

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

Morphologische Entwicklung und Zytokinproduktion
von humanen Präimplantationsembryonen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Sonja Julia Bischofs
aus Münster

Würzburg, Mai 2011

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. U. Zollner

Koreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2011

Die Promovendin ist Ärztin.

1.	Einleitung.....	1
	1.1. In vitro Fertilisation (IVF).....	1
	1.2. Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI).....	3
	1.3. Befruchtung, frühe Embryonalentwicklung und Implantation – Physiologische Grundlagen.....	4
	1.4. Zytokine.....	5
	1.4.1. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)	
	1.4.2. Leukemia inhibitory factor (LIF)	
	1.5. Blastozystenkultur in Deutschland und Australien.....	7
	1.6. Zielsetzung dieser Studie.....	9
2.	Material und Methoden.....	11
	2.1. Patientenkollektiv.....	11
	2.2. Ovarstimulation.....	11
	2.3. Follikelpunktion.....	12
	2.4. Spermienpräparation.....	13
	2.4.1. Gewinnung der Spermien	
	2.4.2. Aufbereitung der Spermien	
	2.5. IVF-Fertilisation.....	14
	2.6. ICSI-Fertilisation.....	15
	2.7. Beurteilung der Zygoten im Vorkernstadium.....	16
	2.7.1. Kriterien des PN-Scorings	
	2.8. Embryonenkultur und Anwendung des Embryoscores.....	22
	2.9. TNF-alpha und LIF.....	28
	2.9.1. Zytokinmessungen	
	2.9.1.1. TNF-alpha	
	2.9.1.2. LIF	
	2.10. Embryotransfer.....	31
	2.11. Schwangerschaftstest	32
	2.12. Statistische Auswertung.....	33
3.	Ergebnisse.....	34
	3.1. Epidemiologie.....	34
	3.2. Alter der Frau.....	35
	3.3. Beurteilung der Vorkerne.....	36
	3.3.1. Vakuolisierung und Blastozystenrate	

3.3.2. Halo-Effekt und Blastozystenrate	
3.3.3. Halo-Effekt und Reifegrad der Embryonen	
3.3.4. PN-Score bei Schwangeren versus Nicht-Schwangeren	
3.3.5. Mittlerer PN-Score bei Schwangeren versus Nicht-Schwangeren nach Single Embryo Transfer (SET)	
3.4. Embryoscoring.....	39
3.4.1. Entwicklung der Embryonen in Kultur	
3.5. IVF versus ICSI.....	43
3.5.1. Fertilisationsrate bei IVF versus ICSI	
3.5.2. Schwangerschaftserfolg bei IVF versus ICSI	
3.5.3. PN-Scoring-Parameter bei IVF versus ICSI	
3.5.4. Embryoscoring bei IVF versus ICSI	
3.6. Zytokinprofil im Kulturmedium.....	44
3.6.1. TNF-alpha	
3.6.2. LIF	
4. Diskussion.....	52
4.1. Morphologie der Zygoten.....	52
4.2. TNF-alpha und LIF in der Reproduktionsmedizin – welche Rolle spielen Sie?.....	56
4.2.1. TNF-alpha	
4.2.2. LIF	
4.3. Diskussion der Ergebnisse.....	61
4.3.1. Diskussion der Daten zur Fertilität	
4.3.2. Diskussion der Ergebnisse des PN-Scoring	
4.3.3. Diskussion der Blastozystenentwicklung	
4.3.4. Diskussion der Ergebnisse IVF versus ICSI	
4.3.5. Ergebnisse des Zytokinprofils	
5. Zusammenfassung.....	70
6. Referenzen.....	73
7. Abkürzungen.....	83

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

In Deutschland ist etwa jedes 7. Paar von einem unerfüllten Kinderwunsch betroffen. Die Gründe hierfür sind vielfältig, oft ist keine Ursache diagnostizierbar. Zur Behandlung der Sterilität können aktuell verschiedene Techniken der assistierten Reproduktion angewandt werden. Hierbei finden unter anderem einfache Methoden wie das Monitoring des weiblichen Zyklus mit Bestimmung des Ovulations- und demnach optimalen Konzeptionszeitpunktes Verwendung. Bei ausbleibendem Erfolg können dann je nach Indikation hormonelle Stimulationsbehandlungen und/oder Inseminationstechniken durchgeführt werden. Ziel dieser Methoden ist stets die Optimierung des zeitlichen wie örtlichen Zusammentreffens der weiblichen und männlichen Keimzellen.

Sowohl weibliche als auch männliche Faktoren können Ursachen eines unerfüllten Kinderwunsches sein. Die häufigste Indikation für eine Insemination ist die leichte bis mittelgradige Subfertilität des Mannes. Das Vorliegen einer schweren Endometriose oder von Verklebungen im Bereich der Tuben kann eine In-Vitro-Fertilisation (IVF) erfordern. Die schwere andrologische Subfertilität mit einem stark eingeschränkten Spermogramm stellt die häufigste Indikation für eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) dar.

1.1. In vitro Fertilisation (IVF)

Im Jahre 1978 berichteten der britische Physiologe Robert G. Edwards und der Gynäkologe Patrick Steptoe von der ersten erfolgreichen In-vitro-Fertilisation (Steptoe und Edwards, 1978). Louise Brown wurde als erstes „Retortenbaby“ in der Nähe von Cambridge geboren. Nach einer laparoskopischen Eizellentnahme und einer extrakorporalen Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium des Ehemannes wurde der Embryo für zweieinhalb Tage kultiviert und anschließend im 8-Zell-Stadium in die Gebärmutter transferiert.

In Deutschland etablierte sich die Methode nach der Geburt des ersten IVF-Babys in Erlangen im Jahre 1981.

Im Laufe der Jahre verbreitete sich die IVF international und unterlag einer Reihe von Verbesserungen. So wurde die Eizellentnahme zunächst im spontanen Zyklus auf laparoskopischem Wege durchgeführt, heute findet sie in den meisten Fällen im stimulierten

Zyklus kurz vor dem Eisprung statt. Der laparoskopische Zugangsweg ist heute durch die sonographisch gesteuerte transvaginale Follikelpunktion weitgehend ersetzt worden.

Auch die Methodik der Embryonenkultur hat sich in den letzten Jahren durch immer wieder neue Forschungserkenntnisse gewandelt (Bing und Ouellette, 2009).

In den 90er Jahren wurde mit Hilfe der sogenannten „Co-Kulturen“ der Kulturmedien mit somatischen Zellen (z.B. humane Tubenepithelien, autologes Endometrium, autologe Theka granulosa oder tierische Epithelien) der steigende metabolische Bedarf der Embryonen gesichert. Durch die Co-Kultur mit somatischen Zellen entwickelte sich eine höhere Rate an Embryonen bis zum gewünschten Blastozysten-Stadium (Magli *et al.*, 1995; Kattal *et al.*, 2008). Problemhaft war diese Art der Kultivierung insofern, als dass es hierunter zum einen zu einer höheren Infektionsrate durch Fremdzellen kam, zum anderen ergab sich ein deutlich erhöhter Laboraufwand, so dass man letztendlich von dieser Art der Kultur wieder abkam.

Mit der Einführung von sequentiellen Medien wurden die Kulturbedingungen für die Embryonen zusehends verbessert. Diese Kulturmedien berücksichtigen die sich ändernden Ernährungsansprüche der Embryonen während ihrer Entwicklung. So beinhalten sie ein einfaches Medium für die Insemination und Fertilisation (Tag 1), ein weiteres Medium für die Entwicklung bis zum 6-bis 8-Zeller-Stadium (Tag 3) sowie ein komplexes Medium für die Kultivierung bis zum Blastozysten-Stadium (Tag 6-7). Mit der Dauer der Kultur steigen die Bedürfnisse der Embryonen an Nährstoffen, die sich ändernde Zusammensetzung der Medien wird diesem gerecht. (siehe Abbildung (Abb.) 1)

Auch die Dauer der Kultur wurde modifiziert. Aktuell tendieren viele Forschergruppen dazu, die verlängerte Kulturzeit bis zum Blastozysten-Stadium zu favorisieren (Gardner *et al.*, 1997, Lane *et al.*, 2007, Zollner *et al.*, 2004). Während zu Beginn der IVF-Entwicklung Embryonen im Mehrzell-Stadium (4- bzw. 8-Zeller) transferiert wurden, so kann man heute die Embryonen nach morphologischen Kriterien beurteilen und die Blastozyste mit dem besten Potential für den Embryotransfer auswählen. Ziele dieser verlängerten Embryonenkultur sind höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten. Auf die Relevanz der Gesetzgebung des jeweiligen Landes (Deutschland versus Australien in der vorliegenden Studie) sei im Abschnitt 1.5 (Blastozystenkultur in Deutschland und Australien) eingegangen.

IVF-Medium für Insemination und Fertilisation	Modifiziertes „human tubal fluid“ (HTF) Medium, mit 25 mM Bikarbonat gepuffert, enthält Penicillin und 10 mg/ml humanes Serumalbumin
G1.2-Medium für die Kultivierung ab dem Pronukleusstadium (Tag 1) bis zum 6 bis 8-Zeller (Tag 3)	mit Bikarbonat gepuffertes IVF-Medium mit nichtessentiellen Aminosäuren und Penicillin, veränderte Konzentration von Glukose, ohne EDTA
G2.2-Medium für die Kultivierung bis zum Stadium der Blastozyste (Tag 5-6) und Transfer	Komplettes bikarbonatgepuffertes Kulturmedium mit Aminosäuren, Vitaminen, Hormonen, 2 mg/ml Humanalbumin und Penicillin

Abbildung 1: Kombination dreier kommerziell erhältlicher Medien für die Blastozystenkultur (IVF 20, G1.2- und G2.2-Medium der Scandinavian IVF Science, Göteborg) (Steck T., 2001).

1.2. Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

1992 wurde über die erste Lebendgeburt nach Durchführung einer ICSI beim Menschen berichtet. Nach Einführung dieser weiteren Methode der Mikromanipulation, das heißt einer mikroskopisch assistierten Fertilisation der Vereinigung von Eizelle und Spermium, gab es jetzt auch eine effektive Behandlung der schweren männlichen Subfertilität, zum Beispiel des Oligo-Asthenoteratozoospermie-Syndroms. Diese häufigste männliche Fertilitätsstörung ist charakterisiert durch das gleichzeitige Vorkommen von verminderter Dichte, erniedrigter Motilität und erhöhter Fehlformrate der Spermien. Auch schwerste Formen der männlichen Subfertilität haben mit diesem Verfahren noch realistische Aussichten auf Erfolg, denn zur Injektion muss nur ein einziges Spermium zur Verfügung stehen. Die ICSI ist ebenso eine wirksame Methode bei Fertilisationsversagen nach Anwendung einer konventionellen IVF (Bing und Ouellette, 2009).

1.3. Befruchtung, frühe Embryonalentwicklung und Implantation – Physiologische Grundlagen

Nach dem Eisprung wird die Eizelle, umgeben von ihrer Corona radiata, in die Tuba uterina aufgenommen. Die Fimbrienbewegung sorgt für den Transport in die Ampulle der Tube.

Nach Aszension der Spermien innerhalb der Gebärmutter bis in den ampullären Teil der Tube erfolgt die Verschmelzung eines einzelnen Spermiums mit der Eizelle. Der größte Teil der Spermien geht auf dem Wege zugrunde und wird von Leukozyten im Uterusmilieu phagozytiert. Nach Eindringen des Spermiums in den Zellleib der Eizelle, dem Ooplasma, kommt es zum Abschluß der meiotischen Reifeteilung und zur Ausstoßung des 2. Polkörperchens. Die Befruchtung zeigt sich zunächst im Auftreten von zwei Vorkernen (Pronuklei) innerhalb von 16-18 Stunden nach Eindringen des Spermiums. In diesem Stadium spricht man von einer imprägnierten Oozyte. Der Fertilisierungsprozess ist erst später nach Abschluß der Verschmelzung beider Vorkerne (Syngamie) und anschließender erster Zellteilung komplett abgeschlossen (24-36 Stunden). Ab diesem Stadium spricht man von einem Präimplantations-Embryo, der sich nun im geteilten Stadium befindet. Es folgen weitere Zellteilungen bis zum 16-Zell-Stadium (Tag 3-4 nach Ovulation). In diesem sogenannten Morula-Stadium vollzieht der Embryo eine Kompaktion der einzelnen Zellen zu einem dichten Verband, so dass lichtmikroskopisch keine einzelnen Zellen mehr abgegrenzt werden können. Am 5. Tag bildet sich das Blastozoele, eine flüssigkeitsgefüllte Höhle innerhalb des Embryos.

Das Schlüpfen der Blastozyste aus der sie umgebenden Schicht, der Zona pellucida, erfolgt am Beginn des 6. Tages nach dem Eisprung. Die Implantation der Blastozyste erfolgt während des 6. Tages und wird in drei Phasen unterteilt: die der Anheftung, der Invasion und schließlich der Nidation und Plazentation. Zunächst heftet sich der embryoblastäre Pol der Blastozyste an der Gebärmutterschleimhaut (Endometrium) an. Dieser Bereich ist mit sogenannten Trophoblastzellen überzogen, die direkten Kontakt mit den Epithelzellen des Endometriums aufnehmen. Diese Interaktion wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen (Integrine) vermittelt. Es wird diskutiert, dass in einem begrenzten Zeitraum während der Implantation (ca. 20.-24. Zyklustag), dem sogenannten „window of implantation“, es zu einer Hochregulation der Integrinexpression im Epithel der Gebärmutterschleimhaut kommt (Lessey 2002, Lessey *et al.*, 1995).

Nach der Anheftung der Blastozyste beginnt die Invasion in das Endometriumstroma. Dazu muss der Embryo durch Induktion von lokalen Apoptosevorgängen seinen Durchtritt durch Epithelschicht und Basalmembran ermöglichen (Galaan *et al.*, 1999). Das endometriale Stroma kann anschließend durch den Einfluss proteolytischer Enzyme lokal zerstört werden. Es wird diskutiert, ob diese Enzyme vom Embryo selbst gebildet werden oder ob eine endometriale Produktion als Reaktion auf embryonale Zytokine stattfindet. Gegenspieler der proteolytischen Enzyme sind spezifische Inhibitoren, welche von Stromazellen der Gebärmutter Schleimhaut gebildet werden sollen (Huang *et al.*, 1998, Floridon *et al.*, 1999, Feng *et al.*, 2000).

Für die Implantation sind unter anderem Parameter wie die Rezeptivität des Endometriums und die Blastozysten-Morphologie von Bedeutung (Donaghay *et al.*, 2007, Straessen *et al.*, 1989,1995). Wenngleich die Rolle der Zytokine im Rahmen der Implantation in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde, so gibt es noch keine verbindlichen Ergebnisse. Die Morphologie der Blastozyste sowie deren Expression von Zytokinen stellen jedoch wahrscheinlich wichtige prognostischen Faktoren dar.

1.4. Zytokine

Zytokine sind Proteine einer Masse von 8 bis 30 kDa (kilo-Dalton), die von verschiedensten Zellen sezerniert werden. Ihre grundlegende Funktion ist die Beeinflussung und Veränderung von Eigenschaften verschiedenster Zellen und Geweben.

Zu den Zytokinen gehören nicht nur Botenstoffe, die von immunologischen und inflammatorischen Zellen gebildet werden, sondern ebenso eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Onkogenen, Chemokinen und andere Faktoren, welche Einfluss auf das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Zellen haben.

Zytokine binden an ihren spezifischen Rezeptor in Zellmembranen und induzieren auf diese Weise eine Kaskade an Signalwegen, die zum eigentlichen Effekt des Zytokins auf eine Zelle oder ein Gewebe führen.

1.4.1. TNF-alpha (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha)

Der Tumor-Nekrose-Faktor ist ein pleiotropes Zytokin, das ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommt. Erstmals beschrieben von Old im Jahre 1955 wurde TNF- alpha als zytotoxisches Protein nach Endotoxin-Behandlung im Serum von Kaninchen identifiziert. Dieser Faktor war verantwortlich für die hämorrhagische Nekrose in Tumorgewebe (Old, 1985) - daher der Name „Tumor-Nekrose-Faktor“. Die Bezeichnung „Tumor-Nekrose-Faktor-alpha“ folgte erst nach der Entdeckung von „TNF-beta“ - auch Lymphotoxin genannt.

Kawakami und Cerami beschrieben 1981 ein Molekül, welches Symptome einer Kachexie bei Patienten mit diversen chronischen Erkrankungen (zum Beispiel Krebserkrankungen oder chronisch entzündliche Erkrankungen) hervorruft. Sie nannten dieses Molekül „Cachectin“, das sich später als identisch mit TNF-alpha heraus stellte (Kawakami und Cerami, 1981).

Das Wirkungsspektrum von TNF-alpha ist jedoch vielfältiger als ursprünglich erwartet. So ist TNF-alpha ein Mediator bei Apoptosevorgängen und spielt bei Entzündungs- sowie Immunreaktionen eine wichtige Rolle. In der Pathogenese vieler Erkrankungen hat TNF-alpha eine entscheidende Funktion: unter anderem bei Sepsis, Multipler Sklerose, Osteoporose, Krebserkrankungen und Diabetes (Chen *et al.*, 2002). Eine ganze Reihe menschlicher Zelltypen produzieren dieses Zytokin: dazu gehören vor allem Monozyten und Makrophagen, jedoch auch NK-Zellen, T-Lymphozyten und Mastzellen.

Einige Studien der letzten Jahre hoben die Bedeutung von TNF-alpha in der Reproduktionsmedizin hervor. Eine wichtige Rolle scheint es in der Schwangerschaft zu haben. So werden TNF-alpha-Protein, TNF-alpha-RNA und auch seine Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 im Verlauf einer Schwangerschaft in verschiedenen Geweben, wie Eierstöcke (Roby *et al.*, 1990), Endometrium (Hunt *et al.*, 1992), Plazenta (Yelavarthi *et al.*, 1991) und im Fetus selbst exprimiert (Zolti *et al.*, 1991).

Die Effekte von TNF-alpha auf den Schwangerschaftserfolg und den Verlauf einer Schwangerschaft werden kontrovers diskutiert. TNF-alpha scheint eine bedeutende Funktion bei Differenzierungs- und Wachstumsprozessen in einer normal verlaufenden Schwangerschaft zu haben (Argiles *et al.*, 1997). Seine negativen Eigenschaften werden in Verbindung mit habituellen Aborten und IVF/ICSI-Versagen diskutiert (Reid *et al.*, 2001; Barmat *et al.*, 1999, Zollner *et al.*, 2004).

1.4.2. Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

1987 beschrieben Gearing und Metcalf ein pleiotropes Zytokin, das die Differenzierung von myeloischen Zellen einer leukemischen Zellreihe (M1) zu Makrophagen ermöglichte (Gearing *et al.*, 1987, Hilton *et al.* 1988). LIF gehört zu der Interleukin-6-Familie und wird wie auch sein Rezeptor LIF-R von diversen Zellen exprimiert: dazu gehören unter anderem aktivierte T-Zellen, Monozyten, Astrozyten, Osteoblasten, Keratinozyten, Myoblasten, Mastzellen, Fibroblasten und Hepatozyten (Hilton *et al.*, 1992). Dies erklärt die Beteiligung von LIF an vielen Vorgängen im menschlichen Körper, wie zum Beispiel Hämatopoese, Knochenmetabolismus, inflammatorische Reaktionen, Differenzierungs- und Proliferationsprozessen (Hilton 1992).

In den letzten zwanzig Jahren beschäftigten sich viele Forscher im Bereich der Reproduktionsmedizin mit dem Leukemia Inhibitory Factor. Smith *et al.* identifizierten 1988 LIF als erstes Protein, das Einfluss auf die Differenzierung von embryonalen Zellen von Mäusen nahm (Smith *et al.*, 1988). Viele Studien untersuchten anhand von Tiermodellen (meist mit Mäusen) die Effekte von LIF auf Blastozystenentwicklung und Implantation. So wurde LIF mRNA in Maus-Präimplantationsembryonen während der Entwicklung vom befruchteten Ei bis hin zur Blastozyste exprimiert (Conquet und Brulet, 1990). Cheng *et al.*, 2004) verzeichneten nach Zugabe eines LIF-antisense-Nukleotid eine geringere Blastozysten-Formationsrate sowie einen signifikanten Abfall bei der Implantationsrate. Auch erreichten im Mausmodell Embryonen in einem mit LIF angereicherten Kulturmedium eine höhere Rate an Blastozysten (Dunlison *et al.*, 1996). In arretierten Embryonen jedoch wurde eine geringere Expression von LIF beobachtet (Chen *et al.*, 1999). Viele Studien der letzten 15 Jahre zeigen, dass LIF eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Implantation von Embryonen hat (Paiva *et al.*, 2009). Seine Interaktionen mit anderen Zytokinen des Reproduktionstraktes sind noch weitgehend ungeklärt und benötigen weitere Studien.

1.5. Blastozystenkultur in Deutschland und Australien

In den meisten Ländern wird die Anwendung assistierter Reproduktionstechniken gesetzlich geregelt. Das Deutsche Embryonenschutzgesetz (dESchG) legt den Umfang der erlaubten Maßnahmen in Deutschland fest. Im Vergleich zu anderen europäischen Ländern sind die Richtlinien in Deutschland relativ restriktiv. In den USA und auch in Australien werden Aspekte wie Kryokonservierung (Einfrieren) von Eizellen oder Embryonen sowie

Leihmutterschaft und Samenspende eher liberal behandelt (Jones and Cohen, 2004, Ethical Guidelines for the clinical Practice of ART, Australian Government, National Health and Medical Research Council, 2007). Die weltweite Tendenz ist heute die verlängerte Kultur der Embryonen bis hin zum Stadium der Blastozyste (siehe Abbildung 2b).

Verbesserte Kulturtechniken und der Einsatz von sequentiellen Kulturmedien machen dies möglich. Ein Argument für die Kultur bis zum 5. Tag nach IVF/ICSI ist die verbesserte Synchronisation des Embryos mit dem Endometrium (Gardner *et al.*, 1997). Hieraus ergibt sich die Möglichkeit des Single Embryo Transfers, d. h. die Auswahl nur eines Embryos mit optimalem Potential für eine erfolgreiche Implantation und somit die Vermeidung von Mehrlingen. Viele europäische Länder und auch Australien praktizieren diese Methode der Auswahl des zu transferierenden Embryos im Blastozystenstadium. In Deutschland jedoch findet diese im Vorkern (Pronukleus)-Stadium (siehe Abb. 2a) statt. Dieses in der embryonalen Entwicklung sehr frühe Stadium ermöglicht zwar die Prädiktion eines späteren Implantationserfolges (Zollner *et al.*, 2002), viele Studien der letzten Jahre jedoch scheinen einen besseren Implantationserfolg und höherer Schwangerschaftsraten bei einer späteren Auswahl nahezulegen (Gardner *et al.*, 1997). Gemäß Embryonenschutzgesetz ist ein Embryo im Pronukleus-Stadium nicht als solcher definiert, so dass in Deutschland in diesem Stadium die Auswahl erlaubt ist, nicht jedoch im späteren per Gesetz als Embryo definierten Blastozysten-Stadium.

In Deutschland ist die Kultivierung von maximal 3 Embryonen erlaubt. Der Embryotransfer erfolgte in vielen IVF-Zentren bislang am Tag 2 oder 3 nach Eizellgewinnung, die Auswahl der Embryonen muss zuvor im Pronukleus-Stadium erfolgen. Eine verlängerte Kultur bis zur Blastozyste wird nun auch in Deutschland durchgeführt (Zollner *et al.*, 2002), während es in Australien schon lange Standard ist. Es hat sich aber gezeigt, dass diese Methode in Deutschland keinen Vorteil bringt. Eine Reglementierung bezüglich der Anzahl der kultivierten Embryonen, dem Zeitpunkt der Auswahl der morphologisch besten Embryonen und der Anzahl der transferierten Embryonen gibt es in Australien nicht.



Abbildung 2a: Vorkernstadium



Abbildung 2b: voll-expandierte Blastozyste

1.6. Zielsetzung dieser Studie

Mit der Anwendung eines detaillierten Vorkern-Scoring-Systems ist es möglich, unter den relativ strengen Richtlinien des deutschen Embryonenschutzgesetzes (dEschG) Zygoten mit einem hohen Entwicklungspotential auszuwählen. Viele Studien der letzten Jahre zeigen, dass der Embryotransfer im Blastozystenstadium zu höheren Implantations- und Schwangerschaftsraten führt. Nach den australischen gesetzlichen Bestimmungen müssen die Zygoten für die weitere Embryonenkultur bis zum Tag 5 nicht bereits im Vorkernstadium ausgewählt werden - so wie es nach dem deutschen EschG verlangt wird. Dies ermöglicht es, alle gewonnenen Eizellen in ihrer weiteren Entwicklung zu bewerten und am 5. Tag den oder die Embryonen mit dem bislang besten Entwicklungsstand für den Embryotransfer auszuwählen. Nicht nur die genaue Analyse der Vorkern-Morphologie sondern vor allem die der Blastozystenmorphologie ist von Bedeutung für diese Auswahl.

Gegenstand dieser Studie war es, eine Korrelation zwischen dem bereits in Deutschland etablierten Pronukleus-Scores (PN-Score) und der Blastozystenmorphologie an einem australischen Kollektiv aufzuzeigen, da hier ja in der Regel alle Vorkernstadien 5 Tage kultiviert werden und so eine bessere Aussage über den Zusammenhang der Tag 1- und der Tag 5-Morphologie gemacht werden kann als unter den Bedingungen des deutschen Embryonenschutzgesetzes.

