

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

Deskriptive morphologische Beurteilung der Pronukleus-
und Embryonalstadien bei der extrakorporalen Befruchtung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Guido Hartl
aus Aichach

Würzburg, März 2003

Referent: Prof. Dr. med. T. Steck

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Dietl

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2003

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. Entwicklung der IVF-Methode	1
1.2. Eizellen und Embryonenkultur	3
1.3. Verlängerte Kultur bis zum Stadium der Blastozyste	4
1.4. Beurteilung und Auswahl der Vorkerne	5
1.5. Fragestellung	7
<u>2. Material und Methoden</u>	8
2.1. Patientenkollektiv	8
2.2. IVF-Stimulation	10
2.3. Follikelpunktion (FP)	12
2.4. Befruchtung der Eizellen	13
2.4.1. IVF-Fertilisation	13
2.4.2. ICSI-Fertilisation	13
2.5. Embryotransfer (ET)	14
2.6. Nachbehandlung	15
2.7. Präparation der Spermien	16
2.7.1. Gewinnung der Spermien	16
2.7.2. Aufbereitung der Spermien	16
2.7.2.1. Zweimaliges Waschen und swim-up	16
2.7.2.2. Zentrifugation über ein Percoll-Kissen	17

2.8. Beurteilung der Zygoten und der Embryonen	19
2.8. 1. Beurteilung der Vorkernstadien (PN)	19
2.8.1.1. Position der Vorkerne zueinander	22
2.8.1.2. Anordnung der Nukleolen im Vorkern	23
2.8.1.3. Anzahl der Nukleolen im Vorkern	24
2.8.1.4. Anzahl der Vorkerne im Ooplasma	25
2.8.1.5. Größe der Vorkerne	26
2.8.1.6. Vakuolen im Ooplasma	27
2.8.1.7. Granulierung des Ooplasmas	28
2.8.1.8. Halo-Effekt der befruchteten Eizelle	29
2.8.1.9. Punktesystem für die Vorkernstadien	30
2.8.1.10. Bilder zu den Vorkernstadien	31
2.8.2. Kultur der Mehrzeller (2- bis 8-Zeller)	34
2.8.2.1. Morphologische Beurteilung der Mehrzeller	35
2.8.2.2. Anzahl der Blastomeren	36
2.8.2.3. Fragmentation des Embryo	36
2.8.2.4. Granulierung des Ooplasmas	36
2.8.2.5. Wachstumsgeschwindigkeit	36
2.8.3. Blastozystenkultur und Beurteilung	37
2.8.3.1. Aufbau und Morphologie der Blastozyste	37
2.8.3.2. Kompaktierender Embryo	38
2.8.3.3. Kompakter Embryo	38
2.8.3.4. Früh kavitierender Embryo	38
2.8.3.5. Spät kavitierender Embryo	39
2.8.3.6. Frühe Blastozyste	39
2.8.3.7. Expandierende Blastozyste	39
2.8.3.8. Voll expandierte Blastozyste	40
2.8.3.9. Bilder zu den Blastozysten	41

<u>3. Ergebnisse</u>	44
3.1. Fertilisation und Schwangerschaft	44
3.2. Spermaqualität bei IVF versus ICSI	46
3.3. Vorkernscore bei IVF versus ICSI	46
3.4. Vakuolisierung und Entwicklung der Blastozysten	46
3.5. Halo-Effekt und Blastulationsrate	47
3.6. Vorkerngröße und Blastulationsrate	47
3.7. Anzahl der Vorkerne	48
3.8. Berechnung des Eichfaktors	48
3.9. Dicke der Zona pellucida und Gesamtdurchmesser	51
3.10. Embryodurchmesser und Blastozystenentwicklung	52
3.11. Vorkern-Bewertung und Blastozystenentwicklung	54
3.12. Prädiktiver Grenzwert für die Blastozystenentwicklung	55
3.13. Embryotransfer und Schwangerschaft	57
3.14. Qualität der Blastozyste und Schwangerschaftserfolg	58
<u>4. Diskussion</u>	61
4.1. Methoden der Bestimmung der Vitalität der Embryonen	61
4.1.1. Nicht-invasive Methoden	62
4.1.1.1. Evaluierung der Morphologie der Zygoten	62
4.1.1.2. Evaluierung der Morphologie der Mehrzeller	66
4.1.1.3. Morphologie der Blastozysten	67
4.1.1.4. Metabolismus der Embryonen	69
4.1.2. Invasive Methoden der Bestimmung der Vitalität	70
4.1.2.1. Detektion chromosomaler Auffälligkeiten	71
4.2. Methodik der Auswahl der Blastozysten	72
4.3. Diskussion des Transfers von Mehrzellern oder Blastozysten	75
4.4. Diskussion der Ergebnisse	77
4.4.1. Das System der Bewertung der Vorkerne	77
4.4.2. Diskussion der Daten zur Fertilität	77
4.4.3. Diskussion der Signifikanzen zur Morphologie der Zygoten	78

4.4.4. Diskussion der Entwicklung der Blastozysten	80
4.4.5. Diskussion der Ergebnisse der Schwangerschaft	81
<u>5. Zusammenfassung</u>	83
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	87
ANHANG	105
Erhebungsbogen zur Beurteilung der Vorkernstadien	105
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BG	Blastozystenentwicklungsgrad
Ca ²⁺	Calciumion
CES	kumulativer Embryoscore
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E ₂	Serumestradiol
EF	Eichfaktor
EGF	Epidermis Wachstumsfaktor
ES	Embryoscore nach Steer
EschG	Embryonenschutzgesetz
ET	Embryotransfer
FP	Follikelpunktion
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HCG	humanes Choriongonadotropin
I.E.	internationale Einheit
ICM	innere Zellmasse (inner cell mass)
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	in-vitro Fertilisation
ns	nicht signifikant
OAT	Oligoasthenoteratospermie
p	Signifikanzniveau
PN	Pronukleus (= Vorkern)
SSR	Schwangerschaftsrate
TCN	Gesamtzellzahl (total cell number)
TE	Trophektoderm
TS	Teilstrich

1. Einleitung

1.1. Entwicklung der IVF-Methode

Die Vereinigung einer Eizelle und eines Spermiums außerhalb des Körpers und schließlich die Rückführung des entstandenen Embryo in die Gebärmutter, ist ein Verfahren der Reproduktion, um Probleme der tierischen und menschlichen Unfruchtbarkeit zu überwinden (Pschyrembel, 1990).

In den sechziger Jahren forschten der englische Physiologe Robert Edwards und der Gynäkologe Patrick Steptoe an menschlichen Eizellen. 1969 gelang es ihnen, eine menschliche Eizelle künstlich außerhalb des Körpers mit Hilfe einer in-vitro Fertilisation erfolgreich zu befruchten. Als dann am 25. Juli 1978 mit der Geburt von Luise Brown in Bristol, England, das erste Kind nach künstlicher Befruchtung geboren wurde, begannen sich weltweit Wissenschaftler intensiv mit den Möglichkeiten der humanen Reproduktionsmedizin zu beschäftigen (Steptoe *et al.*, 1976; Vidaeff *et al.*, 2000). Wenige Jahre später gelang es in Deutschland Siegfried Trotnow und seinen Mitarbeitern, die nach englischem und australischem Vorbild arbeiteten, daß am 16. April 1982 in Erlangen der erste deutsche Säugling namens Oliver Wimmerbacher geboren werden konnte.

Die Methoden der assistierten Reproduktion haben sich im Laufe der Jahre immer mehr verfeinert und sind heute in dem Bemühen, ungewollt kinderlosen Paaren zu einem eigenen Kind zu verhelfen fest etabliert. Die Sterilität ist ein multifaktorielles Krankheitsbild, das durch den Zustand der Unfruchtbarkeit gekennzeichnet ist. Eine klinisch relevante ungewollte Kinderlosigkeit ist gegeben, wenn sich bei einem Paar mit Kinderwunsch nach ein bis zwei Jahren regelmäßigen ungeschützten Kohabitationen keine Konzeption einstellt. Etwa 15% der Paare im fortpflanzungsfähigen Alter sind ungewollt kinderlos. Die Ursachen liegen zu ca. 50% beim weiblichen Geschlecht und zu 35% bei den Männern und in 15% der Fälle an beiden Partnern (Pschyrembel, 1990). Es zeigt sich aber ein Trend, daß die Inzidenz der männlichen Subfertilität zunimmt. In ca. 20 % der Fälle kann die Ursache

der Kinderlosigkeit nicht gefunden werden und man spricht dann von einer idiopathischen Sterilität.

In den meisten IVF-Programmen werden die Embryonen normalerweise im Stadium des Mehrzellers am zweiten oder dritten Tag nach der Gewinnung der Eizellen transferiert. In den letzten Jahren wurde es möglich durch sequenzielle serumfreie Kulturmedien Embryonen bis zum Stadium der Blastozyste zu bebrüten (Gardner und Lane, 1997). Die Bebrütung bis zur Blastozyste begünstigt die Synchronisation der Embryonen mit dem weiblichen Reproduktionstrakt. Die Implantationsrate für die transferierten Mehrzeller verbesserte sich jedoch in den letzten 10 Jahren kaum und erreicht etwa 12,5-15% (Edwards und Craft, 1990). Es konnten jedoch in ausgewählten Patientengruppen Implantationsraten von bis zu 50% erreicht werden (Gardner et al., 1998a, 1998b). Hohe Schwangerschaftsraten konnten jedoch nur erreicht werden, wenn zumindest eine Kohorte von acht normalen Eizellen gewonnen werden konnte und die Auswahl der Embryonen während der Bebrütung zum Stadium der Blastozyste erfolgte (Bongso, 1999). Das hohe Potential zur Implantation der Blastozysten eröffnet die Möglichkeit, weniger Embryonen pro Zyklus zu transferieren und damit gleichzeitig das Auftreten einer mehrfachen Befruchtung zu minimieren.

Eines der großen Probleme in deutschen IVF-Laboratorien ist, daß eine Auswahl der Zygoten nach IVF- oder ICSI-Therapie nur im Stadium der Vorkerne erfolgen darf, weil das deutsche Gesetz zum Schutz der Embryonen die Bebrütung und den Transfer von mehr als drei Embryonen verbietet. Es ist nur erlaubt, so viele Embryonen zu bebrüten, wie voraussichtlich transferiert werden. Die überzähligen Zygoten müssen entweder verworfen oder können auf Wunsch der Patientinnen tiefgefroren werden. Die Auswahl der Zygoten im Stadium der Vorkerne ist nicht nur in Deutschland wichtig, sondern auch in Ländern, die religiöse oder ethische Probleme mit der Züchtung, Aufbewahrung oder Zerstörung lebensfähiger, aber nicht benötigter Embryonen haben könnten.

Viele Studien schlugen eine Auswahl auf der Ebene der Vorkerne vor (Payne et. al., 1997; Scott und Smith, 1998; Tesarik und Greco, 1999; Witteimer

et al., 2000), die das mögliche Potential der Zygoten zur späteren Implantation voraussagen sollten. Bis jetzt ist aber noch wenig über die Entwicklung der ausgewählten Zygoten nach zwei bis drei Tagen Bebrütung bekannt.

Es wäre wünschenswert in einer prospektiven Studie, welche morphologische Kriterien der Zygoten beschreibt, das Auftreten hochwertiger Blastozysten zu untersuchen und um daraus befriedigende Schwangerschaftsraten auch unter den gesetzlichen Bedingungen in Deutschland zu erhalten. Im Vergleich zu früheren Studien soll in dieser Studie eine detailliertere Beschreibung der Zygoten erfolgen. Als Resultat soll das System der Beurteilung zur Auswahl hochwertiger Zygoten führen, die über die Entwicklung hochwertiger Blastozysten zur Maximierung der Rate der Implantation und Schwangerschaft führen kann.

1.2. Eizellen und Embryokultur

Die Eizellen werden aus den hormonell stimulierten Ovarien der Frau entnommen und zur in-vitro Fertilisation vorbereitet. Es gibt verschiedene Arten von Kulturmedien (Gardner *et al.*, 1997). Einfache Medien sind ausgewogene Elektrolytlösungen mit Pyruvat, Laktat und Glukose (Gardner und Lane, 1993c). Komplexe Kulturmedien sind speziell für die in-vitro Bebrütung somatischer Zellen entwickelt worden. Üblicherweise wird den Kulturmedien Serum hinzugefügt. In der Regel stammt dieses Serum von der Patientin. Es konnte aber gezeigt werden, daß serumhaltige Kulturmedien negative Effekte auf die Formierung der Blastozysten haben können (Walter *et al.*, 1992), indem sie die Sequestration von Lipiden fördern und die Entwicklung abnormer mitochondrialer Strukturen bewirken können. Dies kann zu einer Beeinträchtigung der metabolischen Funktionen der wachsenden Embryonen führen (Gardner *et al.*, 1994). Diesen Kulturen ist gemeinsam, daß nach dem Transfer solcher Embryonen letztendlich nur eine Geburtsrate von ca. 10% resultiert und daher mehrere Embryonen transferiert werden müssen, um eine akzeptable Schwangerschaftsrate von etwa 20-30% zu erzielen (Gardner *et al.*, 1997). In normalen standardisierten Kulturmedien kann sich ein Großteil der Embryonen (75%) nicht zur Blastozyste entwickeln (Dokras *et al.*, 1993). Die

Entwicklung bis zum Stadium der Blastozyste kann *in vitro* gefördert werden, indem man die Zusammensetzung der Kulturmedien an die Bedürfnisse der heranreifenden Embryonen anpaßt, welche die metabolischen Veränderungen im weiblichen Reproduktionstrakt widerspiegeln. Der frühe Embryo zeigt ein geringes Maß an Biosynthese und eine niedrige Utilisation von Glukose (Gardner und Leese, 1986). Glukose wird sogar für eine Retardierung der Embryonen aufgrund des oxidativen Stresses verantwortlich gemacht (Gardner *et al.*, 1997). Die Zygote und der Mehrzeller wachsen durch den Kumuluskomplex nahezu in einer glukosefreien Umgebung (Gardner *et al.*, 1997) und werden durch diese Zellen vor allem mit Pyruvat und Laktat versorgt. Mit der Anschaltung des Genoms und der Aktivierung der eigenen Biosynthese am dritten Tag der Entwicklung (Tesarik und Kopecny, 1986) wird Glukose zunehmend wichtiger. Glukose und Aminosäuren werden als potente Regulatoren des Wachstums der präimplantierten Embryonen angesehen (Gardner *et al.*, 1997). Sie regulieren den Energiemetabolismus, die Osmolarität und puffern intrazellulär den pH-Wert ab (Gardner *et al.*, 1997). Die Erkenntnisse über die möglichen Bedürfnisse und den Metabolismus der Embryonen zeigten, daß konventionelle Kulturmedien nicht für die verlängerte Bebrütung von Embryonen geeignet waren. Die Anwendung sequentieller serumfreier Kulturmedien erleichtert die Kultur bis zur Blastozyste.

1.3. Verlängerte Kultur bis zum Stadium der Blastozyste

Ein Großteil der Laboratorien bebrütet Embryonen bei der routinemäßigen extrakorporalen Befruchtung bis zum dritten Tag. Man hat andererseits erkannt, daß die auf fünf bis sechs Tage verlängerte Kultur bis zum Stadium der Blastozyste Vorteile gegenüber der konventionellen drei Tage langen Kultur haben kann. Nach verlängerter Kultur sind reifere und besser an die Bedingungen im Uterus adaptierte Embryonen als nach der Kurzeitkultur bis zum zweiten oder dritten Tag verfügbar. Diese haben eine hohe Implantationsrate und eröffnen die Möglichkeit, die Anzahl der zu transferierenden Embryonen pro Zyklus zu minimieren. Damit sinkt die Rate unerwünschter multipler Mehrlingsgestationen (Gardner und Schoolcraft,

1998b). Zur Zeit stellt die verlängerte Kultur bis zum Stadium der Blastozyste jedenfalls im Ausland die fortgeschrittenste Methode der assistierten Befruchtung dar.

Die Idee des Transfers von Blastozysten ist nicht neu. Sie wurde erstmals in Tierfarmen angewandt und erreichte Schwangerschaftsraten bis zu 40-60% (Vidaeff *et al.*, 2000). Bereits im Jahre 1972 wurde bei Tieren von erfolgreichen Transfers mit einer Wahrscheinlichkeit zur Implantation bis zu 50% berichtet (Croxatto *et al.*, 1972). Das Konzept des Transfers von Blastozysten geriet jedoch wieder in Vergessenheit, da eine längere Bebrütung von Embryonen anspruchsvoll und technisch aufwendig war und zunächst nur eine Erfolgsrate von ca. 10% erzielt wurde (Bolten *et al.*, 1991). Aus den Erfahrungen der Bebrütung menschlicher Embryonen erreichte man eine Verbesserung der Implantationsrate als man erkannte, daß der physiologisch im Reproduktionstrakt wandernde Embryo verschiedenartigen Milieus ausgesetzt ist (Sakkas *et al.*, 1994). Verschiedene Verhältnisse hinsichtlich des Gehaltes an Aminosäuren im Milieu beeinflussen die Reifung der Embryonen (Miller *et al.*, 1987). Die Entwicklung sequentieller Kulturmedien konnte zeigen, daß die Entwicklung von Blastozysten in diesen Medien am fünften Tag der Kultur im Vergleich zu konventionellen einfachen Kulturmedien signifikant erhöht war (Gardner *et al.*, 1998).

