. In Follikeln, aus denen keine Eizellen gewonnen werden konnten, zeigten sich signifikant niedrigere Werte als in Follikeln mit reifen Eizellen. Eine ähnliche Studie von Mendoza et al. (1999) konnte diesen Zusammenhang allerdings nicht bestätigen.

Zwischen IL-1 $\beta$  und den Prostaglandinen E<sub>2</sub> und F<sub>2 $\alpha$</sub>  in der Follikelflüssigkeit besteht eine signifikante Korrelation (Watanabe et al., 1994). Prostaglandine scheinen wiederum an der Eizellreifung beteiligt zu sein (Seibel et al., 1984), so dass IL-1 $\beta$  über diese Mediatoren die Entwicklung der Oozyten indirekt beeinflussen könnte. Karagouni et al. (1998) berichteten bei IVF-Patientinnen über eine positive Korrelation zwischen IL-1 $\beta$ - und Östradiol-Werten im Serum. Auch dies könnte ein Hinweis sein, dass IL-1 $\beta$  die Follikelreifung fördert. Bei kultivierten Granulosazellen vom Schwein stimuliert IL-1 die Zellteilung während des Follikelwachstums (Fukuoka et al., 1989).

Die intrafollikulären Konzentrationen verschiedener Zytokine könnten nicht nur die Eizellentwicklung vor der Ovulation sondern auch deren spätere Befruchtungsfähigkeit beeinflussen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass IL-1 $\beta$  in der Follikelflüssigkeit mit der Fertilisationsrate assoziiert ist: die Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen mit Befruchtungsraten über 90% enthielt signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Werte als die der Vergleichsgruppe mit schlechterer Fertilisation. Diese Feststellung ist in Übereinstimmung mit einer Studie von Mendoza et al. (1999) bei ICSI-Behandlungen: auch hier kamen Eizellen mit normaler Befruchtung und Weiterentwicklung zu Zygoten aus Follikeln mit signifikant höheren IL-1-Konzentrationen als Oozyten mit Fertilisationsversagen. In diese Studie wurden nur Eizellen eingeschlossen, die sich zum Zeitpunkt der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion in der gleichen Entwicklungsphase (Metaphase II) befanden.

Es können verschiedene Ansätze diskutiert werden, um die mögliche Wirkung von IL-1 auf die Eizellqualität und deren spätere Befruchtungsfähigkeit zu erklären. Es ist bekannt, dass IL-1 im Zusammenspiel mit TNF $\alpha$  die Permeabilität von Blutgefäßen steigern kann (Dinarello, 1988). Im Ovar könnte eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit das Eindringen zirkulierender Gonadotropine in die Follikel erleichtern. IL-1 könnte auf diesem Weg die physiologische Wirkung von FSH und LH auf die Follikelreifung unterstützen. IL-1 und TNF $\alpha$  besitzen weiterhin eine hemmende Wirkung auf die FSH-induzierte Östradiol-Produktion von Granulosazellen (Fukuoka et al., 1992; Watanabe et al., 1994

und Best und Hill, 1995). Diese beiden Zytokine könnten gegen Ende der Follikelphase im Ovar zur physiologischen Umstellung der Steroidproduktion von Östradiol auf Progesteron beitragen. IL-1 $\beta$  scheint außerdem die Bildung von NO in Follikelflüssigkeit zu stimulieren (Tao et al., 1997) und könnte auch über diesen Mechanismus die Oozyten beeinflussen.

Andere Autoren, die ebenfalls IL-1 in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen bestimmten, konnten keinen Zusammenhang mit der Fertilisationsrate feststellen (Barak et al., 1992b; Bili et al., 1998 und Barrionuevo et al., 2000). Wodurch sich die widersprüchlichen Studienergebnisse erklären lassen, bleibt unklar. Möglicherweise führen kleine Unterschiede der Stimulationsprotokolle aber auch die geringe Patientenzahl mancher Studien zu nicht vergleichbaren Ergebnissen. Weiterhin bleibt anzumerken, dass eine erfolgreiche Befruchtung nicht nur auf weibliche Parameter zurückzuführen ist, sondern auch von der Spermienqualität maßgeblich beeinflusst wird.

Mendoza et al. (1999) stellten fest, dass Embryonen, die am zweiten Kulturtag eine normale morphologische Entwicklung und schnelle Teilungsfähigkeit besaßen, aus Follikeln mit signifikant höheren IL-1 $\beta$ -Konzentrationen stammten. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Tiermodellen (Adashi et al., 1990). Mehrere Studien an IVF-/ICSI-Patientinnen konnten den Zusammenhang zwischen IL-1 in Follikelflüssigkeit und der Embryoqualität allerdings nicht bestätigen (Barak et al., 1992b; Bili et al., 1998 und Barrionuevo et al., 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit waren die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit weder mit der Zygotenqualität noch mit der Embryomorphologie am dritten und fünften Kulturtag assoziiert. Da in den oben zitierten Studien die Embryonen nicht bis zum fünften Tag nach Insemination kultiviert wurden, kann über den Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$  in der Follikelflüssigkeit und der Blastozystenmorphologie keine vergleichende Aussage getroffen werden. Weiterhin bleibt anzumerken, dass in der vorliegenden Untersuchung nur die Follikelflüssigkeit des dominanten Follikels zur Bestimmung der IL-1 $\beta$ -Konzentration gewonnen wurde. Da die Oozyte des dominanten Follikels nicht gesondert untersucht wurde, konnte bei der späteren

Beurteilung der Embryomorphologie nicht nachvollzogen werden, welcher Embryo sich aus dem dominanten Follikel mit dem zugehörigen IL-1 $\beta$ -Wert entwickelt hatte.

Mendoza et al. (2002) berichteten kürzlich, dass Follikel, deren Oozyten zu einer klinischen Schwangerschaft nach ICSI geführt hatten, signifikant niedrigere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen enthielten als Follikel, aus denen keine Schwangerschaft entstanden war. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu früheren Ergebnissen der selben Autoren und auch dieser Studie: hohe intrafollikuläre IL-1 $\beta$ -Werte scheinen also mit erfolgreicher Befruchtung und niedrigen Implantationsraten assoziiert zu sein. Als Erklärung kann die Hypothese aufgestellt werden, dass IL-1 $\beta$  in der Follikelflüssigkeit Prozesse in der Eizellreifung stimuliert, die für eine normale Fertilisation nötig sind, aber nicht die weitere Lebensfähigkeit der Embryonen verbessern. Im Gegensatz dazu scheint IL-1 $\beta$ , das von Präimplantationsembryonen selbst gebildet wird, deren Entwicklung und Physiologie aber wesentlich zu beeinflussen (siehe Diskussionspunkt 4.3). Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch anderen Studien von Barak et al. (1992b), Bili et al. (1998) und Barrionuevo et al. (2000) liess sich kein Zusammenhang zwischen IL-1 in der Follikelflüssigkeit und der Schwangerschaftsrate feststellen. Dies unterstreicht die Hypothese, dass follikuläres IL-1 keinen vorraussagenden Wert für die spätere Embryoentwicklung und das Implantationspotential hat. Die Entstehung einer Schwangerschaft ist ein hochkomplexer Vorgang und wird neben ovariellen Faktoren maßgeblich auch von der Empfänglichkeit des Endometriums mitbeeinflusst. Es erscheint daher plausibel, dass die Konzentration eines Zytokins in Follikelflüssigkeit nicht im direkten Zusammenhang mit dem Erfolg einer IVF-/ICSI-Behandlung steht.

Auch von anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren in Follikelflüssigkeit (IGF-1, EGF, GM-CSF, IL-6, IL-8) wurde berichtet, dass diese nicht als Marker für den Erfolg einer IVF- oder ICSI-Behandlung dienen können (Hammadeh et al., 2001, 2002a, 2002b und 2003).

Karagouni et al. (1998) vermuten aber dennoch einen Zusammenhang zwischen Implantationsrate und IL-1 $\beta$ . Bei IVF-Patientinnen, die konzipierten,

waren die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen sowohl in der Follikelflüssigkeit als auch im Serum am Tag der hCG-Verabreichung signifikant höher als bei Frauen, die nicht schwanger wurden. Bei gesunden Kontrollpersonen gleichen Alters war im Serum kein IL-1 $\beta$  nachweisbar. Diese Autoren vermuteten daher, dass nachweisbare Serum-Konzentrationen von IL-1 $\beta$  bei IVF-Patientinnen als Hinweis für eine gute Implantationsrate dienen könnten.

Zum Abschluss dieses Diskussionspunkts bleiben zwei kritische Anmerkungen. In den oben diskutierten Studien wurden die Zytokinkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit mit einfach erkennbaren Parametern wie der Befruchtungsrate, der Embryomorphologie und der Schwangerschaftsrate verglichen. Es scheint aber auch möglich, dass eine veränderte Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit bei Oozyten und Embryonen zu Problemen auf molekularer oder chromosomaler Ebene führt, die nicht direkt ersichtlich sind. Andererseits stellt sich die Frage, ob veränderte Zytokinkonzentrationen immer intraindividuelle Variablen darstellen, die zum Beispiel mit einer besseren oder schlechteren Eizellqualität assoziiert sind. Es besteht auch die Möglichkeit, dass es sich um interindividuelle Variablen bei verschiedenen Frauen ohne pathologischen Wert handelt. Um die komplexen Zusammenhänge zwischen dem Reproduktionsprozess und dem Einfluss verschiedener Zytokine zu verstehen, wird noch weitere Forschung nötig sein.

#### **4.2 Einfluß von IL-1 beta auf die Konzentration von Steroiden und Gonadotropinen in der Follikelflüssigkeit**

Eine Vielzahl von Studien hat sich bereits mit dem Einfluß von IL-1 auf die ovarielle Steroidsynthese beschäftigt. Endokrin aktives Gewebe produziert einerseits selbst Zytokine, wird andererseits aber auch durch Zytokine beeinflusst (Mandrup-Poulsen et al., 1995 und Vinatier et al., 1995).