Weiterhin machte es sich die Studie zum Ziel, anhand der Daten einen möglichen Zusammenhang zwischen der Blastozystenmorphologie beziehungsweise der Vorkernmorphologie und dem Implantations- und Schwangerschaftserfolg darzustellen.

Ferner galt es, die Konzentrationen der für die frühe Implantationsphase bedeutsam erscheinenden Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Leukemia Inhibitory Faktor im Kulturmedium zu messen und auf einen möglichen Zusammenhang mit der Vorkern-Morphologie, der Blastozystenmorphologie beziehungsweise dem Schwangerschaftserfolg hin zu untersuchen.

2. Material und Methoden

Die Studie erfolgte während eines durch das IZKF Würzburg geförderten Forschungsaufenthaltes von Frau PD Dr. U. Zollner in Sydney, Australien (Sydney IVF). Die Zytokinmessungen und morphologischen Beurteilungen der Embryonen erfolgten anhand des gewonnenen Bildmaterials in Deutschland im Rahmen der vorliegenden Dissertation.

2.1. Patientenkollektiv

In der Zeit vom Juli 2003 bis November 2003 durchliefen 103 Patientinnen das IVF/ICSI-Programm im Sydney IVF-Zentrum, Sydney, Australien. Die Patientinnen nahmen konsekutiv an dieser prospektiven Studie teil, es gab keine Ausschlusskriterien hinsichtlich ihres Alters, der Spermaqualität, des Alters ihres Partners oder der Ursache der Infertilität. 99 Fälle wurden in die Auswertung dieser Studie einbezogen, da 4 Fälle nachträglich ausgeschlossen werden mussten. Die Gründe hierfür waren ein komplettes Fertilisationsversagen in 2 Fällen, so dass kein Transfer durchgeführt wurde, sowie zwei Fälle einer Second-day-ICSI (Spermieninjektion am Tag 1 nach Fertilisationsversagen bei konventioneller IVF).

2.2. Ovarstimulation

Die In- vitro- Fertilisation erfolgt heute in den meisten Fällen nach hormoneller Stimulation der Ovarien.

Im spontanen Zyklus reift nur ein Follikel mit einer Eizelle heran. Die Follikelpunktion und das Auffinden der Eizelle sind trotz mehrmaligen Spülens wenig Erfolg versprechend. Ein Embryotransfer nach IVF im Spontanzyklus ist nur in 50 bis 75% der Fälle möglich (Steck T, 2001). Aus diesem Grund wird eine kontrollierte ovarielle Hyperstimulation durchgeführt, um mehrere Eizellen gleichzeitig heranreifen zu lassen.

Die Induktion der Follikelreifung erfolgte mittels einer kontrollierten ovariellen Überstimulation. Es wurden standardisierte Protokolle angewendet. Zu diesen gehören das „short protocol“ und das „long protocol“. Im „long protocol“ wurde anschließend an eine hypophysäre Downregulation mit einem GnRH-Analogon (Gonadotropin-releasing-Hormon) reines rekombinantes FSH (Follikel-stimulierendes-Hormon) ab dem 3. Zyklustag appliziert.

FSH ist ein Hormon, welches das Follikelwachstum im Ovar stimuliert und in der ersten Zyklushälfte mehrere Follikel heranreifen läßt. Durch die Downregulation der hypophysären Hormonproduktion mit einem GnRH-Analagon verhindert man einen vorzeitigen LH-Anstieg (luteinisierendes Hormon) im Serum, welcher zu einer verfrühten Ovulation führen würde. Um diese vorzeitige Luteinisierung bei den Patientinnen zu unterdrücken, verabreichte man ihnen am 22. Zyklustag des Vorzyklus 0,2 mg Nafarelin (GnRH-Analagon) intranasal 2- 4 Mal täglich.

Zur darauffolgenden kontrollierten ovariellen Überstimulation wurde den Patientinnen ab dem 3. Zyklustag täglich reines rekombinantes FSH subkutan appliziert. Die weitere Applikation richtete sich nach dem individuellen Ansprechen der Ovarien auf die Stimulation. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte die Kontrolle des Wachstums, der Anzahl und der Größe der Follikel mittels vaginaler Sonographie. Nachdem der Leitfollikel einen Durchmesser von 18 mm erreicht hatte, wurde den Patientinnen noch am gleichen Abend 10 000 IU (internationale Einheiten (units)) HCG verabreicht. Zu diesem Zeitpunkt sollte der Östradiolspiegel für 6 bis 7 Tage stetig angestiegen sein. Das Östradiol wird in den Granulosazellen der Follikel gebildet. Die regelmäßige Messung des Serum-Östradiols stellt somit einen wichtigen Parameter im Monitoring einer erfolgreichen Stimulationsbehandlung dar. Durch die regelmäßige Überwachung von Follikelwachstum und Serumöstradiol kann die medikamentöse Stimulation optimal und individuell gesteuert werden und ist somit Voraussetzung für eine erfolgreiche Eizellentnahme.

2.3. Follikelpunktion

Die Eizellentnahme erfolgte 36 bis 38 Stunden nach der HCG-Injektion, d.h. kurz vor der zu erwartenden Ovulation. Die Follikelpunktion wurde transvaginal unter sonographischer Sicht mittels einer Punktionsnadel durchgeführt. Die Patientin erhielt ca. 30 bis 60 Minuten vor dem Eingriff ein Sedativum. Eine Epiduralanästhesie oder eine kurze Vollnarkose waren ebenfalls möglich. Das hintere und seitliche Scheidengewölbe wurde mit einem Lokalanästhetikum betäubt. Nachdem die Harnblase vollständig entleert wurde, erfolgten die Desinfektion der Vagina und ein Nachspülen mit Kochsalzlösung. Der nächste Schritt bestand in einer orientierenden sonographischen Untersuchung des kleinen Beckens (Lage der Eierstöcke und der Gebärmutter, Ausschluss von freier Flüssigkeit). An den transvaginalen

Ultraschallapplikator wurde eine Spül-Saugautomatik angebracht. Die Punktionslinie war auf dem Bildschirm des Ultraschallgerätes vorgegeben. Im Bereich des hinteren seitlichen Scheidengewölbes wurde die Scheidenschleimhaut durchstoßen. Unter sonographischer Sicht wurde gezielt ein Follikel punktiert und die Follikelflüssigkeit vollständig aspiriert. Durch die Punktionsautomatik war es möglich, einen konstanten Sog mit einem negativen Druck von 180 mmHg auszuüben. Durch anschließendes Spülen der Wand des aspirierten Follikels mit Kulturmedium waren die Erfolgsaussichten, die Eizelle zusammen mit der Follikelflüssigkeit zu aspirieren, nahezu bei 100 % gelegen. Es wurden nacheinander alle Follikel abpunktiert. Ein eventuelles Nachbluten aus den Einstichstellen der Vaginalschleimhaut sistierte nach wenigen Minuten.

Im Anschluss an die Punktion erfolgte das Aufsuchen der Eizellen in den Punktaten unter dem Stereomikroskop (Nikon SMZ 1500, Japan) mit variierender Vergrößerung von 7,5 bis 112,5 fach im Gegenlicht, anschließend die Überführung der Eizellen in das Kulturmedium (SIVF „inhouse“). Dies wurde so schnell wie möglich durchgeführt, da bereits nach wenigen Minuten die Temperatur im Punktat absinkt und der CO₂-Partialdruck ansteigt, was eine Veränderung des pH-Wertes und somit eine Änderung des zellulären Milieus der Eizelle zur Folge hat. Anschließend wurden die Eizellen in entsprechend vorbereitete Kulturschälchen verbracht und im Brutschrank inkubiert.

2.4. Spermienpräparation

2.4.1. Gewinnung der Spermien

Die Spermengewinnung erfolgte durch antegrade Masturbation in ein steriles Gefäß. Zuvor ist eine sexuelle Karenzzeit von 2 bis 5 Tagen empfehlenswert. Innerhalb einer Stunde sollte die Spermienprobe im IVF-Labor abgeliefert worden sein. Das Ejakulat wurde bei 37°C bis zur Verflüssigung aufbewahrt und die Verflüssigungszeit notiert (ca. 30 bis 60 min). Im Anschluss daran erfolgte die Ejakulatanalyse nach den Richtlinien der WHO (WHO, 1992). Volumen, pH-Wert und Farbe des Ejakulates wurden bestimmt und die mikroskopische Untersuchung (Spermienkonzentration, Volumen, Gesamtmenge, Motilität, Morphologie und Vitalität der Spermien, Anzahl der Leukozyten) der Spermienprobe durchgeführt.

2.4.2. Aufbereitung der Spermien

Ziel jeder Spermienaufbereitung ist die Konzentrierung progressiv beweglicher Spermien mit normaler Morphologie, die Trennung der Spermien vom Seminalplasma, die Beseitigung von Bakterien und Detritus und die Reduktion des Volumens des nativen Ejakulats (Steck T, 2001).

In dieser Studie wurde die Aufschwimm-Methode (swim up) zur Aufbereitung des Ejakulates verwendet. Bei der swim-up-Methode wurde nach Spermkissenzentrifugation (Trennen von Seminalplasma, Bakterien, Detritus, Leukozyten und Spermien) die spermienhaltige Phase mit einem Medium überschichtet, in das nur motile Spermien schwammen. Durch dieses Prinzip des swim-ups wurden bewegliche Spermien von unbeweglichen Spermien, zellulären Bestandteilen und Bakterien getrennt. Dem eigentlichen Aufschwimmen der Spermatozoen gingen folgende initiale Wasch- und Zentrifugationsschritte voraus:

Im ersten Schritt wurde das native Ejakulat auf zwei oder mehrere Röhrchen aufgeteilt und bei 200 g für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5802, Australien), bevor es anschließend mit jeweils 0,5 ml (IVF culture medium, SIVF, Australien) pro Röhrchen resuspendiert wurde. Danach erfolgte eine zweite und dritte Zentrifugation bei 145 g für 2 min. Die Überstände wurden nach jedem Durchgang mit einer Pipette entfernt. Durch die Zentrifugation blieb am Boden jedes Röhrchens ein spermienreicher Bodensatz (Pellet) zurück. Zur Vorbereitung auf die anschließende Inkubation wurde das Pellet mit Kulturmedium überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 bis 60 min. Der Überstand mit den aufgeschwommenen motilen Spermien wurde abgehoben und zu 5µl einer 10 %igen Polyvinylpyrrolidon-(PVP-) Lösung („inhouse“ SIVF, Australien) gegeben (Zollner *et al.*, 2001; Steck T, 2001).

2.5. IVF-Fertilisation

Im Anschluss an die Follikelpunktion erfolgte die Identifizierung des Cumulus-Oozyten-Komplexes (COC) im frischen Punktat. Dazu überführte der Embryologe die gewonnene Follikelflüssigkeit in eine Petrischale und durchsuchte sie unter einem Lichtmikroskop auf das Vorhandensein des COC. Zur groben Säuberung wurden die Cumulus-Oozyten-Komplexe mit einer Pasteur-Glaspipette auf- und abgezogen und anschließend in ein

Kulturmedium überführt. Bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Eizellen in einem Brutschrank für eine halbe Stunde äquilibriert. Zur Insemination wurde jede Eizelle jeweils in einen Tropfen von 25 µl Kulturmedium (SIVF, Australia) mit 40000 motilen Spermien gegeben, auf ein Nunc Petridish (Durchmesser von 55 mm) transferiert, anschließend 12-5 h vor Verwendung eingesetzt und im Brutschrank äquilibriert. Bei dem eingesetzten Mineralöl handelt es sich um ein chemisch inertes Öl, welches die Verdunstung von Kulturmedium verlangsamt. Ein Verdampfen des im Medium gelösten CO₂ hätte zusätzlich eine Veränderung des pH-Wertes und der Osmolarität zur Folge und würde zu unphysiologischen Bedingungen für die Eizelle führen. (Steck T, 2001).

2.6. ICSI-Fertilisation

Lag als Indikation für die künstliche Befruchtung eine männliche Subfertilität des Partners vor, wurde die intrazytoplasmatische Spermieninjektion der konventionellen IVF Methode vorgezogen. Wie auch bei der IVF wurden die aspirierten COC („cumulus oocyte complex“) im Kulturmedium bei 37 °C, in Raumluft mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Präinkubation der COC (1 bis 2 Stunden) schloß sich die Denudation der Eizelle (Befreiung der Eizelle von umgebendem Cumulus oophorus und der Corona radiata) an. Mit Hilfe des Enzyms Hyaluronidase konnten Cumulus-oophorus-Zellen nach einer kurzen Einwirkzeit von der Eizelle entfernt werden. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Corona radiata von der Eizelle mechanisch abgelöst. Anschließend erfolgte die Mikroinjektion des Spermiums in die Eizelle. Dafür wurde die zu befruchtende Eizelle in einen Tropfen Kulturmedium in das so genannte ICSI-Schälchen überführt. Die Injektion wurde auf einer mit 37 °C beheizten Glasplatte unter einem Inversionsmikroskop mit 250facher Vergrößerung durchgeführt. Ein weiterer Tropfen mit 1 bis 5 µl PVP (Polyvinylpyrrolidon) gemischt mit etwa 0,5 µl Spermien suspension wurde für wenige Minuten inkubiert, bis die Spermien in die äußere Begrenzung des Tropfens gewandert waren. Nach Auswahl eines vitalen Spermiums wurde dieses durch Druck mit der Injektionskanüle auf den Schwanz immobilisiert („crush“ des Spermiumschwanzes). Die Verwendung von PVP diente der Verlangsamung der Eigenbeweglichkeit des Spermiums. Anschließend wurde das Spermium mit dem Schwanz voran in die Injektionskapillare (gefüllt mit PVP) aufgezogen bis es sich im vorderen Drittel befand. Nachdem die Eizelle in Position gebracht wurde (Polkörperchen auf 6 oder 12 Uhr), fixierte man sie durch leichten Sog der Haltekapillare. Die Injektion erfolgte bei 3 Uhr in der

äquatorialen Ebene. Das Spermium positionierte man an die Spitze der Injektionskapillare und platzierte es nach Durchstechung der Zona pellucida und der Eizellmembran vorsichtig tief in der Eizelle (50 bis 75 % des Durchmessers der Eizelle). Durch Einsaugen der Eizellmembran wird das Brechen derselben erreicht, erst dann ist ein vorsichtiges Injizieren des Spermiums in die Eizelle möglich (Abb. 3). Die Injektionskapillare wurde anschließend vorsichtig zurückgezogen und die Eizellen nach Injektionsvorgang in Kulturmedium gespült und über Nacht inkubiert.

Die Beurteilung auf Fertilisation erfolgte 16 bis 18 Stunden nach ICSI. Zeichen einer erfolgreichen Fertilisation waren das Auftreten von zwei Vorkernen.

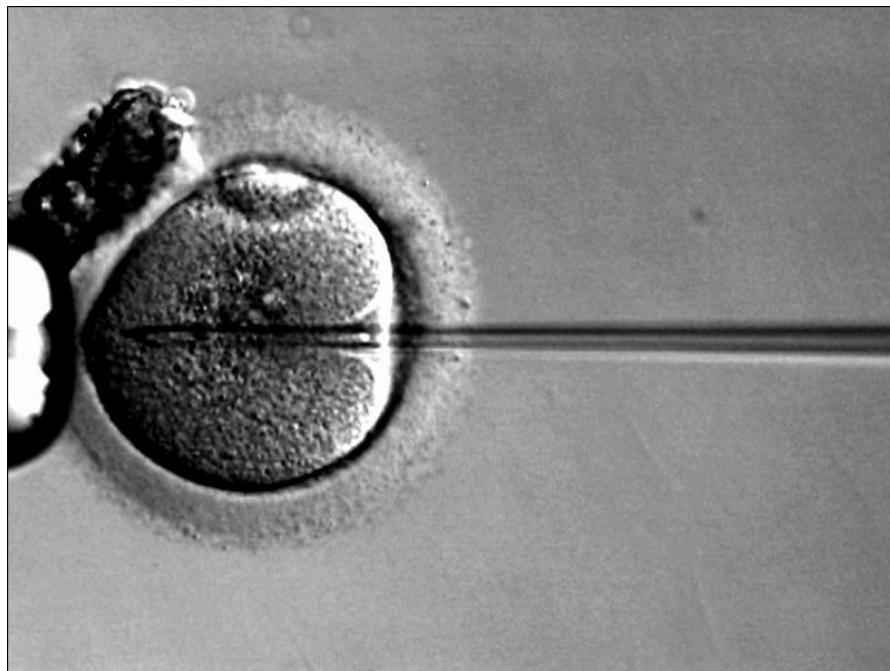


Abbildung 3: Einführen der Injektionskapillare und Applikation des Spermiums

2.7. Beurteilung der Zygoten im Vorkernstadium (PN-Stadium)

Nach 16 bis 18 Stunden Inkubation beurteilte man die inseminierten Eizellen auf Zeichen einer erfolgreichen Befruchtung (Tag 1 der Kultur). Die Kondensierung von zwei Vorkernen (Pronuklei) im Ooplasma der Eizelle und die Bildung eines zweiten Polkörperchens im perivitellinen Raum wurden als Zeichen einer normalen Fertilisation gewertet.

Die Kultivierung der Zygoten erfolgte in Einzeltropfen à 10-15 µl in einer Petrischale (Petridisc, Firma Nunc, USA, siehe Abbildung 4). Die Kultur der Embryonen erfolgte nach dem Prinzip der „single cell culture“, d. h. jede Eizelle befand sich einzeln in einem Mikrotropfen von 10-15 µl Kulturmedium (IVF „in-house-media“, SIVF). Die Anordnung der Zygoten in jedem einzelnen Tropfen und deren Nummerierung erfolgte in einer 5x5 Tropfenreihe beginnend links oben, endend rechts unten. Für die Beurteilung des PN-Stadiums wurde jede Eizelle einzeln unter mikroskopischer Sicht mittels Injektionsnadeln in die Äquatorialebene gedreht und die Anordnung der Vorkerne zueinander bestimmt. Anschließend erfolgte die Dokumentation mit einem Video-Drucker.



Abbildung 4: Exemplarische IVF-Kulturschalen (Nunc, USA)

2.7.1. Kriterien des PN-Scoring

Folgende Parameter wurden an den imprägnierten Oozyten im Vorkernstadium beurteilt (Zollner *et al.*, 2002):

- a) Anzahl der Vorkerne
- b) Anordnung der Vorkerne zueinander
- c) Größe der Vorkerne
- d) Halo- Effekt
- e) Anordnung der Nukleolen innerhalb der Vorkerne
- f) Anzahl der Nukleolen in jedem Vorkern
- g) Vakuolisierung des Ooplasmas
- h) Granulierung des Ooplasmas

Jeder Parameter der PN-Beurteilung wurde mit einem Zahlenwert bewertet. Die kumulative Summe der einzelnen Zahlenwerte ergab den PN-Score jeder Eizelle. Je niedriger der Wert, desto höher war das Potential der Eizelle für eine weitere positive Entwicklung einzuschätzen.

Alle Eizellen, die regulär fertilisiert wurden, d.h. zwei Vorkerne und zwei Polkörper aufwiesen, wurden weiter kultiviert und an den folgenden Tagen hinsichtlich ihrer morphologischen Entwicklung bewertet. Imprägnierte Oozyten mit einem oder drei Vorkernen wurden verworfen.

a) Anzahl der Vorkerne

Bei Eizellen mit zwei Vorkernen und zwei Polkörpern kann man von einer normalen Befruchtung ausgehen. Diese Vorkernstadien haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, eine normale morphologische Entwicklung zu durchlaufen. Imprägnierte Eizellen mit nur einem Pronukleus sind in etwa 70 % der Fälle haploid. Eine pathogenetische Aktivierung des mütterlichen Chromosoms kann hier die Ursache sein.

Eizellen mit drei Vorkernen sind ebenfalls nicht für eine weitere Kultivierung geeignet. In diesen Fällen liegt eine abnormale Fertilisation vor. Die Eizellen sind häufig triploid nach Befruchtung durch zwei Spermien während IVF. Weitere Möglichkeiten wären die fehlende Ausstoßung des 2. Polkörperchens (Digynie) oder ein chromosomales Mosaik.

Sind bei der PN-Beurteilung einer Eizelle keine Vorkerne unter dem Lichtmikroskop sichtbar, so kann es daran liegen, dass die Verschmelzung der beiden Vorkerne (Syngamie) schon stattgefunden hat. Die Zygote kann aber auch in ihrer Entwicklung verzögert sein, und aus diesem Grund wäre eine Kondensierung der Vorkerne noch nicht erfolgt. Am Tag 2 erscheinen die Pronuklei in etwa 25 % der Fälle. Das Potential für eine regelrechte embryonale Entwicklung ist auch in diesen Fällen reduziert. Hat eine Befruchtung tatsächlich nicht stattgefunden, so können genetische Anomalien zugrunde liegen (Steck, 2001).

b) Position der Vorkerne zueinander

Die Position der Vorkerne gibt Aufschluß über die Reifung und Ausprägung des mikrotubulären Apparates im Ooplasma und die synchrone Kondensation der mütterlichen und der väterlichen DNA.

Die optimale Position erreichen die Vorkerne, wenn sie sich maximal annähern. Die Membranen berühren sich und die Wandung der Vorkerne wird leicht eingedrückt. Diese Position wird mit 1 Punkt bewertet.

Haben beide Vorkerne sich stark angenähert so werden 2 Punkte vergeben. Ist die Position der Vorkerne disjunkt so gibt es 3 Punkte.

Die Zygoten mit nur einem Vorkern erhalten 4 Punkte.

c) Größe der Vorkerne

Sind die Vorkerne unterschiedlich groß ist das ein Hinweis auf eine asynchrone Entwicklung des genetischen Materials (Tesarik *et al.*, 1999).

Sind beide Vorkerne gleich groß, wird 1 Punkt gegeben, ist die Größe unterschiedlich werden 2 Punkte vergeben und bei nur einem Vorkern werden 4 Punkte in das Protokoll eingetragen.

d) Halo Effekt

Der Halo-Effekt ist bei der ersten Beobachtung der Eizelle unter dem Mikroskop als heller sichelartiger Saum im Randbereich der Oozyte zu sehen. Er entsteht durch Kondensationsvorgänge in der unmittelbaren Umgebung der Vorkerne, bei denen sich Mitochondrien und weitere Zellorganellen mit Hilfe von Mikrotubuli im Zentrum der Oozyte konzentrieren (Payne *et al.*, 1997).

Im Protokoll wird für einen Halo-Effekt normaler Ausprägung 1 Punkt, für einen leichten Halo 2 Punkte und für einen extremen Halo 3 Punkte notiert. Ist kein Halo Effekt vorhanden gibt es 4 Punkte.

e) Anordnung der Nukleoli innerhalb der Vorkerne

Die Nukleoli (nuclear precursor bodies, NPB) bestehen aus kondensierter mikroskopisch sichtbarer DNA und sind der erste Hinweis auf eine stattfindende Transkription in den Vorkernen (Tesarik und Kopečný, 1989).

Im Vorkernscore wird das Muster ihrer Anordnung in jedem einzelnen Vorkern erfasst. Diese kann möglicherweise repräsentativ für die Qualität des PN-Stadiums des Embryos sein.

Die Anordnung der NPB in Reihe wird mit einem Punkt bewertet. Beginnen sich die Nukleolen in einer Reihe zu formieren werden 2 Punkte notiert, sind sie allerdings ohne erkennbares Muster über den Pronukleus verteilt oder sind keine NPB vorhanden so gibt es 3 Punkte beziehungsweise 4 Punkte.

f) Anzahl der Nukleoli in jedem Vorkern

Die Anzahl der Nukleoli scheint mit dem späteren Entwicklungspotenzial vergesellschaftet zu sein. Sowohl zu wenige als auch zu viele Nukleoli wirken sich nachträglich aus.

3-5 Nukleolen (NPB) ergeben 1 Punkt im PN-Score, über 5 ergeben 2 Punkte, unter 3 NPB 3 Punkte und keine Nukleolen 4 Punkte.

g) Vakuolisierung des Ooplasmas

Eine starke Vakuolisierung des Ooplasmas ist ein Zeichen für degenerative Prozesse in der Zygote und damit als ein prognostisch ungünstiges Merkmal im Vorkern-Score erfasst.

Treten keinerlei Vakuolen auf wird ein Punkt notiert. Ist das Ooplasma nur leicht vakuolisiert werden 2 Punkte gegeben, ist es jedoch stark mit Vakuolen ausgefüllt werden 4 Punkte notiert.

h) Granulierung des Ooplasmas

Eine vermehrte Granulierung des Ooplasmas kann auf eine anormale Entwicklung der Zygote hinweisen.

Erscheint das Ooplasma homogen wird 1 Punkt notiert, weist es jedoch eine Granulierung auf werden 2 Punkte notiert.

2.7.2. Bilder zu den Vorkernstadien

Zur Illustration einige exemplarische Bilder verschiedener Vorkernstadien (Abb. 5A-f).



Abb. 5a: Vorkernstadium mit zwei gleich großen nahe beieinander liegenden Vorkernen, normaler Halo-Effekt, homogene Granulierung des Ooplasmas, keine Vakuolisierung (Score = 10).

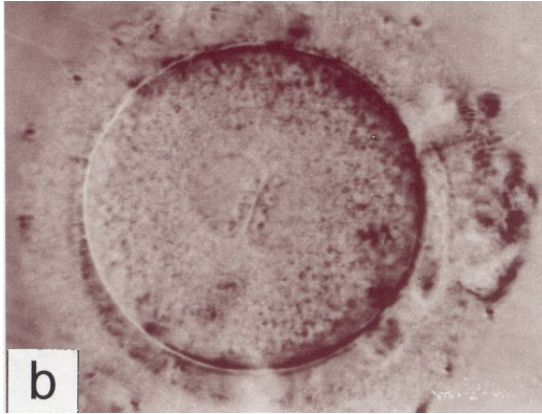


Abb. 5b: gleich große Vorkerne, leichter Halo-Effekt, Reihung der Nukleolen in beiden Vorkernen, homogene Granulierung, keine Vakuolisierung (Score = 11).