1.4. Beurteilung und Auswahl der Vorkerne

Die etablierte Methode, um Embryonen anhand ihrer Morphologie qualitativ zu bewerten, beruht bei frühen Embryonen auf Kriterien der Teilungsgeschwindigkeit, der Anzahl und Größe der Blastomeren, der Symmetrie der Blastomeren und dem Anteil der Fragmentation innerhalb der Embryonen (Puissant *et al.*, 1987; Steer *et al.*, 1992, Tan *et al.*, 1992).

Verschiedene Studien hatten jedoch gezeigt, daß man Embryonen auch schon früher morphologisch bewerten kann. Bei Zygoten, die 12 bis 20 Stunden nach der Insemination im Stadium der Vorkerne untersucht wurden, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen mehreren morphologischen Kriterien und der späteren Qualität der Embryonen, die sich unmittelbar auf das Vermögen zur

Implantation der Embryonen auswirkte (Wright *et al.*, 1990; Balakier *et al.*, 1993; Van Blerkom *et al.*, 1995b, Payne *et al.*, 1997; Scott und Smith 1998; Garello *et al.*, 1999; Goud *et al.*, 1998; Zollner *et al.*, 2001). Jedoch waren die Kriterien, die manche Studien nutzten, invasiv oder erforderten ein Labor mit spezieller Ausrüstung und die Anwendung von langen, zeitintensiven Protokollen.

Allen Systemen zur Bewertung der Vorkerne liegt die Beobachtung zugrunde, daß frühe morphologische Kriterien der Zygote mit der späteren embryonalen Entwicklung korrelieren und damit prospektiv eine Vorhersage über die mögliche Implantations- und Schwangerschaftsrate ermöglichen. Man geht davon aus, daß die frühen Stadien der Entwicklung die inhärenten Potentiale der maternalen Oozyte widerspiegeln (Gardner *et al.*, 1997), aber die frühen Kriterien alleine möglicherweise nicht sicher die normale Entwicklung der Embryonen bis zur Blastozyste voraussagen können.

Die Basis früherer Systeme zur Beurteilung der Morphologie der Vorkerne beruhte zunächst nur auf der Stellung der Nukleolen innerhalb der Vorkerne. Später wurden die Kriterien der Größe der Vorkerne, der Anzahl der Nukleolen und ihre Verteilung innerhalb der Vorkerne sowie die Morphologie des Ooplasmas beurteilt. Darüber hinaus wurden zeitliche morphologische Änderungen im Zytoplasma und der Zeitpunkt der ersten Teilung notiert (Scott und Smith, 1998). Da die Auswahl der Zygoten in Deutschland nur im Stadium der Vorkerne erlaubt ist, gestaltet sich die adäquate Beurteilung dieser Stadien schwieriger als eine spätere morphologische qualitative Beurteilung. Das von Scott und Smith (1998) vorgeschlagene Schema kann in Deutschland nicht vollständig angewendet werden. Die Kriterien der Auswahl nach dem Zeitpunkt der Auflösung der Zellmembranen der Vorkerne und der Zeitpunkt der ersten Teilung nach 24 bis 26 Stunden nach Gewinnung der Eizellen darf zwar noch registriert, aber nicht als Auswahlkriterium angewendet werden.

1.5. Fragestellung

Die Zielsetzung dieser prospektiven Studie war es, mit wissenschaftlichen Methoden zu beschreiben, wie deskriptive morphologische Kriterien des Stadiums der Vorkerne die Entwicklung und die Vitalität von hochwertigen Blastozysten voraussagen. Damit sollte über eine mögliche Selektion der Zygoten eine verbesserte Implantations- und Schwangerschaftsrate bei Paaren mit ungewollter Kinderlosigkeit herbeigeführt werden. In Deutschland dürfen Embryonen ausschließlich aus dem Stadium der Vorkerne ausgewählt werden. Es wäre sinnvoll, ein klinisch applikables Schema zur Bewertung der Vorkerne anzuwenden, das morphologische Kriterien definiert, die mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer guten weiteren Entwicklung der Embryonen führen können. In dieser Studie sollten genaue Kriterien der Morphologie von Zygoten mit Vorkernen für die Auswahl zur weiteren Bebrütung geprüft werden. Es wurde die Anzahl und die Größe der Vorkerne, die Stellung der Vorkerne zueinander, der Halo-Effekt, die Reihung und die Anzahl der Nukleolen in beiden Vorkernen sowie die Anwesenheit von Vakuolen und der Grad der Granulierung des Ooplasmas in der befruchteten Eizelle bewertet. Diese Kriterien wurden zu einem genauen Schema der Beurteilung der Vorkerne zusammengefaßt. Bereits im frühen Stadium der Vorkerne können Zygoten mit einem hohen Potential zur Entwicklung ausgewählt und weiterbebrütet werden, um schließlich hochwertige Blastozysten für den Transfer zu erhalten. Damit läßt sich die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft im Rahmen der extrakorporalen Befruchtung optimieren.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

In der Zeit von Juli 1999 bis April 2000 durchliefen 168 Patientinnen das Programm der extrakorporalen Befruchtung an der Universitätsfrauenklinik Würzburg. Alle Patienten nahmen sukzessiv an dieser Studie teil und wurden weder nach Alter, noch Spermparameter des Partners, noch nach den Ursachen der Infertilität ausgewählt. Bei 101 Patientinnen wurde die klassische IVF-Methode angewendet. Bei 67 Paaren kam die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) als Therapie der männlichen Subfertilität zur Anwendung. Es wurden nur Paare in die Studie aufgenommen, bei denen mindestens eine Eizelle aus den stimulierten Ovarien gewonnen werden konnte, die nach der Insemination nach 14-18 Stunden Bebrütung Zeichen der Befruchtung zeigten. Eine erfolgreiche Befruchtung zeigte sich durch das Auftreten der Vorkerne im Zytoplasma der Eizelle. Konnten bei Patientinnen keine Eizellen gewonnen werden oder zeigten sich schwere Störungen im Ablauf der Befruchtung, wie überzählige Vorkerne (≥ 3 Pronuklei) oder Degenerationen der Embryonen, so wurden diese Fälle ausgeschlossen. Die häufigsten Indikationen für die assistierte Befruchtung werden in folgender Tabelle dargestellt.

46 %	andrologische Subfertilität
36 %	tubare Sterilität
17 %	idiopathische Sterilität
5 %	Endometriose

Tabelle 2.1: Verteilung der häufigsten Indikationen zur künstlichen Befruchtung in Prozent.

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) wurde in allen Fällen der schweren andrologischen Subfertilität (OAT-Syndrom) angewandt. Das Durchschnittsalter der Frauen lag bei $33,4 \pm 4,1$ Jahren und das der Partner bei

36,1 ± 5,3 Lebensjahren. Es gab keinen signifikanten Unterschied der Altersverteilung zwischen Paaren, welche mit der klassischen IVF-Methode oder der ICSI-Methode behandelt wurden. Die durchschnittliche Dauer der Kinderlosigkeit betrug 4,2 Jahre. 33% der kinderlosen Paare nahmen zum ersten Mal an der IVF- und ICSI- Behandlung teil. Bei 21% der Paare war es der zweite Versuch einer künstlichen Befruchtung, bei 16% der Paare der dritte und bei 30% der Paare der vierte oder häufiger.

Die ovarielle Stimulation erfolgte mit humanen menopausalen Gonadotropinen, nachdem die Hirnanhangdrüse mit einem GnRH-Analogen supprimiert wurde. Nach sonographischer Kontrolle der Follikel und Messung des Östradiols erfolgte die Gewinnung der Eizellen 34-36 Stunden nach der Applikation von HCG. Nach Aufarbeitung der Eizellen sowie der Samenprobe mit der folgenden Entscheidung für die IVF- oder die ICSI-Methode wurde die Insemination durchgeführt. Nach einer Inkubation von 16-18 Stunden wurden die Eizellen auf Zeichen einer Befruchtung kontrolliert. (Zollner *et al.*, 1996; Zollner *et al.*, 2001).

Bei den befruchteten Eizellen wurden mittels eines Protokolls alle Zygoten mit Vorkernen bewertet, indem jedem Merkmal eine bestimmte Anzahl von Punkten gegeben und die Summe aller bewerteten morphologischen Parameter zu einem Zahlenwert addiert wurde, der repräsentativ die Qualität der Zygoten mit Vorkernen widerspiegelte (Bewertungsblatt: siehe Anhang). Die besten Zygoten mit Vorkernen wurden für die weitere embryonale Bebrütung ausgewählt und entsprechend dem Embryonenschutzgesetz weiterbebrütet.

Am dritten und fünften Tag wurden die Morphologie und der Grad der Entwicklung aller Embryonen deskriptiv mittels optischer Inspektion unter dem Mikroskop beurteilt. Die Stadien der Entwicklung der Blastozysten wurden in acht Graden notiert. Sämtliche morphologischen Kriterien der Auswahl der Embryonen wurden mit Hilfe mikroskopischer Beobachtung und photographischer Methoden ermittelt.

Um die Belange des Datenschutzes zu beachten, wurde jede Patientin für die statistische Auswertung mit einer Buchstaben-Nummern-Kombination chiffriert. Die Liste der Zuordnungen zwischen den Namen der Patientinnen und den kodierten Nummern wurde in einer WORD 97 Datei gesichert und getrennt aufbewahrt. Anschließend erfolgte die anonymisierte Auswertung der Daten.

Statistische Analysen

Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS 10.0 für Windows durchgeführt. Es handelte sich um eine explorative Datenanalyse, bei welcher die Daten nicht normalverteilt waren. Von allen erhobenen Parametern wurden die Medianwerte und die Streuungen berechnet. Signifikanz wurde angenommen, wenn $p < 0,05$ berechnet wurde. Bei den metrischen Maßen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Zur Analyse der Varianz, ob bestimmte Werte einer Variablen in zwei unverbundenen Gruppen (IVF- versus ICSI-Patienten) gleich waren, wurde der U-Test nach Mann und Whitney benutzt. Der Chi-Quadrat-Test diente dazu, um Häufigkeiten zu vergleichen und die Abhängigkeit zwischen zwei nominalen unverbundenen Variablen zu untersuchen. Um mehrfache Abhängigkeiten zu überprüfen, wurde die Pearson'sche Korrelation benutzt.

2.2. IVF-Stimulation

Die Induktion der Reifung der Eizellen erfolgte mit standardisierten Stimulationsprotokollen. Mittels einer kontrollierten hormonellen ovariellen Überstimulation wurden mehrere Eizellen gleichzeitig zur Reifung gebracht. Es haben sich Stimulationsprotokolle durchgesetzt, welche die Applikation humaner Menopausengonadotropine (HMG) beziehungsweise reinem rekombinanten FSH favorisieren, nachdem die Hypophyse mit einem GnRH-Analogen reversibel blockiert wurde. Das humane Menopausengonadotropin wird aus dem Urin postmenopausaler Frauen gewonnen. Diese Hormone steuern normalerweise das natürliche Wachstum der Follikel.

Das kurze Protokoll ("short protocol") wird nur noch selten verwendet, während das lange Protokoll ("long protocol") in der Mehrzahl der Fälle eingesetzt wird. Um die Reifung der Follikel zu steuern und um störende Einflüsse der autonomen Sekretion der Hirnanhangdrüse zu supprimieren, wurde eine hormonelle Downregulation der Hypophyse eingeleitet. Ziel war die Suppression eines vorzeitigen LH-Anstiegs im Serum, welcher zu einer verfrühten oder unkontrollierten Ovulation geführt und sich ungünstig auf die Qualität der Eizellen und damit die Schwangerschaftsrate ausgewirkt hätte. Zur Downregulation der Hypophyse wurde ein GnRH Analogon verwendet, worauf es zunächst zu einer Stimulation der Hypophyse mit verstärkter Ausschüttung von Gonadotropinen kam ("flare-up-Effekt"), dann aber zu einer Downregulation des GnRH-Rezeptors, was die Sekretion von LH und FSH unterdrückte. Dazu wurde den Patientinnen sechs bis acht Tage vor der erwarteten Ovulation 0,2mg Nafarelin (GnRH-Analogon, Synarela®, Heumann, Nürnberg Deutschland) intranasal 2-4 mal täglich verabreicht.

Zur kontrollierten ovariellen Überstimulation wurden den Patientinnen ab dem dritten Zyklustag intramuskulär täglich jeweils zwei bis drei Ampullen Urogonadotropine (HMG, Menagon®, Ferring, Kiel, Deutschland) oder reines rekombinantes FSH (Gonal F® Serono, Unterschleißheim, Deutschland; Puregon®, Organon, Oberschleißheim, Deutschland) verabreicht. Diese Substanzen bewirkten in der ersten Zyklushälfte ein Heranreifen von mehreren Follikeln in den Ovarien. Die weitere kontrollierte Applikation richtete sich nach dem individuellen Ansprechen der Ovarien auf diese Stimulationsbehandlung. Das Wachstum, die Zahl und Größe der Follikel wurde jeden zweiten bis dritten Tag mit vaginaler Sonographie überwacht. Routinemäßig wurden Blutabnahmen durchgeführt, um den serologischen Anstieg des Estradiols (E₂) zu dokumentieren. Dieser Parameter ist ein gutes Maß für die Reifung der Follikel und Eizellen. Durch das Monitoring des Wachstums der Follikel und des Estradiolwertes konnte der Erfolg der Stimulierung mitverfolgt und über individuelle medikamentöse Steuerungen der Dosis von FSH/HMG Einfluß auf die weitere Entwicklung der Follikel genommen werden (Steigerung der Dosis

bis zu vier Ampullen). Mittels sonographischer Follikulometrie gelang der Nachweis von Follikeln ab 3mm bis 4mm Durchmesser. Nahm ein Follikel einen Durchmesser von mehr als 18mm ein (Leitfollikel) und erreichte das Serumestradiol (E_2) einen Wert, der größer als 400pg/ml war, so wurden der Patientin am Abend (circa 20-22 Uhr) zur Induktion der Ovulation 10.000 I.E. humanes Chorion-Gonadotropin (HCG; Pregnesin®, Serono, Unterschleißheim, Deutschland) intramuskulär appliziert.

2.3. Follikelpunktion

Die Ovulation war 34 bis 38 Stunden nach der Applikation des HCG-Präparates zu erwarten. Etwa 34 Stunden nach der HCG-Injektion wurde unter sonographischer Sicht eine transvaginale Follikelpunktion (FP) ausgeführt. Der Eingriff war in Lokalanästhesie oder Vollnarkose möglich. Nachdem die Vagina desinfiziert und mit physiologischer Kochsalzlösung nachgespült worden war, wurde die Punktion ausgeführt. Auf dem Bildschirm des Ultraschallgerätes war eine Linie für die Punktion vorgegeben. Nach exakter Identifizierung der topographischen Strukturen im kleinen Becken konnten mit der Punktionsnadel die Follikel aspiriert werden. Es wurde eine Spül-Saug-Automatik verwendet, die an dem transvaginalen Ultraschallapplikator angebracht war. Der gesamte Inhalt der Follikel wurde durch die Sogwirkung des Vakuum-Pumpensystems aspiriert. Im IVF-Labor wurden die Aspirate bei 10-facher Vergrößerung im Gegenlicht unter dem Stereomikroskop nach dem Vorhandensein von zellulären Komplexen mit Oozyten inspiziert. Mit feinen Pipetten wurden die Eizellen von den umgebenden Zellen des Cumulus oophorus vorsichtig isoliert und für die spätere Insemination vorbereitet.

2.4. Befruchtung der Eizellen

2.4.1. IVF-Fertilisation

Im frischen Punktat der Follikel erfolgte die lichtmikroskopische Identifizierung der Eizellen, die noch vom Cumulus oophorus umgeben waren. Die Komplexe aus Eizelle und Cumuluszellen wurden zur groben Säuberung mit einem Gelloader (Fa. Eppendorf) auf- und abgezogen. Nach Reinigung der Eizellen wurden sie in ein frisches IVF-Kulturmedium (IVF-50, Scandinavian IVF, Göteborg, Schweden) pipettiert und für eine halbe Stunde im Brutschrank (Fa. Heraeus) bei einer Temperatur von 37 °C und 5% CO₂ äquilibriert. Anschließend wurden die Eizellen zur Mikroinsemination mit einer Eizelle pro Kulturtropfen in Nunc Petridish 55 mm unter OviolTM (Scandinavian IVF, Göteborg, Schweden) mit den Spermien inseminiert. Wichtige Parameter der erfolgreichen Kultur waren die Temperatur, Osmolarität und der pH-Wert des Mediums. Das OviolTM ist ein chemisch inertes Öl und wurde über die Kulturtropfen geschichtet. Es verhinderte die Verdunstung von Flüssigkeit aus dem Kulturtropfen und schirmte die Eizellen vor unphysiologischen Einflüssen ab. Die Gewinnung der Spermien erfolgte meist durch Aufarbeitung des frischen nativen Ejakulates, welches überwiegend durch anterograde Masturbation gewonnen wurde. Für die Insemination wurden pro Eizelle etwa 10-20.000 motile Spermien verwendet.

2.4.2. ICSI-Fertilisation

Bei der ICSI-Methode wird ein Spermium mit einer Mikrokapillare in eine Eizelle injiziert. Das Verfahren ermöglichte Schwangerschaften auch bei Paaren mit schwerer männlicher Subfertilität. Mit Hilfe des Enzyms Hyaluronidase (Scandinavian IVF, Göteborg, Schweden) wurden die Kumuluszellen und die Corona-radiata Zellen von der Eizelle abgelöst. Beschädigte oder nekrotische Eizellen wurden verworfen. Nun folgte das Einbringen der Spermien in Mikrotropfen mit Polyvinylpyrrolidon (PVP). Diese Substanz bremste die Motilität der Spermien und vereinfachte die Immobilisation mit der Injektionspipette durch Schwanzbruch ("crush tail"). Sie ermöglichte die kontrollierte Injektion in einem verlangsamten Injektionsstrom. Außerdem blieb

die neben dem Spermium in die Eizelle injizierte Menge an Kulturmedium gering. Unter sicherem Aufbruch des Oolemmis wurde das Spermium tief (50-75% des Durchmessers der Eizelle) in das Ooplasma der Eizelle injiziert.