Hurwitz et al. (1992) wiesen das komplette IL-1-System im Ovar nach und stellten fest, dass es in der Zyklusmitte zu einer Induktion der IL-1-Genexpression kommt. Auch im peripheren Blut steigt die Konzentration von IL-1 $\beta$  mRNA in der Zyklusmitte an (Polan et al., 1994). Diese Erkenntnisse lassen bereits vermuten, dass es zwischen IL-1 und dem hormonell regulierten Zyklus enge Verbindungen gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben IL-1 $\beta$  auch die Konzentrationen von Steroiden und Gonadotropinen in der Follikelflüssigkeit von IVF- und ICSI-Patientinnen bestimmt und miteinander korreliert. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Wang und Norman, 1992; Huyser et al., 1994; Watanabe et al., 1994 und Büscher et al., 1999) konnte kein Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$  und Östradiol oder Progesteron in der Follikelflüssigkeit ermittelt werden. Barak et al. (1992b) berichteten jedoch über eine signifikant positive Korrelation zwischen IL-1 und Progesteron in der Follikelflüssigkeit von IVF-Patientinnen. Die Werte von IL-1 und Östradiol standen aber nicht miteinander in Verbindung. Die Autoren vermuteten daher, dass die Hauptwirkung von IL-1 im Ovar erst in der Lutealphase, also mit steigendem Progesteron-Einfluß, beginnt.

Auch im Serum wurde eine Korrelation zwischen IL-1 $\beta$  und Steroiden beschrieben (Wang et al., 2002), die andere Autoren (Wang und Norman, 1992) allerdings nicht bestätigten.

Der Effekt von IL-1 auf die Steroidproduktion im Ovar wurde mehrfach an Granulosazellkulturen verschiedener Spezies untersucht.

Bei Ratten hemmt IL-1 $\beta$  dosisabhängig die FSH-stimulierte Östradiol-Synthese von Granulosazellen in vitro (Gottshall et al., 1989 und Zhou und Galway, 1991). Vermutlich bewirkt IL-1 $\beta$  dies über eine Verminderung der Zahl von FSH-

Rezeptoren im Ovar (Gottschall et al., 1988 und Kasson und Gorospe, 1989). Auch in menschlichen Granulosazellen vermindert IL-1 die hCG-stimulierte Östradiol-Freisetzung vermutlich über den Mechanismus einer erhöhten NO-Produktion (Barak et al., 1992a und Tobai und Nishia, 2001). IL-1 könnte auch die Aktivität der P450-Aromatase und anderer Enzyme hemmen, die zur Östradiol-Synthese benötigt werden (Yasuda et al., 1990 und Ghersevich et al., 2001).

Der Einfluß von IL-1 auf die ovarielle Progesteron-Produktion wird in der aktuellen Studienlage widersprüchlich beurteilt. Einige Autoren berichten über eine hemmende Wirkung von IL-1 $\beta$  auf die Progesteron-Synthese in kultivierten Granulosazellen bei Ratten (Gottschall et al., 1987 und 1988 und Kasson und Gorospe, 1989), bei Schweinen (Fukuoka et al., 1989) und beim Mensch (Best und Hill, 1995). Fukuoka et al. (1992) konnten einen Abfall der Progesteron-Produktion in menschlichen Granulosazellen nur bei einem Zusammenspiel von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  feststellen und laut Barak et al. (1992a) beeinflusst IL-1 die ovarielle Synthese dieses Steroids nicht. Im Gegensatz dazu ist aber auch eine Steigerung der Progesteron-Synthese durch den Einfluß von IL-1 bei Ratten (Brännström et al., 1993), bei Hamstern (Nakamura et al., 1990) und bei Menschen (Sjogren et al., 1991 und Chen et al., 2000) beschrieben. Micelli et al. (2003) vermuten, dass IL-1 $\beta$  die Progesteron-Synthese in menschlichen Granulosaluteinzellen über eine Induktion der Cyclooxygenase stimuliert.

Mögliche Erklärungen für die widersprüchlichen Studienergebnisse könnten sein, dass Granulosazellen verschiedener Reifungsgrade verwendet und verschiedene Liganden (IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) untersucht wurden. Auch ist fraglich, ob Experimente an Zellkulturen verschiedener Spezies miteinander verglichen werden können. Best und Hill (1995) vermuten außerdem, dass ovarielle Leukozyten durch IL-1 zur Freisetzung anderer Zytokine angeregt werden, welche dann die Steroidsynthese in Granulosazellen beeinflussen könnten. Die Effekte von IL-1 könnten in vitro also davon abhängig sein, ob in den Zellkulturen Leukozyten vorhanden sind oder nicht.

In der vorliegenden Arbeit bestand auch zwischen IL-1 $\beta$  und FSH oder LH in der Follikelflüssigkeit keine Korrelation. Signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Konzentra-

tionen in der Follikelflüssigkeit von Patientinnen mit kontrollierter ovarieller Hyperstimulation im Vergleich zu Frauen mit natürlichen Zyklen (Loret de Mola et al., 1998), lassen allerdings vermuten, dass die IL-1 $\beta$ -Freisetzung im Ovar durch Gonadotropine beeinflusst wird. Chen et al. (2000) konnten außerdem zeigen, dass die IL-1 $\beta$  mRNA- Expression in menschlichen Granulosa-Zellen in vitro durch LH gesteuert wird. Diese Autoren stellten daher die Hypothese auf, dass die Wirkung von LH auf die ovarielle Steroidsynthese zum Teil über IL-1 $\beta$  vermittelt wird.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass IL-1 die ovarielle Steroidsynthese in vitro beeinflusst. Dennoch konnten mehrere Autoren in der Follikelflüssigkeit von IVF- und ICSI-Patientinnen keine Korrelation zwischen diesen Substanzen feststellen. Es bleibt also fraglich, inwieweit Ergebnisse aus in vitro-Studien auf die Begebenheiten in vivo übertragen werden können. Die genaue physiologische Rolle von IL-1 auf die Hormonproduktion im Ovar scheint daher noch nicht sicher geklärt zu sein.

### **4.3 Zusammenhang zwischen dem IL-1-System und der Embryoentwicklung**

Zytokine beeinflussen nicht nur die Reproduktionsprozesse im Ovar oder Endometrium, sondern spielen auch in der Embryoentwicklung sowie der Kommunikation zwischen mütterlichem Organismus und Embryo eine wichtige Rolle. Im Ovar kommt es vor der Implantation zu einer ansteigenden Produktion von Zytokinen. Wichtige Schritte der frühen Schwangerschaftsentstehung wie zum Beispiel das Anheften der Blastozyste ans Endometrium, das Trophoblastwachstum und die Ausbildung der Dezidua werden durch diese Mediatoren beeinflusst (Hill et al., 1992). Verschiedene Studien an Präimplantationsembryonen von Mäusen bestätigten, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Interleukin-1 $\beta$ , GM-CSF, CSF-1 und TNF $\alpha$  die Embryoentwicklung und Schwangerschaftsentstehung sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können (Hill et al., 1987; Haimovici et al., 1991; Tartakovsky et al., 1991).

Haimovici et al. konnten 1991 an Mäusen zeigen, dass hohe Konzentrationen von IL-1 $\beta$  einerseits die Anheftung der Blastozysten ans Endometrium behindern und andererseits bei bereits haftenden Blastozysten das Trophoblastwachstum signifikant erhöhen.

Zolti et al. gelang 1991 zum ersten Mal der Nachweis von IL-1 im Kulturmedium von menschlichen Oozyten und Embryonen. Im Medium von unfertilisierten Cumuluskomplexen fand sich in den ersten 24 Stunden in vitro starke IL-1-ähnliche Aktivität, die allerdings nach weiteren 24 Stunden Kultur ohne Befruchtung absank. Nach der Fertilisation konnte bereits im Medium der Zygoten IL-1 nachgewiesen werden, wobei die IL-1-Konzentrationen mit der weiteren Entwicklung zu 6-8-Zellern immer mehr anstiegen. Auch andere Arbeitsgruppen berichteten in der folgenden Zeit über das Vorkommen von IL-1 im Embryokulturmedium (Sheth et al., 1991; Austgulen et al., 1995; Baranao et al., 1992 und 1997; Spandorfer et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte in allen Kulturmedien vom Tag 3, also einem Stadium, in dem sich die

Embryonen etwa zu 6-10-Zellern entwickelt haben, IL-1 $\beta$  gemessen werden. Dieses Ergebnis steht somit im Einklang mit früheren Studien.

Leider sind die erzielten Schwangerschaftsraten nach IVF oder ICSI noch immer gering. Es wurde daher bereits mehrfach versucht, einen Vorhersagewert für die spätere Embryoentwicklung oder Graviditätsrate zu ermitteln. Das Messen von Zytokinen im Kulturmedium wäre ein mögliches Verfahren, da ein solcher Test sowohl einfach durchzuführen wäre als auch schnelle Ergebnisse liefern würde. So könnten vor dem Transfer in den Uterus die geeignetsten Embryonen ausgewählt werden.

Baranao et al. (1997) bestimmten die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium von menschlichen 2-4-Zell-Embryonen und berichteten über eine Korrelation mit der Schwangerschaftsrate: im Medium von Embryonen, die sich implantierten, lagen die IL-1 $\beta$ -Werte signifikant höher als in der Vergleichsgruppe. Diese Autoren stellten folglich die Hypothese auf, dass IL-1 $\beta$  im Kulturmedium ein geeigneter Parameter wäre, um den Erfolg einer IVF-Behandlung vorherzusagen. In einer ähnlichen Studie hatte die selbe Gruppe bereits 1992 einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen hoher biologischer Aktivität von IL-1 $\beta$  im Kulturmedium und der Graviditätsrate gefunden.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse von Baranao et al. nicht bestätigt werden, denn zwischen den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Medium vom dritten Kulturtag und der Schwangerschaftsrate bestand keine signifikante Korrelation. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass in dieser Studie das Kulturmedium von einzelnen 6-10-Zell-Embryonen untersucht wurde und von Baranao et al. das Medium von mehreren 2-4-Zellern, die in Schalen mit bis zu fünf Embryonen kultiviert wurden. Baranao et al. konnten im Medium von zwei oder mehr gemeinsam inkubierten Embryonen deutlich höhere IL-1 $\beta$ -Werte (> 80 pg/ml) messen als im Einzel-Medium. Es kann somit vermutet werden, dass die IL-1  $\beta$ -Produktion der Embryonen durch den Kontakt mit andersartigen HLA-Antigenen stimuliert wird. Dies würde auch erklären, dass in der vorliegenden Studie die mittlere IL-1 $\beta$ -Konzentration im Medium von Tag 3 nur bei 5 pg/ml lag. Weiterhin ist anzumerken, dass die Entstehung einer intakten Gravidität

nicht nur von embryonalen Faktoren abhängig ist, sondern auch durch mütterliche Parameter beeinflusst wird. Die Korrelation zwischen der Schwangerschaftsrate und einem embryonalen Zytokin erscheint somit nicht unproblematisch. Ein weiterer Ansatz ist daher der Vergleich zwischen Zytokinwerten im Kulturmedium und der Embryonenmorphologie.