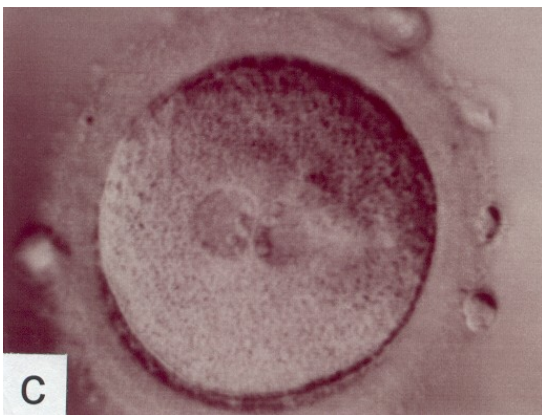


Abb. 5c: ungleiche Größe und maximale Annäherung der Vorkerne, Reihung der Nukleolen, leichter Halo-Effekt (Score = 12).

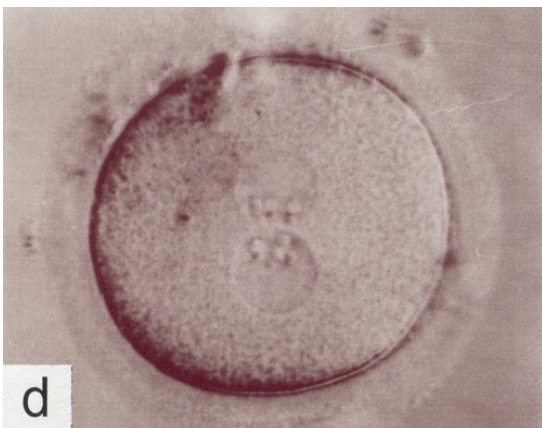


Abb. 5d: Vorkerne nahe beieinander, beginnende Reihung der Nukleolen, kein Halo-Effekt (Score = 16).

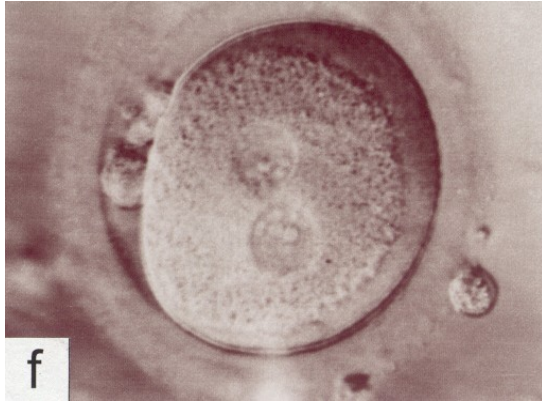


Abbildung 5f: Vorkerne weiter voneinander entfernt, extremer Halo-Effekt, beginnende Reihung der Nukleolen (Score = 17).

Punktwert	1	2	3	4
Anzahl Pronuklei	2 PN			1 PN
Juxtaposition PN	stark zusammen	nahe bei	Entfernt	nur 1 PN
Größe PN	Gleich groß	ungleich	-	nur 1 PN
Halo-Effekt	normal	hell	extrem	kein Halo-Effekt
Anordnung PN in PN 1	Reihe	beginnende Reihe	durcheinander	kein Nukelolus oder kein PN
Anordnung PN in PN 2	Reihe	beginnende Reihe	durcheinander	kein Nukelolus oder kein PN
Anzahl Nukleoli in PN 1	3 bis 5	über 5	unter 3	kein Nukelolus oder kein PN
Anzahl Nukleoli in PN 2	3 bis 5	über 5	unter 3	kein Nukelolus oder kein PN
Vakuolisierung	keine Vakuolen	leicht vakuolisiert	stark vakuolisiert	-
Ooplasma-Beurteilung	homogene Granulierung	starke Granulierung		

Abbildung 5g: PN-Scoring System (nach Zollner *et al.*, 2002), PN= Pronukleus

2.8. Embryonenkultur und Anwendung des Embryoscores

Nach Beurteilung der Eizellen im PN-Stadium wurden diese in frisches Kulturmedium transferiert und erneut als „single-cell-culture“ kultiviert. Die Dauer der Embryo-Kultur

wurde - wenn möglich - bis zum Tag 5 angestrebt, denn zu diesem Zeitpunkt konnte man, eine regelrechte Entwicklung des Embryos vorausgesetzt, von dem Reifestadium einer Blastozyste ausgehen. War der Fall eingetreten, dass ein Embryo in seiner Entwicklung verzögert war, so wurden noch weitere 24 h bis zum Transfer abgewartet. Umgekehrt wurden in manchen Fällen Embryonen schon am Tag 3 oder Tag 4 transferiert, wenn sonst keine Embryonen für den Transfer zur Verfügung standen.

Zur Beurteilung der Mehrzell-Stadien und der Blastozysten wurde ein detaillierter Embryo-Score angewandt. Dieser beinhaltete folgende Parameter (Erläuterung s. unten):

1. Syngamie (Verschmelzen der beiden Vorkerne)
2. Blastomerenanzahl (Furchungsstadium)
3. Fragmentierung
4. Kompaktierung des Embryos < 72 Stunden
5. Kavitation < 96 Stunden
6. Expansion der Blastozyste, innere Zellmasse und Trophoektoderm
7. Reifegrad entsprechend dem Embryo Development Score

2.8.1. Syngamie

Bei der Verschmelzung der beiden Vorkerne (Syngamie) wandern zunächst der männliche und der weibliche Vorkern aufeinander zu. Nach beiderseitiger Anlagerung erfolgt die vollständige Verschmelzung beider Pronuclei.

Die Syngamie sollte innerhalb 24 Stunden nach Insemination erfolgen und ist die Voraussetzung für den Übergang aus dem Vorkern-Stadium in das 2-Zeller-Stadium (erste Furchungsteilung).

Im Embryo-Score wurde entweder „0“ entsprechend einer nicht erfolgten Syngamie oder „1“ entsprechend einer erfolgreichen Verschmelzung festgehalten. Embryonen, bei denen nach 24 Stunden noch keine Verschmelzung stattgefunden hatte, wurden dennoch weiter bebrütet.

2.8.2. Anzahl der Blastomeren (Furchungsstadien)

Frühestens 24 Stunden nach der Insemination (Tag 1) befindet sich der Embryo im 2-Zell-Stadium, welches der ersten embryonalen Teilung entspricht. Nach 44 Stunden kann sich schon ein 4-Zeller Stadium entwickelt haben. Am Tag 2 (> 48 Stunden nach Eizellentnahme) befinden sich die Embryonen in der Regel im Stadium des 2- bis 8-Zellers und am Tag 3 im

Stadium des 8- bis 16-Zellers. Die weitere Entwicklung des Embryos entspricht üblicherweise am Tag 4 dem Morula-Stadium („compacting embryo“). Es können sich jedoch auch schon frühe Blastozysten (early cavitating blastocyst) am Tag 4 gebildet haben. Die weiteren Stadien der Blastozyste („late cavitating“, „early“ oder „expanded blastocyst“) findet man am 5. Tag, schlüpfende oder geschlüpfte Blastozysten am 6. Tag.

Im Embryo-Scoring wurden die Anzahl der Blastomeren an den Tagen 2 und 3 notiert. Am Tag 4, 5, und 6 wurden entweder erfolgreiche oder ausgebliebene Kompaktierung, Kavitation, oder Expansion des Embryos festgehalten.

2.8.3. Fragmentierung

Fragmente entsprechen Abschnürungen von Blastomeren innerhalb des Zytoplasmas. Sie entstehen wahrscheinlich durch Apoptose von einzelnen Blastomeren und umgeben diese innerhalb der Zona pellucida. Die Fragmentierung spiegelt somit Degenerationsprozesse innerhalb des Embryos wieder und reduziert das Potential einer erfolgreichen Entwicklung der Eizelle bis zur Blastozyste.

Im Embryo-Scoring wurde eine ausbleibende Fragmentierung mit „0“ bewertet. Bei bis zu 10 % Fragmenten innerhalb des Zytoplasmas wurde eine „1“ notiert und zwischen 10 % -25 % eine „2“. Lag der Prozentsatz über 25 %, so entsprach dies einer „3“. Der Grad der Fragmentierung wurde an den Tagen 2, 3 und 4 erhoben.

2.8.4. Kompaktierung

Die ersten Anzeichen für die Kompaktierung eines Embryos sind frühestens am Tag 3 der Kultur zu erwarten. Die Membranen der einzelnen Blastomeren lösen sich zunehmend auf. Dieser Vorgang führt zu einer zunehmenden Verschmelzung der Blastomeren zu einer kompakten Zellmasse. Im Embryo-Scoring wurde der Grad der Kompaktierung am Tag 3 und am Tag 4 notiert.

Befand sich ein Embryo nach weniger als 72 Stunden in einem kompaktierenden Stadium wurde dies am Tag 3 festgehalten. Nach 96 Stunden (Tag 4) entstand ein „kompakter Embryo“. Die vollkommene Verschmelzung der Blastomeren führte zur Bildung einer synzytialen Struktur.

2.8.5. Kavitation des Embryos

Nach der Kompaktierung beginnt der Embryo, nach ca. 92 Stunden, ein Blastozöel zu bilden (Tag 4). Dessen Volumen entspricht beim früh-kavitierenden Embryo unter 50 % der embryonalen Zellmasse, beim spät-kavitierenden Embryo über 50 % (Abbildung 6).

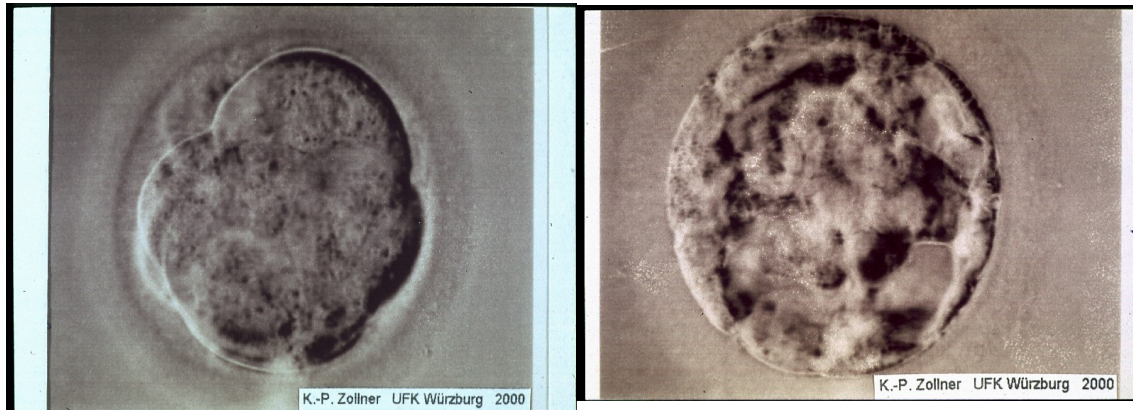


Abbildung 6: früh-kavitierender Embryo (links) und spät-kavitierender Embryo (rechts).

2.8.6. Expansion

Am Tag 5 (120 Stunden nach Insemination) bildet sich aus dem kavitierten Embryo eine frühe expandierende Blastozyste („expanding blastocyst“).

Das Stadium der frühen Blastozyste („early blastocyst“) ist charakterisiert durch das Auftreten einer sich langsam entwickelnden definierten inneren Zellmasse und durch ein sichelzellartig ausgezogenes Trophoektoderm, welches der Zona pellucida von innen anliegt. Das Blastozöel vergrößert sich zunehmend und der Durchmesser der Blastozyste expandiert, was eine weitere Ausdünnung der Zona pellucida zur Folge hat (Abb. 7, 8).

Nach vollständiger Expansion des Blastocoels und maximaler Ausdünnung der Zona pellucida sowie einer hohen Zellzahl der inneren Zellmasse (ICM) erreicht der Embryo das Stadium der voll expandierten Blastozyste („fully expanded blastocyst“). Diese hat einen Durchmesser von ca. 200- 250 μm und ist die reifste Form einer Blastozyste (Abb. 9). Die dünne Zellschicht der Zona pellucida reißt durch die Expansion an ihrer schwächsten Stelle ein und die Blastozyste schlüpft aus ihrer Eihaut („hatched blastocyst“). Dieser Vorgang findet physiologisch unmittelbar vor der Implantation statt. Ohne „Hatching“ erfolgt keine Implantation.

Am fünften Tag der Embryonenkultur wurde der Embryo auf das Ausmaß der Expansion, auf die Existenz einer definierten inneren Zellmasse und eines Trophoektoderms (TE) hin untersucht.

Diese drei Kriterien wurden in der Embryo Scoring Tabelle festgehalten.



Abbildung 7: frühe Blastozyste

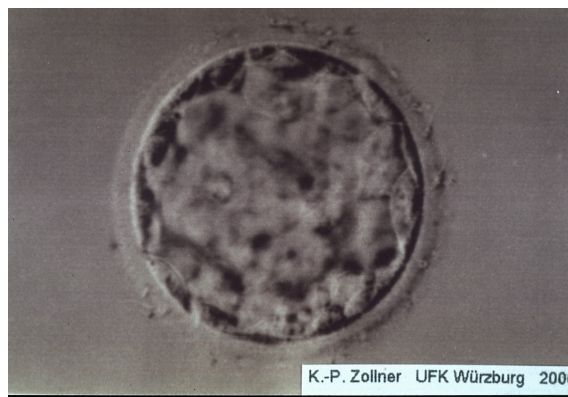


Abbildung 8: expandierende Blastozyste



Abbildung 9: voll expandierte Blastozyste

2.8.7. Reifegrad entsprechend dem Embryo Development Score

Die folgende Tabelle beinhaltet alle Kriterien zur Einstufung eines Embryos bezüglich seines Entwicklungsstadiums. Der Reifegrad wurde an den Tagen 2-6 durch Anwendung des Embryo Development Scores ermittelt.

Grad	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
1	≥ 4 Zeller bis max. 10 % frag	> 6 Zeller bis max. 10 % frag	Morula bis max. 10 % frag	cbl mit def. icm & gutem te cell nr	
2	≥ 4 Zeller bis max. 10 % frag	> 6 Zeller 10-25 % frag; 4-6 Zeller max. 10 % frag	pcm/cm 10-25 % frag; ≥ 8 Zeller max. 10 % frag	cbl mit geringer te cell nr u/o undef. icm u/o geringer deg; ebl mit undef. icm; Morula mit max. 10 % frag	cbl mit def. icm & gutem te cell nr
3	keine Zellteilung; ≤ 4 Zeller mit 10-25 % frag	< 4 Zeller; 4-6 Zeller mit 10-25 % frag; > 25 % frag	< 8 Zeller; ≥ 8 Zeller mit 10-25 % frag; > 25 % frag	bl mit sign. vac, frag u/o deg; nicht kompakt. embryo	cbl mit geringer te cell nr u/o undef icm u/o geringer deg; ebl mit undef. icm; Morula mit max. 10 % frag

Tabelle 1: Embryo Development Score

Abkürzungen:

frag = Fragmentierung (fragmentation)

vac = Vakuolisierung

pcm = teilweise kompaktiertes Morula-Stadium (partially compacted morula)

cm = kompaktiertes Morula-Stadium (compacted morula)

bl = Blastozyste

cbl = kavitierende Blastozyste (cavitation blastocyst)

ebl = frühe Blastozyste (early blastocyst)

icm = innere Zellmasse (inner cell mass)

te cell nr = Trophoektoderm- Zellzahl (trophoectoderm cell number)

deg = Degeneration

2.9. TNF-alpha und LIF, Zytokinmessungen

Die Überstände der Kulturmedien wurden aufgrund der geringen Menge pro Patientin von allen Embryonen gepoolt und am Tag 3 und 5 jeweils bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.9.1. Bestimmung von TNF-alpha

Prinzip des Assays

Dem Quantikine^R HS (high sensitive) Human TNF-alpha- Immunoassay (Quantikine^R- Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA) liegt die quantitative „Sandwich“- Methode (AK-TNF- alpha-AK) zugrunde. Eine Mikrotiterplatte beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper (AK) gegen TNF-alpha diente als Grundlage. In diese wurde Kulturmedium oder Standard pipettiert. Das Kulturmedium der Embryonen wurde pro Patientin gepoolt. Enthielt die Probe TNF-alpha, so wurde dieses durch den spezifischen monoklonalen AK an der Platte gebunden. Nachdem durch einen Waschvorgang alles nicht- gebundene überschüssige Material entfernt wurde, wurde ein Enzym- gebundener polyklonalen AK spezifisch für TNF-alpha in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Ein weiterer Waschvorgang entfernte den ungebundenen Enzym-Antikörper- Überstand. Als nächsten Schritt pipettierte man eine Substratlösung in die Vertiefungen. Nach einer Inkubationszeit wurde eine Amplifier-Lösung hinzugefügt. Die anschließende Farbentwicklung, hervorgerufen durch die Umsetzung des Substrats, entspricht proportional der gebundenen Menge von TNF-alpha aus dem ersten Schritt. Eine Stopplösung wird hinzu pipettiert und die Farbintensität anschließend gemessen.

Versuchsbeschreibung (TNF-alpha)

TNF-alpha wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt (Quantikine^R-Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA).

Die tiefgefrorenen Proben des Kulturmediums wurden zunächst über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und mit einem Vortex-Schüttler durchmischt. Als nächster Schritt wurde zum Erstellen einer Standardkurve eine Eichlösung hergestellt. Dazu hat man den TNF-alpha- Standard (32 pg/val), bestehend aus rekombinantem humanen TNF-alpha (rh-TNF-alpha) und einer gepufferten Proteinbase als Stabilisator, mit 1 ml Verdünnungslösung (RD6-13) aufgefüllt. Die entstandene Eichlösung entsprach somit einer

TNF-alpha Konzentration von 32 pg/ml. Nach einer Inkubationszeit von 15 min erfolgte die Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe der Eichlösung: Zuerst wurden jeweils 500 µl der Verdünnungslösung (RD6-13) in sieben Röhrchen pipettiert. Durch das Pipettieren von 500 µl des Standards in Röhrchen Nr. 7 erzielte man eine Konzentration von 16 pg/ml TNF-alpha in dieser Lösung. Anschließend wurden wieder 500 µl Lösung aus Röhrchen Nr. 7 in Röhrchen Nr. 6 pipettiert. Die Konzentration ergab dann 8 µl TNF-alpha in dieser Lösung. Diese Prozedur wiederholte man, bis in Röhrchen Nr. 2 eine Konzentration von 0,5 pg/ml TNF-alpha erreicht war. Röhrchen Nr. 1 enthielt nur Verdünnungslösung (RD6-13), was demnach 0,0 pg/ml TNF-alpha entsprach und als Negativ-Kontrolle fungierte. Das Röhrchen Nr. 8 enthielt den reinen TNF-alpha-Standard mit einer Konzentration von 32 pg/ml.

Auf eine mit anti-TNF-alpha-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte (12x8 Löcher) wurden zunächst 50 µl der Verdünnungslösung HD1-11 pipettiert. Anschließend fügte man jeweils 200 µl Standard oder Probe (Kulturmedium) hinzu. Mit einer Folie abgedeckt, wurde die Mikrotiterplatte dann für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die überschüssige Flüssigkeit verworfen. In einem anschließenden Waschvorgang mit 400 µl Waschpufferkonzentrat wurden Eichlösung bzw. Standard von den haftenden AK entfernt. Diese Prozedur wiederholte man 6 Mal.

Dann pipettierte man 200 µl Konjugat in jede Vertiefung, deckte diese mit Folie ab und inkubierte die Platte für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur. Es folgten danach weitere 6 Waschvorgänge wie oben beschrieben. Anschließend wurden 50 µl Substratlösung in jedes Loch pipettiert und nach Abdeckung erneut für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. War die Inkubationszeit abgelaufen, gab man jeweils 50 µl Amplifizierlösung hinzu, deckte die Platte erneut ab und inkubierte für weitere 30 min bei Raumtemperatur. Die Amplifizierlösung leitete in diesem Schritt die Farbentwicklung ein. Nach der Inkubation wurden 50 µl Stopplösung in die Löcher pipettiert, die den Reaktionsvorgang beendete. Die Färbung resultiert aus der folgenden Reaktion: Die in der Amplifizierlösung enthaltene Alkalische Phosphatase dephosphorylierte NADPH (nicotinamid adenin dinucleotid phosphat, als Substrat) zu NADH, das ein Cofaktor für eine nachfolgende Redox-Reaktion darstellte. Die zweite Reaktion fand mit Hilfe der Enzyme Alkoholdehydrogenase und Diaphorase (Amplifizier) statt. Diaphorase katalysierte die Reduktion von INT-Violett (Iodonitrotetrazolium Violett) mit NADH. Produkt dieser Reaktion waren eine Formazan-Färbung und NAD⁺. Das NAD⁺ selbst wurde in einer Alkoholdehydrogenase katalysierten Reaktion durch Ethanol reduziert und somit für einen neuen Redoxzyklus wieder gewonnen.

Das Ausmaß der Formazan-Färbung (Menge des Farbprodukts) war direkt proportional zu der Menge an TNF-alpha, das in der initialen Reaktion mit dem AK gebunden wurde.

Die anschließenden photometrischen Messungen wurden innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung bei einem Absorptionsmaximum von 690 nm durchgeführt. Die Erstellung einer Standardkurve erfolgt automatisch. Anhand der Standardkurve wurden die jeweiligen TNF-alpha-Konzentrationen bestimmt.

2.9.2. Bestimmung des Leukemia Inhibitory Faktors (LIF)

Prinzip des Assays

Die quantitative Bestimmung von LIF im Embryo- Kulturmedium erfolgte wie auch bei TNF- alpha mit Hilfe eines ELISA (Quantikine^R HS Human LIF- Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA). In der Probe vorhandenes LIF wurde von einem monoklonalen AK gebunden. Das immobilisierte LIF wurde im nächsten Schritt durch einen zweiten enzymgebundenen polyklonalen AK spezifisch für LIF gebunden. Das Substrat einer hinzu gefügten Substratlösung reagiert, katalysiert durch das gebundene Enzym, zu einem Farbprodukt. Die Färbung wurde photometrisch gemessen und entsprach proportional der Menge an LIF in der Probe.

Versuchsbeschreibung (LIF)

Tiefgefrorenes Kulturmedium wurde zunächst über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und mit einem Vortex-Schüttler durchmischt. Die Eichlösung zur Erstellung einer Standardkurve wurde wie folgt hergestellt. Zum LIF Standard wurden 5ml Verdünnungslösung RD6L pipettiert. Dadurch wurde eine Konzentration von 2000 pg/ml an rekombinantem humanem LIF in der Standardlösung erzielt. Nach 15 Minuten Inkubation erstellte man mit der Eichlösung eine geometrische Verdünnungsreihe. Das Röhrchen Nr. 1 enthielt den reinen Standard. In Röhrchen Nr. 2 bis Nr. 8 wurden zunächst 500 µl Verdünnungslösung RD6L pipettiert. Im nächsten Schritt wurden 500 µl Eichlösung (Standard) in Röhrchen Nr. 2 pipettiert. Die Konzentration an rh LIF entsprach dann 1000 pg/ml. Die Verdünnungsreihe setzte man weiter fort (2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml). Das Röhrchen Nr. 8 enthielt reine Verdünnungslösung RD6L (0,0 pg/ml rh LIF) und diente als Negativ-Kontrolle. Die Positiv- Kontrolle entsprach dem Röhrchen Nr. 1 mit einer Konzentration von 2000 pg/ml and rh LIF.

Auf eine mit anti- LIF- Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte (12x8 Löcher) wurden zunächst 50 µl der Verdünnungslösung RD1D pipettiert. Anschließend fügte man jeweils 200 µl Standard oder Probe (Kulturmedium) hinzu. Mit einer Folie abgedeckt, wurde die Mikrotiterplatte dann für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit jedes Loches aspiriert und anschließend mit 400 µl Waschpufferkonzentrat gefüllt. Diesen Waschvorgang wiederholte man weitere zweimal. Dann pipettierte man 200 µl LIF Konjugat in jede Vertiefung, deckte diese mit Folie ab und inkubierte die Platte für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur. Es folgten danach weitere 3 Waschvorgänge wie oben beschrieben. Anschließend wurden 200 µl Substratlösung (bestehend aus Farbreagenz A und B) in jedes Loch pipettiert und nach Abdeckung erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte musste bei diesem Versuchsschritt vor Licht geschützt werden. Nach der Inkubation wurden 50 µl Stopplösung in die Löcher pipettiert, die den Reaktionsvorgang beendete. Die anschließende photometrische Messung wurde innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm durchgeführt. Die Standardkurve wurde automatisch erstellt und diente der Bestimmung der LIF-Konzentrationen.

2.10. Embryotransfer

In der vorliegenden Studie wurde der Tag des Embryotransfers (ET) für jede Patientin individuell gewählt.

In jedem Fall wurde ein Transfer des Embryos im Blastozystenstadium favorisiert. In 60 % der Fälle fand der Transfer nach fünf Tagen Kultur statt. Es wurden jedoch auch Embryonen nach 2, 3 oder 4 Tagen Kultivierung transferiert. Die Entscheidung hing bei jeder Patientin vom Reifegrad der Embryonen und deren morphologischer Entwicklung ab.