Sowohl bei der IVF- als auch bei der ICSI-Methode erfolgten 14 bis 18 Stunden nach der Insemination die Kontrollen auf das Vorhandensein von Zeichen auf eine Fertilisation. Hierzu wurden die Petrischälchen kurz aus dem Brutschrank entnommen und die Eizellen unter dem Inversmikroskop (Fa. Leitz) bei 300-400facher Vergrößerung inspiziert. Eine erfolgreiche Befruchtung war am Erscheinen der beiden Vorkerne und der Extrusion des zweiten Polarkörperchens erkennbar.

Mit Hilfe des Protokolls zur Beurteilung der Zygoten erfolgte die Auswahl von maximal drei Stadien mit Vorkernen. Überzählige Zygoten wurden auf Wunsch des Paares kryokonserviert. Die ausgewählten Zygoten wurden in frisches G1-Kulturmedium pipettiert und weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am dritten Tag erfolgte die optische Inspektion der Entwicklung der Mehrzeller. Diese wurden anschließend in frisches G2-Medium gesetzt und weitere zwei Tage bebrütet, bis sie am fünften Tag das Stadium der Blastozyste erreicht hatten. Daran schloß sich eine erneute mikroskopische Bewertung und Bildokumentation an.

2.5. Embryotransfer

Die Rücksetzung der Embryonen erfolgte nach einer fünftägigen Bebrütung. Die Embryonen wurden mit einem Katheter in die weibliche Gebärmutter transferiert. Entsprechend den gesetzlichen Regelungen dürfen pro Zyklus maximal drei Embryonen in den Uterus übertragen werden (Deutsches Embryonenschutzgesetz 1.1.1991 §1, Absatz 1 Nr. 3). Der Transfer der Embryonen war mit verschiedenen Kathetermodellen möglich (Lisse-Labotect, Göttingen; Edwards-Wallace). Die Patientin nahm in Steinschnittlage auf einem gynäkologischen Untersuchungsstuhl Platz. Mit einem Spekulum wurde die Portio der Patientin eingestellt. Der Muttermund wurde mit Kulturmedium

gespült. Dann wurde ein Führungskatheter in den Zervikalkanal vorgeschoben. Die Innenkanüle des Transfer-Sets wurde mit 20 μ l G2-Medium in der 3-Tropfen-Technik (1. Medium, 2. Luft; 3. Medium und Embryonen; 4. Luft; 5. Medium) aufgezogen. Der doppelskalierte Katheter wurde etwa zwei Zentimeter in das Cavum uteri vorgeschoben, nachdem in einem Basissonogramm die Länge des Cavums bestimmt worden war. Der Transfer erfolgt 0,5-1cm unterhalb des Fundus uteri. Nach Applikation der Embryonen ruhte die Patientin noch wenige Minuten auf dem Untersuchungsstuhl.

2.6. Nachbehandlung

In den ersten Wochen nach dem Transfer produziert der Embryo noch wenig HCG. Es sind zwar reichlich Gelbkörper vorhanden, aber durch die medikamentöse Downregulierung mit GnRH-Analoga werden sie durch die Hypophyse nicht ausreichend stimuliert. Es kommt zum lutealen Defekt, der eine hormonelle Supplementation der Lutealphase erforderlich macht. Dazu wurde 14 Tage lang jeweils täglich ein- bis zweimal Progesteron als vaginal applikables Gel (Crinone®, Serono, Unterschleißheim, Deutschland) appliziert. Wenn keine Zeichen einer Überstimulation vorlagen, wurde eine Woche nach dem Transfer 5000 I.E. HCG (Pregnesin® 5000 I.E.) subkutan injiziert.

Zur Bestätigung einer Schwangerschaft wurde 14 Tage nach dem Transfer Blut zur Kontrolle des β -HCG-Serumspiegels entnommen. Falls das β -HCG einen Wert >100mU/ml erreicht hatte und keine Blutung aufgetreten war, konnte eine beginnende Schwangerschaft angenommen werden. In den folgenden Wochen wurden regelmäßige sonographische Kontrollen durchgeführt, um die orthotope Nidation des Embryos und in der sechsten Woche der Schwangerschaft regelmäßige Aktionen des Herzens nachzuweisen. Das weitere therapeutische Procedere richtete sich nach der mütterlichen Anamnese und dem Verlauf der Schwangerschaft.

2.7. Präparation der Spermien

2.7.1. Gewinnung der Spermien

Die Samenproben wurden nach einer sexuellen Karenzzeit von circa drei bis fünf Tagen durch antegrade Masturbation in ein weithalsiges, steriles Plastikgefäß (Urinbecher steril, Hartenstein) gewonnen. Innerhalb einer Stunde sollte das native Sperma im IVF-Labor nach den Kriterien der WHO (1992), die von Eliassons (1971) definiert wurden, zum sogenannten Spermogramm aufgearbeitet werden. Die Spermienproben wurden vor und nach der Aufbereitung nach ihrem Volumen, der Spermienzahl, der Konzentration, der Motilität, der Vitalität, der Morphologie und der Anwesenheit von Leukozyten bewertet.

2.7.2. Aufbereitung der Spermien

Die Ejakulate können entweder mit der Aufschwimmethode (swim-up) oder der Zentrifugation über ein Spermienkissen mit swim-down-Phase (percoll cushion centrifugation) aufbereitet werden.

2.7.2.1. Swim-up-Methode:

Beim swim-up-Verfahren ließ man die motilen Spermien aus dem Seminalplasma in eine darüberliegende Schicht aus Kulturmedium wandern. Daran schloß sich eine zweimalige Waschprozedur an. Zunächst wurden folgende drei Arbeitsschritte ausgeführt. Erstens die Verdünnung, zweitens die Isolierung und Zentrifugation und drittens das Waschen der Spermien. Das native Ejakulat wurde auf zwei oder mehrere Röhrchen zur Zentrifuge (Fa. Falcon) verteilt und anschließend zehn Minuten lang bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben jeweils mit 1ml ASP Medium mit 2% HSA resuspendiert (Scandinavian IVF, Göteborg, Schweden). Dann wurde eine zweite und dritte Zentrifugation bei 145 g und zwei Minuten Dauer durchgeführt. Der flüssige Überstand wurde anschließend mit einer Pipette abgesaugt. Das Pellet, welches die Spermien enthielt, blieb im ursprünglichen Fläschchen und wurde mit ASP Medium resuspendiert, erneut zentrifugiert und dekantiert.

Nun folgte die eigentliche swim-up-Prozedur, die in drei Schritten ablief. Erstens das Überschichten, zweitens das Aufschwimmen und drittens die Gewinnung der motilen Spermien. Über das Pellet wurde das swim-up-Medium geschichtet und nach einer Inkubation von 30 bis 60 Minuten bei 37°C der Überstand mit den aufgeschwommenen Spermien vorsichtig abpipettiert. Die in dieser Fraktion enthaltenen motilen Spermien wurden durch erneutes Zentrifugieren isoliert (Zollner *et al.*, 2001).

2.7.2.2. Zentrifugation über ein Percoll-Kissen

Bei der Percoll-Kissen-zentrifugation und anschließender swim-down-Phase handelt es sich um eine neuere Methode der Aufbereitung von nativem Sperma. Es können eine große Zahl an motilen und morphologisch normalen Spermatozoen selektioniert werden. Dieses Verfahren ist besonders empfehlenswert für Ejakulate mit niedriger Spermiedichte.

Zur Herstellung eines Percoll-Kissens wurde eine isotone Percoll-Suspension mit niedriger Dichte verwendet (1,077 g/ml, Biochrom KG, Berlin, Deutschland; 40% Medicult, Kopenhagen, Dänemark). Diese wurden mit PBS (phosphate buffered solution) oder EBSS (Earle's balanced salt solution) gepuffert. Nun folgte das Mischen von 2 ml Percoll mit 0,2 ml mütterlichem Serum. Nach kräftiger Durchmischung wurde auf dieses Percoll-Kissen das 1:1 mit Ham's F-10 verdünnte Ejakulat in gleicher Menge darüberschichtet. Es folgte eine anschließende Zentrifugation der Ansätze für 15 Minuten mit einem Ausschwingrotor bei 300 xg. Der Inhalt des Zentrifugenröhrchens zeigte die typische Vierschichtung: Die übergeschichtete Phase enthielt das Seminalplasma, die auf dem Percoll-Kissen liegende Zwischenschicht trug Zellen, Detritus und Spermien mit geringer Dichte. Im Percoll-Kissen selbst befanden sich meist nur wenig Spermien. Der Niederschlag bestand aus reinen Spermien. Die Überstände wurden anschließend mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt, um das Seminalplasma, Detritus und den größten Teil des Percoll-Kissens zu entfernen. Das Pellet mit den Spermien wurde nun mit 300 µl Ham's

F-10 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde mehrfach wiederholt, um Reste des Percoll-Kissens von den Spermien zu trennen.

Für die anschließende swim-down-Phase wurde ein weiteres Percoll-Kissen hergestellt. In zwei Zentrifugenröhrchen wurde 1,5 ml einer Percoll-Suspension mit der Dichte von 1,1 g/ml gegeben (Mischung von Percoll-Suspensionen mit den Dichten 1,077 g/ml und 1,124 g/ml) und jeweils mit 0,35 ml mütterlichem Serum vermischt. Über diese Kissen wurde die Suspension der Spermien des ersten Arbeitsschrittes geschichtet (0,3 bis 0,8 ml). Für die folgende swim-down-Phase wurden die Ansätze bei 37°C für 1-4 Stunden inkubiert und die Spermien konnten nach unten schwimmen. Anschließend wurde der obere Teil des Percoll-Kissens vorsichtig abgesaugt. Zur Isolierung der Spermien erfolgte eine Verdünnung der Probe mit mindestens 3 ml Medium und ein 5-minütiges Zentrifugieren bei 300 xg. Um Reste des Percolls zu entfernen, wurde erneut resuspendiert und zentrifugiert (Zollner *et. al.*, 1998).

2.8. Beurteilung der Zygoten und Embryonen

Die Entwicklung der Embryonen wurde am ersten Tag im Vorkernstadium, am dritten Tag im Mehrzellstadium und am fünften Tag im Stadium der Blastozyste mikroskopisch bestimmt. Die Bilder wurden mit einer Kamera (Kamera CF 4/1 CCD-SW-Modul) und einem Videoprinter dokumentiert.

Eine angefertigte Meßschablone wurde mit einem Referenz-Meß-Objektträger geeicht, um das Photomaterial maßstabsgerecht zu vermessen. Nachdem alle Embryostufen morphologisch bewertet waren, wurde jeweils von allen Mehrzellern und Blastozysten die Dicke der Zona pellucida und der Durchmesser der Embryonen bestimmt.

Mit dem im Labor entwickelten detaillierten Bewertungssystem für die Vorkernstadien wurden die Embryonen bezüglich ihrer morphologischen Kriterien bepunktet. Von allen Embryonen am dritten Tag wurden der Embryoscore, der kumulative Embryoscore und der mittlere kumulative Embryoscore (Steer *et al.*, 1992) ermittelt. Die Reifegrade der Blastozysten am fünften Tag wurden mit Bezug auf ihre Morphologie und zeitliche Entwicklung in acht Grade skaliert.

2.8.1. Beurteilung der Vorkernstadien

Nach 14 bis 18 Stunden Bebrütung wurden die inseminierten Eizellen auf Zeichen einer Befruchtung inspiziert. Die Bildung eines zweiten Polkörperchens im perivitellinem Raum und die Kondensation zweier Vorkerne sind Zeichen einer normalen Befruchtung. Jede Eizelle wurde einzeln in einem Mikrotropfen mit 5-10µl Volumen IVFTM-Medium und darübergeschichtetem OvoilTM in einer Petrischale bebrütet. Die darin wachsenden Zygoten wurden im Inversmikroskop (400x) optisch inspiziert und mit dem hier entwickelten Score beurteilt.

Alle Zygoten im Stadium der Vorkerne wurden prospektiv morphologisch im Detail nach folgenden Kriterien begutachtet:

- (a) Stellung und Anzahl der Vorkerne
- (b) Reihung und Anzahl der Nukleolen innerhalb der Vorkerne
- (c) Größe der Vorkerne
- (d) Vakuolen im Ooplasma
- (e) Halo-Effekt
- (f) Granulierung des Ooplasmas

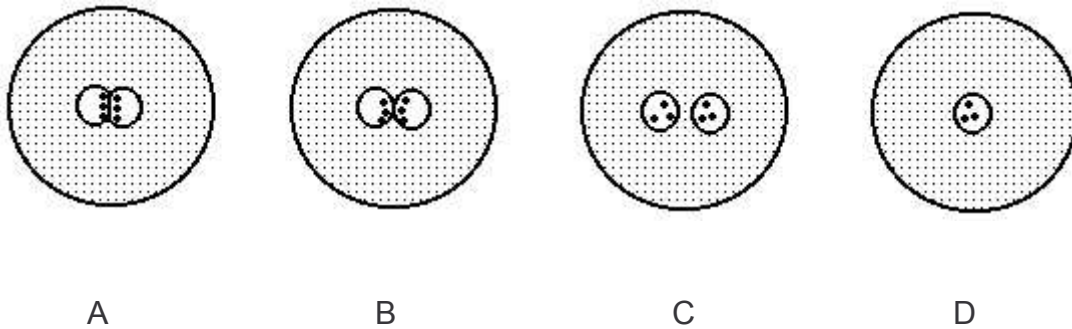
Bei allen Vorkernstadien wurde mit dem Protokoll zur Auswertung ein kumulativer Zahlenwert berechnet, welcher der Summe aller Einzelbewertungen entsprach. Je niedriger dieser Summenwert war, desto höher war das Potential der Zygoten mit Vorkernen in Hinblick auf deren weitere Entwicklung einzuschätzen. Die Reihenbildung der Nukleolen (alignment of nucleoli) an den Grenzflächen der Vorkerne und die Anzahl der Nukleolen innerhalb der Vorkerne wurde für jeden Vorkern einzeln bewertet. Mit der Fokussierung des Lichtmikroskopes in allen Ebenen des Vorkerns, konnte die Stellung und die Anzahl der Nukleolen vollständig bestimmt werden. Zur Ermittlung der genauen Stellung und Nähe der Vorkerne zueinander (Juxtaposition) wurden die Zygoten mit einer Injektionsnadel unter mikroskopischer Sicht vorsichtig gedreht bis die Äquatorialebene eingestellt war. Mit diesem Vorgehen konnte der genaue Abstand der Vorkerne bestimmt werden, da anderenfalls hierdurch eine optische Projektion der Vorkerne hinsichtlich der Horizontalebene zur Vortäuschung einer Juxtaposition geführt hätte.

Nach Erfassung aller relevanten Kriterien der Morphologie der Vorkerne wurden sie mit dem Punktesystem bewertet. Die beste Zygote konnte 10 Bewertungseinheiten erreichen. Der ungünstigste Score betrug 31 Einheiten. Eine Zygote mit einem einzigen Vorkern konnte 37 Punkte erhalten. Einkernige Vorkernstadien wurden im Rahmen dieser Studie bewertet, aber nicht ausgewählt, falls andere Zygoten zur Auswahl standen.

Zur weiteren Kultivierung wurden zwei oder drei Zygoten mit der niedrigsten Punktzahl ausgesucht. Von den ausgewählten Zygoten mit Vorkernen wurde ein kumulativer Vorkern-Score (Summe aller Vorkern-Scores der ausgewählten Zygoten) und ein mittlerer Vorkern-Score berechnet (Summe der PN-Scores / Anzahl der ausgewählten Zygoten). Das weitere Wachstum der ausgewählten Stadien wurde durch optische Inspektion und morphologische Beurteilung an den folgenden Tagen überwacht.

2.8.1.1. Position der Vorkerne zueinander

Die Entfernung der Vorkerne zueinander innerhalb des Ooplasmas gibt Auskunft über Vorgänge der Reifung des mikrotubulären Systems und der zeitlichen Synchronität der Kondensation der maternalen und paternalen DNA.



Skizze A:

Beide Vorkerne haben sich gegenseitig maximal angenähert. Die Membranen der Vorkerne drücken sich an der Stelle ihrer Berührung leicht konkav ein. Es wurde ein Punkt vergeben.

Skizze B:

Die beiden Vorkerne zeigen eine starke Annäherung oder berühren sich tangential. Es wurden zwei Punkte im Protokoll notiert.

Skizze C:

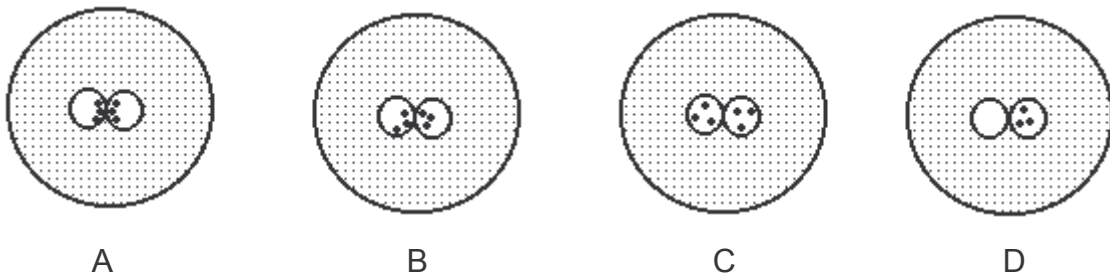
Die disjunkte Position der Vorkerne ohne gegenseitigen Kontakt im Ooplasma wurde mit drei Punkten beurteilt.