Austgulen et al. (1995) bestimmten 24 und 48 Stunden nach Insemination die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium und verglichen diese mit der Zahl und Fragmentation der Blastomeren. Diese Arbeitsgruppe konnte keinen Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$  im Medium und der Embryonenmorphologie feststellen. Auch Orvieto et al. (1999) fanden keine signifikante Korrelation zwischen dem Teilungsstadium der Embryonen am zweiten Kulturtag und den IL-1 $\beta$ -Werten im Kulturmedium. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie bestätigt werden, auch wenn hier Embryonenmorphologie und IL-1 $\beta$ -Werte vom dritten Kulturtag verglichen wurden. Es fiel auf, dass im Tag 3-Medium von Embryonen mit hoher Teilungsrate und geringer Fragmentierung die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Durchschnitt niedriger lagen als bei Embryonen mit schlechterer morphologischer Qualität. Der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant.

In verschiedenen Arbeiten wurde sogar berichtet, dass eine Antagonisierung des IL-1-Systems positive Auswirkungen auf die Embryo-Entwicklung haben könnte. Spandorfer et al. (2000) konnten zeigen, dass hohe IL-1ra-Konzentrationen im Tag 3-Kulturmedium mit einer guten Embryoqualität einhergingen und sich hohe IL-1 $\beta$ -Werte negativ auf die Graviditätsrate auswirkten. Embryonen in einer Kokultur mit autologen Endometriumzellen zeigten höhere Teilungsraten und geringere Fragmentierung als die Vergleichsgruppe im konventionellen Medium. Die selben Autoren bestimmten 2003 die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in mütterlichem Serum, das als Zusatz zum Embryokulturmedium verwendet wurde. Auch hier waren hohe IL-1 $\beta$ -Werte im Serum negativ assoziiert mit der späteren Embryo-Entwicklung und dem IVF-Ergebnis. Auch de los Santos et al. (1996) vermuteten, dass sich die Antagonisierung der IL-1-Wirkung durch IL-1ra positiv auf das frühe Embryowachstum auswirkt. Sie untersuchten das Medium eines Embryo, der

nach dem Transfer zu einer klinischen Schwangerschaft führte und konnten zeigen, dass die IL-1 $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Kulturmedium während dessen Entwicklung zur Blastozyste nahezu konstant blieben, die IL-1ra-Sekretion aber stark anstieg. Das Verhältnis IL-1 $\alpha$  + IL-1 $\beta$ / IL-1ra im Kulturmedium sank also bis zum Zeitpunkt der erfolgreichen Implantation immer weiter ab. Das Vorhandensein von IL-1-Zytokinen im Medium war in dieser Studie an die Kokultur mit Endometriumzellen gebunden. Dies lässt vermuten, dass das Endometrium an der Regulierung des embryonalen IL-1-Systems beteiligt ist. Es stellt sich also die Frage, inwieweit Ergebnisse aus In-vitro-Studien mit und ohne Kokultur vergleichbar sind und ob diese Erkenntnisse auf die Reproduktionsprozesse in vivo übertragbar sind.

In der vorliegenden Studie wurde der Embryotransfer erst am fünften Tag nach Insemination bzw. Injektion durchgeführt. Durch den Einsatz komplexer Medien ist es möglich, die Embryonen bis zum Stadium der Blastozyste zu kultivieren und somit den Embryotransfer an den natürlichen Zeitpunkt der Implantation anzugleichen. Im Rahmen dieser Studie war es daher möglich, die IL-1 $\beta$ -Werte im Kulturmedium vom fünften Tag nach Insemination zu bestimmen. Beim Vergleich mit der Blastozystenmorphologie ergab sich keine signifikante Korrelation. Wurde im Medium allerdings ein IL-1 $\beta$ -Grenzwert von 18 pg/ml überschritten, so zeigten die zugehörigen Embryonen eine signifikant bessere morphologische Entwicklung als die Vergleichsgruppe. In den oben diskutierten Studien (Baranao et al., 1992 und 1997 ; Austgulen et al., 1995; Orvieto et al., 1999 und Spandorfer et al., 2000) wurden Zytokinkonzentrationen und Embryoqualität zu einem deutlich früheren Zeitpunkt der Kultur bestimmt, so dass diese Ergebnisse nicht auf die Blastozystenkultur übertragbar sind.

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass das IL-1-System an der Implantation der Blastozysten und der „Kommunikation“ zwischen Endometrium und Embryo beteiligt ist.

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde nachgewiesen, dass Präimplantationsembryonen von Mäusen bereits ab dem 4-8-Zell-Stadium IL-1 $\beta$ - und IL-1ra mRNA produzieren können (Takacs et al., 1996 und Krüssel et

al., 1997). Das früheste Entwicklungsstadium, in dem sich alle Komponenten des IL-1-Systems, also auch der IL-1- Rezeptor nachweisen ließen, war das der kompaktierten Morula. Der Anteil von Embryonen mit Expression von IL-1-Zytokinen nahm mit fortschreitender Entwicklung zur Blastozyste immer mehr zu (Krüssel et al., 1997).

Ein entscheidender Hinweis auf die Beteiligung der IL-1-Zytokine an der Embryoimplantation gelang Simón et al. (1994a): diese Gruppe konnte zeigen, dass eine Blockade des IL-1-Rezeptors im luminalen Endometrium durch IL-1ra die Implantation bei Mäusen verhindern kann. Später erkannten Simón et al. (1998), dass IL-1ra einen direkten Effekt auf endometriale Epithelzellen hat und dort wichtige morphologische Veränderungen der Zytoplasmamembran vor der Embryoimplantation hemmt, die von Murphy et al. (1995) bereits als „Plasmamembran- Transformation“ beschrieben wurden.

Kauma et al. berichteten 1990 zum ersten Mal über das Vorkommen von IL-1 $\beta$  mRNA in menschlichem Endometrium. Die Expression von IL-1 $\beta$  erscheint allerdings erst in der Lutealphase. Tabibzadeh et al. (1992) berichteten über ein ubiquitäres Vorkommen von IL-1 $\beta$  in endometrialem Epithel, Stroma und Endothelzellen, während Simón et al. (1993) IL-1 $\beta$  nur in Makrophagen und Endothelzellen der Uterusschleimhaut nachweisen konnten. In vivo-Untersuchungen ergaben, dass die intrakavitären IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Uterus nach Progesteron-Applikation signifikant anstiegen (Simón et al., 1996). Das IL-1-System im Endometrium scheint also hormonell reguliert zu werden, was dessen natürliche Rolle im Implantationsprozess unterstreicht. Auch der IL-1ra wird während aller Zyklusphasen im Endometrium exprimiert (Simón et al., 1995), so dass auch auf dieser Ebene eine Regulation der IL-1 $\beta$ -Wirkung möglich ist.

Der IL-1R tl kommt während des gesamten Zyklus im menschlichen Endometrium vor, wobei das Maximum der Expression in der Lutealphase, also dem Zeitpunkt der Embryoimplantation liegt (Simón et al., 1993). Die Hauptlokalisierung des IL-1R tl ist in endometriellen Epithelzellen zu finden, also dem oberflächlichen Teil der Schleimhaut, mit dem der Embryo Kontakt aufnimmt.

Krüssel et al. (1996) konnten außerdem zeigen, dass IL-1 $\beta$  und der zugehörige Rezeptor Typ I auf mRNA- und Protein-Ebene während des gesamten Zyklus im Tubenepithel vorhanden sind. Somit wäre eine Interaktion zwischen mütterlichem und embryonalem IL-1-System bereits während der Wanderung des Embryos durch den Eileiter möglich.

Die oben diskutierten Studien über den Nachweis von IL-1 $\beta$  in Embryokulturmedium zeigen bereits, dass menschliche Präimplantationsembryonen dieses Zytokin schon in frühen Stadien produzieren können. Die Expression des embryonalen Genoms beginnt im 4-8-Zell-Stadium, so dass die Produktion von Zytokinen bereits sehr früh auf embryonale Transkription zurückzuführen ist (Braude et al., 1988).

Immunhistochemische Untersuchungen von de los Santos et al. (1996) wiesen IL-1 $\beta$ , IL-1ra und den IL-1 Rezeptor Typ I in Oozyten und Präimplantationsembryonen aller Stadien nach. Die selben Autoren bestimmten IL-1 auch im Kulturmedium. Interessanterweise konnte IL-1 aber nur bei Kokultur der Embryonen mit endometrialen Epithelzellen gemessen werden, nicht dagegen bei Kokultur mit endometrialen Stromazellen oder im konventionellen Medium. Der immunhistochemische Nachweis von IL-1 innerhalb der Blastomeren gelang jedoch unabhängig von der Kulturform. Dies lässt vermuten, dass der Kontakt mit dem Epithel des Endometriums eine wichtige Rolle für die Freisetzung des embryonalen IL-1 spielt.