Die australische Gesetzgebung sieht bzgl. der Dauer der Embryonenkultur keine Einschränkung vor. Auch die Anzahl der Embryonen, die transferiert werden dürfen, ist nicht gesetzlich vorgegeben. Aufgrund des damit steigenden Risikos für Mehrlingschwangerschaften nach einem Transfer von mehreren Embryonen fand in 66 % der Fälle ein single-embryo-transfer (SET) statt, d. h. nur ein Embryo wurde transferiert. 25 Patientinnen wurden 2 Embryonen transferiert und in nur 2 Fällen erfolgte ein Transfer von 3 Embryonen.

Vor dem Embryotransfer wurden die zum Transfer vorgesehenen Embryonen, die sich zuvor in einzelnen Kulturtropfen befanden, in ein gemeinsames Schälchen (sogenanntes

„center well“) mit Kulturmedium überführt. Die Patientin nahm auf einem gynäkologischen Untersuchungsstuhl in Steinschnittlage platz. Es schloss sich eine sonographische Untersuchung des Uterus zur Feststellung seiner genauen Lage und Krümmung an. Der Embryotransfer erfolgte transzervikal nach Spiegeleinstellung und Säuberung der Portio ohne vorausgegangene Analgesie oder Anästhesie. Für die Platzierung der Embryonen in den Uterus wurden atraumatische und sterile Einmalkatheter (Cook, Sydney IVF, Australien) verwendet, die passiv der Krümmung des Zervikalkanals folgen. Die Katheter bestehen aus einer äußeren Führungshülse aus starrem Kunststoff und einem inneren weichen Katheter. Die äußere Hülse wurde über den äußeren Muttermund geschoben, durch deren Spitze der innere Katheter transzervikal bis ca. 1 cm unterhalb des Fundus vorgeschoben wurde. Der Stellung des Katheters ermöglicht eine Markierung der Länge des Uterus und erleichtert somit die korrekte Platzierung der Katheterspitze. Die Katheter wurden in der 3-Tropfen-Technik mit den Embryonen beladen. Dafür wurden 20 µl Kulturmedium aufgezogen, gefolgt von wenigen Mikroliter Luft, anschließend dem Kulturmedium mit den Embryonen, wieder Luft und zuletzt erneut einer kurzen Säule Medium. Durch Anwendung der 3-Tropfen-Technik war es möglich, die Embryonen weitestgehend vor unphysiologischen Einflüssen (Verdunstung, Temperaturabfall, Änderung des pH-Wertes) zu schützen. Nach korrekter Platzierung wurde die Katheterspitze mit den Embryonen in das Cavum uteri entleert und der Katheter entfernt. Danach erfolgte eine sorgfältige Spülung des Katheters mit Kulturmedium. Eventuell an der Katheterwand haftende Embryonen können so in der gleichen Sitzung erneut transferiert werden. Nach dem Embryotransfer blieben die Patientinnen noch einige Minuten ruhig liegen.

2.11. Schwangerschaftstest

Zwei Wochen nach Follikelpunktion erfolgte ein Schwangerschaftstest (quantitatives beta-HCG) aus dem Serum der Patientinnen. Eine klinische Schwangerschaft wurde durch sonographischen den Nachweis einer Fruchthöhle diagnostiziert.

2.12. Statistische Auswertung

Das Statistikprogramm SPSS 13.0 diente der statistischen Auswertung der erhobenen Daten. Es wurden zum einen Häufigkeiten und Mittelwerte bestimmt, ferner diente der Mann-Whitney-Test (U-Test) der Bestimmung des Vorliegens von Korrelationen zwischen zwei nicht-parametrischen Stichproben. Es erfolgte zudem eine grafische Darstellung der erhobenen Daten zur besseren Illustration. Mithilfe der Sperman'schen Rangkorrelation wurde festgestellt, ob zwischen zwei Parametern eine Korrelation besteht. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde hierbei als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Epidemiologie

Es wurden die Daten von 99 Patientinnen in dieser prospektiven Studie ausgewertet, davon nahmen 49 Frauen (49,5%) am konventionellen IVF- Programm teil, bei 50 Frauen (51,5%) wurde eine ICSI aufgrund der androgenen Subfertilität des Partners durchgeführt.

Das Alter der Frauen lag zwischen 19 und 44 Jahren. Bei den Partnern lag die Spannweite des Alters zwischen 23 und 58 Jahren. Das Durchschnittsalter der Frauen lag bei $36,1 \pm 5,8$ Jahren, das der Männer bei $38,9 \pm 6,4$ Lebensjahren.

Insgesamt wurden in dieser Studie bei den 99 Patientinnen 856 Eizellen gewonnen. Im Mittel konnten bei den Follikelpunktion $8,82 \pm 4,8$ Eizellen pro Patientin gewonnen werden. 438 (im Mittel $4,56 \pm 3,14$ pro Patientin) inseminierte Eizellen zeigten nach 14 bis 18 Stunden Zeichen einer erfolgreichen Fertilisation (Bildung eines 2. Polkörperchens und Kondensation von zwei Vorkernen). Bei 14 Eizellen wurden Zeichen einer abnormen Befruchtung (kein oder nur ein Vorkern) gefunden. Im Mittel betrug die Anzahl der fertilisierten Eizellen (Fertilisationsrate) $62,66 \pm 22,0$ %.

Bei 59 % der kinderlosen Paare handelte es sich um ihren ersten Versuch der künstlichen Befruchtung, in 18 % um den zweiten, in 17 % um den dritten. Bei 6 % der Paare handelte es sich um den vierten oder mehrfachen IVF/ICSI-Zyklus.

Die Indikationen für die assistierte Befruchtung waren vielfältig, wobei die andrologische Subfertilität eindeutig überwog (siehe Tabelle 2).

Der Embryotransfer fand in 61 % der Fälle an Tag 5, in 22 % an Tag 3, in 11,6 % an Tag 4, in 4,7 % an Tag 2 und in 1,2 % an Tag 6 statt. Bei 59 Patientinnen wurde nur ein Embryo, bei 25 Patientinnen wurden zwei Embryonen und bei 2 Patientinnen drei Embryonen transferiert. In 10 Fällen fand kein Embryotransfer statt. Die „Single Embryo Transfer“- Rate (SET) lag bei 66 %. Die Schwangerschaftsrate pro ET ergab bei 22 klinischen Schwangerschaften 24,7 %.

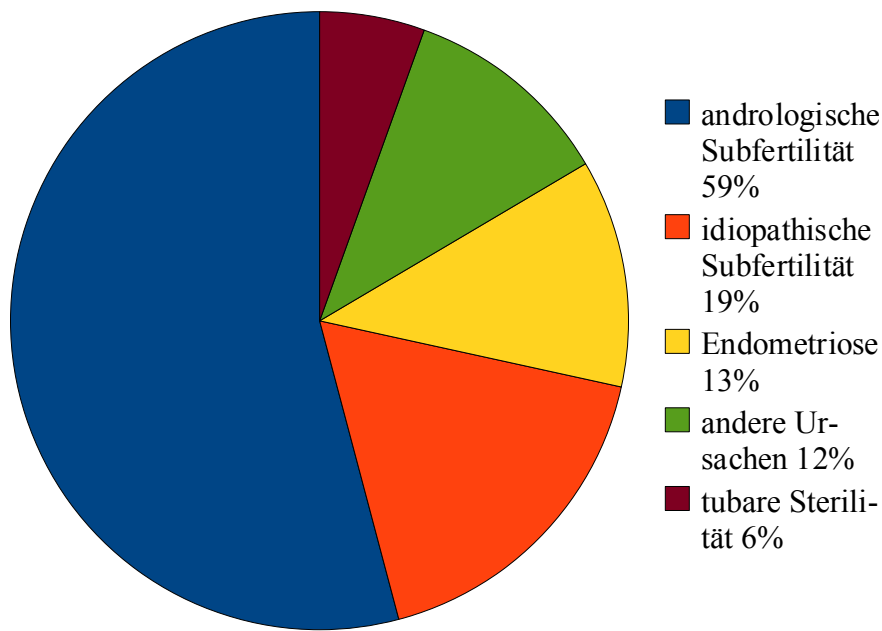


Tabelle 2: Indikationen für die assistierte Befruchtung

3.2. Alter der Frau – Einfluss auf Eizellgewinnung, Embryotransfer, Schwangerschaftsrate und Indikationsstellung

Das Alter der Frau ist einer der wichtigsten Parameter wenn es um den Erfolg einer künstlichen Befruchtung geht. Die ovarielle Funktionsreserve, d.h. das Vermögen der Ovarien ausreichend viele Follikel reifen zu lassen, kann mit zunehmendem Alter eingeschränkt sein. In der Literatur findet man ab einem Alter von über 35 Jahren abnehmende Raten (z.B. DIR (Deutsches IVF-Register)). In unserer Studie lag das durchschnittliche Alter der Frauen bei $36,1 \pm 5,8$ Jahren. Die Altersspanne reichte von 19 bis zu 44 Jahren. Die Patientinnen wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe der unter 35-Jährigen und die Gruppe der ≥ 35 -Jährigen (siehe Tabelle 3). Bei der Gruppe der Frauen unter 35 Jahren konnten signifikant mehr Eizellen durch Follikelpunktion gewonnen werden als bei der Gruppe der über 35-Jährigen. Dies gilt auch für die Anzahl der erfolgreich fertilisierten Eizellen (7,7 versus 6,2). Durchschnittlich mussten bei der jüngeren Gruppe signifikant weniger Embryonen transferiert werden (0,9 versus 1,4). Die Gruppe unter 35 Jahren kam im Gegensatz zur Gruppe über 35 Jahren auf eine SET- Rate von 96 % (versus 57 %).

	Frauen < 35J.	Frauen ≥ 35J.	p <
mittlere Anzahl der gewonnenen Eizellen	11,3 (±4,5)	7,9 (±4,7)	0,001
mittlere Anzahl der fertilisierten Eizellen	7,7 (±4,5)	6,2 (±3,2)	0,001
mittlere Anzahl der transferierten Embryonen	0,9 (±0,4)	1,4 (±0,7)	0,05

Tabelle 3: Alter der Frau als Einflussgröße

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verschiedenen Indikationen zur assistierten Befruchtung (ART). In der Gruppe der unter 35-Jährigen überwiegen männliche Faktoren als Hauptindikation für eine assistierte Befruchtung, weibliche Faktoren gewinnen an Bedeutung bei den Frauen über 35 Jahren, auch spielen idiopathische oder „andere“ Ursachen eine größere Rolle (s. Tabelle 4).

Indikation für die ART (%)	Frauen < 35 J.	Frauen ≥ 35 J.	p <
Männliche Subfertilität	73	38	0,001
Endometriose	8	16	0,001
Tuben Faktor	8	5	0,05
Idiopathisch	8	24	0,001
Tuben Faktor & männliche Subfertilität	-	2	
Tuben Faktor & Endometriose	-	2	
Andere Faktoren	4	14	0,001

Tabelle 4: Indikation für ART

3.3. Beurteilung der Vorkerne (PN-Scoring)

Der früheste Zeitpunkt für die Auswahl morphologisch intakter Prä-Embryonen ist das Pronukleus-Stadium. Dieses Stadium erreicht die befruchtete Eizelle 14 bis 18 Stunden nach der erfolgreichen Fertilisation mit der Ausbildung zweier Vorkerne.

In der Zygoten-Scoring-Tabelle wurden die fertilisierten Eizellen auf ganz bestimmte Kriterien überprüft. Diese erste morphologische Beurteilung resultierte für jede Zygote in einem individuellen Punktwert, dem PN-Score. Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 5) zusammengefasst. Der mittlere PN-Score lag bei $16,5 \pm 3,7$ Punkten.

Anzahl der Vorkerne (%)		Anzahl der Nukleolen im PN1 (%)	
2 Pronuclei	98,6	3-5	58,2
1 Pronucleus	2,4	> 5	34,7
Juxtaposition der Vorkerne (%)		< 3	4,3
maximal	58,8	kein Nukleolus oder Pronukleus	2,8
dicht nebeneinander	34,5	Anzahl der Nukleolen PN2 (%)	
disjunkt	4,3	3-5	46,7
nur 1 PN vorhanden	2,3	> 5	48,2
Größe der Vorkerne (%)		< 3	1,7
gleich	45,4	kein Nukleolus oder Pronukleus	3,4
unterschiedlich	51,8	Anordnung der Nukleolen PN1 (%)	
nur 1 PN vorhanden	2,4	Reihe	41,3
keine Angabe	0,4	beginnend in Reihe	33,2
Halo-Effekt (%)		ungeordnet	22,7
normal	23,6	kein Nukleolus oder Pronukleus	2,8
leicht	29,4	Anordnung der Nukleolen PN2 (%)	
extrem	16,1	Reihe	17,1
kein Halo	30,9	beginnend in Reihe	41,1
Vakuolisierung des Ooplasmas (%)		ungeordnet	38,5
kein	84,6	kein Nukleolus oder Pronukleus	3,2
leicht	12,2	Granulierung des Ooplasmas (%)	
stark	1,1	homogen	68,1
keine Angabe	2,1	granuliert	31,9
		Gesamt-PN-Score	
		schwanger	15,8
		nicht-schwanger	17,2

Tabelle 5: Ergebnisse des Zygoten-Scorings im Vorkern-Stadium

3.3.1. Vakuolisierung und Blastozystenrate

Das Ausmaß der Vakuolisierung der Eizelle im PN- Stadium kann auf degenerative Prozesse hinweisen. Ist sie stark, so ist die Wahrscheinlichkeit für eine optimale Entwicklung der Eizelle zur Blastozyste am Tag 5 minimal.

	keine/leichte Vakuolisierung	starke Vakuolisierung	p
Blastozystenrate am Tag 5	44,3 %	0 %	< 0,01

Tabelle 6: Vakuolisierung und Blastozystenrate

Insgesamt zeigten nur 5 Embryonen im PN-Stadium eine starke Vakuolisierung (Tabelle 6). Von diesen entwickelte sich jedoch keine bis zum Tag 5 der Kultur zur Blastozyste. Eine Eizelle entwickelte sich bis zu einem kompaktierten Morula-Stadium, 1 Eizelle erreichte das 12-Zeller-, 2 das 8-Zeller- Stadium und eine arretierte bereits im < 4- Zeller- Stadium.

3.3.2. Halo-Effekt und Blastozystenrate

Im Rahmen des PN-Scorings zeigten die Zygoten eine relativ unterschiedliche Entwicklung des Halo-Effekts. Diese Kontrahierung des Zytoplasmas um die zwei Vorkerne kann bei normaler bis leichter Ausprägung auf eine günstige Entwicklung des Embryos hinweisen (Ebner *et al.* 2003). Nach Anwendung des PN-Scoring wurde bei 110 von 466 Zygoten ein normaler, bei 137 ein leichter, bei 75 ein extremer und bei 144 gar kein Halo-Effekt beobachtet.

Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Halo-Effekts und der Entwicklung der Zygote zur Blastozyste (Blastozystenrate). Dennoch zeigten die Embryonen, welche sich im Laufe der Kultur zu einem Blastozysten-Stadium entwickelten (frühe, voll expandierte oder geschlüpfte Blastozyste) zuvor im PN-Stadium folgende Halo-Verteilung: 30 % leichter Halo, 33 % normaler Halo, 16 % extremer Halo und 21 % kein Halo. Bei der Mehrzahl der späteren Blastozysten (63 %) wurde also ein leichter bis normaler Halo-Effekt beobachtet (s. Tab. 7).

	leichter Halo	normaler Halo	extremer Halo	kein Halo
Halo-Effekt PN-Stadium	30%	33%	16%	21%

Tabelle 7: Halo-Effekt im PN-Stadium

3.3.3. Halo-Effekt und Reifegrad der Embryonen

Obwohl sich der Einfluss des Halo-Effektes auf die Blastozystenentwicklung nicht statistisch signifikant beweisen ließ, so zeigte sich dennoch ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Halo-Effektes und der Blastomerenzahl am Tag 2 sowie der Reifegrade der Embryonen an den Tagen 4 und 5. Die mittlere Anzahl an Blastomeren am Tag 2 lag in der Gruppe der Embryonen mit leichter/normaler Halo-Ausprägung ($3,4 \pm 0,95$) signifikant höher als die Anzahl in der Gruppe der Embryonen mit extremen/keinem Halo-Effekt ($3,2 \pm 0,98$; $p < 0,05$). Embryonen mit einem leichten/normalen Halo zeigten also eine schnellere Teilung

ihrer Blastomeren bis zum Tag 2 der Kultur. Auch an den Tagen 4 und 5 korrelierte die Ausprägung des Halo-Effektes signifikant mit dem Reifegrad der Embryonen ($p < 0,01$). Je schlechter die Halo-Ausbildung war, desto schlechter war auch die Entwicklung der Embryonen (Grad 3 und 4).

3.3.4. Mittlerer PN-Score bei Schwangeren versus Nicht-Schwangeren

Der PN-Score entspricht der Summe aller im PN-Scoring erreichten Punkte für jede einzelne Eizelle. Je kleiner der PN-Score, desto höher ist das Potential der Eizelle sich regelrecht zu entwickeln. Es wurde der mittlere PN-Score aller Eizellen einer Patientin ermittelt und dieser in Zusammenhang mit dem Schwangerschaftserfolg gesetzt. Embryonen von Patientinnen mit einem positiven Schwangerschaftsergebnis hatten signifikant kleinere PN-Scores als die von nicht-schwangeren Patientinnen (Tabelle 8).

	schwanger	nicht-schwanger	p
mPN-Score ges.	15,8	17,2	< 0,05

Tabelle 8: mittlerer PN-Score schwanger vs. nicht-schwanger

3.3.5. Mittlerer PN-Score bei Schwangeren versus Nicht-Schwangeren nach SET

Bei 59 Patientinnen wurde ein SET durchgeführt. Dies resultierte in einer Schwangerschaftsrate von 25,4 % pro Embryotransfer. Der Pronukleus-Score der Zygoten, welche nach SET zu einer Schwangerschaft geführt hatten, war signifikant besser als der Score bei nicht-schwangeren Patientinnen (s. Tab. 9).

Die Mehrzahl der transferierten Embryonen der Schwangeren (14/15) erreichte einen sehr guten PN-Score (10-14).

	schwanger	nicht-schwanger	p
mPN-Score SET	15,1	16,9	< 0,05

Tabelle 9: mittlerer PN-Score nach SET

3.4. Embryoscoreing

Eine detaillierte Beobachtung der embryologischen Entwicklungsstadien bis zur Blastozyste war die Voraussetzung für Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit, der morphologischen

Veränderungen und Reifung der Embryonen sowie eines möglichen Stillstandes in der Entwicklung der Embryonen.

3.4.1. Entwicklung der Embryonen in der Kultur

a. Reifegrad

An den Tagen 2 bis 6 wurde jeder einzelne Embryo bezüglich seines Entwicklungsstadiums überprüft. Dies ergab die Einteilung in verschiedene Reifegrade, verwiesen sei hier auf die Einstufung gemäß der bereits erläuterten Tabelle der Reifegrade unter Punkt 2.8.7. Die Mehrzahl der Embryonen wurde an den Tagen 2 bis 4 in die Grade 1 und 2 eingestuft. Die Anzahl der Grad-3-Embryonen stieg mit zunehmender Kulturzeit bis zum Tag 5.

Von den Grad 1/2-Embryonen des Tag 5 wurden später 43 % transferiert. 41,4 % wurden kryokonserviert, und nur 13,6 % mussten verworfen werden. Nach Transfer dieser morphologisch gut ausgebildeten Embryonen resultierten 5 von insgesamt 22 klinischen Schwangerschaften. Ähnliche Werte wurden mit dem Transfer der Grad 1/2-Embryonen des 4. Tages der Kultur erzielt. Obwohl ein Embryotransfer nur in 11,6 % der Fälle am Tag 4 stattfand, resultierten aus den Transfers 6 klinische Schwangerschaften. Grad 3 Embryonen zeigten entweder Zeichen einer Arretierung ihres Wachstums oder Degenerationszeichen und wurden nur in 4 % der Fälle transferiert. 89 % hingegen wurden verworfen. Eine klinische Schwangerschaft entstand dabei nicht. Am Tag 3 fanden 22 % der ET statt. 47 % der gut entwickelten Embryonen (Grad 1 und 2) wurden transferiert, 47 % kryokonserviert und 6 % verworfen. Die am 3.Tag transferierten Embryonen erzielten aber keine Schwangerschaft. Die Grad 3 Embryonen wurden nur bei zwei Patientinnen transferiert, die nicht schwanger wurden (Tabelle 10).

Reifegrad	Tag 2 n=458	Tag 3 n=450	Tag 4 n=385	Tag 5 n=353
1	234	166	74	34
2	189	154	158	107
3	35	120	153	212

Tabelle 10: Reifegrad der Embryonen am Tag 2,3,4 und 5

b. Fragmentierung

An den Tagen 2, 3 und 4 wurde die Entwicklung der Embryonen neben den Furchungsteilungen auch anhand der Fragmentierung des Zytoplasmas beurteilt.

Die Abschnürungen entstehen durch Apoptosevorgänge in den einzelnen Blastomeren und werden als ein Korrelat für Degenerationsprozesse diskutiert. Keine oder eine leichte Fragmentierung (bis zu 10 %) schränken eine normale Entwicklung der Embryonen nicht ein.

Die Analyse der Daten ergab in der Gruppe 1 und 2 (Fragmentierung bis zu 10 %) am Tag 2 der Kultur einen Prozentsatz von 81 %. Die gleiche Gruppe erreichte am Tag 3 immer noch 72 % und am Tag 4 wieder 74 %. Der Gruppe 4 (über 25 % Fragmente) wurden sehr wenige Embryonen zugeordnet. Es waren nur 1,9 % am Tag 2 stark fragmentiert, aber der Anteil stieg über 5,1 % am Tag 3, bis auf 5,6 % am Tag 4 (Abbildung 10).

Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Fragmentierung und dem Schwangerschaftserfolg konnte nicht gefunden werden.

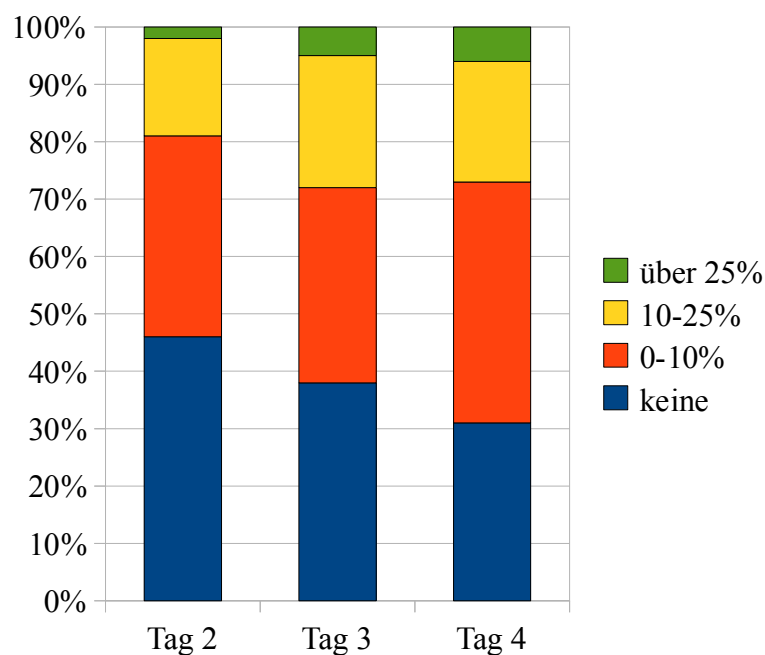


Abbildung 10: Entwicklung der Fragmentierung von Tag 2 bis Tag 4

c. Stadien der embryonalen Entwicklung Tag 3 bis Tag 5

Am Tag 3 war die Blastomerenanzahl der Embryonen das aussagekräftigste Kriterium der weiteren Entwicklung. An den Tagen 4 und 5 wurden Stadien einer teilweise kompaktierten Morula bis hin zur geschlüpften Blastozyste beobachtet.

Am Tag 4 erreichten 52 % der Embryonen ein kompaktiertes Stadium, 1,6 % entwickelten sich zur Blastozyste. Am Tag 5 wurden bei 44 % der Embryonen ein Blastozysten-Stadium beobachtet, 36 % zeigten bereits Kompaktierungsvorgänge und nur 20 % befanden sich in einem ≤ 16 -Zeller-Stadium (Tabelle 11).

	Tag 3	Tag 4	Tag 5
mittlere Zellzahl	6,5 (\pm 1,3)		
< 16 Zellen	-	160 (44 %)	69 (20 %)
16- Zeller	-	8 (2 %)	1 (0,3 %)
teilweise kompaktierte Morula	-	105 (29 %)	56 (16,2 %)
kompaktierte Morula	-	84 (23 %)	69 (20 %)
frühe Blastozyste	-	6 (1,6 %)	68 (20 %)
expandierte Blastozyste	-	-	75 (22 %)
geschlüpfte Blastozyste	-	-	8 (2 %)

Tabelle 11: Stadien der embryonalen Entwicklung von Tag 3 bis Tag

d. Blastozystenanzahl Tag 5 schwanger versus nicht-schwanger

Zum Zeitpunkt der Implantation befindet sich der Embryo physiologischerweise im Stadium der Blastozyste. Dieses Entwicklungsstadium zeigt das beste Potential für eine erfolgreiche Einnistung des Embryos. In unserem Patientenkollektiv entwickelten sich die Embryonen der Frauen, die nach dem Transfer konzipierten, in 60 % der Fälle zu mehr als *einer* Blastozyste. Bei 25 % entwickelte sich zumindest eine Blastozyste und bei 15 % erreichte kein Embryo dieses Entwicklungsstadium. Die Frauen, die nicht schwanger geworden sind, hatten in nur 45 % der Fälle mehr als eine Blastozyste, in 24 % eine Blastozyste und in 30 % überhaupt keine Blastozyste. Aus diesen Ergebnissen ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Anzahl der Blastozysten am 5. Tag der Kultur und dem Schwangerschaftserfolg. Bei Frauen die konzipierten wurden signifikant mehr Blastozysten übertragen als bei Nichtschwangeren ($3,0 \pm 3,1$ versus $1,7 \pm 1,8$, $p = 0,04$).

e. Innere Zell Masse (ICM) und Trophoektoderm (TE)

Am 5. Tag der Kultivierung erreichten die Embryonen bei optimaler Entwicklung das Stadium der voll expandierten Blastozyste mit definierter inneren Zellmasse und einer hohen Zellzahl des Trophoektoderms. 64 % der Embryonen zeigten sowohl eine schlecht ausgebildete ICM wie auch ein unterentwickeltes TE. Bei 34 % waren ICM und TE gut ausgebildet. Embryonen mit einem gut entwickelten Trophoektoderm zeigten einen signifikant besseren PN-Score und Reifegrad als die Embryonen mit wenig entwickeltem TE (15 versus 17, $p < 0,01$; 1,8 versus 2,8; $p < 0,01$).