Skizze D:

Vier Punkte erhielten Vorkernstadien mit einem Vorkern. Je höher die vergebene Punktzahl war, desto ungünstiger war die Bewertung.

2.8.1.2. Anordnung der Nukleolen

Das Muster der Verteilung der Nukleolen erlaubt Rückschlüsse auf die Qualität der späteren Embryonen. Das Auftreten wird als erstes Zeichen der Aktivität der Transkription beschrieben und repräsentiert mikroskopisch sichtbare kondensierte DNA innerhalb der Vorkerne (Tesarik und Kopečný, 1989). Die Betrachtung dieser NPB-Nukleolen (nuclear precursor bodies) ist ein möglicher Ansatzpunkt, um deskriptiv die Qualität der frühen embryonalen Stadien zu bewerten. In dieser Studie wurde dieses Kriterium für jeden Vorkern einzeln erhoben.



Skizze A:

Die Reihung der Nukleolen entlang der tangentialen Achse an der inneren Membran der Vorkerne wurde mit einem Punkt bewertet. Sie galt als optimale morphologische Variante.

Skizze B:

Die Wanderung der Nukleolen zur Achse der Vorkerne mit beginnender Reihung der Nukleolen wurde mit zwei Punkten protokolliert.

Skizze C:

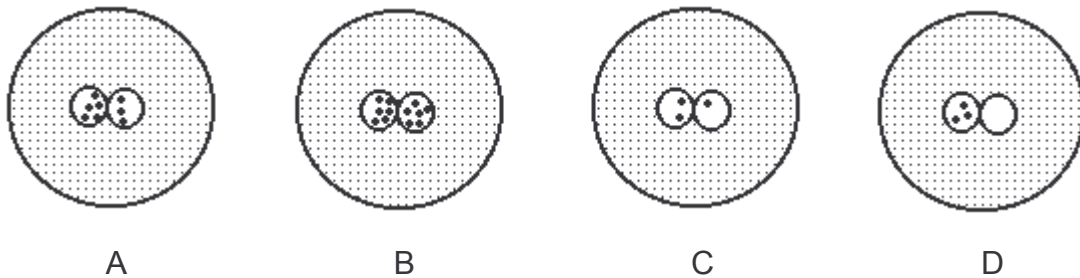
Die diffuse Verteilung der Nukleolen innerhalb der Vorkerne wurde mit drei Punkten notiert.

Skizze D:

Das Fehlen der Nukleolen in einem Vorkern oder ein fehlender Vorkern wurde mit vier Punkten im Protokoll vermerkt.

2.8.1.3. Anzahl der Nukleolen im Vorkern

Das Vorhandensein von drei bis fünf Nukleolen pro Vorkern korreliert empirisch mit einer guten Qualität der Embryonen. In dieser Studie wurde die Anzahl der Nukleolen für jeden Vorkern einzeln bestimmt.



Schema A:

Vorkerne mit jeweils drei bis fünf Nukleolen wurden mit einem Punkt protokolliert. Das war die optimale Bewertung.

Schema B:

Vorkerne mit mehr als fünf Nukleolen wurden mit zwei Punkten im Protokoll vermerkt.

Schema C:

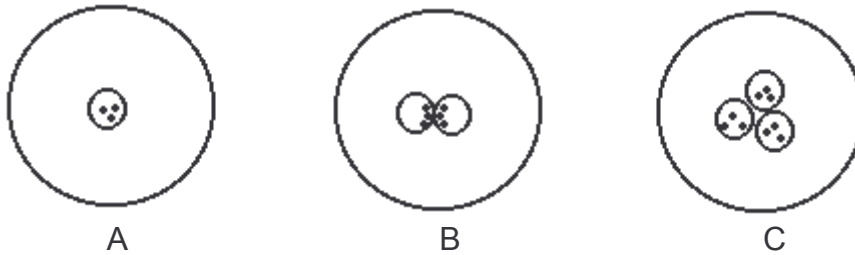
Unterschreitet die Anzahl der Nukleolen pro Vorkern den Grenzwert von drei Nukleolen notierte man drei Punkte.

Schema D:

Waren entweder keine Nukleolen im Vorkern identifizierbar oder fehlte ein Vorkern, so wurden vier Punkte notiert.

2.8.1.4. Anzahl der Vorkerne im Ooplasma

Befruchtete Eizellen bilden in der Regel zwei sichtbare Vorkerne. Sie repräsentieren kondensiertes genetisches Material. Der maternale und der paternale Vorkern enthalten jeweils den halben Chromosomensatz.



Schema A:

Bei Präsenz eines singulären Vorkernes wurden vier Punkte protokolliert.

Schema B:

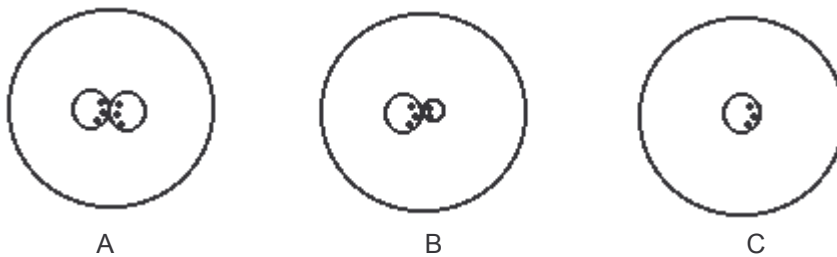
Sind zwei Vorkerne im Ooplasma sichtbar (normaler Zustand), wurde ein Punkt vergeben.

Schema C:

Vorkernstadien mit mehr als zwei Vorkernen wurden nicht in diese Studie eingeschlossen.

2.8.1.5. Größe der Vorkerne

Die asynchrone Entwicklung des genetischen Materials manifestiert sich durch ungleiche Größen der Vorkerne. Die embryonale Entwicklung kann ungünstig beeinflusst werden (Tesarik *et al.*, 1999).



Schema A:

Die Vorkerne im Ooplasma sind gleich groß. Es wurde ein Punkt im Protokoll vermerkt.

Schema B:

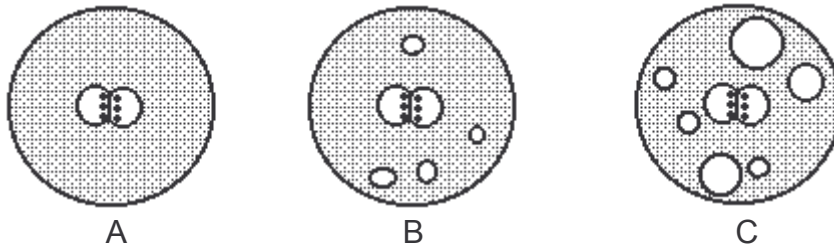
Bei ungleicher Größe der Vorkerne innerhalb des Ooplasma wurden zwei Punkte aufgeschrieben.

Schema C:

Die Anwesenheit eines singulären Vorkernes wurde mit vier Punkten bewertet.

2.8.1.6. Vakuolen im Ooplasma

Degenerative Veränderungen im Zytoplasma der befruchteten Eizelle können zu einer Vakuolisierung führen.



Schema A:

Das Fehlen einer Vakuolisierung gilt als günstiges prognostisches Kriterium. Dieser Zustand wurde mit einem Punkt bewertet.

Schema B:

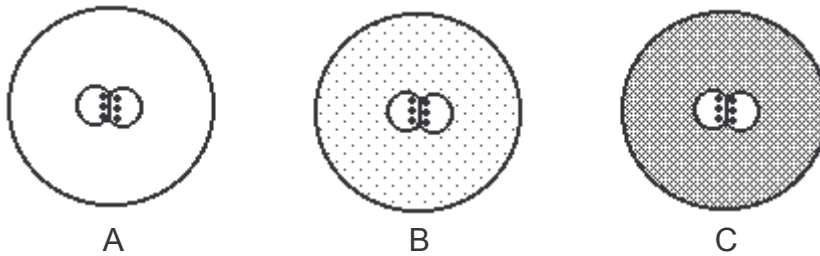
Eine leichte Vakuolisierung im Ooplasma wurde mit zwei Punkten bewertet.

Schema C:

Bei ausgeprägter Vakuolisierung des Ooplasma wurden drei Punkten vergeben.

2.8.1.7. Granulierung des Ooplasma

Eine verstärkte Granulierung des Ooplasmas der Zygoten mit Vorkernen kann einen anormalen Ablauf der Entwicklung anzeigen.



Schema A:

Zygoten mit einem homogenen und leicht granuliertem Ooplasma stellen einen normalen Befund dar. Im Protokoll wurde ein Punkt notiert.

Schema B:

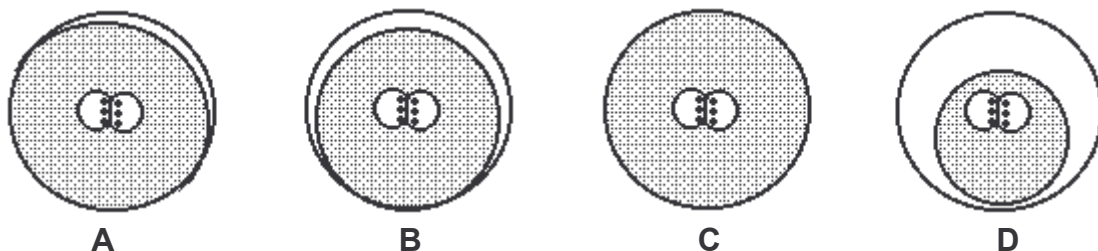
Vorkernzygoten mit grobscholligem Zytoplasma erhielten zwei Punkte.

Schema C:

Eine stark ausgeprägte Granulation des Ooplasma wurde, wie in Schema B, ebenfalls mit zwei Punkten protokolliert.

2.8.1.8. Halo-Effekt der befruchteten Eizelle

Payne *et al.* (1997) beschrieben die Ausrichtung zytoplasmatischer Organellen vom Rand der Eizelle weg in Richtung der zentral liegenden Vorkerne. Dieser Halo-Effekt ist lichtmikroskopisch mit einer Differential-Kontrast-Optik erkennbar. Er imponiert als hell und glatt begrenzter sichelartiger konvexer Saum im Randbereich der Eizelle. Eine Erklärung findet dieses Phänomen durch Vorgänge einer perinukleären Kondensation und der Ansammlung von Zellorganellen mit mitochondrialen Relokationen im Zentralbereich der Eizelle (Scott und Smitt, 1998; Payne *et al.*, 1997).



Schema A:

Ein leichter Halo-Effekt der Zygote wurde mit zwei Punkten ins Protokoll eingetragen.

Schema B:

Eine normale Ausprägung des Halo-Effekt wurde mit einem Punkt bewertet.

Schema C:

Bei Abwesenheit des Halo-Effektes im Randbereich der Zygote wurden vier Punkte vergeben.

Schema D:

Ein extrem ausgeprägter Halo-Effekt wurde mit drei Punkten notiert.

2.8.1.9. Punktesystem für die Vorkernstadien

In dem hier beschriebenen Punktesystem für Zygoten mit Vorkernen wurden die morphologischen Kriterien der Nähe der Vorkerne, der Halo-Effekt, die Reihung der Nukleolen für jeweils beide Vorkerne, die Größe der Vorkerne, die Vakuolisierung im Ooplasma, die Anzahl der Nukleolen in beiden Vorkernen, die Anzahl der Vorkerne und das Ausmaß der Granulierung des Ooplasmas bewertet. Die Ausprägung der einzelnen Merkmale wurde mit Punkten von eins bis vier skaliert. Dabei entsprach die niedrigste Punktzahl der günstigsten und die höchste Punktzahl der ungünstigsten morphologischen Ausprägung eines Merkmals.

Punkte:	1	2	3	4
Nähe der Vorkerne	sehr nahe	naheliegend	getrennt	nur ein Vorkern
Halo-Effekt	normal	leicht	extrem	kein Halo-Effekt
Reihung der Nukleolen im ersten Vorkern	Reihe	beginnende Reihung	zerstreut	keine Nukleolen oder kein Vorkern
Reihung der Nukleolen im zweiten Vorkern	Reihe	beginnende Reihung	zerstreut	keine Nukleolen oder kein Vorkern
Größe der Vorkerne	gleich	ungleich	-	nur ein Vorkern
Vakuolen	keine	leicht	stark	-
Anzahl der Nukleolen im ersten Vorkern	3-5	> 5	< 3	keine Nukleolen oder kein Vorkern
Anzahl der Nukleolen im zweiten Vorkern	3-5	> 5	< 3	keine Nukleolen oder kein Vorkern
Anzahl der Vorkerne	2	-	-	1 Vorkern
Granulierung des Ooplasmas	homogen	stark	-	-

Tabelle 2.3.1.9: Punktesystem für die Beurteilung der Vorkernstadien

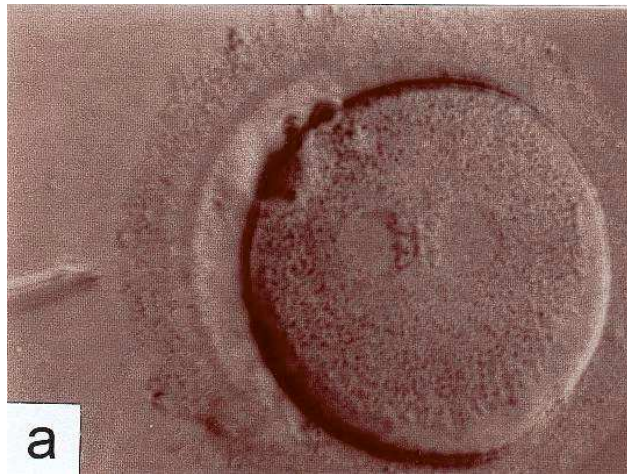
2.8.1.10. Bilder zu den Vorkernstadien

Abbildung 2.8.1.10.1:

Zwei Vorkerne mit gleicher Größe in unmittelbarer Nähe zueinander; normaler Halo-Effekt; Reihung der Nukleolen in beiden Vorkernen; Anzahl der Nukleolen in beiden Vorkernen beträgt 3-5; homogene Granulierung des Ooplasma und keine Vakuolen. Bewertung = 10 Punkte.

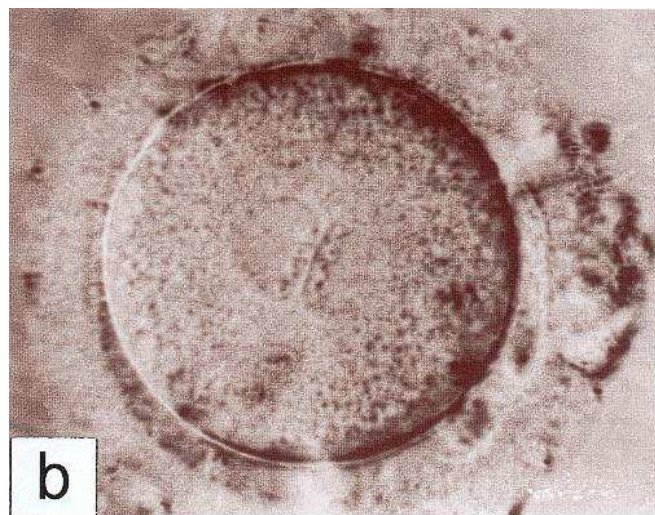


Abbildung 2.8.1.10.2:

Wie Bild a, jedoch mit leichterem Halo-Effekt. Bewertung = 10 Punkte

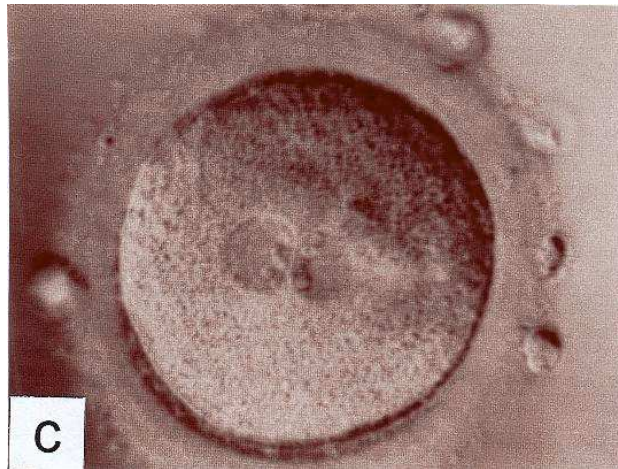


Abbildung 2.8.1.10.3:

Leichter Halo-Effekt und ungleiche Größe der beiden Vorkerne. Bewertung = 12 Punkte.

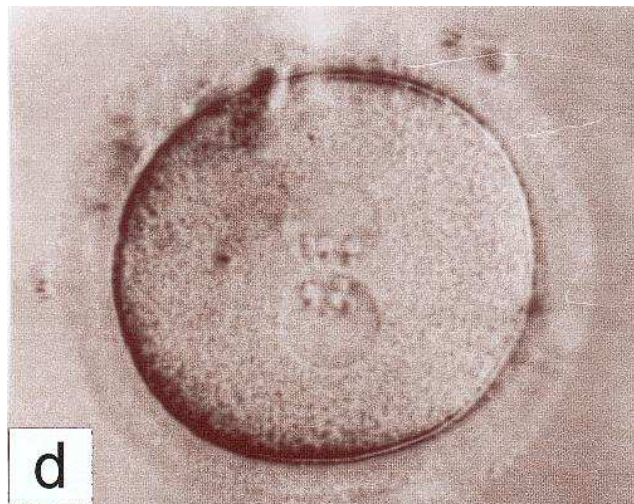


Abbildung 2.8.1.10.4:

Naheliegende Position der Vorkerne; kein Halo-Effekt; Anzahl der Nukleolen in beiden Vorkernen ist größer als fünf. Bewertung = 16 Punkte.