Krüssel et al. (1998b) untersuchten einzelne Blastomeren von menschlichen 8-Zell-Embryonen mittels PCR auf das Vorhandensein von Komponenten des IL-1-Systems. In allen Blastomeren konnte IL-1 R tl mRNA nachgewiesen werden, in 75% der Zellen IL-1 $\beta$  mRNA und nur 17 % der Blastomere enthielten IL-1ra mRNA. Die zwei Embryonen, deren Blastomeren IL-1ra mRNA bildeten, traten vor Erreichen des Blastozystenstadiums in einen Entwicklungsstillstand ein. Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen IL-1ra und der Embryoentwicklung besteht oder es sich hier um eine zufällige Beobachtung handelt, kann aufgrund der kleinen Fallzahl nicht beurteilt werden. Ein weiterer Kritikpunkt an dieser Arbeit ist die Tatsache, dass pro Embryo nur eine Blastomere untersucht wurde und somit nicht auf mRNA-Expression des gesamten Embryos geschlossen

werden kann. In einer früheren Studie konnten Krüssel et al. (1998a) nämlich zeigen, dass alle Zellen von atypisch fertilisierten 3 PN-Embryonen IL-1 R t1 mRNA enthielten, sich die mRNA-Menge zwischen den einzelnen Blastomeren aber deutlich unterschied.

Durch die oben beschriebenen Studien gelang also sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene der Nachweis, dass Präimplantationsembryonen bereits ab dem 4-Zell-Stadium die Komponenten des IL-1-Systems produzieren können. Dies unterstreicht die Vermutung, dass diese Zytokine an der Embryoentwicklung und Implantation beteiligt sind.

Der Kontakt und die wechselseitige Beeinflussung zwischen Embryo und Endometrium scheint für den Reproduktionsprozess eine wichtige Rolle zu spielen. In vitro kultivierte Präimplantationsembryonen entwickeln sich zum Beispiel signifikant schlechter als Embryonen gleicher Stadien in vivo (Vanderhyden et al., 1988). Durch eine Kokultivierung der Embryonen mit endometrialen Epithelzellen kann deren Entwicklung in vitro deutlich verbessert werden (Prichard et al., 1992 und Simón et al., 1997a). Simón et al. vermuteten bereits 1994, dass eine Kommunikation zwischen Embryo und Endometrium über das IL-1-System möglich ist. De los Santos et al. (1996) berichteten bei menschlichen Präimplantationsembryonen über eine gezielte Sekretion von IL-1 $\beta$  nur bei Kontakt mit endometrialen Epithelzellen. Simón et al. (1997b) konnten zeigen, dass embryonales IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  am Endometrium die Expression von  $\beta_3$ -Integrin stimuliert. Integrine, eine Form von Adhäsionsmolekülen, scheinen für die Anheftung der Blastozyste an die Uterusschleimhaut eine wichtige Rolle zu spielen. Zu einer Koexpression der Integrine  $\alpha_v$  und  $\beta_3$  kommt es dabei nur zwischen dem 20. und 24. Tag des menstruellen Zyklus (Lessey et al., 1995). Innerhalb dieses Zeitraums findet auch die Embryoimplantation statt, so dass diskutiert wurde, ob die Integrine ein Marker für das sogenannte „window of implantation“ sind. Das et al. (2002) zeigten, dass IL-1 die Expression von  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Integrinen auch auf der Oberfläche von Trophoblastzellen induziert. Nach der Anheftung muss der Embryo das Epithel und die Basalmembran des Endometriums durchdringen, um sich für die weitere Entwicklung in die Dezidua einzunisten. Für diesen Prozess werden proteolytische Enzyme, wie zum

Beispiel Kollagenasen benötigt. Huang et al. (1998) konnten auch hier eine Beteiligung des IL-1-Systems nachweisen: IL-1 $\beta$  stimulierte bei endometrialen Stromazellen die Expression von Kollagenase Typ IV (entspricht Matrix-Metalloproteinase-9) und reduzierte gleichzeitig die Expression der natürlichen Inhibitoren dieses Enzyms (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP Typ 1 und 3). Auch Trophoblastzellen werden durch IL-1 $\beta$  zur vermehrten Expression von Kollagenase Typ IV angeregt (Librach et al., 1994). Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass das IL-1-System maßgeblich an der Implantation beteiligt ist: embryonales IL-1 $\beta$  könnte sowohl die Anheftung der Blastozysten als auch deren Invasion ins Endometrium erleichtern.

In der vorliegenden Arbeit konnte in allen Kulturmedien vom Tag 5 IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass menschliche Präimplantationsembryonen im Stadium der Blastozyste IL-1 $\beta$  produzieren und sezernieren können. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den oben diskutierten Studien (De los Santos et al., 1996; Krüssel et al., 1998a und 1998b). In vier Fällen lagen die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Medium von Tag 5 über einem Grenzwert von 18 pg/ml. Die morphologische Qualität der zugehörigen Embryonen war signifikant besser als in der Vergleichsgruppe. Der fünfte Kulturtag entspricht ungefähr dem Zeitpunkt der natürlichen Implantation, einem Prozess, an dem IL-1 $\beta$  maßgeblich beteiligt zu sein scheint. Ein Zusammenhang zwischen hohen IL-1 $\beta$ -Werten am fünften Kulturtag und guter Qualität der Blastozysten erscheint daher plausibel, denn die Produktion von IL-1 $\beta$  durch die Blastozysten könnte für den Erfolg des weiteren Reproduktionsprozesses entscheidend sein. Aufgrund der niedrigen Fallzahl kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um eine zufällige Beobachtung handelt.

Diese und viele andere Studien bestätigen, dass das IL-1-System an der Entwicklung und Physiologie von Präimplantationsembryonen beteiligt ist. Inwieweit sich diese Erkenntnisse auf klinische Anwendungen im Rahmen von IVF- oder ICSI-Behandlungen übertragen lassen, muss noch weiter geklärt werden. Ein Ansatzpunkt für zukünftige Studien könnte zum Beispiel die Fragestellung sein, ob ein Zusatz von Zytokinen zu Kulturmedien die Embryonenentwicklung in vitro günstig beeinflussen kann.

## **5. Zusammenfassung**

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass zwischen dem Immunsystem und dem Reproduktionssystem enge Verbindungen bestehen und nahezu alle bekannten Zytokine in den Fortpflanzungsprozess involviert sind. Interleukin-1, ein primär entzündungsförderndes Zytokin, wurde auch in zahlreichen Zellen und Geweben des Reproduktionstrakts nachgewiesen.

Ziel dieser Untersuchung war, den Einfluss von IL-1  $\beta$  auf die Entwicklung menschlicher Präimplantationsembryonen bei der künstlichen Befruchtung zu überprüfen.

An der Studie nahmen 256 Paare teil, die aufgrund verschiedener Indikationen das IVF-/ICSI-Programm der Universitäts-Frauenklinik Würzburg durchliefen. In der Follikelflüssigkeit der IVF-/ICSI-Patientinnen wurden sowohl die IL-1  $\beta$ -Konzentrationen, als auch die FSH-, LH-, Östradiol- und Progesteron-Werte bestimmt. Der Embryotransfer fand nach einer Kulturdauer von fünf Tagen statt. Die Qualität der Embryonen wurde 14 bis 18 Stunden nach Insemination anhand des Zygoten-Scores nach Zollner et al. (2002) beurteilt. Am dritten Kulturtag erfolgte die Morphologie-Evaluierung anhand des Embryo-Scores nach Steer et al. (1992) und am fünften Kulturtag anhand der Blastozystenbeurteilung von Bongso (1999). Sofern ausreichend Material vorhanden war, wurden die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen auch in den Überständen der Embryo-Kulturmedien von Tag 3 und Tag 5 bestimmt.

In IVF-Zyklen konnte zwischen IL-1 $\beta$  in der Follikelflüssigkeit und der Fertilisationsrate ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Befruchteten sich über 90 % der Eizellen, so lagen die zugehörigen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen signifikant höher (3,34 pg/ml) als bei niedrigeren Befruchtungsraten  $\leq$  90 % (1,96 pg/ml,  $p = 0,032$ ). Bei der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion konnte diese Assoziation nicht nachgewiesen werden.

IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit scheinen mit der Embryonenqualität nicht in Verbindung zu stehen. Weder mit der Zygotenqualität noch mit der morphologischen Entwicklung der Embryonen am

dritten oder fünften Kulturtag zeigte sich eine signifikante Korrelation. Es fiel jedoch auf, dass die Follikelflüssigkeit von Frauen, deren Embryonen am fünften Kulturtag eine sehr gute morphologische Beurteilung erhielten (Grenzwert der mittleren Blastozystenbeurteilung: 3,5), im Durchschnitt deutlich höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (3,4 pg/ml) aufwies als die Vergleichsgruppe (2,4 pg/ml). Der Unterschied war aber nicht signifikant ( $p = 0,162$ ).

Zwischen dem Eintritt einer Schwangerschaft und den IL-1 $\beta$ -Werten in der Follikelflüssigkeit bestand keine signifikante Abhängigkeit.

Die gemessenen Steroide und Gonadotropine in der Follikelflüssigkeit standen bis auf zwei Ausnahmen nicht mit den Fertilisationsdaten, der Embryonenmorphologie und dem Schwangerschaftsausgang in Verbindung: hohe FSH-Konzentrationen gingen mit durchschnittlich schlechterer Zygoten-Qualität ( $p = 0,012^*$ ) und hohe LH-Werte mit einer schlechteren morphologischen Beurteilung der Embryonen am dritten Kulturtag einher ( $p = 0,022^*$ ).

Zwischen IL-1 $\beta$  und Hormonen konnte in der Follikelflüssigkeit kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

Die IL-1 $\beta$ -Werte im Kulturmedium von Tag 3 zeigten keine signifikante Korrelation mit der zugehörigen Embryonenmorphologie. Lag der mittlere Embryo-Score jedoch bei Werten über 40, so war die durchschnittliche IL-1 $\beta$ -Konzentration im Medium deutlich niedriger (3,7 pg/ml) als bei Embryonen mit einem schlechteren Score (5,3 pg/ml,  $p = 0,060$ ). Der Unterschied war aber nicht signifikant.