Die Qualität der inneren Zellmasse zeigt ebenfalls einen Zusammenhang mit dem Reifegrad am Tag 5. Eine ICM mit einer hohen Zellzahl erreichte einen signifikant besseren Reifegrad als eine geringe Zellzahl (1,8 versus 2,8; $p < 0,01$).

3.5. IVF versus ICSI

In 49 % der Indikationen war der „Male Factor“, die andrologische Subfertilität, der Grund für eine assistierte Befruchtung. In diesen Fällen war eine ICSI notwendig. In den übrigen wurde eine IVF durchgeführt. Es wurde untersucht ob sich die IVF-Fälle von den ICSI-Fällen bezüglich der Fertilisationsrate, der Schwangerschaftsrate, der PN-Scoring und der Embryoscore-Parameter unterscheiden.

3.5.1. Fertilisationsrate bei IVF versus ICSI

Die mittlere Fertilisationsrate bezogen auf ICSI und IVF betrug 61 %. Entsprechend der Methode der Fertilisierung wurde bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion eine signifikant höhere Fertilisationsrate erreicht (Tabelle 12).

	IVF (n=49)	ICSI (n=50)	p
Fertilisationsrate %	53,1	69,7	< 0,01

Tabelle 12: Fertilisationsrate IVF versus ICSI

3.5.2. Schwangerschaftserfolg bei IVF versus ICSI

Die mittlere Schwangerschaftsrate pro ET betrug 24,7 %. Bei einer Gegenüberstellung der IVF-Fälle und ICSI-Fälle zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Schwangerschaftserfolg (IVF 10 Schwangerschaften versus ICSI 12 Schwangerschaften (n.s.)).

3.5.3. PN-Scoring-Parameter bei IVF versus ICSI

Die Ergebnisse der einzelnen Parameter des PN-Scoring (Anzahl der PN, Halo-Effekt, Vakuolisierung u.a.) unterscheiden sich nicht nach IVF- bzw. ICSI-Fertilisation. Der Gesamt-PN-Score jedoch unterscheidet sich signifikant in den beiden Gruppen. In der IVF-Gruppe liegt der mittlere PN-Score mit 16,9 Punkten signifikant höher als der mittlere PN-Score der ICSI-Gruppe mit 16,2 Punkten ($p < 0,05$).

3.5.4. Embryo-Scoring bei IVF versus ICSI

Die folgende Tabelle fasst einzelne wichtige Ergebnisse des Zygoten- und Embryo-Scorings für die IVF- und die ICSI-Gruppe zusammen (Tabelle 13).

	Gesamt	IVF	ICSI	p
mittlerer PN-Score	16,5 (\pm 3,7)	16,9 (\pm 3,4)	16,2 (\pm 3,7)	< 0,05
mittlerer Reifegrad Tag 3	1,9 (\pm 0,8)	1,87 (\pm 0,8)	1,92 (\pm 0,8)	n.s.
mittlerer Reifegrad Tag 4	2,2 (\pm 0,7)	2,2 (\pm 0,7)	2,2 (\pm 0,7)	n.s.
mittlerer Reifegrad Tag 5	2,5 (\pm 0,7)	2,5 (\pm 0,7)	2,5 (\pm 0,7)	n.s.
mittlere Anzahl komp. Embr. Tag 4	2,7 (\pm 2,5)	2,0 (\pm 2,2)	3,3 (\pm 2,9)	0,038
Blastozysten Tag 5	155	39,70%	60,30%	< 0,01
zusätzliche Blastozysten Tag 6 (MW)	38 (0,6 \pm 1)	0,4 (\pm 0,7)	1,0 (\pm 1,5)	< 0,01
transferierte Embryonen (MW)	109(1,1 \pm 0,6)	1,3 (\pm 0,7)	1,1 (\pm 0,7)	n.s.
erfolgreiche Schwangerschaft	22	10	12	n.s.

Tabelle 13: PN-Score und Embryo-Scoring-Parameter IVF versus ICSI

komp. Embr.= kompaktierte Embryonen

3.6. Zytokinprofil im Kulturmedium

Wie oben ausführlich erläutert, wird pro- wie anti-inflammatorischen Zytokinen eine wichtige Rolle im Rahmen der Implantation wie auch der embryonalen Differenzierung zugeschrieben. Analog zu obigen Protokoll wurde an den Tagen 3 und 5 der Kultur das Kulturmedium jedes Embryos einer Patientin gesammelt. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen (pro Patientin) von Tumor Nekrose Faktor alpha sowie dem Leukemia Inhibitory Faktor gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in Zusammenhang mit dem Schwangerschaftserfolg sowie anderen Faktoren wie zum Beispiel den Embryoscoring-Parametern gesetzt.

3.6.1. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF-alpha)

Den Einfluss von TNF-alpha auf den Verlauf und Erfolg einer Schwangerschaft wurde in vorausgegangenen Studien kontrovers diskutiert. Dem Zytokin werden jedoch bedeutende Funktionen im Rahmen von Differenzierungs- und Wachstumsprozessen im Verlauf einer Schwangerschaft zugeschrieben.

3.6.1.1. Mittlere TNF-alpha- Konzentration an Tag 3/ 5 der Kultur

Am Tag 3 und 5 der Kultur wurde im gesammelten Kulturmedium der Embryonen jeder Patientin die Konzentration von TNF-alpha bestimmt (Tabelle 14).

	Tag 3	Tag 5	p
TNF-alpha (pg/ml)	0.54	0.37	< 0,01

Tabelle 14: mTNF-alpha-Konzentration an Tag 3 und 5 der Kultur

3.6.1.2. Zusammenhang zwischen TNF-alpha- Konzentration und der Schwangerschaftsrate

Die TNF-alpha Konzentration im Kulturmedium wurde am 3.Tag und 5.Tag der Kultur gemessen und in Zusammenhang mit dem Schwangerschaftserfolg gesetzt. Es zeigten sich signifikant geringere Konzentrationen von TNF-alpha im Kulturmedium schwangerer Frauen.

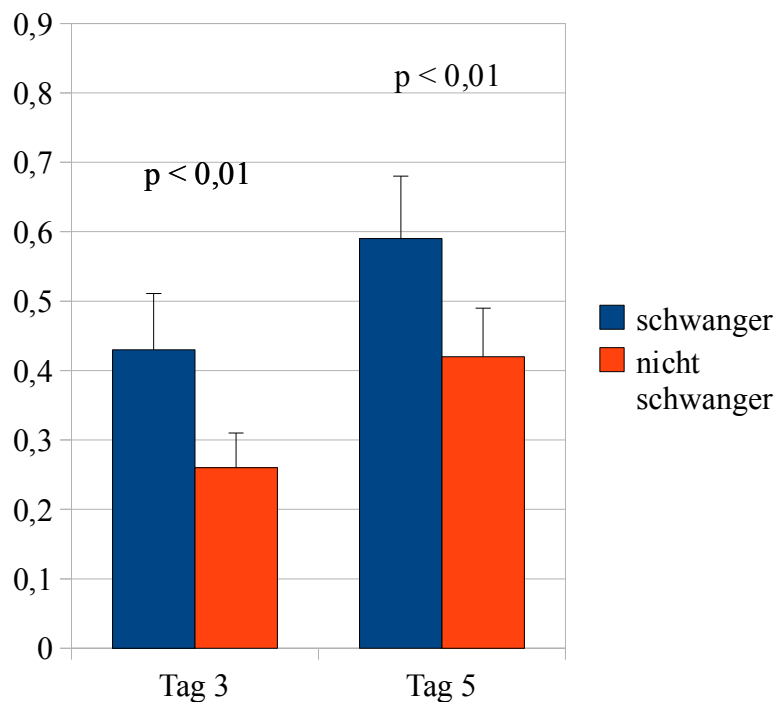


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen der TNF-alpha-Konzentration an Tag 3/Tag 5 und der Schwangerschaftsrate.

Im Gegensatz dazu wurden im Kulturmedium von Embryonen, die nach ET zu keinem Schwangerschaftserfolg geführt haben, wesentlich höhere Konzentrationen gemessen (Abbildung 11, Tabelle 15).

TNF-alpha (pg/ml)	schwanger	nicht-schwanger	p
Tag 3	0,43 (\pm 0,08)	0,59 (\pm 0,05)	< 0,01
Tag 5	0,26 (\pm 0,05)	0,42 (\pm 0,07)	< 0,01

Tabelle 15: TNF-alpha-Konzentration an Tag 3 und 5

3.6.1.3. Mittlere TNF-alpha-Konzentration bei SET und DET

Wie oben erwähnt wurde in 66 % der Fälle nur ein Embryo transferiert (single embryo transfer, SET). Bei 25 Patientinnen transferierte man 2 Embryonen (double embryo transfer, DET). Es stellte sich hier nunmehr die Frage, ob es einen Unterschied zwischen den Konzentrationen von TNF-alpha bei schwangeren und nicht-schwangeren Frauen nach SET beziehungsweise DET gibt.

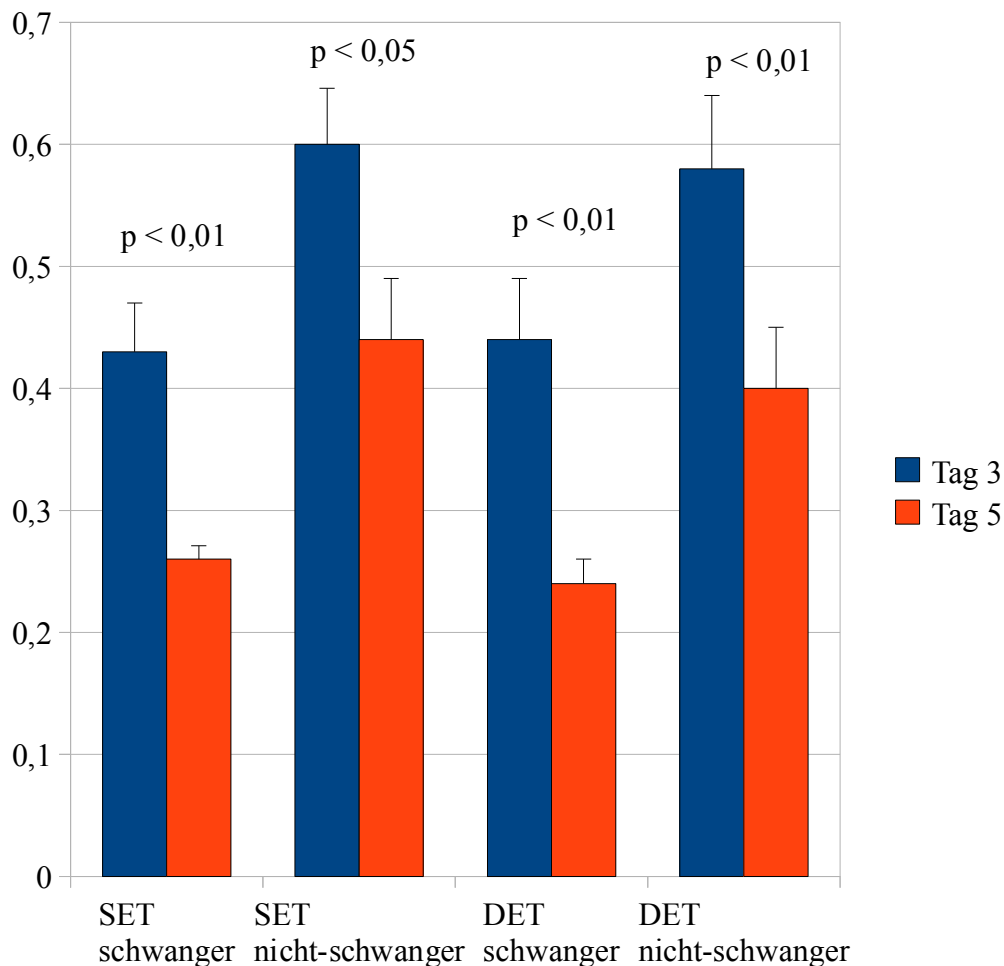


Abbildung 13: mittlere TNF-alpha-Konzentration schwanger/nicht-schwanger SET versus DET (ns).

TNF-alpha (pg/ml)	SET schwanger	SET nicht-schwanger	DET schwanger	DET nicht-schwanger	p (SET vs. DET)
Tag 3	0,43 (± 0,05)	0,6 (± 0,07)	0,44 (± 0,04)	0,58 (± 0,06)	n.s.
Tag 5	0,26 (± 0,01)	0,44 (± 0,05)	0,24 (± 0,01)	0,4 (± 0,07)	n.s.

Tabelle 16: TNF-alpha-Konzentration SET versus DET an Tag 3 und 5

Am Tag 3 und 5 wurden die TNF-alpha-Konzentrationen in den Gruppen Schwangere versus Nicht-Schwangere gemessen. Es zeigten sich sowohl im SET als auch im DET niedrigere Werte beiden schwangeren Patientinnen. Ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von SET gegenüber DET resultierte jedoch nicht (Abbildung 13, Tabelle 16).

3.6.1.4. Zusammenhang zwischen dem mittleren PN-Score und der TNF-alpha-Konzentration am Tag 5

Wie bereits im obigen Abschnitt erläutert besteht ein Zusammenhang zwischen dem PN-Score eines Embryos und der Aussicht auf eine erfolgreiche Schwangerschaft nach ET.

Der mittlere PN-Score pro Patientin ergab bei den schwangern Frauen deutlich kleiner Werte als bei den Frauen die nach ET nicht konzipierten. Der PN-Score lässt demnach auf eine positive Entwicklung des Embryos und einem hohen Potential für eine erfolgreiche Implantation schließen. Weiterhin hatten die Untersuchungen ergeben, dass schwangere Patientinnen deutlich geringere TNF-alpha-Konzentration im embryonalen Kulturmedium hatten. Höhere TNF-alpha-Konzentrationen scheinen wie auch die höheren PN-Scores einen negativen Einfluss auf ein positives Schwangerschaftsergebnis zu haben. Deshalb untersuchten wir den Zusammenhang zwischen dem mittleren PN-Score pro Patientin und deren mittleren TNF-alpha-Konzentration.

Der mittlere PN-Score pro Patientin korrelierte mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ positiv mit der TNF-alpha-Konzentration am Tag 5. Je höher also der mPN-Score der Embryonen (pro Patientin) war, desto höher war auch die TNF-alpha-Konzentration im Kulturmedium am Tag 5.

Es zeigte sich hierbei ein cut-off Wert für den mPN-Score von 16. Bei einem mPN Score < 16 war die mittlere TNF-alpha-Konzentration an Tag 5 signifikant niedriger als bei einem mPN Score > 17 (siehe Tabelle 17).

TNF-alpha (pg/ml)	mPN < 16	mPN > 17	p
	0,34 (± 0,08)	0,42 (± 1,1)	< 0,05

Tabelle 17: TNF-alpha-Konzentration in Abhängigkeit vom mPN-Score

3.6.1.5. Zusammenhang zwischen der TNF-alpha-Konzentration und der inneren Zellmasse/Trophoektoderm am Tag 5

Wie oben erwähnt, waren Ausbildung von innerer Zellmasse beziehungsweise Trophoektoderm mit der Qualität der Embryonen im Vorkernstadium und am Tag 5 assoziiert. Auch die TNF-alpha-Konzentration war bei einem besseren PN-Score signifikant kleiner. Da in unserer Studie hohe TNF-alpha-Konzentrationen einen negativen Einfluß auf den Schwangerschaftserfolg hatten, wurde in der weiteren Analyse der Qualität der embryonalen Entwicklung die innere Zellmasse und das Trophoektoderm mit den TNF-alpha-Konzentrationen in Verbindung gebracht. Die Daten ergaben bei gut entwickelter innerer Zellmasse niedrigere TNF-alpha-Konzentrationen als bei unterentwickelter inneren Zellmasse ($0,35 \pm 0,9$ pg/ml versus $0,38 \pm 0,1$ pg/ml, n.s.). Die Messungen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Trophoektoderms und der TNF-alpha-Konzentration. Im Kulturmedium von Embryonen mit einem gut entwickelten TE wurden deutlich geringere Konzentrationen gemessen als in den Proben mit wenig entwickeltem TE ($0,33 \pm 0,1$ pg/ml versus $0,38 \pm 0,1$ pg/ml, $p = 0,001$).

3.6.2. Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

Das Glykoprotein Leukemia Inhibitory Faktor spielt eine zentrale Rolle bei der Implantation des Embryos. Es wurde bereits in der Follikelflüssigkeit bei Frauen gemessen und ist auch im Kulturmedium humaner Präimplantationsembryonen messbar.

3.6.2.1. Mittlere LIF-Konzentration am Tag 3/5 der Kultur

Es wurde am Tag 3 und 5 der Kultur im gesammelten Kulturmedium der Embryonen jeder Patientin die Konzentration von LIF bestimmt. Durchschnittlich wurde ein Anstieg der Konzentration um 4 pg/ml von Tag 3 auf Tag 5 beobachtet (Tabelle 18).

	Tag 3	Tag 5	p <
LIF (pg/ml)	31,5	35,5	0,05

Tabelle 18: mittlere LIF-Konzentration im Kulturmedium an Tag3/5

3.6.2.2. Mittlere LIF- Konzentration am Tag 3/5 bei schwangeren Patientinnen versus nicht-schwangeren Patientinnen

Die Messungen ergaben an beiden Tagen signifikant höhere mittlere LIF-Konzentrationen bei Schwangeren gegenüber Nicht-Schwangeren (Abbildung 14, Tabelle 19).

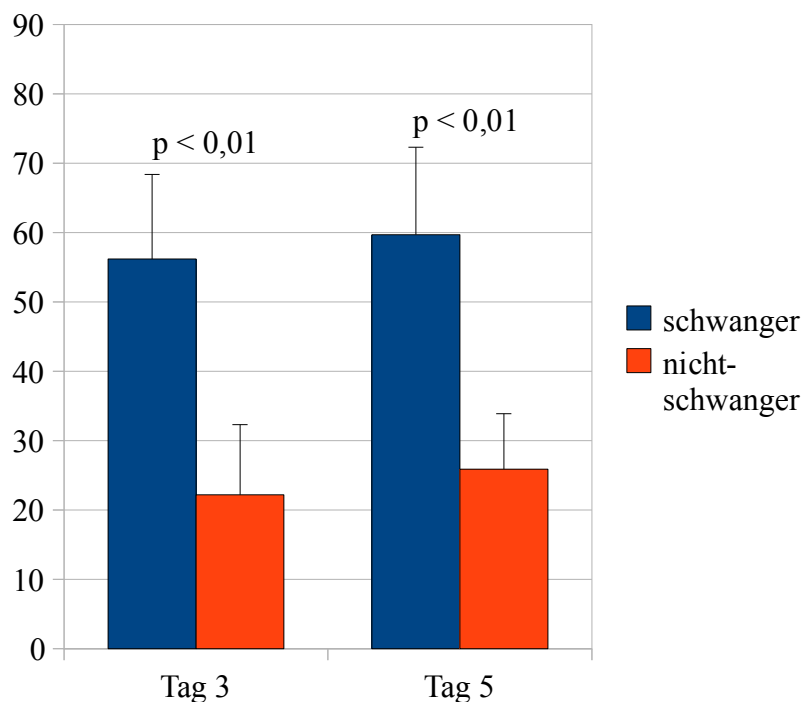


Abbildung 14: mittlere LIF-Konzentration Tag3/5 schwanger versus nicht-schwanger

LIF (pg/ml)	schwanger	nicht-schwanger	p
Tag 3	56,2	22,2	< 0,01
Tag 5	59,7	25,9	<0,01

Tabelle 19: mittlere LIF-Konzentration an Tag 3 und 5, schwanger vs. nicht-schwanger

3.6.2.3. Mittlere LIF-Konzentration und PN-Score am Tag 3

Interessanterweise ergab sich auch ein Zusammenhang zwischen dem mPN-Score und der LIF-Konzentration am Tag 3. Bei der Gruppeneinteilung fand sich ein Cut off Wert von 16. Embryonen mit einem PN Score ≤ 16 , also einem höheren Potential, wiesen deutlich höhere

LIF-Werte auf. Hingegen hatten Embryonen mit einem PN-Score über 17, also mit einem geringeren Entwicklungspotential, wesentlich niedrigere LIF-Konzentrationen (Abbildung 15, Tabelle 20).

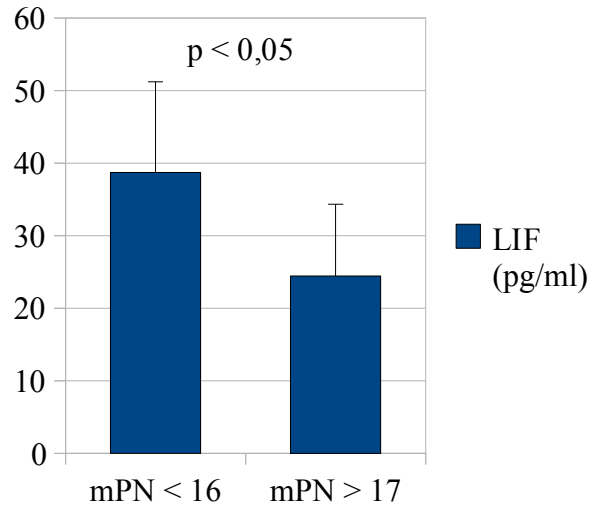


Abbildung 15: LIF-Konzentration bei mPN < 16 sowie > 17

LIF (pg/ml)	mPN < 16	mPN > 17	p
	38,7 (± 12,5)	24,44 (± 9,9)	< 0,05

Tabelle 20: Zusammenhang zwischen mPN-Score und der LIF- Konzentration am Tag 3

3.6.2.4. Mittlere LIF-Konzentration bei SET und DET

In weiteren Analysen der LIF-Konzentrationen am Tag 3 und 5 in den Gruppen Schwangere vs. Nicht-Schwangere zeigten sich sowohl im SET als auch im DET signifikant höhere Werte bei den schwangeren Patientinnen (Tabelle 16). Die Konzentrationen bei SET unterschieden sich weder in der Gruppe der Schwangeren und der Nicht-Schwangeren von den Konzentrationen bei DET (Tabelle 21).

LIF (pg/ml)	Schwanger	Nicht-schwanger	p (schwanger vs. nicht-schwanger)
SET			
Tag 3	55,4	21,4	0,01
Tag 5	62,8	26,6	
DET			
Tag 3	57,9	22,3	0,01
Tag 5	52,5	25,0	

Tabelle 21: LIF-Konzentration (Tag 3/5) bei SET/DET schwanger vs. nicht-schwanger

Nach Transfer von einem Embryo (SET) konnte eine Schwangerschaftsrate von 25,9% erreicht werden. Wurden zwei Embryonen transferiert (DET) resultierten 31,7% in einem positiven Schwangerschaftserfolg (Tabelle 22).

	SET	DET	p
Schwangerschaftsrate (%)	25,9	31,7	n.s.

Tabelle 22: Schwangerschaftsrate SET vs. DET

3.6.2.5. Zusammenhang zwischen der LIF-Konzentration und der inneren Zellmasse/Trophektoderm am Tag 5

Wie oben erwähnt waren Ausbildung von innerer Zellmasse beziehungsweise Trophektoderm mit der Qualität der Embryonen im Vorkernstadium und am Tag 5 assoziiert. Auch die LIF-Konzentration (Tag 3) war bei einem besseren PN-Score signifikant höher. Da in unserer Studie hohe LIF-Konzentrationen einen positiven Einfluss auf den Schwangerschaftserfolg hatten, wurde in der weiteren Analyse der Qualität der embryonalen Entwicklung die innere Zellmasse und das Trophektoderm mit der mittleren LIF-Konzentration in Verbindung gebracht. Die Messungen in der Gruppe der Embryonen mit gut ausgebildeter innerer Zellmasse ergaben keine signifikant höheren Werte als die der Gruppe mit schlecht ausgebildeter Zellmasse. Das Kulturmedium von Embryonen mit gutem Trophektoderm enthielt jedoch signifikant höhere LIF-Konzentrationen als das von Embryonen mit schlechtem Trophektoderm ($42,3 \pm 29,9$ pg/ml versus $35,5 \pm 26,1$ pg/ml, $p = 0,046$).