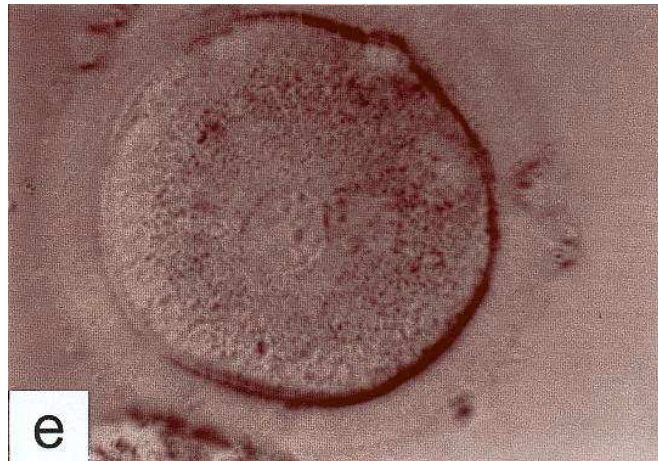


Abbildung 2.8.1.10.5:

Naheliegende und ungleich große Vorkerne; kein Halo-Effekt; beginnende Reihung der Nukleolen im zweiten Vorkern; Anzahl der Nukleolen im zweiten Vorkern ist größer als fünf. Bewertung = 17 Punkte.

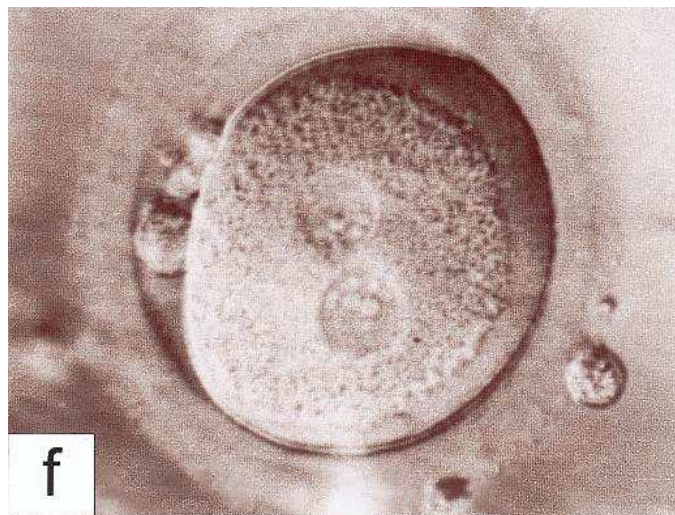


Abbildung 2.8.1.10.6:

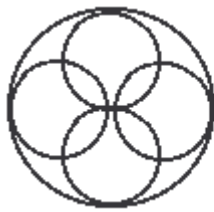
Zwei getrennt liegende Vorkerne mit extrem ausgeprägtem Halo-Effekt; beginnende Reihung der Nukleolen im zweiten Vorkern; Anzahl der Nukleolen in beiden Vorkernen ist größer als fünf. Bewertung = 17 Punkte.

2.8.2. Kultur der Mehrzeller (2-Zeller bis 8-Zeller)

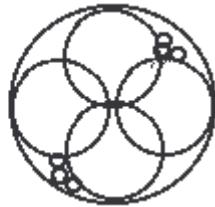
Die ausgewählten Zygoten mit Vorkernen wurden in das G1.2TM -Medium (Scandinavian IVF, Göteborg, Schweden) umgesetzt und weitere 48 Stunden im Brutschrank bebrütet. Anschließend wurden sie in das G2.2TM -Medium pipettiert (Scandinavian IVF, Göteborg, Schweden). Die Teilungsrate und die Morphologie der Mehrzeller wurden lichtmikroskopisch am dritten Tag erhoben. Wenn die Embryonen nach 48 Stunden Bebrütung mindestens sechs Blastomeren aufwiesen, so wurden sie in das G2.2TM -Medium umgesetzt, um die weitere Entwicklung zur Blastozyste zu optimieren. Zeigten die Embryonen aber noch nicht mindestens sechs Blastomeren, so wurden sie noch weitere vier Stunden im G1.2TM -Medium bebrütet und anschließend noch einmal mikroskopiert. Wenn auch sie mindestens das Stadium des Sechszellers erreicht hatten, wurden sie zur weiteren Bebrütung ebenfalls in frisches G2.2TM Medium gesetzt. Falls dies nicht der Fall war, wurden sie in frischem G1.2 Medium bis zum nächsten Tag weiter kultiviert und erneut beurteilt.

2.8.2.1. Morphologische Beurteilung der Mehrzeller

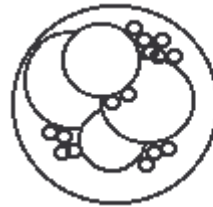
Steer *et al.* hatten 1992 ein Schema zur Bewertung der Mehrzeller entwickelt (Steer *et al.*, 1992).



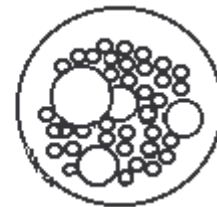
Grad 4



Grad 3



Grad 2



Grad 1

Grad 4: Sphärische Blastomeren gleicher oder ungleicher Größe, keine Fragmentation sichtbar, moderate Lichtrefraktibilität.

Grad 3: Ungleiche Größe der Blastomeren mit weniger als 10% Fragmentation, variable Lichtrefraktibilität.

Grad 2: Ungleiche Größe der Blastomeren, Ausmaß der Fragmentation zwischen 10 bis 50%.

Grad 1: Asymmetrische, asphärische Blastomeren ungleicher Größe mit einer Fragmentation größer als 50%. Steer *et al.* betrachteten diese Mehrzeller als ungünstigste Varianten in Hinblick auf eine normale weitere Entwicklung.

Das System der Bewertung der Mehrzeller beruht auf der Anzahl der Blastomeren und dem Ausmaß der Fragmentation innerhalb der Embryonen. Daraus kann man den Embryoscore pro Embryo ($ES = \text{Anzahl der Blastomeren} \times \text{Grading}$), den kumulativen Embryoscore ($CES = \text{Summe aller ES}$), sowie den mittleren kumulativen Embryoscore ($mCES = CES / \text{Anzahl transferierter Embryonen}$) berechnen (Steer *et al.*, 1992).

2.8.2.2. Anzahl der Blastomeren

Die Morphologie der Blastomeren ist günstig zu beurteilen, wenn sie sowohl Symmetrie der Achsen als auch eine Äquivalenz der Größe aufweisen. Die Membranen der Blastomeren kommunizieren mittels Mikrotubuli. Bis zum vierten Tag bilden Gap-Junctions primitive Desmosomen aus und Mikrovilli kontaktieren gegenseitig die benachbarten Membranen der Blastomeren in den interzellulären Lücken. Diese Bindungen lösen sich im Stadium des Sechs- bis Achtzellers zunehmend auf.

2.8.2.3. Fragmentation der Embryonen

Fragmentationen sind unregelmäßige Abschnürungen oder degenerierte Bestandteile durch suboptimale Ereignisse im Ablauf der Teilung. Das Fehlen einer Fragmentation ist ein Kriterium hochwertiger Embryonen.

2.8.2.4. Granulierung des Ooplasmas

Eine leichte Granulation des Ooplasmas wird mit einer normalen ungestörten Entwicklung assoziiert. Grobscholligkeit kann ein Indiz für denaturierende Ereignisse innerhalb des Zytoplasmas sein. Detrimentale Effekte auf die weitere Entwicklung der Embryonen sind nicht ausgeschlossen.

2.8.2.5. Wachstumsgeschwindigkeit

Mehrzeller mit kurzen Generationszeiten zum Vielzeller zeigen eine günstigere Entwicklung. Im Durchlaufen der morphologischen Stadien zur Blastozyste differenzieren sich neue Membranstrukturen und zelluläre Transportsysteme. Durch Bildung verschiedener Rezeptoren für Growth-Faktor (EGF) zeigen die Embryonen zunehmende Sensitivität bezüglich neuartiger Stimuli.

2.8.3. Blastozystenkultur und Beurteilung

Nach der Umsetzung der Mehrzeller mit mindestens sechs Blastomeren in ein frisches G2.2TM -Medium am dritten Tag wurden die Embryonen weitere 48 Stunden im G2.2TM -Medium bis zum fünften Tag bebrütet. Im Inversmikroskop erfolgte am fünften Tag die Ermittlung der Morphologie und des Reifegrades der Blastozysten. Indirekte Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit der Entwicklung lassen sich über den Reifegrad der Blastozysten (retardiert - normal - beschleunigt) ziehen (Bongso *et al.*, 1999).

Grad:	Zustand der Entwicklung der Blastozyste:
1	Voll expandierte Blastozyste
2	Expandierte Blastozyste
3	Frühe Blastozyste
4	Spät höhlender Embryo mit > 50% Blastozoel
5	Früh höhlender Embryo mit < 50% Blastozoel
6	Kompakter Embryo
7	Kompaktierender Embryo
8	Atretisches Furchungsstadium

Tabelle 2.8.3: Skalierung der Entwicklung der Blastozysten in Grade.

2.8.3.1 Aufbau und Morphologie der Blastozyste

Nach fünftägiger Bebrütung der Embryonen *in vitro*, sind deren Blastomeren zunehmend synzytiolytisch verschmolzen und zeigen eine Formierung zu inneren und äußeren embryonalen Zellen. Diese Embryonen bilden einen zunehmend mit Flüssigkeit gefüllten Hohlraum (Blastocoel) aus. Die Differenzierung in äußere und innere Zellen führt zur Polarisierung der Embryonen und der Ausbildung einer Animal-Vegetal-Achse. Die innere Zellmasse (ICM = inner cell mass) geht aus den inneren Zellen hervor. Aus ihr erfolgt die Entwicklung zum Embryoblasten und später die Progression zur Keimscheibe. Die äußeren Zellen zeigen eine Formierung zum Trophoblasten,

welche die Zona pellucida von innen epithelartig auskleiden und das Blastocoel in sich einschließen. Der frühe Trophoblast differenziert sich zum Trophektoderm und übernimmt die Vorgänge der Implantation. Der sich bildende Synzytiotrophoblast erfüllt nutritive und metabolische Funktionen.

2.8.3.2. Kompaktierender Embryo



Drei Tage nach der Bebrütung kommt es zur Bildung des kompaktierenden Embryo. Es ist eine zunehmende Lyse der Membranen der Blastomeren und eine beginnende Verschmelzung zu einer kompakten Zellmasse erkennbar.

2.8.3.3. Kompakter Embryo



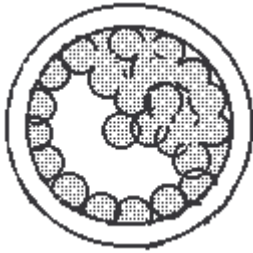
Im G2.2-Medium beginnen die einzelnen Blastomeren nach 72 Stunden unter zunehmender Auflösung ihrer Zellgrenzen zu verschmelzen und bilden ein synzytiales Netzwerk. Schließlich entsteht nach circa 96 Stunden der kompakte Embryo, bei dem keine Blastomeren mehr zu erkennen sind und der Prozeß der Verschmelzung vollständig abgelaufen ist.

2.8.3.4. Früh kavitierender Embryo



Etwa 96 Stunden (Tag 4) nach der Befruchtung beginnt der kompakte Embryo ein Blastocoel zu bilden, dessen Inhalt zunächst weniger als 50% der gesamten Masse des Embryo beträgt. Durch transzelluläre Vorgänge werden mittels ATP und der Beteiligung von Ca^{2+} Na^{+} -Ionen extrazellulär gepumpt. Es entsteht das Blastocoel.

2.8.3.5. Spät kavitierender Embryo



Etwa 100-120 Stunden nach der Befruchtung wird das Stadium des spät kavitierenden Embryos erreicht. Das Volumen des Blastozoels ist größer als 50% des Volumens des Embryos geworden.

2.8.3.6. Frühe Blastozyste



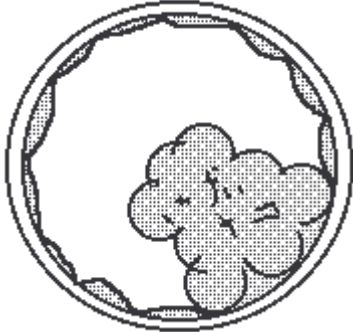
Nach etwa 120 Stunden (Tag 5) bildet sich eine deutlich differenzierbare innere Zellmasse. Das Trophektoderm hat sich als einzelne Zellschicht mit semisphärischen oder auch schon teilweise sichelzellartigen Zellen von innen epithelartig der Zona pellucida angelegt. Das Blastozoele vergrößert sich. Der Durchmesser der frühen Blastozyste expandiert weiter und es kommt zur weiteren Ausdünnung der Zona pellucida.

2.8.3.7. Expandierende Blastozyste



Ab 120 Stunden (Tag 5) ist eine gut abgrenzbare innere Zellmasse und ein dünnes sichelzelliges epithelartiges Trophektoderm zu erkennen. Die Höhle des Blastocoels nimmt an Volumen zu. Es kommt zur substantiellen Vergrößerung des Durchmessers der Blastozyste.

2.8.3.8. Voll expandierte Blastozyste



Nach 144 Stunden in Kultur hat die Zellzahl (TCN = total cell number) stark zugenommen. Die Zona pellucida ist verdünnt und das Blastozoele zeigt eine maximale Expansion. Der Durchmesser der Blastozyste beträgt nun etwas mehr als 200 μm . Die voll expandierte Blastozyste ist die reifste Form der Blastozyste. Durch weiteres Wachstum wird schließlich die starre Zona pellucida an ihrer schwächsten Stelle einreißen und unter dem starken Druck aufbrechen. Dann wird die Blastozyste aus ihrer Eihaut schlüpfen. Physiologisch repräsentiert die geschlüpfte Blastozyste das embryonale Stadium unmittelbar vor der Implantation.