Im Tag 5-Medium von Blastozysten mit einer guten morphologischen Qualität und einer mittleren Blastozystenbeurteilung von 3,5 oder besser lagen die IL-1 $\beta$ -Werte signifikant höher (29,3 pg/ml) als beim Restkollektiv (4,4 pg/ml,  $p = 0,041^*$ ). Hohe IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Tag 5-Kulturmedium scheinen also mit schneller Reifungsfähigkeit der Embryonen und einer guten Blastozystenqualität vergesellschaftet zu sein.

In dieser Studie waren hohe intrafollikuläre IL-1 $\beta$ -Konzentrationen bei IVF-Patientinnen mit erfolgreicher Befruchtung assoziiert, zeigten jedoch keinen Zusammenhang mit der morphologischen Entwicklung der Embryonen. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass IL-1 $\beta$  in der Follikelflüssigkeit Prozesse

stimuliert, die für eine normale Befruchtung nötig sind, aber nicht die weitere Lebensfähigkeit der Embryonen verbessern. Auch mit der Schwangerschaftsrate stand IL-1 $\beta$  nicht in Verbindung. Die Bestimmung dieses Zytokins in der Follikelflüssigkeit von IVF- und ICSI-Patientinnen scheint somit keinen Vorhersagewert für den Erfolg einer solchen Behandlung zu haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde in allen Medien von Tag 3 und Tag 5 der Embryokultur IL-1 $\beta$  nachgewiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass menschliche Präimplantationsembryonen dieses Zytokin bereits ab dem 6-10-Zell-Stadium produzieren und sezernieren können. Welche exakten Vorgänge in der Entwicklung und Physiologie von Präimplantationsembryonen durch IL-1 $\beta$  beeinflusst werden, muss allerdings noch weiter untersucht werden.

Abschließend bleibt anzumerken, dass die Funktionen von IL-1  $\beta$  bei der Reproduktion vielfältig und komplex sind und durch verschiedene Einflussfaktoren alteriert werden können. Die Patienten dieser Studie nahmen aufgrund verschiedener Indikationen am IVF-/ICSI-Programm teil und unterschieden sich auch durch andere Faktoren wie zum Beispiel das Vorliegen von Zyklusanomalien oder die Art der Behandlung (IVF oder ICSI). Bei solch einem heterogenen Patientengut ist es daher schwierig, die genaue Bedeutung von IL-1  $\beta$  bei der künstlichen Befruchtung zu beurteilen oder herauszufinden, welche Patientinnen eventuell von einer Zytokin-Zugabe zum Embryo-Kulturmedium profitieren könnten.

## **6. Literaturverzeichnis**

Adashi, E. Y. (1990) The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr. Rev.*, **11**, 454-464

Adashi, E. Y. (1996) Immune Modulators in the Context of the Ovulatory Process: A Role for Interleukin-1. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **35**, 190-194

Adashi, E. Y. (1997) The potential role of IL-1 in the ovulatory process: an evolving hypothesis. *J. Reprod. Immunol.*, **35**, 1-9

Arend, W. P. und Guthridge, C. J. (2000) Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **59**, 160-164

Artini, P. G., Battaglia, C., D'Ambrogio, G., Barreca, A., Droghini, F., Volpe, A. und Genazzani, A. R. (1994) Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum. Reprod.*, **9**, 902-906

Austgulen, R., Arntzen, K. J., Vatten, L. J., Kahn, J. und Sunde, A. (1995) Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor-  $\beta$  and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in-vitro-fertilization. *Hum. Reprod.*, **10**, 171-176

Barak, V., Yanai, P., Treves, A. J., Roisman, I., Simon, A. und Laufer, N. (1992a) Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. *Fertil. Steril.*, **58**, 719-725

Barak, V., Mordel, N., Holzer, H., Zajicek, G., Treves, A. J. und Laufer, N. (1992b) The correlation of interleukin-1 and tumour necrosis factor to

- oestradiol, progesterone and testosterone levels in periovulatory follicular fluid of in-vitro fertilization patients. *Hum. Reprod.*, **7**, 462-464
- Baraňao, R. I., Piazza, A., Rumi, L. S. und Polak de Fried, E. (1992) Predictive value of interleukin-1  $\beta$  in supernatants of human embryo cultures. *Fertil. Steril.*, **58**, 0-007
- Baraňao, R. I., Piazza, A., Rumi, L. S. und Polak de Fried, E. (1997) Determination of IL-1 and IL-6 Levels in Human Embryo Culture-Conditioned Media. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **37**, 191-194
- Barrionuevo, M. J., Schwandt, R. A., Rao, P. S., Graham, L. B., Maisel, L. P. und Yeko, T. R. (2000) Nitric Oxide (NO) and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) in Follicular Fluid and Their Correlation With fertilization and Embryo Cleavage. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **44**, 359-364
- Best, C. L. und Hill, J. A. (1995) Interleukin-1 $\alpha$  and - $\beta$  modulation of luteinized human granulosa cell oestrogen and progesterone biosynthesis. *Hum. Reprod.*, **10**, 3206-3210
- Biggers, J. D. (1971) New observation on the nutrition of the mammalian embryo. In: Blandau, R. J., editor. *The biology of the blastocyst*. Chicago, IL, USA: *University of Chicago Press*; p. 319
- Bili, H., Tarlatzis, B. C., Daniilidid, M., Fleva, A., Bontis, J., Tourkantonis, A. und Mantalenakis, S. (1998) Cytokines in the human ovary: presence in follicular fluid and correlation with leukotriene B4. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **15**, 93-98
- Bongso, A. (1999) *Handbook on Blastocyst Culture*. Sydney Press Induspint (5) Pte. Ltd.

- Brännström, M., Wang, L. und Norman, R. J. (1993) Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. *Biol. Reprod.*, **48**, 165-171
- Braude, P., Bolton, V. und Moore, S. (1988) Human gene expression first occurs between the four- and eight-cells stages of preimplantation development. *Nature*, **332**, 459-461
- Büscher, U., Chen, F. C. K., Kentenich, H. und Schmiady, H. (1999) Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum. Reprod.*, **14**, 162-166
- Carberg, M., Nejaty, J., Fröysa, B., Guan, Y., Söder, O. und Bergqvist, A. (2000) Elevated expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum. Reprod.*, **15**, 1250-1255
- Cerreti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A., Huebner, K. und Black, R. A. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1  $\beta$  converting enzyme. *Science*, **256**, 97-100
- Chard, T. (1996) Cytokines in implantation. *Hum. Reprod. Update*, **1**, 385-396
- Chen, H. F., Shew, J. Y., Chao, K. H., Chang, L. J., Ho, H. N. und Yang, Y. S. (2000) Luteinizing Hormone Up-Regulates the Expression of Interleukin-1 $\beta$  mRNA in Human Granulosa-Luteal Cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **43**, 125-133

- Colotta, F., Dower, S. K., Sims, J. E. und Mantovani, A. (1994) The type II "decoy" receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol. Today*, **15**, 562-566
- Das, C., Kumar, V. S., Gupta, S. und Kumar S. (2002) Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.*, **53**, 257-268
- De Los Santos, M. J., Mercarder, A., Frances, A., Portoles, E., Remohi, J., Pellicer, A. und Simon, C. (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol. Reprod.*, **54**, 563-574
- De Los Santos, M. J., Anderson, D. J., Racowsky, C., Simón, C. und Hill, J. A. (1998) Expression of interleukin-1 system genes in human gametes. *Biol. Reprod.*, **59**, 1419-1424
- Deutsches IVF-Register (DIR) (2003) Bundesgeschäftsstelle Ärztekammer Schleswig-Holstein, Bismarckallee 8-12, 23795 Bad Segeberg
- Dinarello, C. A. (1988) Biology of interleukin-1. *FASEB J.*, **2**, 108-115
- Dinarello, C. A. (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.*, **8**, 1314-1325
- Dower, S. K., Kronheim, S. R., Hopp, T. P., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis, S., Henney, C. S., Urdal, D. L. (1986) The cell surface receptors for interleukin-1  $\alpha$  and interleukin-1  $\beta$  are identical. *Nature*, **324**, 266-268

- Dower, S. K., Sims, J. E., Stanton, T. H., Slack, J., McMahan, C. J., Valantine, M. A. und Bomsztyk, K. (1990) Molecular heterogeneity of interleukin-1 receptors. *Ann. N. Y. Ac. Sc.*, **594**, 231-239
- Dower, S. K., Fanslow, W., Jacobs, C., Waugh, S., Sims, J. E. und Widmer, M. B. (1994) Interleukin-1 antagonists. *Therapeutic Immunol.*, **1**, 113-122
- Espey, L. (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.*, **50**, 233-288
- Fukuoka, M., Yasuda, K., Taii, S., Takakura, K. und Mori, T. (1989) Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in culture of porcine granulosa cells. *Endocrinol.*, **124**, 884-890
- Fukuoka, M., Yasuda, K., Fujiwara, H. et al. (1992) Interactions between interferon  $\gamma$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interleukin-1 in modulating progesterone and oestradiol production by human luteinized granulosa cells in culture. *Hum. Reprod.*, **7**, 1361-1364
- Furutani, Y., Notake, M., Yamayoshi, M., Nomura, H., Ohue, M., Furuta, R., Fukui, T., Yamada, M. und Nakamura, S. (1985) Cloning and characterisation of the cDNAs for human and rabbit interleukin-1 precursor. *Nucl. Acids Res.*, **13**, 5869-5882
- Gérard, N., Caillaud, M., Martoriati, G., Goudet, G. und Lalmanach, A. C. (2004) The interleukin-1 system and female reproduction. *Endocrinol.*, **180**, 203-212
- Géry, I. und Waksman, B. H. (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J. Exp. Med.*, **136**, 143-155