4. Diskussion

4.1. Morphologie der Zygoten

Die Anzahl der zu transferierenden Embryonen wird in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz geregelt. Restriktionen des Embryonenschutzgesetzes bei der Auswahl bestehen insofern, als dass nicht *mehr* Embryonen entstehen dürfen als für die IVF benötigt werden. Damit soll die Entstehung überzähliger Embryonen vermieden werden. In Deutschland muss die Auswahl am Tag 1 erfolgen, und maximal drei Pronukleus-Stadien dürfen weiter kultiviert werden. Eine Auswahl des besten Embryos mit dem besten Potential ist zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise erst im Blastozystenstadium, nicht zulässig. Die deutschen Reproduktionszentren sind demnach auf ein detailliertes PN-Scoring-System angewiesen, um die Auswahl der besten Embryonen im Pronukleus-Stadium zu ermöglichen und hohe Implantations- und Schwangerschaftsraten zu erzielen.

Zahlreiche Forschergruppen evaluierten in den 90er Jahren verschiedenste morphologische Kriterien einer imprägnierten Zygote mit dem Ziel, einen validen Zusammenhang mit der späteren Entwicklung des Embryos und dessen Aussicht auf einen Implantations- und Schwangerschaftserfolg zu finden (Wright *et al.*, 1990; Van Blerkom *et al.*, 1995; Scott und Smith, 1998; Tesarik *et al.*, 1999, Donaghay *et al.*, 2007).

Die Vorkerne sind die Basis einer morphologischen Beschreibung von imprägnierten Oozyten. Man geht davon aus, dass in den Vorkernen der Eizelle Reifungsprozesse stattfinden, die in bestimmten morphologischen Mustern ablaufen. Die Folge dieser Abläufe ist eine gezielte Annäherung der beiden Vorkerne und die Ausrichtung ihrer Nukleolen in einer Reihe. Obwohl diese Vorgänge koordiniert ablaufen, unterliegen sie zeitlichen Variationen (Payne *et al.*, 1997). Wright *et al.* postulierten bereits 1990 die Reihung der Nukleolen am Berührungspunkt der Vorkerne als wichtiges Kriterium für die Auswahl von Zygoten.

Spätere Studien setzten den Fokus ihrer Beobachtung unter anderem auch auf den Halo-Effekt oder die Vakuolisierung des Ooplasmas der Zygote (Zollner *et al.*, 2002; Ebner *et al.*, 2003). 1998 berichteten Scott und Smith über ein Bewertungssystem, das durch morphologische Beobachtungen im Vorkernstadium die Auswahl hochwertiger Zygoten ermöglichte. Basis ihres Bewertungssystems waren die Position der Vorkerne zueinander, die Verteilung ihrer Nukleolen und die Qualität des Ooplasmas. Hochwertige Zygoten

entwickelten sich laut ihrer Studie schneller. Folgend beinhaltete ihr System auch die Zeitspanne bis zur Auflösung der Membranen der zwei Vorkerne sowie die Zeit bis zur ersten Furchungsteilung der Zygote in die ersten zwei Blastomeren. Ein schnelles Eintreten dieser Prozesse korrelierte mit einer höheren Schwangerschaftsrate (Scott und Smith, 1998).

Ludwig *et al.* (2000) übernahmen das Bewertungssystem von Scott und Smith (1998) und modifizierten es im Sinne des deutschen Embryonenschutzgesetzes. Das bedeutete, dass sie nur die Kriterien in ihr neues System übernehmen konnten, die ausschließlich im Vorkernstadium erhoben werden konnten. So wurden die Syngamie (Verschmelzung der beiden Vorkerne) und die erste Furchungsteilung nicht in ihr Scoring-System aufgenommen. Das Ergebnis ihrer Studie war eine signifikante Korrelation zwischen der Morphologie der Embryonen und dem kumulativen Score der Zygotenbeurteilung. Es konnte ein Schwellenwert berechnet werden, der die wahrscheinliche prozentuale Vorhersage eines Schwangerschaftserfolges zuließ.

Tesarik und Greco berichteten 1999 über ihr eigenes Bewertungssystem. Es beinhaltete die Größe der Nukleolen, ihre Anzahl und ihr Verteilungsmuster innerhalb der Vorkerne. Sie postulierten, dass eine einzige morphologische Beurteilung im Vorkernstadium, d.h. mit nur einem Blick, ausreichend wäre, um das mögliche Potential des Embryos zur Implantation voraussagen zu können.

Mit ihrem „pattern 0“ legten sie die optimale Anordnung der Nukleolen innerhalb der Vorkerne fest. Embryonen mit diesem optimalen Muster arretierten in nur 8,5 % der Fälle zwischen dem 4- bis 8-Zeller-Stadium. Der Vorteil des Scorings von Tesarik und Greco (1999) gegenüber dem von Scott und Smith (1998) war die Vereinfachung der Anwendung der Bewertung. Sie fand nur einmal während des Vorkern-Stadiums statt und die Anzahl der zu evaluierenden Parameter war geringer.

Scott und Alvero (2000) führten zur besseren Bewertung der Zygoten den Z-Score ein, der die von Tesarik und Greco (1999) empfohlenen Muster pattern 0 bis pattern 5 zu vier Gruppen reduzierte (Z1 bis Z4). Die Z-Einteilung bezog sich analog zu Tesarik (1999) auf die Größe, Anzahl und Verteilung der Nukleolen. Die Ergebnisse dieser Studie waren die höhere Blastozystenrate der Z1 und Z2 Zygoten verglichen mit den Z3 und Z4 Zygoten sowie eine hieraus resultierende höhere Implantationschance der Z1 und Z2 Zygoten. Nach Ansicht von Scott und Alvero (2000) stellt der Z-Score das Potential der Oozyte dar. Die Größe, Anzahl und Verteilung der Nukleolen ist das morphologische Korrelat für eine Umstrukturierung der rRNA-Synthese innerhalb der Zygote. Eine Abweichung des Verteilungsmusters der

Nukleolen, so wird vermutet, könnte Ausdruck einer asynchronen Entwicklung auf nuklearer und zytoplasmatischer Ebene sein. Folge dieser Abweichung könnte eine Arretierung oder Retardierung der weiteren embryologischen Entwicklung sein. Die Beurteilung der Zygoten im Vorkern-Stadium ist auch in dieser Studie als aussagekräftiges Verfahren für die Auswahl von vitalen Embryonen bewertet worden. Dennoch wird es für sinnvoll gehalten, die Morphologie von Embryonen zu mehreren Zeitpunkten ihrer Entwicklung zu evaluieren (Scott und Alvero, 2000).

Tesarik führte 2000 zusammen mit Junka eine prospektive Studie von ICSI-Zyklen durch, mit der er die in seiner vorherige Studie (Tesarik und Greco, 1999) erzielten hohen Implantationsraten belegen konnte. Embryonen, die im Vorkernstadium mit einem „pattern 0“ bewertet worden waren, erzielten eindeutig höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten (30,2 % versus 11,2 % und 44,8 % versus 22,1 %). Diese Studie ließ sie zu dem Schluss kommen, dass eine Bewertung der Zygoten im Vorkernstadium neben der bisherigen Beurteilung der Embryonen am Tag 3 der Kultur ein möglicher prognostisch wichtiger Faktor für die Auswahl von vitalen Embryonen sein könnte.

Wittemer *et al.* (2000) bestätigten schließlich die Studie von Tesarik und Junka (2000). Sie erzielten nach Anwendung des Tesarik-Schemas auf ein Kollektiv von 262 IVF/ICSI-Zyklen eine signifikant bessere Auswahl von qualitativ hochwertigen Embryonen mit höherem Potential für eine Implantation. Dabei wurde jede Zygote mit ihrem zugewiesenen Muster bei ihrer weiteren embryologischen Entwicklung beobachtet. Es zeigte sich, dass Zygoten mit dem „pattern 0“ eine hohe Tendenz zur Entwicklung guter Embryonen hatten. Wurde zumindest ein Embryo mit dem „pattern 0“ im Anschluß transferiert, so kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Implantationsrate gegenüber den Transfers, bei denen kein „pattern 0“-Embryo vorhanden war (39,3 % versus 19,7 %).

Zollner *et al.* (2002) griffen in ihrem PN-Score einzelne Aspekte der bisherigen Studien auf und entwickelten ein detailliertes Bewertungssystem, das die Auswahl von Zygoten ermöglichte, welche sich bis zum Tag 5 der Kultur in 46 % der Fälle zu Blastozysten entwickelten. Das Scoring-System beinhaltete sowohl die Anzahl, Größe und Anordnung der Vorkerne und der Nukleoli sowie den zytoplasmatischen Halo-Effekt, die Vakuolisierung sowie Granulierung des Ooplasmas. Der mittlere Vorkern-Score korrelierte positiv mit dem durchschnittlichen Reifegrad der Blastozysten in ICSI-Zyklen, jedoch nicht in IVF-Zyklen. Es konnte ein Cut-off-Wert des Vorkernscores für die ICSI-Zyklen berechnet werden, bei dem der Unterschied im Reifegrad der Blastozyste sowie der Anzahl von arretierten Embryonen in

Fokus gesetzt werden konnte. Unter dem Cut-off von 15 Punkten war der Reifegrad der Blastozyste signifikant besser (6 versus 7) und die Anzahl der arretierten Embryonen lag deutlich niedriger (23 % versus 45 %) als bei einem Wert über 15.

In der vorliegenden Studie wurde das Bewertungssystem von Zollner *et al.* (2002) angewandt. Im Zygoten-Scoring-Table wurden die fertilisierten Eizellen auf die folgenden Kriterien überprüft: Anzahl der Vorkerne, Juxtaposition der Vorkerne, Größe der Vorkerne, Anzahl der Nukleolen in den Vorkernen, Anordnung der Nukleolen in den Vorkernen, Halo Effekt, Vakuolisierung und Granulierung des Ooplasmas.

Die erste Beurteilung resultierte für jede Zygote in einem individuellen Punktwert, dem PN-Score. Der mittlere PN-Score lag bei $16,5 \pm 3,7$ Punkten. Nach den australischen gesetzlichen Bestimmungen bestand in unserer Studie die Möglichkeit jede einzelne Zygote nicht nur in ihrem Vorkernstadium zu beurteilen, sondern auch in ihrer späteren embryonalen Entwicklung bis zur Blastozyste zu verfolgen, denn es gibt in den australischen Richtlinien keine Einschränkung was die Anzahl der kultivierten fertilisierten Eizellen betrifft. Dies ermöglichte es uns in dieser Studie, einzelne Parameter der PN-Beurteilung mit den Parametern der späteren Embryonenbeurteilung (Embryo-Scoring) auf einen möglichen Zusammenhang zu untersuchen.

Wie schon in der Studie von Zollner *et al.* (2002) beschrieben, war auch in unserer Studie das Ausmaß der Vakuolisierung des Zytoplasmas im Vorkernstadium ein prognostischer Faktor für die spätere embryonale Entwicklung. Zygoten mit keiner oder nur leichter Vakuolisierung entwickelten sich in 44,3 % zur Blastozyste (Blastozystenformationsrate). Bei einer starken Vakuolisierung ist eine optimale Entwicklung der Zygote sehr unwahrscheinlich. Sie ist hinweisend auf degenerative Prozesse und Anzeichen für eine drohende Arretierung des Embryos. Insgesamt zeigten nur 5 Embryonen im PN-Stadium eine starke Vakuolisierung. Von diesen entwickelte sich jedoch keine zur Blastozyste. Sie zeigten eine Arretierung spätestens im 12-Zeller-Stadium.

Das PN- Kriterium Halo-Effekt wurde wie auch bei Zollner *et al.* (2002) und Ebner *et al.* (2003) in unserer Studie untersucht. Es zeigte sich allerdings kein statistischer Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Halo-Effekts und der Entwicklung der Zygote zur Blastozyste. Dennoch wurde bei der Mehrzahl der späteren Blastozysten (36%) ein leichter bis normaler Halo-Effekt beobachtet. Desweiteren zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Halo-Effekt und der Blastomerenzahl am Tag 2 sowie der Reifegrade der

Embryonen an den Tagen 4 und 5. Die mittlere Anzahl an Blastomeren am Tag 2 lag in der Gruppe der Embryonen mit leichter/normaler Halo-Ausprägung ($3,4 \pm 0,95$) signifikant höher als die Anzahl in der Gruppe der Embryonen mit extremen/keinem Halo-Effekt ($3,2 \pm 0,98$; $p < 0,05$). Embryonen mit einem leichten/normalen Halo zeigten also eine schnellere Teilung ihrer Blastomeren bis zum Tag 2 der Kultur. Auch an den Tagen 4 und 5 korrelierte die Ausprägung des Halo-Effekts signifikant mit dem Reifegrad der Embryonen ($p < 0,01$). Je schlechter die Halo-Bewertung, desto schlechter war auch die Entwicklung der Embryonen (Grad 3 und 4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die weitere embryonale Entwicklung zum Teil bereits im Vorkernstadium absehen lässt, und dass ein detaillierter Vorkern-Score zur Auswahl der zu kultivierenden Embryonen nützlich ist.

4.2. TNF-alpha und LIF in der Reproduktionsmedizin: Welche Rolle spielen sie?

4.2.1. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha

Das Zytokin TNF-alpha wurde erstmals im Serum von Kaninchen isoliert, welche zuvor mit einem bakteriellen Endotoxin behandelt worden waren. Es war verantwortlich für eine hämorrhagische Nekrose in Tumorgewebe (Old, 1975). Heute werden TNF-alpha viele Funktionen zugeschrieben. Es ist beteiligt bei der Proliferation aber auch beim Zelltod in vielen Geweben. Es agiert bei Gefäßneubildung sowie bei inflammatorischen, zytotoxischen und immunmodulatorischen Reaktionen im menschlichen Organismus (Aggarwal *et al.*, 1996).

Die Rolle von TNF-alpha in der Reproduktionsmedizin wurde in den letzten 15 Jahren kontrovers diskutiert. Viele Studien schrieben TNF-alpha eine positive Rolle im Rahmen von Embryoentwicklung, Implantation und Schwangerschaft zu. Andere setzten die negativen Aspekte des Zytokins in den Vordergrund. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von habituellen Aborten soll zum Beispiel ein Ungleichgewicht in der Expression von TH1- und TH2- Zytokinen zugunsten der TH1-Zytokine IL-2, IFN-gamma und TNF-alpha sein (Reid *et al.*, 2001, Zenclussen *et al.*, 2006). Ob TNF-alpha einen positiven oder negativen Effekt ausübt scheint laut einiger Studien von dem Ausmaß seiner Expression abzuhängen.

TNF-alpha und seine Rezeptoren sind im Endometrium und im Ovar nachgewiesen worden (Hunt *et al.*, 1992, Roby *et al.*, 1990). Während des weiblichen Zyklusses wird TNF-

alpha in der Sekretionsphase exprimiert (Philippeaux *et al.*, 1993), jedoch nicht in der Proliferationsphase. Ein Abfall von Östrogen in dieser sekretorischen Phase könnte die TNF-alpha-Expression erklären, denn Östrogen soll die Freisetzung von TNF-alpha aus Monozyten inhibieren (Loy *et al.*, 1992). Die beobachtete Infiltration des Endometriums mit Monozyten und deren TNF-alpha Expression wird als möglicher Auslöser für das Einsetzen der Sekretionsphase diskutiert. TNF-alpha scheint die Permeabilität der Zellen des Endometriums zu steigern und damit das typische Ödem des Stromas auszulösen (Tabibzadeh, 1994). Die Proliferation des Endometriumepithels soll laut Tabibzadeh durch den Einfluss von TNF-alpha inhibiert werden. Hierbei soll das Zytokin Apoptosevorgänge in den Epithelzellen des Endometriums zum Ende der Sekretionsphase induzieren. Ein hämorrhagischer Untergang des Epithels ist die Folge. TNF-alpha scheint also eine Schlüsselfunktion bei den inflammatorischen Prozessen des Menstruationszyklus zu spielen.

Für eine erfolgreiche Implantation sollte sich das maternale Endometrium in der frühen Sekretionsphase befinden. Zu diesem Zeitpunkt differenziert sich das Endometrium zum hypersekretorischen Epithel der Dezidua und ist Expressionsort zahlreicher Wachstumsfaktoren (Irwin *et al.*, 1994).

4.2.2. Leukemia Inhibitory Faktor (LIF)

LIF wird in vielen Zelltypen und Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Seine Rolle in der Reproduktionsmedizin war Thema zahlreicher Studien der letzten 15 Jahre. Interessanterweise nimmt LIF Einfluss auf viele physiologische Vorgänge im menschlichen Körper: Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben (Hilton *et al.*, 1992). Seine Interaktion mit vielen anderen Zytokinen und deren Rezeptoren des menschlichen Organismus macht den exakten Nachweis seines Wirkungsspektrums schwierig, denn manche seiner Effekte auf Zellen und Geweben können durch verwandte Zytokine imitiert werden: IL-6, Onkostatin M und andere (Gearing *et al.*, 1992, Murakami *et al.*, 1993).

LIF kann in den meisten Geweben des Reproduktionstraktes sowohl bei Säugetieren (meist Mäusen) sowie beim Menschen nachgewiesen werden. Die Bindung von LIF an den LIF-Rezeptor und an gp130 aktiviert viele Transduktionswege. Der LIF-Rezeptor wird im Endometrium, in Oozyten und Blastozysten exprimiert. Das LIF-Protein wird im Endometrium in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus gebildet. Zum Zeitpunkt der Implantation findet man seine höchste Konzentration. Diese physiologische Präsenz von LIF zum Zeitpunkt der Implantation könnte ein kritischer Parameter für den Erfolg der Einnistung

der Blastozyste in die Gebärmutter darstellen. Das Endometrium steht während des Zyklus und einer frühen Schwangerschaft unter ständig wechselndem Einfluss von Steroidhormonen, lokalen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Vogiagis *et al.* (1996) und Chen *et al.* (1995) untersuchten in gewonnenem Uterusgewebe in den verschiedenen Phasen des Zyklus die Expression von LIF. Mittels Immunhistochemie konnte LIF zellulär und mittels Northern Blot die mRNA nachgewiesen werden. Sie fanden relativ niedrige Spiegel in der Proliferationsphase, die nach der Ovulation anstiegen und bis zum Ende des Zyklus relativ konstant hoch blieben bis sie schließlich wieder auf die Basisspiegel sanken. Die LIF mRNA konnte nur während der mittleren und späten Sekretionsphase nach Tag 20 des Zyklus nachgewiesen werden. Diese zwei Studien kamen also zu dem Ergebnis, dass LIF und seine mRNA Transkripte zum Zeitpunkt der erwarteten Implantation in hohen Spiegeln nachzuweisen sind und es eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang zu spielen scheinen (Vogiagis *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1995).

Ihr physiologisches Milieu für die frühe Reifung findet die Eizelle in der Follikelflüssigkeit. Diese Umgebung kann das Implantationspotential und die embryonale Entwicklung der Eizelle beeinflussen. Nachdem der Einsatz von Follikelflüssigkeit *in vitro* einen positiven Effekt auf die Entwicklung von humanen Präimplantationsembryonen und deren Schwangerschaftsraten hatte (Hemmings *et al.*, 1994), konnte das Zytokin LIF in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. Senturk *et al.* (1998) und Coskun *et al.* (1998) beobachteten, dass die LIF-Konzentration in präovulatorischen Follikeln signifikant höher war als in den Follikel, die bereits in fortgeschrittener Entwicklung waren. Weiterhin zeigten die Daten von Senturk *et al.* (1998) eine Korrelation zwischen den LIF-Konzentrationen der Follikelflüssigkeit und der Qualität der Embryonen.

Keltz *et al.* (1996) konnten eine hohe Konzentration an LIF im ampullären Abschnitt der Tuba uterina messen. Zollner *et al.* (2004) konnten in der Follikelflüssigkeit nach Follikelpunktion im Rahmen ihrer IVF/ICSI-Studie den Leukemia Inhibitory Faktor nachweisen. Interessanterweise konnten signifikant höhere LIF-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit der Frauen gemessen werden, die nach ET konzipierten. Die Follikelflüssigkeit nicht-schwangerer Frauen zeigte deutlich niedrigere LIF-Konzentrationen. Eine Assoziation zwischen den LIF-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit und dem Schwangerschaftserfolg nach IVF/ICSI scheint wahrscheinlich.

Eine weitere Lokalisation der LIF-Produktion ist die Plazenta. Kojima *et al.* (1994) beschrieben eine hohe LIF-Expression der humanen Dezidua während des ersten Trimesters

der Schwangerschaft. Das Chorion jedoch exprimiert im ersten Trimester sowie am Termin nur geringe LIF-Spiegel. Epithelreiche Fraktionen des humanen Endometriums zeigten sowohl in der sekretorischen Phase als auch in der proliferativen Phase eine höhere LIF-Expression als die stromareichen Fraktionen.

Doch nicht nur Ovar, Endometrium, Tuba uterina und Plazenta zeigen LIF-Expression. Im Embryo selbst konnten Forscher die Rezeptor-Transkripte (LIF- β -Untereinheit und gp130-Untereinheit) des Zytokins LIF nachweisen. Van Eijk et al. (1996) demonstrierten in ihrer Studie die Expression der LIF-Rezeptor-Untereinheiten und gp130 in der Oozyte, in den verschiedensten Furchungsstadien humaner Präimplantationsembryonen und im Blastozystenstadium.

Dunglison *et al.* (1996) konnten durch die Zugabe von LIF zum Kulturmedium einen Anstieg in der Blastozysten-Formationsrate und eine verbesserte Qualität der Blastozysten erzielen. Andere Studien wie die von Juriscova *et al.* (1995) konnten dies nicht bestätigen. Die Applikation von LIF zum Kulturmedium zeigte hier keinen Benefit bezüglich der Entwicklung der Embryonen bis zum Blastozystenstadium.

LIF wird unter anderem in aktivierten T-Zellen gebildet. Diese sind in der Zellmasse um die Eizelle herum, dem Cumulus oophorus, vertreten. Eine mögliche Expression durch Immunozyten könnte einen Effekt auf die frühe Entwicklung der Eizelle haben. 2001 veröffentlichten Piccinni *et al.* eine Studie zum Zytokinprofil im humanen Cumulus oophorus. Ihr Ziel war der Nachweis einer Produktion von IL-4 und LIF durch die T-Zellen des Cumulus oophorus. Es konnten CD4 positive T-Zellen und Makrophagen unter den Cumulus-Zellen gefunden werden. T-Zellen, die von diesem CD4 positiven Zell-Klon generiert werden konnten zeigten ein höheres Potential IL-4 und LIF zu exprimieren als andere CD4 positive T-Zellen, die nicht aus dem Cumulus oophorus der Patientin stammten. Die LIF-Produktion wird laut den Autoren über IL-4 vermittelt, deren Expression wiederum durch das im Cumulus oophorus gebildete Progesteron stimuliert wird. Ihre Daten sprechen für eine Zytokin-Expression durch die T-Zellen des Cumulus oophorus, welche, wie in anderen Studien bestätigt, einen positiven Einfluss auf die Präimplantations-Entwicklung von Säugetier-Embryonen zu haben scheint (Piccinni *et al.*, 2001).

Das Zytokin LIF wird nicht nur im Rahmen der Embryoentwicklung und Implantation diskutiert, sondern auch in Zusammenhang mit der weiblichen Infertilität. Weibliche Indikationen, die eine assistierte Befruchtung erfordern, sind zahlreich (Tubenverklebungen, Endometriose und andere). Bei Frauen mit habituellen Aborten und IVF/ICSI-Versagen liegen

die Ursachen woanders. Während meistens Gerinnungsstörungen und Infektionen diskutiert werden, könnte auch eine Dysregulierung auf Zytokinebene ein weiterer Erklärungsversuch sein. Im Zusammenhang mit habituellen Aborten wurde schon das Zytokin TNF-alpha diskutiert (siehe oben). Eine fehlerhafte Produktion von LIF könnte ebenso zu den Einflussfaktoren eines Implantations- und Schwangerschaftsversagens gezählt werden.

In einer Studie von Laird *et al.* (1997) wurden sowohl Uterusflüssigkeit als auch Gewebebiopsien des Endometriums in drei verschiedenen Gruppen von Patientinnen gewonnen: fruchtbare Frauen, idiopathisch infertile Frauen und Frauen mit habituellen Aborten. Es zeigten sich höhere LIF-Spiegel in der aspirierten Uterusflüssigkeit und den Endometrium-Biopsien von fruchtbaren Frauen. In den Proben von infertilen Frauen ungeklärter Ursache wurden niedrigere Spiegel gemessen. Der erste Nachweis von LIF gelang am 7.Tag nach dem LH-Anstieg (LH + 7), ein LIF-Peak wurde bei LH + 12 gemessen und bei LH + 14 konnte ein Abfall des LIF-Spiegels verzeichnet werden. Die Zeitspanne LH + 7 bis LH + 14 entspricht dem Implantationsgeschehen *in vivo*. Im Zeitraum des LH-Anstiegs bis LH + 6 konnte in der Gruppe der fertilen Frauen kein LIF nachgewiesen werden. Der niedrigere LIF-Spiegel der Frauen mit idiopathischer Infertilität zum Zeitpunkt der erwarteten Implantation führte die Autoren zu der Vermutung, dass LIF die Einnistung des Embryos in den Uterus möglicherweise unterstützt (Laird *et al.*, 1997).