2.8.3.9. Bilder zu den Blastozysten



Abbildung 2.8.3.9.1:
Atretisches Furchungsstadium

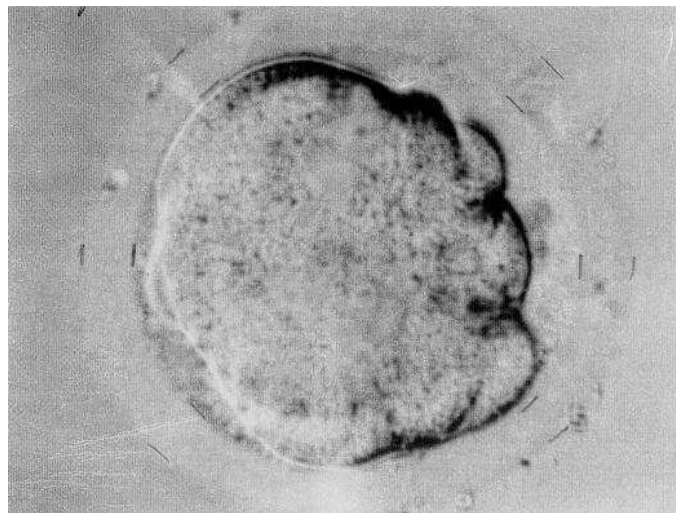


Abbildung 2.8.3.9.2:
Kompakter Embryo

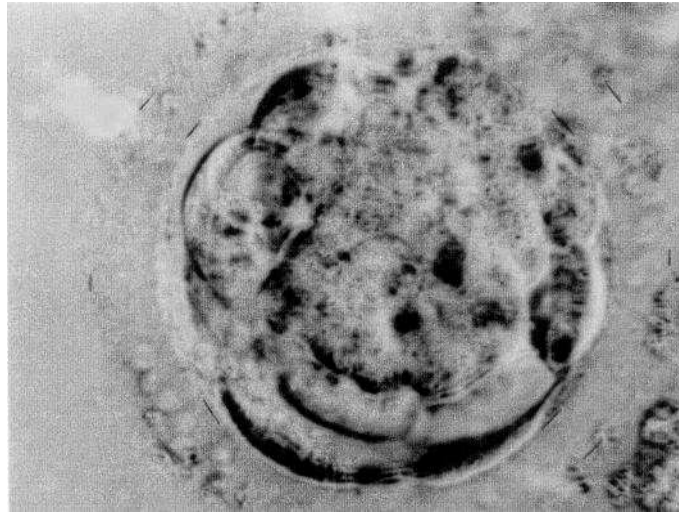


Abbildung 2.8.3.9.3:
Kavitierender Embryo

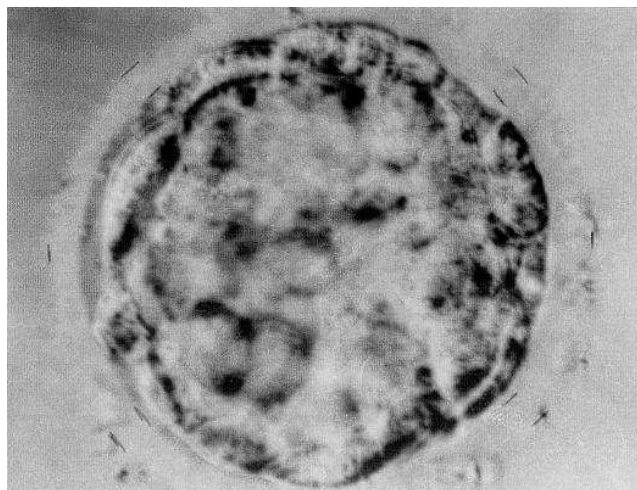


Abbildung 2.8.3.9.4:
Voll kavitierter Embryo

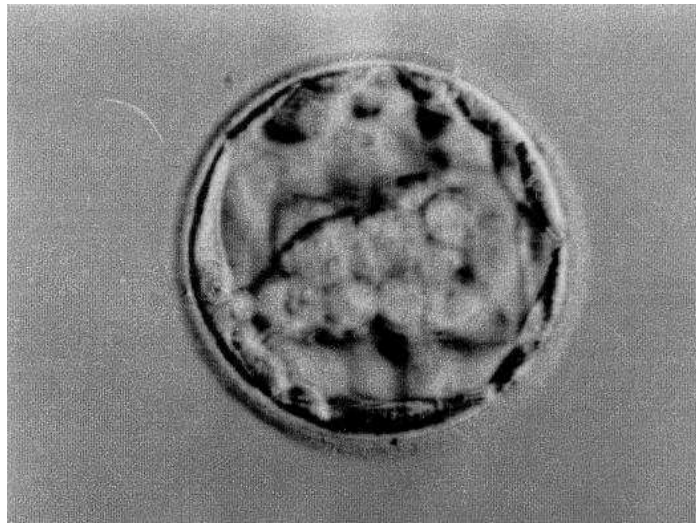


Abbildung 2.8.3.9.5:
Expandierende Blastozyste

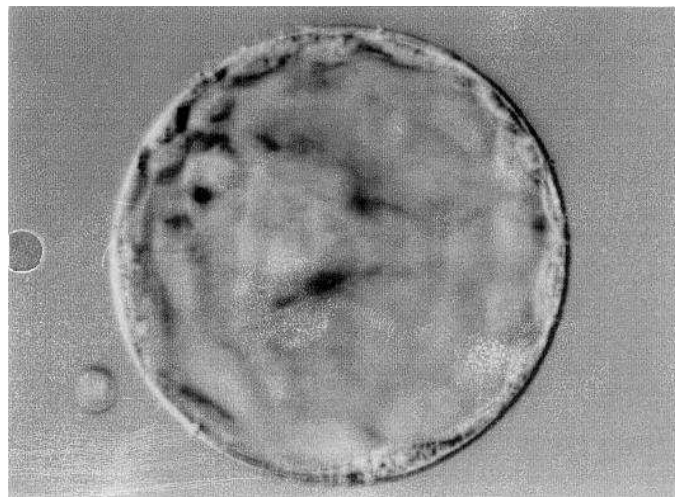


Abbildung 2.8.3.9.6:
Voll expandierte Blastozyste

3. Ergebnisse

3.1. Fertilisation und Schwangerschaft

Bei den 168 Patientinnen, die das IVF/ICSI Programm der Universitätsfrauenklinik Würzburg durchliefen, konnten 1450 Eizellen durch Punktion der Follikel gewonnen werden. 1119 Eizellen zeigten Zeichen einer erfolgreichen Befruchtung und erreichten nach 14 bis 18 Stunden Bebrütung das Stadium der Vorkerne. Unbefruchtete, degenerierte oder Eizellen mit einer anormalen Fertilisation (≥ 3 Vorkerne im Ooplasma) wurden ausgesondert. Befruchtete Eizellen wurden im Stadium der Vorkerne zur weiteren Bebrütung ausgewählt. Die überzähligen Zygoten wurden entweder verworfen oder auf Wunsch des Paares tiefgefroren. Insgesamt konnten 424 Zygoten mit Vorkernen ausgewählt werden. In fünf Zygoten kondensierte nur ein Vorkern, so daß die weitere Kultur der Embryonen unterblieb, da eine normale Entwicklung nicht zu erwarten war. Bei 97 Paaren war es möglich, die maximale Anzahl von drei Embryonen auszuwählen und anschließend zu transferieren. Bei 62 Paaren konnten zwei Embryonen weiterbebrütet werden und in neun Fällen war nur ein Embryo für eine weitere Bebrütung vorhanden. In den 67 ICSI Zyklen konnten signifikant mehr Eizellen gewonnen werden als in den 101 IVF Zyklen (ICSI im Median 10 (Bandbreite 1-19) versus IVF 7 (1-23), $p = 0,004$). Die Zahl der fertilisierten Eizellen war ebenfalls signifikant erhöht (IVF 6 (1-19) versus ICSI 7 (1-8), $p = 0,042$). Obwohl signifikant mehr Embryonen in ICSI-Zyklen als in IVF-Zyklen transferiert werden konnten (ICSI 3 (1-3) versus IVF 2 (1-3), $p = 0,008$), waren die Raten der Schwangerschaften zwischen den beiden Methoden der Behandlung kaum verschieden (ICSI 20,9 % versus IVF 18,8 % pro Transfer).

	Gesamt (n = 168)	IVF (n = 101)	ICSI (n = 67)	p
Alter (Jahre)	33 (23-42)	33 (25-41)	33 (23-42)	ns
Anzahl Oozyten	8 (1-23)	7 (1-23)	10 (1-19)	0,004
Anzahl Oozyten in Metaphase II	-	-	9 (1-18)	-
Anzahl fertilisierter Oozyten	6 (1-19)	6 (1-19)	7 (1-18)	0,042
Fertilisationsrate (%)	87,5 (17-100)	85,7 (17-100)	88,9 (27-100)	ns
Anzahl transferierter Embryonen	3 (1-3)	2 (1-3)	3 (1-3)	0,008
Implantationsrate pro transferiertem Embryo (%)	9,2	9,4	8,9	ns
Schwangerschaftsrate (%)	19,6	18,8	20,9	ns
Mittlerer Vorkern-Score	12,7 (10-21,5)	12,3 (10-21,5)	13 (10-19)	ns
Kumulativer Embryoscore	60 (12-192)	62 (16-160)	59 (12-192)	ns
Mittlerer kumulativer Embryoscore	24 (5,3-64)	24 (5,3-64)	24 (6-64)	ns
Mittlerer Blastozystengrad	5,7 (2-8)	5,7 (2-8)	5,5 (2,3-8)	ns

Tab. 3.1: Vergleich der Parameter der Fertilisation und der Kultur der Embryonen in der mit IVF (n = 101) und der mit ICSI (n = 67) behandelten Gruppe (Werte in Median und Bandbreite).

3.2. Spermaqualität bei IVF versus ICSI

Die Spermaparameter Volumen, Konzentration, Spermienanzahl, Motilität, Vitalität und Morphologie waren bei IVF-Paaren im natürlichen Ejakulat und nach Aufbereitung signifikant besser als bei Paaren, welche mit der ICSI-Methode behandelt wurden.

Die morphologischen Parameter der Zygoten mit Vorkernen wurden mit der Zahl der bebrüteten Blastozysten und der arretierten Embryonen verglichen. Signifikante Abhängigkeiten ließen sich für die Parameter Vakuolisierung, Halo-Effekt und die Größe der Vorkerne finden. Bei den restlichen morphologischen Kriterien wie Abstand der Vorkerne zueinander, Reihung der Nukleolen und Anzahl der Nukleolen innerhalb der Vorkerne sowie der Granulierung des Ooplasmas gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede in der Zahl der blastulierten Embryonen zur Anzahl der arretierten Embryonen.

3.3 Vorkernscore bei IVF versus ICSI

Der mittlere Vorkern-Score betrug bei den IVF-Zyklen im Median 12,3 (Bandbreite 10-21,5) und bei den ICSI-Zyklen 13,0 (10-19). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der IVF- und der ICSI-Methode.

3.4. Vakuolisierung und Entwicklung der Blastozysten

	starke Vakuolisierung	leichte oder keine Vakuolisierung	p
Blastozystengrad	8 (5-8)	6 (1-8)	0,019
arretierte Embryonen (%)	71	27	0,019

Tabelle 3.4: Zusammenhang der Entwicklung der Blastozysten zur Rate der arretierten Embryonen bei starker und leichter Vakuolisierung im Zytoplasma.

Bei starker Vakuolisierung der Vorkernstadien degenerierten 71 % der Embryonen. Dagegen betrug die Rate der arretierten Embryonen nur 27 %, wenn keine oder nur eine leichte Vakuolisierung sichtbar war ($p = 0,019$). Der mittlere Grad der Entwicklung der Blastozysten in stark vakuolisierten Embryonen betrug im Median 8 (Bandbreite 5-8) und in Embryonen mit leichter oder fehlender Vakuolisierung 6 (1-8) ($p = 0,019$).

3.5. Halo-Effekt und Blastulationsrate

	normaler oder leichter Halo-Effekt	extremer oder kein Halo-Effekt	p
Blastulationsrate (%)	47	29	0,041

Tabelle 3.5: Zusammenhang der Rate der Entwicklung zur Blastozyste bei normalem und anormalem Halo-Effekt.

Bei Vorkernstadien mit einem normalen oder leichtem Halo-Effekt betrug die Rate der Entwicklung zur Blastozyste 47 %. Bei Zygoten mit keinem oder sehr starkem Halo-Effekt dagegen nur 29 % ($p = 0,041$).

3.6. Vorkerngröße und Blastulationsrate

	Vorkerne gleich groß	Vorkerne ungleich groß	p
Blastulationsrate (%)	49	36	0,015

Tabelle 3.6: Zusammenhang der Rate der Entwicklung zur Blastozyste bei gleicher und ungleicher Größe der Vorkerne im Zytoplasma der Zygoten.

Die Rate der blastulierten Embryonen betrug bei Vorkernstadien mit gleich großen Vorkernen 49 %, aber nur 36%, wenn die beiden Vorkerne im Zytoplasma der Zygote unterschiedlich groß waren ($p = 0,015$).

3.7. Anzahl der Vorkerne

	1 Vorkern vorhanden	2 Vorkerne vorhanden	p
Blastulationsrate (%)	0	47	-

Tabelle 3.7: Zusammenhang der Entwicklung der Embryonen zur Blastozyste bei verschiedener Anzahl von Vorkernen im Zytoplasma der Zygoten.

Keine der Zygoten mit nur einem Vorkern entwickelte sich zu einer vitalen Blastozyste. Die Rate der Blastulation betrug bei Zygoten mit zwei Vorkernen 47%.

3.8. Berechnung des Eichfaktors

Die metrischen Maße der Zellen können nicht direkt gemessen werden, sondern nur über die optische Projektion auf eine transparente Meßskalierung im Okular. Um zu einer guten Genauigkeit und zu einer brauchbaren Reproduzierbarkeit der Meßwerte zu kommen, ist es nötig für jede Stufe der Vergrößerung einen definierten Eichfaktor zu bestimmen.

Ein Okularmikrometer (nominale Meßskalierung) wurde ins Okular eingesetzt und ein gläsernes Referenz-Objektmikrometer (rationale Skalierung: 200 Teilstriche entsprachen 2mm Länge) auf den Kreuztisch des Mikroskopes aufgelegt. Entsprechend dem Nonius-Prinzip wurden mehrere gleichartige Überschneidungen der Teilstriche im Okular- und Objektmikrometer aufgesucht und notiert. Der Eichfaktor wurde durch einer Meßreihe von zwei unabhängigen Untersuchern bestimmt.

Der Mittelwert aus 8 Meßwerten wurde als Eichfaktor (EF) zur späteren Bestimmung der wahren Größen verwendet. Um einen genauen Meßwert zu erhalten, wurden Meßreihen erstellt. Die jeweiligen Vergrößerungen wurden

einmal im 10x und zum anderen in der späteren Arbeitsvergrößerung im 20x Bereich berechnet.

Vergrößerung 10x								
Objektmikrometer	0,66	0,34	0,33	0,66	0,31	0,62	0,35	0,70
Okularmikrometer	64	33	32	64	30	60	34	68
Eichfaktor	10,31	10,30	10,31	10,31	10,33	10,33	10,29	10,29

Tabelle 3.8.1: Gemittelter EF_1 : $10,31\mu\text{m}$ (1 Teilstrich im Okularmikrometer entsprach $10,31\mu\text{m}$ in der 10x Vergrößerung)

Vergrößerung 20x								
Objektmikrometer	0,17	0,31	0,48	0,17	0,16	0,31	0,48	0,17
Okularmikrometer	33	60	93	33	31	60	93	33
Eichfaktor	5,15	5,16	5,16	5,15	5,16	5,17	5,16	5,15

Tabelle 3.8.2: Gemittelter EF_2 : $5,16\mu\text{m}$ (1 Teilstrich im Okularmikrometer entsprach $5,16\mu\text{m}$ in der 20x Vergrößerung)

$EF_1/EF_2 = 2$. Dies bewies gleichzeitig, daß sich die Vergrößerungen im 10x und 20x-Bereich verdoppelten.

Als nächstes wurden von zwei unabhängigen Untersuchern für alle Vergrößerungen des Mikroskopes (32x, 20x, 10x) vier Faktorwerte bestimmt. In diesem Verfahren wurden für eine Oozyte, die als Referenzzelle diente, die Teilstriche pro Stufe der Vergrößerung bestimmt (1 Teilstrich $\cong 10\mu\text{m}$).

32x Vergrößerung					Mittelwert
Objektmikrometer (µm)	0	4	18	32	
Okularmikrometer (TS)	0	12	56	100	
1/EF	0	0,33	0,32	0,32	0,32
Eichfaktor	0	3,33	3,21	3,20	3,25

Tabelle 3.8.3: Für die Oozyte konnten in der 32x Vergrößerung 50 Teilstriche (TS) ermittelt werden: $50 \text{ TS} \times 3,25 \mu\text{m}/\text{TS} = 162,3 \mu\text{m}$

20x Vergrößerung					Mittelwert
Objektmikrometer (µm)	0	7	21	96	
Okularmikrometer (TS)	0	13	40	96	
1/EF	0	0,53	0,525	0,521	0,525
Eichfaktor	0	5,38	5,25	5,21	5,28

Tabelle 3.8.4: Für die Oozyte konnten in der 20x Vergrößerung 30 Teilstriche (TS) ermittelt werden: $30 \text{ TS} \times 5,28 \mu\text{m}/\text{TS} = 158,4 \mu\text{m}$

10x Vergrößerung					Mittelwert
Objektmikrometer (µm)	0	22	52	82	
Okularmikrometer (TS)	0	22	50	79	
1/EF	0	1,0	0,96	0,96	0,97
Eichfaktor	0	10,0	10,4	10,37	10,26

Tabelle 3.8.5: Für die Oozyte konnten in der 10x Vergrößerung 16 Teilstriche (TS) ermittelt werden: $16 \text{ TS} \times 10,26 \mu\text{m}/\text{TS} = 164,16 \mu\text{m}$

Der arithmetische Mittelwert des Durchmessers der Oozyte aus den drei Messungen betrug $161,6\mu\text{m}$. Der größte Streuwert vom Mittelwert war $3,2\mu\text{m}$ entfernt. Daraus ließ sich für alle Vergrößerungen ein mittlerer metrischer Fehler von $\pm 2\%$ berechnen. Dieser Meßfehler ist für die optische Vermessung der Maße der Embryonen akzeptabel. Anschließend konnte für die Zygoten der Probanden der Durchmesser und die Dicke der Zona pellucida bestimmt werden. Die ausgezählte Anzahl der Teilstriche beim Okularmikrometer (keine Meßskalierung) wurde für die Durchmesser und Dicken der Embryonen in einer Tabelle erfaßt und dann mit dem entsprechenden Eichfaktor multipliziert.

3.9. Dicke der Zona pellucida und Gesamtdurchmesser

Von den Embryonen wurden am dritten und am fünften Tag Bilder mit einem Photoprinter angefertigt. Anschließend wurde mit Hilfe des Eichfaktors eine geeichte Meßschablone angefertigt und auf eine transparente Klarsichtfolie kopiert. Nun wurden jeweils die Dicken der Zonae pellucidae und die äußeren Durchmesser der Embryonen vermessen. Die Dicken und Durchmesser wurden als arithmetisches Mittel von drei um 120° versetzten Messungen an den Photos der Embryonen ermittelt.

	IVF	ICSI	p
Dicke der Zona pellucida der Zygoten am Tag 3 (μm)	$14,9 \pm 2,8$	$15,9 \pm 2,6$	0,01
Dicke der Zona pellucida der Blastozysten am Tag 5 (μm)	$13,9 \pm 3,3$	$15,4 \pm 3,1$	0,01
Durchmesser der Zygoten am Tag 3 (μm)	$159,2 \pm 6,0$	$159,7 \pm 6,6$	ns
Durchmesser der Blastozysten am Tag 5 (μm)	$162,9 \pm 8,9$	$161,8 \pm 6,7$	ns

Tabelle 3.9: Zusammenhang der Dicken der Zona pellucida und des Durchmessers der Zygoten am dritten Tag und der Blastozysten am fünften Tag der Bebrütung (Mittelwerte mit Standardabweichung).

Die Zonae pellucidae der mit IVF fertilisierten Embryonen waren am dritten und am fünften Tag signifikant dünner als die mit der ICSI-Methode befruchteten Embryonen. Bezüglich der Durchmesser am dritten und fünften Tag ließen sich zwischen den beiden Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

3.10. Embryodurchmesser und Blastozystenentwicklung

IVF:	Maße (μm)	Embryoscore	Blastozystengrad
Dicke der Zona pellucida am Tag 3	$14,9 \pm 2,8$	$p = 0,047$	ns
Dicke der Zona pellucida am Tag 5	$13,8 \pm 3,3$	ns	$p < 0,001$
Durchmesser der Zygoten am Tag 3	$159,4 \pm 6,2$	ns	ns
Durchmesser der Blastozysten am Tag 5	$162,8 \pm 8,9$	$p = 0,015$	$p < 0,001$

Tabelle 3.10: Zusammenhang der Dicken der Zona pellucida und der Durchmesser der Zygoten und Blastozysten am dritten und fünften Tag mit dem Embryoscore und der Entwicklung zur Blastozyste in der IVF-Population.