- Ghersevich, S., Isomaa, V. und Vihko, P. (2001) Cytokine regulation of the expression of estrogenic biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **172**, 21-30
- Gottschall, P. E., Uehara, A., Talbot Hoffmann, S. und Arimura, A. (1987) Interleukin-1 inhibits follicle stimulating hormone- induced differentiation in rat granulosa cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **149**, 502-509
- Gottschall, P. E., Katsuura, G., Dahl, R. R., Hoffmann, S. T. und Arimura, A. (1988) Discordance in the effects of interleukin-1 on rat granulosa cell differentiation induced by follicle- stimulating hormone or activators adenylate cyclase. *Biol. Reprod.*, **39**, 1074-1085
- Gottschall, P. E., Katsuura, G. und Arimura, A. (1989) Interleukin-1 suppresses follicle- stimulating hormone- induced estradiol secretion from cultured ovarian granulosa cells. *J. Reprod. Immunol.*, **15**, 281-290
- Granowitz, E. V., Porat, R., Mier, J. W., Pribble, J. P., Stiles, D. M., Boledow, D. C., Catalano, M. A., Wolff, S. M. und Dinarello, C. A. (1992) Pharmacokinetics, safety and immunomodulatory effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in healthy humans. *Cytokine*, **4**, 353-360
- Haimovici, F., Hill, J. A. und Anderson, D. J. (1991) The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biol. Reprod.*, **44**, 69-75
- Hammadeh, M. E., Ertan, A. K., Baltes, S., Braemert, B., Georg, T., Rosenbaum, P. und Schmidt W. (2001) Association between Interleukin Concentration in Follicular Fluid and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **45**, 161-167

- Hammadeh, M. E., Ertan, A. K., Zeppezauer, M., Baltes, S., Georg, T., Rosenbaum, P. und Schmidt W. (2002a) Immunoglobulins and Cytokines Level in Follicular Fluid in Relation to Etiology of Infertility and their Relevance to IVF Outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **47**, 82-90
- Hammadeh, M. E., Ertan, A. K., Rosenbaum, P. und Schmidt W. (2002b) Relationship between Ovarian Stimulation Regimen and Interleukin level in Pre-ovulatory Follicular Fluid and Their Effect on ICSI Outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **48**, 255-261
- Hammadeh, M. E., Fischer- Hammadeh, C., Georg, T., Rosenbaum, P. und Schmidt W. (2003) Comparison between Cytokine Concentration in Follicular Fluid of Poor and High Responder Patients and their Influence of ICSI-outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **50**, 131-136
- Hannum, C. H., Wilcox, C. J., Arend, W. P., Joslin, F. P., Dripps, D. S., Heimdal, P. L., Armes, L. G., Sommer, A., Eisenberg, S. P., Thompson, R. C. (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*, **343**, 336-340
- Harkin, D.G., Bignold, L.P., Herriot-Warnse, D.M. und Kirby, C.A. (1994) Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes towards human pre-ovulatory follicular fluid and serum using a „spares-pore“ polycarbonate filtration membrane. *J. Reprod. Immunol.*, **27**, 151-155
- Hill, J. A., Haimovici, F. und Anderson, D. J. (1987) Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. *J. Immunol.*, **139**, 2250-2254
- Hill, J. A., Haimovici, F. und Anderson, D. J. (1992) Cytokines are considered critical in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **28**, 123-126

- Horuk, R. und McCubrey, J. A. (1989) The IL-1 receptor in Raji human B-lymphoma cells. Molecular characterization and evidence for receptor-mediated activation of gene expression. *Biochem. J.*, **260**, 657-663
- Howard, R. D., Mc Ilwraith, C. W., Trotter, G. W. und Nyborg, J. K. (1998) Cloning of equine interleukin-1 alpha and equine interleukin-1 beta and determination of their full-length cDNA sequences. *Am. J. Vet. Res.*, **59**, 704-711
- Huang, H. Y., Wen, Y., Irvine, J. C. et al. (1998) Cytokine mediated regulation of TIMP-1, TIMP-3 and 92-kDa Type IV collagenase messenger RNA expression in human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1721-1729
- Hurwitz, A., Loukides, J., Ricciarelli, E., Botero, L., Katz, E., Mc Allister, J. M., Garcia, J. E., Rohan, R., Adashi, E. Y. und Hernandez, E. R. (1992) Human intraovarian interleukin-1 (IL-1) system: highly compartmentalized and hormonally dependent regulation of the genes encoding IL-1, its receptor, and its receptor antagonist. *J. Clin. Invest.*, **89**, 1746-1754
- Huyser, C., Fourie, F. L., Bosmans, E. et al. (1994) Interleukin-1 beta, interleukin-6, and growth hormone levels in follicular fluid. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **11**, 193-202
- Jasper, M. und Norman, R. (1995) Immunoreactive interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in thecal, stromal and granulosa cell cultures from normal and polycystic ovaries. *Hum. Reprod.*, **10**, 1352-1354
- Karagouni, E. E., Chryssikopoulos, A., Mantzavinos, T., Kanakas, N. und Dotsika, E. N. (1998) Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 $\alpha$  may affect the

implantation rate of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil. Steril.*, **70**, 553-559

Kasson, B. G. und Gorospe, W. C. (1989) Effects of interleukins 1, 2 and 3 on follicle- stimulating hormone- induced differentiation of rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **62**, 103-111

Kauma, S., Matt, D., Strom, S. et al. (1990) Interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), human Leukocyte antigen HLA-DR  $\alpha$ , and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) expression in endometrium, placenta and placental membranes. *Am. J. Obstet.*, **163**, 1430-1437

Khan, S.A., Schmidt, K., Hallin, P., Di Pauli, R., De Geyter, C. und Nieschlag, E. (1988) Human testis cytosol and ovarian follicular fluid contain high amounts of interleukin-1-like factor(s). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **58**, 221-230

Krüssel, J. S., Simón, C., Bielfeld, P. et al. (1996) Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in different parts of the human fallopian tube throughout the menstrual cycle: possible implications for early embryonic development or implantation. *Meeting of the American Society for reproductive Medicine, November 2-6, Boston, MA*, Abstract, 52, p. S53

Krüssel, J. S., Huang, H.-Y., Wen, Y., Kloodt, A. R., Bielfeld, P. und Polan, M. L. (1997) Different pattern of interleukin-1 beta (IL-1 beta), interleukin-1 receptor antagonist- (IL-1ra) and interleukin-1 receptor type I- (IL-1R tl) mRNA-expression in single preimplantation mouse embryos at various developmental stages. *J. Reprod. Immunol.*, **34**, 103-120

Krüssel, J. S., , Huang, H.-Y., Simon, C., Behr, B., Pape, A. R., Wen, Y., Bielfeld, P. und Polan, M. L. (1998a) Single Blastomeres within Human

- Preimplantation Embryos express Different Amounts of Messenger Ribonucleic Acid for  $\beta$ -Actin and Interleukin-1 Receptor Type I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 953-959
- Krüssel, J. S., Simon, C., Rubio, M. C., Pape, A. R., Wen, Y., Huang, H.-Y., Bielfeld, P. und Polan, M. L. (1998b) Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, **13**, 2206-2211
- Krüssel, J. S. (2001) Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Rahmen der embryonalen Implantation.
- Lei, Z. M., Chegini, N. und Rao, C. H. V. (1991) Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol. Reprod.*, **44**, 1148-1156
- Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Sawin, S. W. et al. (1995) Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil. Steril.*, **63**, 535-542
- Librach, C. L., Feigenbaum, S. L., Bass, K. E., Cui, T. Y., Verastas, N., Sadovsky, Y., Quigley, J. P., French, D. L. und Fisher, S. J. (1994) Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17125-17131
- Lomedico, P. T., Gubler, U., Hellmann, C. P., Dukovich, M., Giri, J. G., Pan, Y. C., Collier, K., Semionow, R., Chua, A. O. und Mizel, S. B. (1984) Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature*, **312**, 458-462
- Loret de Mola, J. R., Goldfarb, J. M., Hecht, B. R., Baumgardner, G. P., Babbo, C. J. und Friedlander, M. A. (1998) Gonadotropins Induce the Release of

- Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  from the Human Preovulatory Follicle. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **39**, 387-390
- Loukides, J. A., Loy, R. A., Edwards, R., Honig, J., Visintin, I. und Polan, M. L. (1990) Human follicular fluids contain tissue macrophages. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**, 1363-1367
- Machelon, V., Nome, F., Duran-Gasselin, I. et al. (1995) Macrophage and granulosa interleukin-1  $\beta$  mRNA in human ovulatory follicles. *Hum. Reprod.*, **10**, 2198-2203
- Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Reimers, J. I. et al. (1995) Cytokines and the endocrine system. I. The immunoendocrine network. *Eur. J. Endocrinol.*, **133**, 660-671
- March, C. J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D. P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C. S., Kronheim, S. R., Grabstein, K. et al. (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, **315**, 641-647
- Martin, U. und Falk, W. (1997) The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. *Europ. Cyt. Net.*, **8**, 5-17
- Mendoza, C., Cremades, N., Ruiz-Requena, E., Martinez, F., Ortega, E., Bernabeu, S., Greco, E. und Tesarik, J. (1999) Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum. Reprod.*, **14**, 628-635
- Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., Cremades, N., Martinez, F., Bernabeu, R., Greco, E. und Tesarik, J. (2002) Follicular Fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum. Reprod.*, **17**, 1017-1022

- Micelli, F., Tropea, A., Minici, F., Navarra, P., Lanzone, A. und Apa, R. (2003) Interleukin-1  $\beta$  stimulates Progesterone Production by in vitro Human Luteal Cells: Evidence of a Mediatory Role of Prostaglandins. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **88**, 2690-2694
- Murphy, C. R. (1995) The cytoskeleton of uterine epithelial cells: a new player in uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Hum. Reprod. Update*, **1**, 567-580
- Nakamura, Y., Kato, H. und Terranova, P. F. (1990) Interleukin-1  $\alpha$  increases thecal progesterone production of preovulatory follicles in cyclic hamsters. *Biol. Reprod.*, **43**, 169-173
- Narko, K., Ritvos, O. und Ristimaki, A. (1997) Induction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2 alpha receptor expression by interleukin-1 beta in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinol.*, **138**, 3638-3644
- Nayudu, P., Lopata, A., Jones, G., Gook, D. A., Bourne, H. M., Sheather, S. J., Brown, T. C. und Johnston, W. I. (1989) An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: Oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics. *Hum. Reprod.*, **4**, 558-567
- Nishida, T., Hirato, T., Nishino, N., Mizuno, K., Sekiguchi, Y., Takano, M., Kawai, K., Nakai, S. und Hirai, Y. (1988) Cloning of the cDNA for rat interleukin-1  $\alpha$  and  $\beta$ . In *Monokines and Other Non-Lymphocytic Cytokines*, pp 73-78. Eds Poweda M. C.
- Ohlsson, K., Bjsrk, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R. und Thompson, R. C. (1990) Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature*, **348**, 550-552