Hambartsoumian *et al.* (1998) konnten mit ihrer Studie die Ergebnisse von Laird *et al.* (1997) bekräftigen. Sie untersuchten drei Gruppen von Frauen unter 40: Frauen mit idiopathischer Infertilität, mit multiplen Implantationsversagen nach IVF/ICSI und fruchtbare Frauen, die im letzten Jahr erfolgreich eine Schwangerschaft ausgetragen hatten. Endometrium-Gewebeproben wurden in jeder Gruppe zu festgelegten Zeitpunkten während der Proliferations- und der Sekretionsphase des Zyklus gewonnen. Die Endometrium-Proben wurden anschließend für 24h kultiviert, das Kulturmedium anschließend gesammelt und mittels ELISA auf LIF hin untersucht. Die Ergebnisse der Messungen ergaben bei den infertilen Frauen eine deutliche Dysregulation der LIF-Produktion während der Proliferationsphase und der Sekretionsphase. Infertile Frauen zeigten im Gegensatz zu den fruchtbaren Patientinnen keinen LIF-Anstieg in der Sekretionsphase. In der Proliferationsphase variierte die LIF-Produktion stark. Die Dysregulation der endometriellen LIF-Produktion bei infertilen Frauen könnte eine Erklärung für das Auftreten multiplen Implantationsversagens nach assistierter Befruchtung und einer idiopathischen Infertilität sein (Hambartsoumian *et al.*, 1998).

LIF konnte in vielen Geweben des weiblichen Reproduktionstrakts nachgewiesen werden. Die Annahme vieler Arbeitsgruppen, dass LIF einen positiven Einfluss auf die frühe Entwicklung und Implantation von Embryonen nimmt, ist in höchstem Maße wahrscheinlich. Eine verminderte Expression im Endometrium zum Zeitpunkt der Implantation könnte ein möglicher Erklärungsansatz für ein habituelles Abortgeschehen und eine ungeklärte Infertilität der Frau sein. Der Einsatz von LIF in der assistierten Reproduktion ist nach Entwicklung eines rekombinanten LIFs (rh LIF) vielleicht in naher Zukunft möglich. Präklinische und klinische Untersuchungen mit rh LIF werden zurzeit durchgeführt.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Diskussion der Daten zur Fertilität

Die männliche Subfertilität war in unserem Patientenkollektiv die häufigste Indikation für eine assistierte Befruchtung. In der Gruppe der Frauen unter 35 Jahren war sie mit 73 % deutlich häufiger als die Endometriose, der Tubenfaktor und die idiopathische Sterilität (jeweils 8 %). In der Gruppe der Frauen über 35 Jahren war die männliche Subfertilität mit 38 % immer noch Indikation Nr. 1. Endometriose und die idiopathische Unfruchtbarkeit folgten mit 16 % beziehungsweise 14 %. Der Grund für eine Kinderlosigkeit schien bei den jungen Paaren unseres Kollektivs eindeutig auf der männlichen Seite zu liegen. Wenn Frauen das Alter von 35 Jahren überschritten haben, waren beide Seiten fast ausgewogen (38 % versus 47 %).

Die Einschränkung der weiblichen Fertilität spiegelte sich auch in der ovariellen Reserve der Frau wider. Die durchschnittliche Anzahl an gewonnenen Eizellen lag - bezogen auf alle Patientinnen - bei 9 Eizellen. Nach Einteilung der Frauen konnten in der Gruppe A signifikant mehr Eizellen verzeichnet werden als in der Gruppe B (11 versus 8, $p < 0,001$). Mit zunehmendem Alter der Frau konnte also eine Abnahme der ovariellen Reserve beobachtet werden, die sich in der Indikation für eine künstliche Befruchtung widerspiegelte. Während das Alter des Mannes in unserer Studie keinen Einfluss auf die Art der künstlichen Befruchtung hatte, so war das Alter der Frau ein entscheidender Faktor.

4.3.2. Diskussion der Ergebnisse des PN-Scoring

Das Zygoten-Scoring-System dieser Studie vervollständigt viele bisherige Scoring-Systeme in der Literatur (Tesarik und Greco, 1999, Ludwig *et al.*, 2000, Scott und Alvero, 2000). Es

beeinhaltet die Evaluation von Anzahl, Anordnung und Größe der Vorkerne und ihrer Nukleolen, sowie die Ausbildung des Halo-Effekts, der Vakuolisierung und Granulation des Ooplasmas.

Mit einem durchschnittlichen PN-Score von 16,5 Punkten konnte noch keine sichere Aussage gemacht werden, ob es sich hierbei um morphologisch gut entwickelte Zygoten handelte, die ein hohes Potential hatten, das Stadium der Blastozyste zu erreichen. Erst durch die nähere Analyse der Daten jedes einzelnen Kriteriums konnten schon bekannte Hypothesen zuvoriger Studien bestätigt werden. Bisherige Arbeiten bewerten die Vakuolisierung der Zygoten als negative Einflussgröße auf die Entwicklung vitaler Embryonen. Dies konnte in unserer Studie bestätigt werden. Zygoten, die eine starke Vakuolisierung zeigten, arretierten bereits im Mehrzeller-Stadium. Lediglich eine Zygote erreichte das Stadium einer kompaktierten Morula. Keine einzige Zygote aus dieser Gruppe entwickelte sich zur Blastozyste. Die Gruppe der Zygoten mit keiner oder nur leichter Vakuolisierung wurde eine Blastozytenformationsrate von 44,3 % erreicht. Darüber hinaus wurde die Blastozytenformationsrate durch die Ausprägung des Halo-Effekts beeinflusst. Ebner *et al.* (2003) postulierten in ihrer Arbeit, dass die Ausbildung eines Halo-Effekts einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Präimplantationsembryonen und deren Implantation hat. Das Ausmaß des Halo-Effekts hatte in dieser Studie keinen Einfluss auf deren Entwicklung und Einnistung.

Obwohl der negative Einfluss eines fehlenden Halo-Effekts auf die Blastozystenentwicklung sich in unserer Studie nicht statistisch beweisen ließ, so deuten einige Daten zumindest darauf hin. Embryonen, die sich im Laufe der Kultur zu Blastozysten entwickelt hatte, hatten im PN-Scoring in 63 % der Fälle einen leicht oder normal ausgeprägten Halo-Effekt. 21 % der späteren Blastozysten bildeten keinen Halo aus, bei 16 % war er stark ausgeprägt. Diese Zahlen weisen darauf hin, dass ein leichter oder normaler Halo-Effekt die Blastozystenentwicklung begünstigt und dass ein fehlender Halo diese Wahrscheinlichkeit mindert (n.s.). Die Aussage von Ebner *et al.* (2003) konnte mit dieser Studie somit zumindest im Ansatz bestätigt werden.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei der Analyse des Zusammenhangs zwischen der Ausprägung des Halo und der mittleren Blastomerenanzahl der Embryonen am Tag 2. Mit durchschnittlich 3,38 versus 3,16 Blastomeren am Tag 2 entwickelten sich die Zygoten mit nur leichtem oder normalem Halo signifikant schneller als diejenigen mit einem extrem ausgebildetem oder gar keinem Halo ($p < 0,05$). Dieser Unterschied in der weiteren

Entwicklung der Embryonen war auch an den Tagen 4 und 5 zu beobachten. Der Halo-Effekt korrelierte mit dem Reifegrad der Embryonen. Zygoten mit starkem oder keinem Halo entwickelten sich schlechter als Zygoten mit einem leichten/normalem Halo ($p < 0,01$). Der Einfluss des Halo-Effekts spiegelte sich in den vorliegenden Daten nicht in der Blastozystenrate sondern im Reifegrad der Embryonen an den Tagen 2 und 4 und wider.

Eine Studie von Salumets *et al.* (2001) kam zu ähnlichen Ergebnissen. Sie untersuchten die Zygoten bezüglich des Ausmaßes der nukleolären Polarisierung innerhalb der Vorkerne und des Halo-Effektes. Auch sie konnten bestätigen, dass die Embryonen mit einem normalen Halo-Effekt sich signifikant besser entwickeln (60,9 % versus 52,2 %). Zeigten die Zygoten eine diffuse Verteilung der Nukleolen innerhalb der Vorkerne, waren die Teilungsraten signifikant langsamer (38,9 % versus 54 %).

Bei der Analyse unserer Daten zeigte sich kein offensichtlicher Zusammenhang in Bezug auf die Größe und Anordnung der Vorkerne, der Anzahl und Reihung der Nukleolen sowie der Granulierung des Ooplasmas. Andere Studien (Wittmer *et al.*, 2000, Tesarik und Greko, 1999) rücken die Bedeutung der Kriterien „Anzahl und Anordnung der Nukleolen“ in den Vordergrund ihres Zygoten-Scorings. Es stellt sich hierbei jedoch die Frage, ob diese zwei Parameter die Qualität und das Potential eines Präimplantationsembryos vollständig widerspiegeln können.

4.3.3. Diskussion der Blastozystenentwicklung

In der vorliegenden Studie fand die Auswahl der zu transferierenden Embryonen nicht bereits im Vorkern-Stadium - wie es im deutschen Embryonenschutzgesetz vorgeschrieben ist – statt, sondern der Zeitpunkt des Transfers konnte ganz individuell nach australischen Bedingungen zwischen dem Tag 2 und Tag 6 der Kultur durch den Embryologen festgelegt werden. Die Anzahl der in Kultur befindlichen Embryonen beeinflusste hierbei maßgeblich den Zeitpunkt (Tag) des Embryotransfers. Während der verlängerten Kultur bis zur Blastozyste wurden die Wachstumsgeschwindigkeit und die Morphologie der Embryonen genau beobachtet. Zeigte ein Embryo Anzeichen für eine Arretierung seines Wachstums, so schied dieser Embryo für den Transfer aus. Die Embryonen jedoch, die sich schnell entwickelten, keine übermäßige Fragmentierung zeigten und bis zum Tag 5 der Kultur ein kompaktiertes Stadium oder sogar ein Blastozysten-Stadium erreichten, wurden zum Transfer ausgewählt. Am Tag 5 der Kultur erreichten 44 % der Embryonen das Blastozysten-Stadium. 20 % davon entwickelten sich zur frühen und 2 % waren bereits geschlüpfte Blastozysten. Das optimale Stadium der voll

expandierten Blastozyste erreichten immerhin 22 % der Embryonen. Die Blastozystenrate unserer Studie (44 %) bestätigt die Ergebnissen anderer Studien (Gardner *et al.*, 1998). Die Wachstumsgeschwindigkeit der Embryonen spiegelte sich in unserer Studie anhand der Entwicklung des Reifegrades über die Tage 2 bis 5 wider. 60 % der Embryonen waren am Tag 4 sehr gut entwickelt, am Tag 5 waren es noch 40 %. Der Verlauf des Reifegrades bestätigt damit die hohe Blastozystenrate dieser Analyse. In über der Hälfte der Fälle fand der Transfer der Embryonen am 5.Tag der Kultur statt.

4.3.4. Diskussion der Ergebnisse IVF versus ICSI

Die Anzahl der ICSI-Zyklen und der IVF-Zyklen war in unserer Studie ausgeglichen. Die Fertilisationsrate war jedoch bei der ICSI mit 69,7 % versus 53,2 % bei IVF signifikant höher ($p < 0,01$). Dies begründet sich in der unterschiedlichen Technik der Fertilisierung. Bei einer ICSI wird ein motiles Spermium in die Eizelle injiziert, im Falle einer IVF-Insemination muss eines aus 40 000 motilen Spermien die Zellwand der Oocyte passieren. In der Anzahl der klinischen Schwangerschaften in unserer Studie scheint die ICSI der IVF ebenfalls überlegen (12 versus 10, n.s.).

Die einzelnen Bewertungskriterien des Vorkern-Scorings unterschieden sich nicht signifikant in den Gruppen ICSI und IVF. Der Wert des PN-Scores jedoch war bei den ICSI-Zygoten signifikant besser als bei den IVF-Zygoten (16 versus 17, $p < 0,05$). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Beurteilung der Embryonen während der Kultur. Es konnten beim Reifegrad der Embryonen am Tag 3, 4 und 5 keine deutlichen Unterschiede zwischen der ICSI- und der IVF-Gruppe gefunden werden. Die mittlere Anzahl an kompaktierten Embryonen an Tag 4 und die Anzahl der Blastozysten an Tag 5 jedoch waren in der ICSI-Gruppe signifikant höher als in der IVF-Gruppe (3,3 versus 2,0, $p = 0,038$; 60,3 % versus 39,7 %, $p < 0,01$). Unsere Ergebnisse konnten keine eindeutigen Vorteile der ICSI-Methode gegenüber der IVF-Methode zeigen. Die Implantationsraten unterschieden sich nicht signifikant und die geringere Anzahl der klinischen Schwangerschaften ist wahrscheinlich eher auf das höhere Alter der Frau und deren eingeschränkter ovarieller Reserve zurückzuführen.

4.3.5. Ergebnisse des Zytokinprofils im Kulturmedium

4.3.5.1. TNF-alpha-Konzentrationen

TNF-alpha wird von vielen Geweben des Reproduktionstraktes während einer Schwangerschaft exprimiert und synthetisiert. Das Protein TNF-alpha, seine mRNA und seine Rezeptoren wurden sowohl im Ovar (Roby *et al.*, 1990), im Endometrium (Hunt *et al.*, 1992), in der Plazenta (Trophoblast (Yelavarthi *et al.*, 1991) und Dezidua (Casey *et al.*, 1989), als auch im Fetus selbst (Zolti *et al.*, 1991) nachgewiesen. Man findet das Zytokin in der Amnionflüssigkeit, in der die Konzentration zum Termin der Geburt ansteigt (Opsjon *et al.*, 1993). Es ist also wahrscheinlich, dass TNF-alpha eine wichtige Rolle im Verlauf einer normalen Schwangerschaft hat. So scheint es eine Rolle in Differenzierungs- und Wachstumsprozessen zu spielen. Viele Autoren schreiben dem Zytokin jedoch auch negative Eigenschaften im Bezug auf Schwangerschaft und Embryonenentwicklung zu. Eine Studie von Silver *et al.* (1994) berichtete nach einer Gabe von Lipopolysacchariden beziehungsweise einem hohen Bolus von TNF-alpha über massive Hämorrhagien und ein Abortgeschehen. Nach Gabe eines kleineren Bolus TNF-alpha wurde in einer ähnlichen Studie von Carbo *et al.* (1995) über einen Abfall des Transports von Aminosäuren durch Abnahme der plazentaren Durchblutung berichtet. Als mögliche Folge diskutierten die Autoren eine Einschränkung des embryonalen Wachstums. Viele Studien wiesen auf einen Zusammenhang zwischen der TNF-alpha Konzentration in der Amnionflüssigkeit und einer Komplikation der Schwangerschaft, wie zum Beispiel Infektionen oder Frühgeburt hin (Romero *et al.*, 1989; Hillier *et al.*, 1993).

In der hier durchgeführten Studie wurde die Konzentration von TNF-alpha im Kulturmedium der Embryonen gemessen. Damit sollte untersucht werden, ob der Embryo selbst während seiner Entwicklung in-vitro dieses Zytokin exprimiert und sezerniert. TNF-alpha konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Die mittlere Konzentration an TNF-alpha wurde am Tag 3 höher gemessen als am Tag 5 (0,54 pg/ml versus 0,37 pg/ml). Sie war bei schwangeren Frauen sowohl am Tag 3 als auch am Tag 5 signifikant niedriger als bei Nicht-Schwangeren (0,43 versus 0,59 pg/ml und 0,26 versus 0,42 pg/ml; $p < 0,01$). Nach unseren Ergebnissen scheint die Konzentration von TNF-alpha mit dem Schwangerschaftsausgang nach IVF bzw. ICSI assoziiert zu sein. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in einer Studie von Zollner *et al.* (2004) vorgestellt. Diese Studie untersuchte die Follikelflüssigkeit des dominanten Follikels bei 197 Patientinnen, die ein IVF/ICSI-Programm durchliefen. Die Konzentration von TNF-alpha war bei schwangeren Frauen (0,39 pg/ml) signifikant niedriger als bei Nicht-Schwangeren (0,71 pg/ml, $p < 0,05$). Diese zwei Studien bekräftigen beide die

Hypothese, dass sich hohe Konzentrationen von TNF-alpha wohlmöglich negativ auf die Implantation und den Schwangerschaftserfolg auswirken könnten. Desweiteren kann TNF-alpha in Follikelzellen, Makrophagen und Leukozyten des Ovars nachgewiesen werden und es soll Einfluss auf die frühe Follikelreifung haben indem es Signale zur Zellmigration und Zelldifferenzierung gibt (Terranova *et al.*, 1993). TNF-alpha scheint die Entwicklung einer Eizelle also nicht nur im negativen Sinne zu beeinflussen.

Die Rate des Single Embryo Transfers (SET) war in unserem Patientenkollektiv mit 66% relativ hoch. Immer mehr Reproduktionszentren streben ebenfalls einen SET an. Bei jungen Frauen unter 35 Jahren ist dies eine Maßnahme, um das Risiko einer Mehrlingsschwangerschaft zu vermeiden. Gründe für den Transfer mehrerer Embryonen sind Implantationsversagen nach vorausgegangenem Transfer und eine starke Einschränkung der weiblichen Fertilität. Vor einem SET wurde der morphologisch beste Embryo wenn möglich im Stadium der Blastozyste ausgewählt. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie analysiert, ob sich die TNF-alpha-Konzentrationen bei einem SET von denen eines DET unterscheiden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen beider Gruppen nachgewiesen werden. Es wurden jedoch sowohl bei SET als auch bei DET erneut signifikant niedrigere TNF-alpha-Konzentrationen der Gruppe der Schwangeren gemessen (SET: 0,43 versus 0,6 pg/ml und 0,26 versus 0,44 pg/ml, $p < 0,01$; DET: 0,44 versus 0,58 pg/ml und 0,24 versus 0,40 pg/ml, $p < 0,01$).

Bei der Analyse einer möglichen Korrelation zwischen Embryonenmorphologie und der TNF-alpha-Konzentration zeigte sich, dass TNF-alpha weder direkt dem Reifegrad der Embryonen noch mit der Anzahl der Blastozysten, die sich bis zum Tag 5 der Kultur entwickelt hatten, korrelierte. Da sich bei schwangeren Frauen jedoch signifikant mehr Blastozysten bis zum Tag 5 entwickelt hatten (3,0 versus 1,7; $p = 0,04$) und die TNF-alpha-Konzentration am Tag 5 bei diesen Patientinnen deutlich niedriger war, könnte man vermuten, dass in dem Kulturmedium, in dem sich mehr Blastozysten entwickelten, es auch zu einer geringeren TNF-alpha-Expression kam. Zum Zeitpunkt des Blastozystenstadiums ist die Expression von TNF-alpha durch den Embryo eventuell geringer. Dies lässt sich jedoch nicht definitiv beweisen. Es ist davon auszugehen, dass die im Kulturmedium gemessenen Konzentrationen vom Embryo selbst stammten, da es durch die in-vitro-Kultur zu keinerlei äußeren Einflüssen während der Bebrütung kommen konnte. Die sequentiellen Medien enthielten keine Zytokine, die wiederum eine Produktion von TNF-alpha durch den Embryo hätten induzieren können.

Ein direkter Zusammenhang ergab sich zwischen dem mittleren PN-Score und der TNF-alpha-Konzentration am Tag 5. Wie bereits im obigen Abschnitt erläutert besteht ein Zusammenhang zwischen dem PN-Score eines Embryos und der Aussicht auf eine erfolgreiche Schwangerschaft nach ET.

Der mittlere PN-Score pro Patientin ergab bei den schwangeren Frauen deutlich niedrigere Werte als bei den Frauen, die nach ET nicht konzipierten. Der PN-Score lässt demnach auf eine positive Entwicklung des Embryos und einem hohen Potential für eine erfolgreiche Implantation schließen. Der PN-Score korrelierte mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ positiv mit der TNF-alpha-Konzentration am Tag 5. Je schlechter die Zygoten einer Patientin im Vorkernstadium eingestuft wurden, desto höher war später die TNF-alpha-Konzentration im Kulturmedium. Die Qualität der Embryonen im frühen Stadium als Zygote scheint also mit der TNF-alpha-Expression im Kulturmedium assoziiert zu sein. Schlechter entwickelte Zygoten scheinen in der weiteren Kultur mehr TNF-alpha zu produzieren, was sich wiederum negativ auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate auszuwirken scheint.

4.3.5.2. LIF-Konzentrationen

Zum Zeitpunkt der Implantation kommt die Blastozyste erstmals in Kontakt mit dem maternalen Endometrium (Dezidua). Der Präimplantationsembryo hat sich bis zu diesem Zeitpunkt weitgehend selbständig entwickelt. Seine weitere embryonale Entwicklung ist nun abhängig vom umgebenden mütterlichen Milieu. Eine erfolgreiche Implantation scheint nach dem heutigen Wissenstand von embryonalen und maternalen Faktoren bestimmt zu sein (Lass *et al.*, 2001).

Ziel dieser Studie war der Nachweis des LIF-Proteins im Kulturmedium. Das Zytokin konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Bei der In-vitro-Kultur wurde weder LIF hinzugefügt noch waren die Embryonen während der Kultivierung bis zum Zeitpunkt des Embryotransfers maternalen Faktoren wie zum Beispiel der LIF-Präsenz in der Follikelflüssigkeit ausgesetzt. Der fehlende LIF-Effekt von außen konnte uns deshalb zu dem Ergebnis führen, dass nachgewiesenes LIF im Kulturmedium allein durch den Embryo selbst exprimiert werden konnte. Die mittlere Konzentration von LIF im Kulturmedium stieg von 31,5 pg/ml am 3.Tag der Kultur auf 35,5 pg/ml am 5.Tag an. Physiologisch befindet sich der Embryo zum Zeitpunkt der Implantation im Stadium der voll expandierten Blastozyste. Am Tag 5 der Kultur erreichten 44 % der kultivierten Embryonen unserer Studie ein Blastozysten-Stadium. Der beobachtete Anstieg der LIF-Konzentration vom 3. bis zum 5. Tag könnte einen

möglichen Anstieg der LIF-Expression durch den Embryo zum Zeitpunkt der Implantation widerspiegeln.

Eine Studie von Chen *et al.* (1999) untersuchte die Expression von LIF und seiner Rezeptoren-Transkripte (LIF-R) in Maus- und humanen Präimplantationsembryonen. 30 von 34 humanen Embryonen exprimierten das Zytokin LIF. In 31 von 34 Embryonen konnte LIF-R mRNA nachgewiesen werden. Die Expression beider Transkripte zeigten einen Abfall bei Embryonen, die sich im 4-Zeller-Stadium befanden oder einen Wachstumsstillstand für 24-48h hatten. Ihre Ergebnisse demonstrieren, dass LIF und LIF-mRNA während der Präimplantationsperiode in humanen Embryonen exprimiert werden und bestätigen unsere gemessenen Konzentrationen im Kulturmedium humaner Präimplantationsembryonen. Embryonen in frühem Stadium oder mit einer Arretierung ihres Wachstums zeigten signifikant niedrigere Expression des Zytokins (Chen *et al.*, 1999).

Die Rolle von LIF bei der embryonalen Entwicklung wurde in den letzten Jahren in vielen Arbeitsgruppen untersucht und führte zu kontroversen Ergebnissen. In einer Studie von Duglison *et al.* (1996) wurden überzählige humane Embryonen, die von Paaren nach IVF zur Verfügung gestellt wurden, in LIF-angereichertem (1,000 IU/ml) Kulturmedium bebrütet. Die Blastozystenformation stieg nach Anwendung von LIF von 18 % auf 44 % ($p < 0,025$) und die Qualität der Blastozysten von 10 % auf 33 % ($p = 0,025$) an (Duglison *et al.*, 1996). Der Zusatz von LIF hatte in dieser Studie einen positiven Einfluss auf die embryonale Entwicklung. In der vorliegenden Studie bestand zwar eine Assoziation mit der Vorkern-Entwicklung aber es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der embryonalen Entwicklung und der LIF-Konzentration im Kulturmedium. Die Embryonen mit einem guten PN-Scoring ($mPN \leq 16$) hatten signifikant höhere LIF-Konzentrationen als die Embryonen mit einem schlechten Vorkern-Score ($mPN\text{-Score} \geq 17$; $p < 0,05$). Die Ergebnisse der Evaluation der Reifegrade an den Tagen 3, 4 und 5 ergaben ebenfalls keine signifikante Korrelation mit den LIF-Werten. Embryonen mit einem gut ausgebildeten Trophektoderm hatten jedoch signifikant höhere LIF-Konzentrationen im Kulturmedium als schlechter entwickelte Embryonen ($42,3 \pm 29,9$ versus $35,5 \pm 26,1$ pg/ml, $p = 0,05$).

Die Korrelation mit der Vorkernmorphologie und dem Blastozystenkriterium Qualität des Trophektoderm lassen auch in dieser Studie auf eine Assoziation zwischen LIF und der embryonalen Entwicklung schließen. Die Ergebnisse einer Studie von Jurisicova *et al.* (1995) stimmen diesbezüglich nicht mit denen von Duglison *et al.* (1996) überein. Eine höhere LIF-Konzentration im Kulturmedium muss jedoch nicht bedeuten, dass ein LIF-Zusatz zum

Kulturmedium mit einer besseren Embryo-Qualität einhergeht. So zeigten Jurisicova et al. in ihrer Studie, dass trotz exogener Hinzugabe von LIF zum Kulturmedium humaner Präimplantationsembryonen nur ein geringer Anstieg der Blastozystenformationsrate nach Zugabe einer mittleren Konzentration von LIF (7,5 ng/ml und 10 ng/ml) zu verzeichnen war. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen. Der Nutzen einer Zugabe von LIF zum Kulturmedium konnte aufgrund kontroverser Studien noch nicht bewiesen werden. Weitere Studien sind notwendig um gültige Aussagen machen zu können.

Der Vergleich der Konzentrationen in der Gruppe der Patientinnen, die nach Transfer konzipierten mit denen der Gruppe von Frauen, die nicht schwanger geworden sind, zeigte eine signifikant höher LIF-Konzentration in der Gruppe der schwangeren Frauen (56,2 versus 22,0 pg/ml an Tag 3 ($p < 0,01$) und 59,7 versus 25,9 pg/ml an Tag 5 ($p < 0,01$). Es konnte also ein positiver Zusammenhang zwischen der LIF-Konzentration und dem Schwangerschaftserfolg beobachtet werden. Dieses galt sowohl für die Frauen, die nach einem SET als auch nach einem DET schwanger geworden sind. Das Kulturmedium der Embryonen, die zu einem positiven Schwangerschaftsergebnis geführt haben, enthielt signifikant mehr LIF als das nicht schwangerer Frauen ($p < 0,01$).