ICSI:	Maße (μm)	Embryoscore	Blastozystengrad
Dicke der Zona pellucida am Tag 3	$15,9 \pm 2,6$	ns	ns
Dicke der Zona pellucida am Tag 5	$15,4 \pm 3,2$	ns	$p = 0,002$
Durchmesser der Zygoten am Tag 3	$159,5 \pm 6,4$	ns	ns
Durchmesser der Blastozysten am Tag 5	$161,9 \pm 7,1$	$p = 0,001$	$p = 0,006$

Tabelle 3.10.2: Zusammenhang der Dicken der Zona pellucida und der Durchmesser der Zygoten und Blastozysten am dritten und fünften Tag mit dem Embryoscore und der Entwicklung zur Blastozyste in der ICSI-Population.

In der Kohorte der ICSI Embryonen ließ sich ein signifikanter Zusammenhang der Dicke der Zona pellucida am fünften Tag mit der Entwicklung der Blastozysten finden. Beim Durchmesser der Blastozysten am fünften Tag war sowohl der Embryoscore als auch der Blastozystengrad signifikant. Der Median des Embryoscores betrug 26,6 (Bandbreite 1 - 64). Der Grad der Entwicklung der Blastozysten war 5,6 (1 - 8). Die Durchmesser und Dicken sind als Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet worden.

Sowohl bei den Embryonen nach der IVF- als auch nach der ICSI-Methode ließen sich bezüglich des mittleren Vorkern-Scores, des kumulativen Embryoscores und des mittleren kumulativen Embryoscores keine signifikanten Unterschiede in der Dicke der Zona pellucida und des Durchmessers der Embryonen am dritten und fünften Tag finden.

3.11. Vorkernbeurteilung und Blastozystenentwicklung

Der mittlere Vorkern-Score war sowohl bei der IVF- als auch bei der ICSI-Methode in den Zyklen mit elektivem Transfer signifikant niedriger als in den Zyklen ohne elektivem Transfer der Embryonen. Standen mehr als zwei oder drei Zygoten mit Vorkernen zur Verfügung aus denen eine Auswahl für die Kultur der Embryonen getroffen werden konnte, wurden die Patientinnen dem elektiven Protokoll zugeordnet. Falls keine überzähligen Vorkernstadien vorhanden waren, wurden sie in das nicht elektive Protokoll aufgenommen. Von den ausgewählten Zygoten mit Vorkernen (n = 424) erreichten nach fünf Tagen Bebrütung 46 % der Embryonen das Stadium der Blastozyste. Die Verteilung der Reifegrade der Blastozysten zeigt die folgende Tabelle:

Grad	Entwicklungsstand der Embryonen	Häufigkeit (%)
(1)	voll expandierten Blastozyste	2 %
(2)	expandierende Blastozyste	6 %
(3)	frühe Blastozyste	12 %
(4)	spät kavitierender Embryo	12 %
(5)	früh kavitierender Embryo	14 %
(6)	kompakter Embryo (= Morula)	17 %
(7)	kompaktierender Embryo (= Morula)	9 %
(8)	atretisches Furchungsstadium	28 %

Tabelle 3.11: Darstellung der graduellen Skalierung der Entwicklung der Embryonen am fünften Tag in Kultur und deren Häufigkeiten.

Das Stadium der Morula erreichten 26% der Embryonen. Das ist die Summe der Häufigkeiten der kompakten Embryonen (Grad 6) und der kompaktierenden Embryonen (Grad 7). Die Häufigkeiten der Entwicklung der Embryonen waren zwischen den IVF und ICSI-Zyklen nicht signifikant verschieden. In Bezug auf die ICSI-Zyklen konnte eine signifikante Korrelation des mittleren Vorkern-Scores mit der mittleren Entwicklung der Blastozysten gefunden werden ($p =$

0,041). Bei den IVF-Zyklen war dieser Zusammenhang jedoch nicht signifikant ($p = 0,786$). Weiterhin korrelierte der mittlere Vorkern-Score signifikant mit dem Alter der Patientinnen ($p = 0,017$) und der Anzahl der gewonnenen Eizellen ($p = 0,022$).

3.12. Prädiktiver Grenzwert für die Blastozystenentwicklung

Für den Vorkern-Score konnte bei den ICSI-Zyklen durch serielle Analyse der Varianz ein Grenzwert von 15 Einheiten ermittelt werden. Wenn der Vorkern-Score größer als 15 Bewertungseinheiten war, so zeigte die Entwicklung der Embryonen zur Blastozyste eine signifikante Reduktion. Der Median des Grades der Blastozysten war 7 (Bandbreite 3-8). Bei einem Vorkern-Score von ≤ 15 Bewertungseinheiten, war die Entwicklung zur Blastozyste mit einem Median des Scores von 6 (Bandbreite 1-8) signifikant verbessert ($p = 0,012$). Darüber hinaus war bei einem Vorkern-Score ≤ 15 Bewertungseinheiten der Anteil arretierter Embryonen signifikant reduziert (22,6% versus 45 %, $p = 0,030$).

Hinsichtlich des Embryoscores, der prozentualen Entwicklung der Blastozysten und der Rate der Schwangerschaften zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vorkernstadien mit einem Score > 15 und ≤ 15 Einheiten.

In den ICSI-Zyklen mit einem Vorkern-Score ≤ 15 Bewertungseinheiten konnten gute Embryonen identifiziert werden. Sie bildeten signifikant mehr Blastozysten aus und gleichzeitig arretierten signifikant weniger Embryonen im Stadium des Mehrzellers als bei Vorkernstadien, die > 15 Bewertungseinheiten erhielten.

Wenn der mittlere Vorkern-Score > 15 Einheiten betrug, war danach die Rate der Schwangerschaften reduziert (14,3%). Embryonen mit einem mittleren Vorkern-Score ≤ 15 Bewertungseinheiten zeigten hingegen günstigere Schwangerschaftsraten (21,7%). Trotz der höheren Schwangerschaftsrate bei den Vorkernzygoten, die ≤ 15 Einheiten erzielten, war der Unterschied in der

Schwangerschaftsrate gegenüber den Pronukleusstadien mit > 15 Punkten nicht signifikant.

	PN-Score \leq 15	PN-Score > 15	p
Bewertung der Embryonen	24 (1-64)	18 (8-64)	ns
Grad der Blastozysten	6 (1-8)	7 (3-8)	0,012
Entwicklung zur Blastozyste (%)	47,8	30,0	ns
Arretierte Embryonen (%)	22,6	45,0	0,03
Schwangerschaftsrate (%)	21,7	14,3	ns

Tabelle 3.12: Vergleich der Entwicklung der Embryonen zur Blastozyste und zur Arretierung sowie die Rate der Schwangerschaften zwischen den Kohorten der Embryonen mit einem prädikativen Grenzwert von \leq 15 Punkten und > 15 Punkten in der Beurteilung der Vorkernstadien bei den ICSI-Zyklen (n = 67).

3.13. Embryotransfer und Schwangerschaft

Es konnte eine durchschnittliche Schwangerschaftsrate von rund 20 % pro Embryotransfer erzielt werden. Sie war sowohl in den IVF- (18,8 %) als auch in den ICSI-Zyklen (20,9 %) vergleichbar. Alle ausgewählten Zygoten im Vorkernstadium wurden bis zum fünften Tag bebrütet und anschließend transferiert. In den 168 Zyklen nach assistierter Befruchtung konnten 33 klinische Schwangerschaften erzielt werden. Neun Frauen hatten einen Abort. Sechs Schwangerschaften führten zu Zwillingen. 18 Frauen gebaren ein gesundes Kind. Die durchschnittliche Rate der Implantation pro Embryo betrug 9,2 %. (IVF 9,4%, ICSI 8,9 %). Die durchschnittliche Schwangerschaftsrate in Zyklen mit nicht elektivem (n = 61) Embryotransfer betrug 15 % (1 Embryo: Schwangerschaftsrate 22%; 2 Embryonen: 13%; 3 Embryonen 14 %). In Zyklen mit elektivem Transfer der Embryonen (n = 107) konnte eine Rate der Schwangerschaft von 22 % (2 Embryonen: 21 %; 3 Embryonen: 24 %) erreicht werden.

IVF-Methode:	elektiver Transfer	nicht-elektiver Transfer	p
Alter (Jahre)	33 (25-41)	34,5 (25-41)	ns
Anzahl der Eizellen	9 (2-23)	4 (1-13)	0,000
Fertilisationsrate (%)	85,7 (38-100)	92,3 (17-100)	ns
Anzahl transferierter Embryonen	3 (2-3)	2 (1-3)	0,031
Mittlerer Vorkern-Score	12 (10-15,5)	13,3 (10-21,5)	0,001
Kumulativer Embryo-Score	63 (16-160)	58 (16-128)	ns
Mittlerer kumulativer Embryo-Score	24 (5,3-64)	25,8 (8-64)	ns
Mittlerer Blastozystengrad	5,7 (2,3-8)	5,9 (2-8)	ns
Schwangerschaftsrate (%)	20,0	15,0	ns

Tabelle 3.13.1: Vergleich der Entwicklung der Vorkernstadien und der Embryonen sowie der Schwangerschaftsrate bei Patientinnen in den Gruppen des elektiven und des nicht elektiven Embryotransfers, die mit der IVF-Methode behandelt wurden (Angaben in Median und Bandbreite).

ICSI-Methode:	elektiver Transfer	nicht-elektiver Transfer	p
Alter (Jahre)	32 (23-42)	34 (24-42)	ns
Anzahl der Eizellen	11 (5-19)	6 (1-16)	0,001
Fertilisationsrate (%)	88,9 (27-100)	80 (29-100)	ns
Anzahl transferierter Embryonen	3 (2-3)	3 (1-3)	ns
Mittlerer Vorkern-Score	12,7 (10-16,3)	14 (11,5-19)	0,011
Kumulativer Embryo-Score	59,5 (18-160)	58 (12-192)	ns
Mittlerer kumulativer Embryo-Score	24 (6-64)	23,7 (12-64)	ns
Mittlerer Blastozystengrad	5,6 (2,3-8)	5,3 (2,6-8)	ns
Schwangerschaftsrate (%)	23,9	14,3	ns

Tabelle 3.13.2: Vergleich der Entwicklung der Vorkernstadien und der Embryonen sowie der Schwangerschaftsrate bei Patientinnen in den Gruppen des elektiven und des nicht elektiven Embryotransfers, die mit der ICSI-Methode behandelt wurden (Angaben in Median und Bandbreite).

3.14. Qualität der Blastozyste und Schwangerschaftserfolg

Zwischen den Frauen mit und ohne Eintritt einer klinischen Schwangerschaft, gab es in Hinblick auf das Alter, der Anzahl gewonnener Eizellen, der Rate der Fertilisation, der Anzahl transferierter Embryonen, dem mittleren Vorkern-Score und dem mittleren kumulativen Embryoscore sowie in der Qualität des Samens des Partners keine signifikanten Unterschiede.

Frauen, die mit der IVF- oder ICSI-Methode schwanger wurden, hatten im Vergleich zu den nicht schwangeren Frauen eine signifikant bessere mittlere Entwicklung der Blastozysten (4 versus 6, $p = 0,001$).

Frauen, welche durch die IVF-Behandlung eine Schwangerschaft erzielten, zeigten bezüglich des kumulativen Embryo-Scores einen signifikant besseren

Wert im Vergleich zu denen, die nicht schwanger wurden (80 versus 56, $p = 0,024$). Bei der ICSI-Behandlung war dieser Unterschied nicht signifikant. Patientinnen, denen Embryonen im Entwicklungsgrad 6 (kompakter Embryo), Grad 7 (kompaktierender Embryo) und Grad 8 (blockierter Embryo) transferiert wurden, erreichten keine Schwangerschaften. Auch kam es bei den 12 Patientinnen, denen morphologisch arretierte Embryonen transferiert wurden, zu keiner einzigen Schwangerschaft. Bei allen Frauen, die mit der IVF- oder ICSI-Methode therapiert und schwanger wurden, war in der Kultur der Embryonen mindestens eine Blastozyste vorhanden.

IVF-Methode: (n = 101)	schwanger (n = 19)	nicht schwanger (n = 82)	p
Alter (Jahre)	34 (26-38)	33 (25-41)	ns
Anzahl der Eizellen	8 (1-19)	7 (1-23)	ns
Fertilisationsrate (%)	83,3 (50-100)	87,5 (17-100)	ns
Anzahl transferierter Embryonen	3 (1-3)	2 (1-3)	ns
Mittlerer Vorkern-Score	12,7 (10-17)	12,3 (10-21,5)	ns
Kumulativer Embryo-Score	80 (40-109)	56 (16-160)	0,024
Mittlerer kumulativer Embryo-Score	30,7 (16,7-38)	24 (5,3-64)	ns
Mittlerer Grad der Blastozysten	4 (2,3-6)	6 (2-8)	0,001

Tabelle 3.14.1: Vergleich der Daten zur Fertilisation und Entwicklung der Embryonen in den Gruppen der Frauen, die schwanger und nicht schwanger wurden bei Therapie mit der IVF-Methode (Angaben in Median und Bandbreite).

ICSI-Methode: (n = 67)	schwanger (n = 14)	nicht schwanger (n = 53)	p
Alter (Jahre)	32,5 (26-40)	33 (23-42)	ns
Anzahl der Eizellen	11 (1-18)	9 (2-19)	ns
Fertilisationsrate (%)	88,9 (57-100)	89,9 (27-100)	ns
Anzahl transferierter Embryonen	3 (1-3)	3 (1-3)	ns
Mittlerer Vorkern-Score	12,8 (10-18,3)	13 (10-19)	ns
Kumulativer Embryo-Score	76 (43-128)	57 (12-192)	ns
Mittlerer kumulativer Embryo-Score	26 (14,3-64)	21,7 (6-64)	ns
Mittlerer Grad der Blastozysten	4,2 (2,3-7,5)	6 (2,6-8)	0,001

Tabelle 3.14.2: Vergleich der Daten zur Fertilisation und Entwicklung der Embryonen in den Gruppen der Frauen, die schwanger und nicht schwanger wurden bei Therapie mit der ICSI-Methode (Angaben in Median und Bandbreite).

4. Diskussion

4.1. Methoden der Bestimmung der Vitalität von Embryonen

Die absolute Vitalität der Embryonen kann nur durch ihre Fähigkeit der erfolgreichen Implantation in einen rezeptiven Uterus bestimmt werden. Wenn die Vitalität von Embryonen vor dem Transfer bestimmt werden soll, so stellt sich die Frage mit welcher Methode dies geschehen soll. Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten. So kann die Vitalität mittels der morphologischen zeitlichen Entwicklung oder mittels metabolischer Tests evaluiert werden. Für spezielle Fragestellungen stehen in Einzelfällen genetische Methoden zur Bestimmung der Vitalität der Embryonen zur Verfügung.

In einem IVF-Programm sollte auf alle Fälle die Vitalität der Embryonen erhoben werden, um folgend nur lebensfähige Embryonen mit hohem Potential zur Einnistung in den stimulierten Uterus zu transferieren und um die Effektivität des Verfahrens optimal zu gestalten. Die Morphologie der Embryonen und deren Wachstum repräsentieren zwar nützliche Informationen, sind aber keine absoluten Verfahren, um die Vitalität der Embryonen zu bestimmen. Vitale Embryonen resultieren aus einer normalen Fertilisation durch normale Gameten unter adäquaten Bedingungen der Bebrütung.

Ausschließlich nicht invasive Methoden zur Bestimmung der Vitalität der Embryonen können routinemäßig in einem Programm der künstlichen Befruchtung eingesetzt werden. Chromosomale Auffälligkeiten, welche die Vitalität negativ beeinflussen, spiegeln sich nur bedingt in der Morphologie der Gameten und Embryonen wieder. Die Bestimmung der Vitalität einzelner Embryonen wird oft dadurch larviert, daß in einem normalen IVF-Programm häufig mehrere Embryonen gleichzeitig transferiert werden müssen, um die Häufigkeiten bezüglich des Erfolges der Schwangerschaft anzuheben. Bei erfolgreicher Schwangerschaft kann aber aus der Kohorte transferierter Embryonen der vitalste Embryo mit höchstem Potential zur Implantation oft nicht sicher identifiziert werden.

4.1.1. Nicht-invasive Methoden

Embryonen werden normalerweise vor dem Transfer in den Uterus auf der Basis ihrer mikroskopischen Morphologie und ihres chronologischen Wachstums während der Bebrütung in Kultur evaluiert. Die Bestimmung der Morphologie kann in jedem Stadium der Entwicklung der Embryonen angewendet werden. Die Untersuchung der Vitalität anhand metabolischer Produkte des Stoffwechsels ist in der Regel erst im späteren Stadium der Blastozyste aussagekräftig.