- Orvieto, R., Bar-Hava, I., Schwartz, A., Shelef, M., Ashkenazi, J., Bar, J. und Ben-Rafael, Z. (1999) Interleukin-1 $\beta$  Production by Human Preimplantation Embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **16**, 394-397
- Paria, B. C. und Dey, S. K. (1990) Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 4756
- Piquette, G., Simón, C., El-Danasouri, I., Frances, A. und Polan, M. (1994) Gene regulation of interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor type I, and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in human granulosa-luteal cells. *Fertil. Steril.*, **62**, 760-770
- Polan, M., Loukides, J. und Honig, J. (1994) Interleukin-1 in human ovarian cells and in peripheral blood monocytes increases during the luteal phase: evidence for a midcycle surge in the human. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **170**, 1000-1007
- Rice, A. und Chard, T. (1998) Cytokines in Implantation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **9**, 287-296
- Seibel, M. M., Swartz, M. S., Smith, D., Levesque, L. und Taymor, M. L. (1984) In vitro prostaglandin concentration in human preovulatory follicles. *Fertil. Steril.*, **42**, 482-485
- Sheth, K. V., Roca, G. L., Al-Sedairy, S. T., Parhar, R. S., Hamilton, C. J. C. M. und Jabbar, A. (1991) Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo culture fluid. *Fertil. Steril.*, **55**, 952-957

- Simón, C., Piquette, G. N., Frances, A. et al. (1993) Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 549-555
- Simón, C., Frances, A., Piquette, G. N. et al. (1994a) The immune mediator interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents embryonic implantation. *Endocrinol.*, **134**, 521-528
- Simón, C., Frances, A., Piquette, G. N., Hendrickson, M., Milki, A. und Polan, M. J. (1994b) Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation : Immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 847-854
- Simón, C., Frances, A., Yon Lee, B. et al. (1995a) Immunohistochemical localization, identification and regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in the human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, **1**, 2472-2477
- Simón, C., Pellicer, A. und Polan, M. J. (1995b) Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. *Hum. Reprod.*, **10**, 43-54
- Simón, C., Mercader, A., Frances, A. et al. (1996) Hormonal regulation of serum and intracavitary IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1ra. IL-1 endometrial microenvironment of the human embryo at the apposition phase under physiological and supraphysiological steroid level conditions. *J. Reprod. Immunol.*, **31**, 165-184
- Simón, C., Mercader, A., Gimeno, M. J. und Pellicer, A. (1997a) The Interleukin- 1 System and Human Implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **37**, 64-72

- Simón, C., Gimeno, M. J., Mercader, A., O'Connor, J. E., Remohí, J., Polan, M. L. und Pellicer, A. (1997b) Embryonic regulation of integrins  $\beta_3$ ,  $\alpha_1$  and  $\alpha_4$  on human endometrial epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 2607-2616
- Simón, C., Moreno, C., Remohi, J. und Pellicer, A. (1998a) Cytokines and embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **39**, 117-131
- Simón, C., Valbuena, D., Krüssel, J., Bernal, A., Murphy, C. R., Shaw, T. et al. (1998b) Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil. Steril.*, **70**, 896-906
- Sims, J. E., March, C. J., Cosman, D., Widmer, M. B., MacDonald, H. R., McMahan, C. J., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jackson, J. L., Call, S. M., Friend, D., Alpert, A. R., Gillis, S., Urdal, D. L., Dower, S. K. (1988) cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*, **241**, 585-589
- Sims, J. E., Gayle, M. A., Slack, J. L., Alderson, M. R., Bird, T. A., Giri, J. G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanbeck, K. et al. (1993) Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *PNAS*, **90**, 6155-6159
- Sjogren, A., Holmes, P. V. und Hillensjo, T. (1991) Interleukin-1  $\alpha$  modulates luteinizing hormone stimulated cAMP and progesterone release from human granulosa cells in vitro. *Hum. Reprod.*, **6**, 910-913
- Spandorfer, S. D., Neuer, A., Liu, H.-C., Bivis, L., Clarke, R., Veeck, L., Witkin, S. S. und Rosenwaks, Z. (2000) Interleukin-1 Levels in the Supernatant of Conditioned Media of Embryos Grown in Autologous Endometrial Coculture: Correlation with Outcome after In Vitro Fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **43**, 6-11

- Spandorfer, S. D., Neuer, A., Liu, H.-C., Rosenwaks, Z. und Witkin, S. S. (2003) Involvement of Interleukin-1 and the Interleukin-1 Receptor Antagonist in In Vitro Embryo Development Among Women Undergoing In Vitro Fertilization Embryo Transfer. *J. Assist. Reprod. Genetics*, **20**, 502-505
- Steck, T.: *Praxis der Fortpflanzungsmedizin*. Schattauer Verlag, 2001
- Steer, C.V., Mills, C. L., Tan, S. L., Campbell, S. und Edwards, R.G. (1992) The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in- vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum. Reprod.*, **7**, 117-119
- Stephoe, P. C. und Edwards, R. G. (1978) Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, **2**, 8079-8092
- Symons, J. A., Eastgate, J. A. und Duff, G. W. (1991) Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin-1. *J. Exp. Med.*, **174**, 1251-1254
- Tabibzadeh S. und Sun, X. Z. (1992) Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Reprod.*, **7**, 1214-1221
- Takacs, P. und Kauma, S. (1996) The expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor type I mRNA during preimplantation mouse development. *J. Reprod. Immunol.*, **32**, 27-35
- Tao, M., Kodama, H., Kagabu, S., Fukuda, J., Muruta, M., Shimizu, Y., Hirano, H. und Tanaka, T. (1997) Possible contribution of follicular interleukin-1 $\beta$  to nitric oxide generation in human pre-ovulatory follicles. *Hum. Reprod.*, **12**, 2220-2225

- Tartakovsky, B. und Ben-Yair, E. (1991) Cytokines modulate preimplantation development and pregnancy. *Dev. Biol.*, **146**, 345-352
- Tazuke, S. I. und Giudice, L. C. (1996) Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal: embryonic interactions. *Sem. Reprod. Endocrinol.*, **14**, 231-245
- Terranova, P. F. und Montgomery Rice, V. (1997) Review: Cytokine Involvement in Ovarian Processes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **37**, 50-63
- Tobai, H. und Nishiya, I. (2001) Nitric oxide mediates inhibitory effect of interleukin-1 beta on estrogen production in human granulosa-luteal cells. *J. Obstet. Gynecol. Res.*, **27**, 53-59
- Van Blerkom, J. (1996) The influence of intrinsic and extrinsic factors on the development potential of chromosomal normality of the human oocyte. *J. Soc. Gyn. Invest.*, **3**, 3-11
- Vanderhyden, B. C., Armstrong, D. T. (1988) Decreased embryonic survival of in vitro fertilized oocytes in rats is due to retardation of preimplantation development. *J. Reprod. Fertil.*, **83**, 851-857
- Vinatier, D., Dufour, P., Tordjeman-Rizzi, N. et al. (1995) Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **63**, 155-168
- Wang, L. J. und Norman, R. J. (1992) Concentrations of immunoreactive interleukin-1 and interleukin-2 in human preovulatory follicular fluid. *Hum. Reprod.*, **7**, 147-150

- Wang, X. F., Xing F. Q. und Chen, S. L. (2002) Interleukin-1beta expression on ovarian granulosa cells and its clinical implication in women undergoing in vitro fertilization. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao*, **22**, 934-936
- Watanabe, H., Nagai, K., Yamaguchi, M., Ikenoue, T. und Mori, N. (1993) Interleukin-1 beta stimulates prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> alpha synthesis in human ovarian granulosa cells in culture. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **49**, 963-967
- Watanabe, H., Nagai, K., Yamaguchi, M., Ikenoue, T. und Mori, N. (1994) Concentration of interleukin-1 $\beta$  correlates with prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub>  in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum. Reprod.*, **9**, 9-12
- World Health Organization: *WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion*. Springer Verlag, 1999
- Yasuda, K., Fukuoka, M., Taii, S., Takakura, K. und Mori, T. (1990) Inhibitory effects of interleukin-1 on follicle-stimulating hormone induction of aromatase activity, progesterone secretion, and functional luteinizing hormone receptors in cultures of porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.*, **43**, 905-912
- Zhou, M. H. und Galway, A. B. (1991) Inhibitory effect of interleukin-1 beta on follicle stimulating hormone (FSH) induced estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Sheng Li Xue Bao*, **43**, 67-72
- Zollner, U., Zollner, K.-P., Hartl G., Dietl, J. und Steck, T. (2002) The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum. Reprod.*, **17**, 1327-1333

Zolti, M., Ben-Rafael, Z., Meiom, R., Shemesh, M., Bider, D., Mashiach, S. und Apte, R. N. (1991) Cytokine involvement in oocyte and early embryos. *Fertil. Steril.*, **56**, 265-272

## Anhang

### Gesetz zum Schutz von Embryonen

Datum: 13. Dezember 1990

Fundstelle: BGBl I 1990, 2746

Textnachweis ab: 1. 1.1991 Stand: Geändert durch Art. 22 G v. 23.10.2001 I 2702

#### **ESchG § 1 Mißbräuchliche Anwendung von Fortpflanzungstechniken**

**(1)** Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer

1. auf eine Frau eine fremde unbefruchtete Eizelle überträgt,
2. es unternimmt, eine Eizelle zu einem anderen Zweck künstlich zu befruchten, als eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen, von der die Eizelle stammt,
3. es unternimmt, innerhalb eines Zyklus mehr als drei Embryonen auf eine Frau zu übertragen,
4. es unternimmt, durch intratubaren Gametentransfer innerhalb eines Zyklus mehr als drei Eizellen zu befruchten,
5. es unternimmt, mehr Eizellen einer Frau zu befruchten, als ihr innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen,
6. einer Frau einen Embryo vor Abschluß seiner Einnistung in der Gebärmutter entnimmt, um diesen auf eine andere Frau zu übertragen oder ihn für einen nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck zu verwenden, oder
7. es unternimmt, bei einer Frau, welche bereit ist, ihr Kind nach der Geburt Dritten auf Dauer zu überlassen (Ersatzmutter), eine künstliche Befruchtung durchzuführen oder auf sie einen menschlichen Embryo zu übertragen.