Eine Arbeit von Zollner et al. (2004) setzte die mittels ELISA gemessene LIF-Konzentration in der Follikelflüssigkeit, welche im Rahmen eines IVF-Programms gewonnen worden war, mit dem Schwangerschaftserfolg in Zusammenhang. Analog zu den hier gezeigten Ergebnissen schien die LIF-Konzentration in der Follikelflüssigkeit mit dem Schwangerschaftserfolg assoziiert zu sein. Patientinnen die nach ET konzipierten hatten signifikant höhere LIF-Konzentrationen in ihrer Follikelflüssigkeit (Zollner *et al.*, 2004). Beide Studien bekräftigen demnach die wichtige Rolle von LIF im Rahmen einer erfolgreichen Implantation und Schwangerschaft.

5. Zusammenfassung:

Der Rahmen der Fortpflanzungsmedizin in Deutschland wird durch das Embryonenschutzgesetz geregelt. Dieses besagt, dass bei der In-Vitro-Fertilisation nur so viele Embryonen (maximal 3) kultiviert werden dürfen, wie auch transferiert werden sollen. Die Auswahl dieser Embryonen muss bereits im Vorkernstadium erfolgen. Ziel dieser Untersuchung war es, eine mögliche Korrelation der Vorkern- und Embryonenmorphologie mit einer später erfolgreichen Implantation und eines Schwangerschaftserfolges aufzuzeigen. Der bereits in Deutschland etablierte Pronucleus-Score sollte an dem australischen Kollektiv angewendet werden, da dort in der Regel alle Vorkernstadien fünf Tage kultiviert werden und eine bessere Aussage über den Zusammenhang der Tag 1- und der Tag-5-Morphologie gemacht werden kann als unter den Bedingungen des deutschen Embryonenschutzgesetzes. Ferner galt es, die in der Reproduktionsmedizin bedeutenden Zytokine Tumor-necrosis-Factor alpha (TNF-alpha) und Leukemia-Inhibitory-Factor (LIF) und deren Konzentration im Kulturmedium im Hinblick auf einen späteren Schwangerschaftserfolg zu beurteilen, da diese eine bedeutende Rolle bei der Embryonalentwicklung und Implantation zu spielen scheinen.

Gegenstand der vorliegenden Studie waren 99 kinderlose Paare, die an dem IVF/ICSI-Programm im Sydney IVF-Zentrum, Australien, aufgrund unterschiedlichster Indikationen teilnahmen. Die Entwicklung der Eizellen zum Pronukleusstadium und späteren Blastozystenstadium wurde beobachtet und mittels eines detaillierten und etablierten Pronukleus-Scores (PN-Score) und Embryo-Scores bewertet. An den Tagen 3 und 5 wurden die Überstände der Kulturmedien asserviert und daraus die Konzentration von TNF-alpha und LIF bestimmt.

Das durchschnittliche Alter der Frauen lag bei $36,1 \pm 5,8$ Jahren, die Indikationen für die assistierte Befruchtung waren vielfältig, wobei die andrologische Subfertilität mit 59 % deutlich überwog. In die Analyse fanden insgesamt 856 Eizellen Eingang, sich im Rahmen der Kultivierung entwickelnde Embryonen wurden hinsichtlich ihres Reifegrades an den Tagen 2-5 beurteilt. Die erste Beurteilung resultierte für jede Zygote in einem individuellen Punktwert, dem PN-Score. Der mittlere PN-Score lag bei $16,5 \pm 3,7$ Punkten. Die mittlere Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer betrug 24,7 %, wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Methodik (IVF versus ICSI) konnten hier nicht aufgezeigt werden.

Die Beurteilung der Vorkernstadien erfolgte nach Zollner *et al.* (2002). Es konnte gezeigt werden, dass bei Beurteilung des Pronucleus-Scores sowohl das Ausmaß der Vakuolisierung wie auch der sogenannte Halo-Effekt eine Auswirkung auf die spätere embryonale Entwicklung und damit auch den Implantations- und Schwangerschaftserfolg haben. Eine ausgeprägtere Vakuolisierung (als Hinweis auf ablaufende degenerative Prozesse) führte zu einer signifikant erniedrigten Blastozystenrate (0 % bei starker Vakuolisierung, 44,3 % bei keiner oder leichter Vakuolisierung, $p < 0,01$), die Ausprägung des Halo-Effektes korrelierte direkt mit einer günstigeren embryonalen Entwicklung, bei der Mehrzahl der späteren Blastozysten (63 %) wurde ein leichter bis normaler Halo-Effekt beobachtet. Es fand sich ferner, dass in seiner Gesamtheit eine kleinere Gesamtpunktzahl des PN-Score mit einer günstigeren Entwicklung einer Eizelle korrelierte. Der mittlere PN-Score war bei Patientinnen mit positivem Schwangerschaftsergebnis signifikant kleiner als der von nicht-schwangeren Patientinnen (mPN-Score schwanger 15,8 versus nicht-schwanger 17,2, $p < 0,05$).

Die Beobachtung der frühen embryonalen Entwicklungsstadien bis zur Blastozyste, der Wachstumsgeschwindigkeit, morphologischen Veränderungen sowie der Reifung der Embryonen finden Einfluss in den Embryo-Score. Embryonen, welche mit einem schlechten Reifegrad (Grad 3) transferiert wurden, zeigten keinen Schwangerschaftserfolg. Ebenfalls zeigte sich, dass die Beurteilung des Reifegrades der Embryonen in der verlängerten Kultur direkten Einfluss auf einen Schwangerschaftserfolg haben. Embryonen, welche sich an Tag 5 der Kultur bereits zur Blastozyste entwickelt haben, haben das höchste Potenzial für einen Schwangerschaftserfolg. Bei Frauen, die konzipierten, wurden signifikant mehr Blastozysten übertragen als bei Nichtschwangeren ($3,0 \pm 3,1$ versus $1,7 \pm 1,8$, $p < 0,05$).

Erhöhte TNF-alpha-Konzentrationen im Kulturmedium führten zu einer signifikant niedrigeren Schwangerschaftserfolgsrate ($0,42 \pm 0,07$ pg/ml bei nicht-schwangeren versus $0,26 \pm 0,05$ pg/ml bei schwangeren Patientinnen, $p < 0,01$). Hierbei war es unerheblich, ob es sich um einen single- oder double-Embryo-Transfer handelt. Aufgezeigt werden konnte zudem, dass eine direkte Korrelation von PN-Score und TNF-alpha-Konzentration besteht. Je niedriger der PN-Score, desto niedriger die TNF-alpha-Konzentration im Kulturmedium, desto aussichtsreicher die Implantation und folgende Schwangerschaft. Es zeigte sich hierbei für den mPN-Score ein cut-off Wert von 16. Bei einem PN-Score < 16 war die mittlere TNF-

alpha-Konzentration an Tag 5 mit $0,34 (\pm 0,08)$ pg/ml signifikant geringer als bei einem Score über 17 ($0,42 (\pm 1,1)$ pg/ml ($p < 0,05$)).

Bezüglich des LIF konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Während der Kulturzeit kommt es zu einem Anstieg der LIF-Konzentration im Kulturmedium (31,5 pg/ml an Tag 3, 35,5 pg/ml an Tag 5). Der höhere Anstieg korrelierte mit einer signifikant höheren Schwangerschaftsrate. Patienten, die konzipierten, zeigten im Kulturmedium an Tag 5 eine mittlere LIF-Konzentration von 59,7 pg/ml, nicht-schwangere Frauen eine von nur 25,9 pg/ml ($p < 0,01$). Auch hier fanden wir keine Unterschiede beim single- versus double-Embryo-Transfer.

Zusammenfassend bedarf es für eine erfolgreiche Implantation eines komplexen Zusammenspiels zwischen der sich entwickelnden Blastozyste und dem Endometrium. Ob es zu einer erfolgreichen Implantation kommt, hängt von zahlreichen Faktoren ab. Die untersuchten Scores wie auch Zytokinprofile können hierbei nur Bausteine darstellen. Anhand etablierter Scoring-Systeme versucht man, prädiktiv einen möglichen Implantationserfolg zu beurteilen. Anhand unserer Studie konnte gezeigt werden, dass gemäß Scoring-Beurteilung gut entwickelte Blastozysten eine erhöhte Implantationsrate aufweisen. Die Zytokinproduktion der Embryonen ist mit der Schwangerschaftsrate assoziiert. Hierbei scheint TNF-alpha in erhöhten Konzentrationen eher auf einen nicht-favorablen Verlauf hinzudeuten, wohingegen höhere Konzentrationen an LIF klar mit erhöhten Schwangerschaftsraten korrelierten. Ziel weiterer Untersuchungen sollte es nunmehr sein, ob gegebenenfalls exogen den Kulturmedien zugeführte Zytokine zu einer verbesserten Entwicklung und somit einem höheren Schwangerschaftserfolg führen.

6. Referenzen

- Aggarwal BB, Schwarz L, Hogan ME, Rando RF. Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-receptor dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Res.* 1996, Nov 15;56(22):5156-64.
- Argiles JM, Carbo N, Lopez-Soriano FJ. TNF and Pregnancy: the Paradigm of a Complex Interaction. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1997, Vol. 8 No. 3, 181-188.
- Australian Government, National Health and Medical Research Council. Ethical guidelines on the use of assisted reproductive technology in clinical practice and research. www.ag.gov.au/cca. June 2007.
- Barmat LI, Nasti K, Yang X, Spandorfer S, Kowalik A, El-Roeiy A. Are cytokines and growth factors responsible for the detrimental effects of hydrosalpingeal fluid on pregnancy rates after IVF-embryo transfer? *Fertil Steril* 1999. 72 (6): 1110-2.
- Bing et Oulette. Fertilisation in vitro. *Methods Mol Biology* 2009, 550, 251-66.
- Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Administration of tumor necrosis factor- α results in a decreased placental transfer of amino acids in the rat. *Endocrinology* 1995; 136: 3579-3584.
- Casey ML, Cox SM, Beutler B, Milewicz L MacDonald PC. Cachectin/tumor necrosis factor- α formation in human deciduas: potential role of cytokines in infection induced preterm labor. *J Clin Invest* 1989; 83: 430-436.
- Chen DB, Hilsenrath R, Yang ZM, Le SP, Kim SR, Chuong CJ et al. Leukemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro. *Hum Reprod* 1995; 10: 911-918.

- Chen G, Goeddel D. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 2002; 296: 1634-1635
- Chen HF, Shew JY, Ho HN, Hsu WL, Yang YS. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999; 72: 713-719.
- Cheng TC, Huang CC, Chen CI, Liu CH, Hsieh YS, Huang CY, Lee MS, Liu JY. Leukemia inhibitory factor antisense oligonucleotide inhibits the development of murine embryos at preimplantation stages. *Biol Reprod* 2004; 70: 1270-1276.
- Conquet and Brulet. Developmental expression of myeloid leukaemia inhibitory factor gene in preimplantation blastocysts and in extraembryonic tissue of mouse embryos. *Mol Cell Biol.* 1990; 10 (7): 3801-5
- Coskun S, Uzumcu M, Jaroudi K, Hollanders JM, Parhar RS, Al-Sedairy ST. Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth. *Am J Reprod Immunol.* 1998; 40 (1): 13-8.
- Deutsches IVF-Register, Bundesgeschäftsstelle, Ärztekammer Schleswig-Holstein, Bismarckallee 8-12, 23795 Bad Segeberg
- Donaghay M, Lessey BA: Uterine receptivity: alterations associated with benign gynaecological disease. *Semin Reprod Med* 2007; 25(6): 461-75.
- Dunlison GF, Barlow DH, Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod* 1996; 11: 191-196.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmatic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod* 2003; 11: 2406-2412.

ESchG (1990) Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz- ESchG). Bundesgesetzblatt Teil I, 2746-2748.

Ethical Guidelines for the clinical Practice of ART, Australian Government, National Health and Medical Research Council 2007

Eijk van W, Mandelbaum J, Salat-Baroux J, Belaisch-Allart J, Plachot M, Junca AM, Mummery CL. Expression of leukemia inhibitory factor receptor subunits LIFR beta and gp130 in human oocytes and preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*. 1996; 2 (5): 355-60.

Feng, Q., Liu, K., Byrne, S., Liu, G., Wang, X., Li, Z., Ockleford, C.D. Expression of urokinase, plasminogen activator inhibitors and urokinase receptor in pregnant rhesus monkey uterus during early placentation. *Placenta* 2000; 21: 184-193.

Fertility and Sterility 2004 Vol. 81, No.5 Suppl. 4, May 2004. IFFS Surveillance 04.

Floridon, C., Nielsen, O., Hlund, B., Sunde, L., Westergaard, J.G., Thomsen, S.G., Teisner, B. Localization and significance of urokinase plasminogen activator and its receptor in placental tissue from intrauterine, ectopic and molar pregnancies. *Placenta* 1999; 20: 711-721.

Galaan, A., Herrero, R., Mercader, A., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A., O'Conner, J.E., Simón, C. Coordinated regulation of endometrial epithelial apoptosis induced by the human blastocyst as a crucial mechanism during human implantation. *Fertil Steril* 1999; 72 (Suppl. 1), S27.

Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: A feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod* 1997; 3: 367-382

Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*. 1987 Dec 20;6(13):3995-4002

- Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosley J, Zieger SF, Cosman D. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992; 255: 1434-1437.
- Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 137-143.
- Hemmings R, Lachapelle MH, Falcone T, Miron P, Ward L, Guyda H. Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embryos. *Fertil Steril* 1994; 62 (5): 1018-21.
- Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Echenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 941-948.
- Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells. *Anal Biochem* 1988; 173: 359-367.
- Hilton DJ. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sc* 1992; 17: 72-76.
- Huang H.Y., Wen, Y., Irwin, J.C., Krüssel, J.S., Soong, Y.K., Polan, M.L. Cytokine-mediated regulation of 92-Kilodalton Type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1721-1729.
- Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Tabibtadeh S. Tumor necrosis factor- α mRNA and protein in human endometrium. *Hum Biol Reprod* 1992; 47: 141-147.
- Irwin JC, de las Fuentes L, Giudice LC. Growth factors and decidualization in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep;94(3):946-53.

Jones, Howard V. and Cohen, Jean. Iffs surveillance 2004, *Fertil Steril* 2004, Vol. 81, 5, suppl. 4.

Juriscicova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertil Steril* 1995; 64: 999-1002.

Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008;90(4):1069-76.

Kawakami M, Cerami A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Expl Med* 1981; 154: 631-637.

Keltz MD, Attar E, Buradagunta S, Olive DL, Kliman HJ, Arici A. Modulation of LIF gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 Dec; 175(6):1611-9.

Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Moji T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod*. 50 (4): 882-7.

Krüssel, Jan-Steffen. Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Rahmen der embryonalen Implantation, 2001

Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dumphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997; 12: 569-574.

Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: Which is the best? *Best Prac Res Clin Obstetrics Gynaecology* 2007 Feb 21, 83-100.

- Lass A, M.D., Weishui Weiser, Ph.D., Alain Munafo, Ph.D., and Ernest Loumaxe, M.D., Ph.D. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 2001; 76, 6: 1091-1096.
- Larry I. Barmat, Kim Nasti, Xu Yang, Steven Spandorfer, Ania Kowalik, Albert El-Roeiy. Are cytokines and growth factors responsible for the detrimental effects of hydrosalpingeal fluid on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer? *Fertil Steril* 1999; 72, 6: 1110-1112.
- Lessey , B.A., Castelbaum, A.J., Sawin, S. W., Sun, J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995; 63: 535-542
- Lessey BA. Adhesion molecules and Implantation. *J Reprod Immunol* 2002, May-June: 55(1-2): 101-12.
- Loy RA, Loukides JA, Polan ML. Ovarian steroids modulate human monocyte tumor necrosis factor alpha messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *Fertil Steril*. 1992 Oct; 58(4):733-9.
- Ludwig M, Schöpfer B, Al-Hasani S, Diedrich K. Clinical use of pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* 2000; 15: 325-329.
- Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T. IL-6 induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 1993; 260: 1808-1810.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Fiorentino A, D'Errico A. Human embryo co-culture: results of a randomized prospective study. *Int J Fertil Menopausal Stud*. 1995;40(5):254-9.
- Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; 230: 630-632.

Opsion SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswanf G, Sundan A, Waage A, Austgule R. Tumor necrosis factor, interleuin-1 and interleukin-6 in normal human pregnancy.

Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 397- 404.

Paiva P, Menkhorst E, Salamonsen L, Dimitriadis E. Leukemia inhibitory factor and IL-11: critical regulators in the establishment of pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009, 20 (4): 319-28.

Payne D, Flaherty S, Barry M, Matthews C. Preliminary observation on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997; 12: 532-541.

Piccinni MP, Scaletti C, Mavilia C, Lazzeri E, Romagnani P, Natali I, Pellegrini S, Livi C, Romagnani S, Maggi E. Production of IL-4 and leucemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *Eur J Immunol* 2001; 31 (8): 2431-2437.

Reid JG, Simpson NAB, Walker RG, Economidou O, Shillito J, Gooi H-C, Duffy SR, Walker JJ. The carriage of pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45: 35-40.

Roby KF, Weed J, Lyles R, Terranova PF. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1096-1102.

Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiltinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes assessment of human embryo quality. *Hum Reproduction* 2001 Oct; 16(10):2177-81.

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

- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of pronuclear human embryo is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394-2403.
- Senturk LM, Arici A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol.* 39 (2): 144-51.
- Silver RM, Lohner WS, Daynes RA, Mitchell MD, Branch DW. Lipopolysaccharide-induced fetal death: the role of tumor-necrosis-factor- α . *Biol Reprod* 1994; 50: 1108-1112.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336: 688-690
- Thomas Steck. Praxis der Fortpflanzungsmedizin. 2001, Schattauer Verlag, Stuttgart, Germany
- Steptoe P.C. and Edwards R.G. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 8079- 8092
- Straessen, C., Camus, M., Khan, Il, Smitz, J., Van Waesberghe, L., Wisanto, A., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C. An 18- month survey of infertility treatment by *in vitro* fertilization, gamete and zygote intrafallopian transfer, and replacement of frozen-thawed embryos. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer* 1989; 6: 22-29
- Straessen, C., Nagy, Z.P., Liu, J., Janssenwillen, Cl, Camus, M., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C. One year`s experience with elective transfer of two good quality embryos in the human in vitro fertilization and intracytoplasmatic sperm injection programmes. *Hum Reprod* 1995; 10: 3305-3312
- Tabibzadeh S. Cytokines and the hypothalamic-pituitary-ovarian-endometrial axis. *Hum Reprod Update* 1994; 61: 1-17.

- Terranova P.F., Sancho-Tello M. and Hunter V.J. Tumor necrosis factor- α and ovarian function. *In the Ovary* ed. E.Y. Adashi and P.C.K. Leung. Raven Press Ltd, New York, 1993, 395-411.
- Tesarik J, Kopecny V, Plachot M, Mandelbaum J. Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos development in vitro. *J Reprod Fertil* 1989; 78: 463
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-1323.
- Tesarik J, Junka AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a single non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000; 15: 1396-1399.
- Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organisation during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod 1995 Update* 1: 429-461.
- Vogiagis D, Marsh MM, Frey RC, Salamonsen LA. Leukemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol* 1996; 148: 95-102.
- World Health Organization (1992) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Witteimer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000; 15: 2591-2597.

- Wright G, Wilkers S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, Toledo A, Cohen J. Observation on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications of cryoconservations. *Hum Reprod* 1990; 5: 109-115.
- Yelavarthi KK, Chen HL, Yang Y, Fishback JL, Cowley BD, Hunt JS. Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein in rat uterine and placental cells. *J Immunol* 1991; 146: 3840-3848
- Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol.* 2006 Aug;28(1):31-9.
- Zollner U., Zollner K.-P., Hartl G., Dietl J., Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002; 17, 5: 1327-1333.
- Zollner U., Zollner K.-P., Hofmann T., Dietl J. TNF-alpha und LIF concentration in follicular fluid. Association with fertilization results, embryo and blastocyst morphology and IVF/ICSI outcome. *ESHRE 2004*, Berlin
- Zollner U, Zollner KP, Steck T, Dietl J. Pronuclear scoring. Time for international standardization. *J Reprod Med.* 2003 May;48(5):365-9.
- Zollner K.-P. Erste Erfahrungen mit der Blastozystenkultur nach IVF oder ICSI unter den Bedingungen des Deutschen Embryonenschutzgesetzes
- Zollner KP, Zollner U, Schneider M, Dietl J, Steck T. Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med Sci Monit* 2004, Jan 10, CR 1-7.
- Zolti M, Ben-Rafael T, Meiom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte RN. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril* 1991; 56: 265-272.

7. Abkürzungen

AK	Antikörper
bl	Blastozyste
cbl	kavitierende Blastozyste (cavitating blastocyst)
cm	kompaktiertes Morula-Stadium (compacted morula)
COC	cumulus oocyte complex
deg	Degeneration (degeneration)
DET	Double Embryo Transfer
DNA/DNS	deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
ebl	frühe Blastozyste (early blastocyst)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET	Embryotransfer
frag	Fragmentierung
FSH	Follikel-stimulierendes-Hormon
GnRH-Analogon	Gonadotropin-releasing-Hormon
HCG	humanes Choriongonadotropin
icm	innere Zellmasse (inner cell mass)
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
INT-Violett	Iodonitrotetrazolium Violett
IU	International unit
IVF	In vitro Fertilisation
LH	Luteinissierendes Hormon
LIF	Leukemia inhibitory factor
min	Minuten
mKonz	mittlere Konzentration
mPN-Score	mittlerer Pronukleus-Score
NADH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	nicotinamid adenin dinucleotid phosphat
NPB	nuclear polar bodies
pcm	teilweise kompaktiertes Morula-Stadium (partially compacted morula)
PN-Stadium	Pronukleus-Stadium

PN-Score	Pronukleus-Score
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rh- TNF-alpha	rekombinanter humaner Tumor Nekrose Faktor alpha
SET	Single Embryo Transfer
TE	Trophektoderm
te cell nr	Trophektoderm- Zellzahl (trophoectoderm cell number)
TNF-alpha	Tumor necrosis factor- alpha
vac	Vakuolisierung
WHO	World health organisation

Danksagung

Besonderer Dank gebührt den folgenden Personen, die allesamt zum erfolgreichen Abschluss meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Frau Privat-Dozentin Dr. med. U. Zollner für die perfekte und unermüdliche Betreuung, insbesondere jedoch für die Anspornung insbesondere in der Endphase meiner Fertigstellung.

Herrn K.-P. Zollner, ehemals leitender Medizinisch Technischer Assistent des IVF-Labors an der Frauenklinik und Poliklinik der Universität Würzburg, für die sehr kompetente und hilfsbereite Betreuung.

Herrn Professor Dr. med. J. Dietl, Direktor der Frauenklinik und Poliklinik der Universität Würzburg, die hervorragende Ausstattung der Labore sowie die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

Herrn Professor Dr. med. T. Grimm für die Bereitschaft und Zeit, meine Promotionsarbeit als Koreferent kritisch zu beurteilen.

Meinen Eltern und meinem Mann Stefan für die stete und liebevolle Unterstützung während des Studiums wie auch meiner Promotionsarbeit.

Lebenslauf

Sonja Julia Bischofs geb. Schwärzel

Klosterstraße 29
48143 Münster

Geburtsdatum: 9. Januar 1980
Geburtsort: Mannheim

Ausbildung

- 1990- 1999 **Käthe- Kollwitz- Gymnasium**, Neustadt/Weinstrasse
- 1999 **Abitur**
- 1999-2002 **Studium der Humanmedizin, Universität Rostock**
- 2001 **Ärztliche Vorprüfung**
- 2002 **Erstes Staatsexamen**
- 2002-2006 **Studium der Humanmedizin, Julius- Maximilians- Universität
Würzburg**
- 2004 **Zweites Staatsexamen**
- 2006 **Drittes Staatsexamen**
- seit 01.10.2006 **Assistenzärztin** Kath. St. Josef-Krankenhaus, Kliniken Essen-Süd,
Chefarzt Dr. med. H. Rotthaus, Abteilung für Gynäkologie und
Geburtshilfe
- seit 01.04.2008 Assistenzärztin Evangelisches Bethesda Johanniter Krankenhaus,
Duisburg, Chefarzt Prof. Dr. med. W. Neuhaus, Abteilung für
Gynäkologie und Geburtshilfe, Chefarztin Dr. med. G. Schrappe,
Abteilung für Senologie, Zertifiziertes Brustzentrum
- 30.08.09-15.09.10 Elternzeit
- seit 15.09.2010 Assistenzärztin Evangelisches Krankenhaus Hamm, Klinik für
Gynäkologie und Geburtshilfe, Chefarzte Dr. med. G. Meyer und Dr.
med. J. Bärmig

Bisherige Projekte im Rahmen der Promotion

- 2005 Bayrischer Kongress, Salzburg, Vortrag: "Zusammenhang zwischen der
Konzentration von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) im Kulturmedium
humaner Embryonen und der IVF-Schwangerschaftsrate"

2005

21th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Copenhagen
Posterpräsentation: "LIF concentration in embryo culture media during IVF is predictive for embryo implantation in single embryo transfer as well as in double embryo transfer "

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink. The signature reads "Sonja Bartsch" in a cursive script.