**(2)** Ebenso wird bestraft, wer

1. künstlich bewirkt, daß eine menschliche Samenzelle in eine menschliche Eizelle eindringt, oder
2. eine menschliche Samenzelle in eine menschliche Eizelle künstlich verbringt, ohne eine Schwangerschaft der Frau herbeiführen zu wollen, von der die Eizelle stammt.

**(3)** Nicht bestraft werden

1. in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 1, 2 und 6 die Frau, von der die Eizelle oder der Embryo stammt, sowie die Frau, auf die die Eizelle übertragen wird oder der Embryo übertragen werden soll, und

2. in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 7 die Ersatzmutter sowie die Person, die das Kind auf Dauer bei sich aufnehmen will.

(4) In den Fällen des Absatzes 1 Nr. 6 und des Absatzes 2 ist der Versuch strafbar.

### **ESchG § 2 Mißbräuchliche Verwendung menschlicher Embryonen**

(1) Wer einen extrakorporal erzeugten oder einer Frau vor Abschluß seiner Einnistung in der Gebärmutter entnommenen menschlichen Embryo veräußert oder zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck abgibt, erwirbt oder verwendet, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer zu einem anderen Zweck als der Herbeiführung einer Schwangerschaft bewirkt, daß sich ein menschlicher Embryo extrakorporal weiterentwickelt.

(3) Der Versuch ist strafbar.

### **ESchG § 3 Verbotene Geschlechtswahl**

Wer es unternimmt, eine menschliche Eizelle mit einer Samenzelle künstlich zu befruchten, die nach dem in ihr enthaltenen Geschlechtschromosom ausgewählt worden ist, wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft. Dies gilt nicht, wenn die Auswahl der Samenzelle durch einen Arzt dazu dient, das Kind vor der Erkrankung an einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne oder einer ähnlich schwerwiegenden geschlechtsgebundenen Erbkrankheit zu bewahren, und die dem Kind drohende Erkrankung von der nach Landesrecht zuständigen Stelle als entsprechend schwerwiegend anerkannt worden ist.

### **ESchG § 4 Eigenmächtige Befruchtung, eigenmächtige Embryoübertragung und künstliche Befruchtung nach dem Tode**

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

1. es unternimmt, eine Eizelle künstlich zu befruchten, ohne daß die Frau, deren Eizelle befruchtet wird, und der Mann, dessen Samenzelle für die Befruchtung verwendet wird, eingewilligt haben,

2. es unternimmt, auf eine Frau ohne deren Einwilligung einen Embryo zu übertragen, oder

3. wissentlich eine Eizelle mit dem Samen eines Mannes nach dessen Tode künstlich befruchtet.

(2) Nicht bestraft wird im Fall des Absatzes 1 Nr. 3 die Frau, bei der die künstliche Befruchtung vorgenommen wird.

### **ESchG § 5 Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen**

(1) Wer die Erbinformation einer menschlichen Keimbahnzelle künstlich verändert, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer eine menschliche Keimzelle mit künstlich veränderter Erbinformation zur Befruchtung verwendet.

(3) Der Versuch ist strafbar.

### **(4) Absatz 1 findet keine Anwendung auf**

1. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer außerhalb des Körpers befindlichen Keimzelle, wenn ausgeschlossen ist, daß diese zur Befruchtung verwendet wird,
2. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer sonstigen körpereigenen Keimbahnzelle, die einer toten Leibesfrucht, einem Menschen oder einem Verstorbenen entnommen worden ist, wenn ausgeschlossen ist, daß
  - a) diese auf einen Embryo, Foetus oder Menschen übertragen wird oder
  - b) aus ihr eine Keimzelle entsteht, sowie
3. Impfungen, strahlen-, chemotherapeutische oder andere Behandlungen, mit denen eine Veränderung der Erbinformation von Keimbahnzellen nicht beabsichtigt ist.

### **ESchG § 6 Klonen**

- (1)** Wer künstlich bewirkt, daß ein menschlicher Embryo mit der gleichen Erbinformation wie ein anderer Embryo, ein Foetus, ein Mensch oder ein Verstorbener entsteht, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.
- (2)** Ebenso wird bestraft, wer einen in Absatz 1 bezeichneten Embryo auf eine Frau überträgt.
- (3)** Der Versuch ist strafbar.

### **ESchG § 7 Chimären- und Hybridbildung**

- (1)** Wer es unternimmt,
  1. Embryonen mit unterschiedlichen Erbinformationen unter Verwendung mindestens eines menschlichen Embryos zu einem Zellverband zu vereinigen,
  2. mit einem menschlichen Embryo eine Zelle zu verbinden, die eine andere Erbinformation als die Zellen des Embryos enthält und sich mit diesem weiter zu differenzieren vermag, oder
  3. durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Tieres oder durch Befruchtung einer tierischen Eizelle mit dem Samen eines Menschen einen differenzierungsfähigen Embryo zu erzeugen, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.
- (2)** Ebenso wird bestraft, wer es unternimmt,
  1. einen durch eine Handlung nach Absatz 1 entstandenen Embryo auf
    - a) eine Frau oder
    - b) ein Tier zu übertragen oder
  2. einen menschlichen Embryo auf ein Tier zu übertragen.

### **ESchG § 8 Begriffsbestimmung**

- (1)** Als Embryo im Sinne dieses Gesetzes gilt bereits die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an, ferner jede einem Embryo entnommene totipotente Zelle, die sich bei Vorliegen der dafür erforderlichen weiteren Voraussetzungen zu teilen und zu einem Individuum zu entwickeln vermag.

(2) In den ersten vierundzwanzig Stunden nach der Kernverschmelzung gilt die befruchtete menschliche Eizelle als entwicklungsfähig, es sei denn, daß schon vor Ablauf dieses Zeitraums festgestellt wird, daß sich diese nicht über das Einzellstadium hinaus zu entwickeln vermag.

(3) Keimbahnzellen im Sinne dieses Gesetzes sind alle Zellen, die in einer Zell-Linie von der befruchteten Eizelle bis zu den Ei- und Samenzellen des aus ihr hervorgegangenen Menschen führen, ferner die Eizelle vom Einbringen oder Eindringen der Samenzelle an bis zu der mit der Kernverschmelzung abgeschlossenen Befruchtung.

### **ESchG § 9 Arztvorbehalt**

Nur ein Arzt darf vornehmen:

1. die künstliche Befruchtung,
2. die Übertragung eines menschlichen Embryos auf eine Frau,
3. die Konservierung eines menschlichen Embryos sowie einer menschlichen Eizelle, in die bereits eine menschliche Samenzelle eingedrungen oder künstlich eingebracht worden ist.

### **ESchG § 10 Freiwillige Mitwirkung**

Niemand ist verpflichtet, Maßnahmen der in § 9 bezeichneten Art vorzunehmen oder an ihnen mitzuwirken.

### **ESchG § 11 Verstoß gegen den Arztvorbehalt**

(1) Wer, ohne Arzt zu sein,

1. entgegen § 9 Nr. 1 eine künstliche Befruchtung vornimmt oder
2. entgegen § 9 Nr. 2 einen menschlichen Embryo auf eine Frau überträgt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Nicht bestraft werden im Fall des § 9 Nr. 1 die Frau, die eine künstliche Insemination bei sich vornimmt, und der Mann, dessen Samen zu einer künstlichen Insemination verwendet wird.

### **ESchG § 12 Bußgeldvorschriften**

(1) Ordnungswidrig handelt, wer, ohne Arzt zu sein, entgegen § 9 Nr. 3 einen menschlichen Embryo oder eine dort bezeichnete menschliche Eizelle konserviert.

(2) Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße bis zu zweitausendfünfhundert Euro geahndet werden.

### **ESchG § 13 Inkrafttreten**

Dieses Gesetz tritt am 1. Januar 1991 in Kraft.

## **Danksagung**

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Ursula Zollner möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und die Bemühungen um die Korrektur bedanken.

Auch Herrn Klaus-Peter Zollner danke ich für die vielen Erklärungen und Hilfestellungen sowie die Korrektur.

Vielen Dank an Frau Sachse für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Tiemo Grimm bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

## **Lebenslauf**

### **Angaben zur Person:**

<b>Name</b>	Theresa Hofmann
<b>Geburtsdatum</b>	02.06.1979
<b>Geburtsort</b>	Bamberg
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Eltern</b>	Dr. Peter Hofmann, Arzt für Allgemeinmedizin Maria Hofmann-Weidig, Sonderschullehrerin
<b>Geschwister</b>	Juliane, geb. am 11.09.1983

### **Ausbildung:**

<b>Grundschule</b>	1985-1989 Volksschule Gaustadt
<b>Gymnasium</b>	1989-1998 Franz-Ludwig-Gymnasium Bamberg Abschluss der Schulausbildung mit Abitur 1998
<b>Studium</b>	1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg Ärztliche Vorprüfung im Herbst 2000 1. Staatsexamen im Herbst 2001 Auslandssemester an der Université Claude Bernard in Lyon 2001/2002 2. Staatsexamen im Herbst 2004 Praktisches Jahr 10/2004-09/2005 3. Staatsexamen im Herbst 2005

Würzburg, Februar 2006