4.1.1.1. Evaluierung der Morphologie der Zygoten

Die Tendenz einer befruchteten Eizelle zur Polarisierung genetischer Strukturen ist die Basis aller Systeme zur morphologischen Beschreibung der Zygoten mit Vorkernen. Es wird vermutet, daß in der Eizelle und in den Vorkernen Prozesse der Reifung stattfinden, die sich mikroskopisch in bestimmten morphologischen Mustern widerspiegeln. Es führt zur gezielten Annäherung der beiden Vorkerne und zur Reihung der Nukleolen innerhalb der Vorkerne. Ähnliche morphologische Abläufe wurden mittels zeitlich gesteuerter Cinematographie beobachtet. Diese lassen vermuten, daß die beobachteten Vorgänge koordiniert ablaufen, auch wenn eine große zeitliche Variation der Vorgänge innerhalb der Vorkerne beobachtet wurde (Payne *et al.*, 1997). Anfänglich wurde nur die Reihung der Nukleolen an der Berührungsstelle der Vorkerne als Auswahlkriterium genommen (Wright *et al.*, 1990). Das Aussehen des Ooplasmas und der Halo-Effekt sind aber auch wichtige Kriterien für die Auswahl der Zygoten.

Einige frühere Studien postulierten den Zusammenhang morphologischer Kriterien für die Auswahl vitaler Zygoten mit der späteren Entwicklung der Embryonen und dem Erfolg der Schwangerschaft. (Wright *et al.*, 1990; Balakier *et al.*, 1993; Van Blerkom *et al.*, 1995; Payne *et al.*, 1997; Scott und Smith 1998; Tesarik *et al.*, 1999).

Scott und Smith hatten 1998 ein System der Bewertung der Zygoten vorgeschlagen, das auf empirische Beobachtungen beruhte und es ermöglichte,

bereits im Stadium der Vorkerne hochwertige Zygoten auszuwählen. Die Annahme war, daß sich hochwertige Eizellen nach der Fertilisation in einem schnelleren Prozeß der Entwicklung befanden als andere. Die Grundlage ihres ersten klinisch anwendbaren Bewertungssystems basierte auf die Nähe der Vorkerne zueinander, der Verteilung der Nukleolen in den Vorkernen und dem Aussehen des Ooplasmas. In ihrem System maßen sie darüber hinaus den Zeitpunkt der Auflösung der Vorkerne und die Zeit bis es zur ersten Teilung der embryonalen Zellmasse in zwei Blastomeren kam. Ein frühes Auftreten dieser Ereignisse korrelierte mit einer hohen Schwangerschaftsrate. Dieses System war prospektiv konstruiert und sollte ursprünglich die Wahrscheinlichkeit der Implantation beim eintägigen Transfer erhöhen (Scott und Smith, 1998).

In Anlehnung an Scott und Smith (1998) modifizierten Ludwig *et al.* (2000) das Bewertungssystem, um es auch in Deutschland anwenden zu können. Sie wählten nur Kriterien aus, die ausschließlich im Stadium der Zygoten erhoben werden konnten. Der Zeitpunkt der Auflösung der Membranen der Vorkerne und die erste Teilung in zwei Blastomeren wurden nicht einbezogen. Sie fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Morphologie der Embryonen und dem kumulativen Score und konnten einen Schwellenwert berechnen, der es ihnen erlaubte, die prozentuale Wahrscheinlichkeit möglicher Schwangerschaften zu bestimmen.

Tesarik und Greco (1999) berichteten über ein modifiziertes Bewertungssystem, in welchem sie die Größe der Nukleolen, die Anzahl der Nukleolen und ihr Verteilungsmuster innerhalb der Vorkerne durch eine einfache und einmalige Beobachtung des Stadiums der Vorkerne bestimmten und damit das mögliche Potential zur Implantation der Embryonen voraussagen konnten. Das optimale Muster für das Arrangement der Nukleolen definierten sie als "pattern 0". Die Rate der arretierten Embryonen zwischen dem Stadium der 4- bis 8-Zeller war bei diesem optimalen Muster nur 8,5 %. Ihr Score berücksichtigte allerdings nur morphologische Kriterien innerhalb der Vorkerne. Sie empfahlen aber, daß es sinnvoll wäre, mehrere morphologische Systeme zur Beurteilung der Embryonen zu kombinieren. Der Vorteil des Systems von Tesarik (1999) gegenüber dem von Scott (1998) lag in der einmaligen

zeitsparenden Bewertung der Zygoten mit Vorkernen und der geringeren Anzahl zu evaluierender Parameter.

Scott und Alvero (2000) hatten einen verbesserten Score ausgearbeitet und führten den Z-Score ein, der die vorgeschlagenen sechs Muster der Morphologie ("pattern 0" bis "pattern 5") von Tesarik (1999) in vier Gruppen zusammenfaßte (Z1 bis Z4). Der Hauptaspekt der "Z-Bewertung" bezog sich auf die Größe, die Anzahl und die Verteilung der Nukleolen in den Vorkernen. Die Z1 und Z2 Zygoten entwickelten sich häufiger zu hochwertigen Blastozysten, während die Z3 und Z4 Zygoten ein ungünstigeres Potential zur Implantation zeigten, egal wie deren weitere morphologische Entwicklung war. Da der Z-Score nicht von äußeren Faktoren abzuhängen schien, vermuteten sie, daß der Z-Score das innere Potential der Oocyte selbst widerspiegelte, und daß eigentlich die Vorgänge der Umstrukturierung der rRNA Synthese beobachtet wurden. Abweichungen von bestimmten Mustern der Nukleolen legten die Vermutung nahe, daß eine asynchrone Entwicklung auf nuklearer wie auch auf zytoplasmatischer Ebene vorliegen könnte, die zu einer retardierten weiteren Entwicklung der Embryonen führen kann. Seitdem ein klarer Zusammenhang zwischen der Morphologie der Vorkernstadien und der Fähigkeit der Embryonen zu implantieren bekannt ist, wäre es sinnvoll, die Embryonen skaliert in mehreren Stufen ihrer Entwicklung zu bewerten und auszuwählen (Scott und Alvero, 2000).

Tesarik und Junka (2000) führten mit dem von ihnen empfohlenem System (Tesarik und Grecco, 1999) eine prospektive Studie mit ICSI-Zyklen durch, in der sie bewiesen, daß die von ihnen vermutete, retrospektiv postulierte verbesserte Implantationsrate tatsächlich erreichbar war. Sie fanden heraus, daß Embryonen, die im Vorkernstadium mit "pattern 0" bewertet wurden eine signifikant höhere Schwangerschaftsrate (44,8% versus 22,1%) und Implantationsrate (30,2% versus 11,2%) ergaben. Sie empfahlen, daß die Mitführung einer Bewertung der Vorkerne neben der Beurteilung der Embryonen am dritten Tag ein weiterer möglicher unabhängiger Faktor für die Auswahl der Embryonen sein könnte.

Wittemer *et al.* (2000) hatten schließlich in einer Studie mit 262 Paaren in IVF- und ICSI-Zyklen gezeigt, daß die prospektive Anwendung des Schemas von Tesarik (1999) zu einer signifikant besseren Qualität der Embryonen mit höherem Potential zur Implantation führte. Für jedes Muster der Zygoten wurde die weitere Entwicklung der Embryonen beobachtet. Die "pattern 0" Zygoten zeigten eine hohe Tendenz zur Entwicklung hochwertiger Embryonen. Der Transfer von mindestens einem "pattern 0" Embryo verbesserte signifikant die Einnistung gegenüber solchen Populationen in denen kein "Pattern 0" Embryo vorhanden war (39,3% versus 19,7%). Mit Bezug auf klinische Parameter wie Alter des Partners und der Ursache der Infertilität fanden sie keine Zusammenhänge mit den Mustern der Verteilung der Nukleolen (Wittemer *et al.*, 2000).

Garello *et al.* (1999) beschäftigten sich mit der Frage, ob die Stellung der Polkörperchen (PB) zueinander und die Orientierung der Vorkerne relativ zu den Polkörperchen mit der Morphologie der Embryonen assoziiert war. Weiterhin interessierte sie, ob die Stelle der Punktion der ICSI relativ zum ersten Polkörperchen eine veränderte Anordnung der Vorkerne und der Polarkörperchen nach sich zogen und wie sie mit einer veränderten Qualität der Embryonen korreliert waren. Sie wollten damit neue Kriterien einer morphologischen Evaluierung postulieren, da bis heute die relative Orientierung der Vorkerne zu den Polkörpern, die möglicherweise zytoplasmatische oder nukleare Rotierungen relativ zu den Polkörpern widerspiegeln können, bis jetzt selten beurteilt wurden. Sie fanden, daß die Orientierung der Polkörperchen relativ zur Achse der Vorkerne mit der Morphologie der späteren Embryonen korrelierte, aber der Abstand der Polkörperchen nicht mit der Morphologie. Signifikante Unterschiede zwischen der IVF- und der ICSI-Methode fanden sie in der Position der Vorkerne, einer irregulären Teilung und einer fehlenden Teilung in Blastomeren. Bezüglich der Schwangerschaftsraten waren beide Gruppen ähnlich (Garello *et al.*, 1999).

Fisch *et al.* (2001) unternahmen einen weiteren Versuch, um das Potential der Entwicklung früher embryonaler Stadien mit deren späterer Entwicklung zu korrelieren. Sie konstruierten in einem IVF-Programm einen

"Graduierten Embryo Score" (GES), der die Kriterien der Reihung der Nukleolen an der Achse der Vorkerne, die regelhafte Teilung, den Grad der Fragmentierung bei der ersten Zellteilung und die Anzahl der Blastomeren sowie die Morphologie der drei Tage alten Embryonen zu einem Score zusammenfaßte. Die beste Zygote konnte einen Wert von 100 Einheiten erhalten. Sie fanden, daß sich 64% der Embryonen mit einem GES von 90-100 Einheiten zu Blastozysten formierten, aber nur 31%, wenn sie mit 70-85 Einheiten beurteilt wurden. Mit einem Score von 70-100 Einheiten erreichten sie Implantationsraten bis 39%, während bei einer Bepunktung mit 0-64 Einheiten Implantationsraten bis 24% beobachtet werden konnten.

4.1.2. Evaluierung der Morphologie der Mehrzeller

Die embryonale Vitalität kann durch das morphologische Aussehen der Mehrzeller mit der Rate der Schwangerschaft korreliert werden. Die drei am weitesten verbreiteten Kriterien der morphologischen Bestimmung der Vitalität der Mehrzeller sind erstens die kontinuierliche Teilung, zweitens die Form und die relative Größe der Blastomeren und drittens der Anteil kernloser Fragmente. Systeme zur Beurteilung der Mehrzeller beruhen in der Regel auf einer 3-5 schrittigen Prozedur der Bewertung. Hochwertige Mehrzeller formen reguläre, symmetrische Blastomeren, die je nach Stand der Entwicklung eine bestimmte Größe haben und kaum Zeichen einer Fragmentation aufweisen (Hardarson *et al.*, 2001; Van Royen *et al.*, 2001; Visser und Fourie, 1993; Ziebe *et al.*, 1997). Embryonen mit ungünstiger Entwicklung zeigen hingegen ungleiche Größe der Blastomeren mit mehr als 50% Fragmentation (Bolton *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1991; Steer *et al.*, 1992). In 200 natürlichen Zyklen in denen jeweils ein Embryo transferiert worden war, fanden Monks *et al.* (1993), daß Embryonen mit guter Morphologie mit höherer Wahrscheinlichkeit implantierten. Sie zeigten, daß sich schnell wachsende Embryonen mit einer Fragmentation < 20% häufiger implantierten als solche mit höhergradiger Fragmentation. Auch Embryonen mit suboptimaler Morphologie führten zu einer signifikanten Anzahl von Schwangerschaften (Cummins *et al.*, 1986).

Steer *et al.* (1992) entwickelten einen Embryo-Score, der die Berechnung des absoluten embryonalen Beitrages zur Schwangerschaft pro transferiertem Embryo ermöglichte. Gleichzeitig konnte die Anzahl zu transferierender Embryonen berechnet werden. Der Nachteil dieses Scores lag darin, daß die Auswahl zum Zeitpunkt des Transfers stattfand und unklar blieb, welcher Mehrzeller sich tatsächlich in die Schleimhaut des Uterus implantierte. Der kumulative Embryoscore war nicht konstant und hing jeweils von der Anzahl der transferierten Embryonen pro Zyklus ab. Mehrere andere Systeme lehnten sich an die morphologische Beschreibung von zwei bis drei Tage alten Embryonen an, um die Implantations- und Schwangerschaftsrate zu berechnen.

Giorgetti *et al.* (1995) beschäftigten sich mit der Frage, welche Kriterien ein optimaler Embryo für einen Transfer haben sollte. Sie untersuchten 957 Transfers in denen jeweils nur ein Embryo transferiert wurde und postulierten, daß ein optimaler Embryo nach 48 Stunden Bebrütung ein Vierzeller mit symmetrischer Konfiguration der Blastomeren ohne Fragmentierung sowie ohne weitere morphologische Auffälligkeiten sein sollte. Diese Kriterien sind denen sehr ähnlich, die bereits Steer *et al.* (1992) vorgeschlagen hatten.

Ein indirekter Versuch die Vitalität der Embryonen zu bestimmen war von Gregory *et al.* (1994) unternommen worden. Sie untersuchten den Einfluß der proliferativen Kapazität des zellulären Komplexes der die Eizellen umgab. Sie fanden einen direkten Zusammenhang zwischen der proliferativen Kapazität der Corona-Zellen mit der Entwicklung der Embryonen. Wenn keine Replikation der Zellen stattfand, so kam es unabhängig von der Beschaffenheit der Eizellen und der Zygoten zu keiner einzigen Implantation.

4.1.1.3. Morphologie der Blastozysten

Die Entwicklung voll expandierender Blastozysten kann ein guter Anhaltspunkt für eine hohe Vitalität der Embryonen sein. Dokras *et al.* (1993) empfahlen ein System der Klassifikation der Blastozysten, das Parameter wie die Kavitation, die Ausdehnung des Blastozoels und Charakteristika der inneren Zellmasse evaluierte. Die Validität dieser Klassifikation wurde durch die Messung des sezernierten β -HGC der Blastozysten bestätigt. In einer Studie mit 317

Embryonen fanden Bolton *et al.* (1989), daß sich 20% gut bewerteter Embryonen zur voll expandierten Blastozyste entwickelten, aber auch 5% der schlechtesten Embryonen bildeten hochwertige Blastozysten. Dies bestätigte die Korrelation zwischen der Morphologie und der Vitalität. Es zeigte aber auch, daß manche Embryonen mit guter morphologischer Qualität nicht ultimativ vital und andere hingegen trotz schlechter morphologischer Bewertung vital waren. Fishel *et al.* (1995) fanden, daß nur 17,5% der expandierenden Blastozysten *in vitro* schlüpfen und konnten nachweisen, daß in einem IVF-Programm die Raten der Zellteilungen von 8 bis 51 Stunden streuten, aber Embryonen die schließlich schlüpfen, nur eine Streuung von 16 bis 23 Stunden hatten. Arbeiten an Embryonen mit Mäusen zeigten, daß das Schlüpfen eng mit der Implantation korrelierte (Cui *et al.*, 1993). Cohen *et al.* (1991) demonstrierten, daß es Korrelationen in der Dicke der Zona pellucida und der Implantation gab, welche die Idee vorschlugen, daß die Blastozyste durch eine schwache Stelle in der Zona pellucida schlüpfen.

Die Progredienz des Wachstums der Embryonen *in vitro* offenbaren brauchbare Informationen über die Vitalität der Embryonen. Cummins *et al.* (1986) fanden, daß schnell wachsende Embryonen mit einer Wachstumsrate von 110% bezogen auf die Verdopplung der zu erwartenden Blastomeren zu signifikant mehr Schwangerschaften führten. Dies war aber nur zu beobachten, wenn dies mit einer brauchbaren Qualität der Embryonen verbunden war. Diese Feststellung wurde dadurch bestätigt, daß die Teilungsraten von Mehrzellern die Entwicklung zur Blastozyste vor dem Stadium des 4-Zellers nicht sicher voraussagen konnte, wohingegen Embryonen mit geringer Fragmentation und regulärer Blastomerisation mit höherer Wahrscheinlichkeit zur Bildung vitaler Blastozysten tendierten. Interessanterweise fanden sie auch, daß Embryonen die sich in der erwarteten Zeit zum Achtzeller entwickelten auch häufiger den Zeitraum der Aktivierung des Genoms (Braude *et al.*, 1988) durchliefen und sich zur expandierten Blastozyste entwickelten. Gleichzeitig stieg mit dem Durchlaufen dieser kritischen Zeitspanne die Rate beobachteter embryonaler Blockierungen und damit des beobachteten embryonalen Zelltores an (Bolton *et al.*, 1989).

4.1.1.4. Metabolismus der Embryonen

Ein weiterer Versuch, die Vitalität der Embryonen zu bestimmen, ist die Möglichkeit entweder die Aufnahme von Nährstoffen oder die Sekretion metabolischer Produkte des Stoffwechsels in den Überständen der Kulturmedium zu messen. Zur Zeit stehen diese Prozeduren aber noch nicht routinemäßig in den Laboratorien zur Verfügung, da deren Anwendung noch relativ teuer und zeitintensiv sind.

Eines der wichtigsten Sekretionsprodukte im frühen Embryo ist das β -HCG. In der Regel wird es ab dem siebten Tag signifikant im Kulturmedium meßbar (Fishel *et al.*, 1985; Lopata *und* Lachlan Hay 1989). Obwohl β -HCG mRNA bereits im Stadium des 6-8 Zeller nachweisbar ist, erfolgt die Sekretion frühestens im Stadium der expandierten Blastozyste. Daraus läßt sich folgern, daß dieser Parameter für die Auswahl von Mehrzellern oder frühen Embryonen weniger gut geeignet ist.

O' Neill *et al.* (1988) und Collier *et al.* (1990) beobachteten, daß es eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von PAF (platelet activating factor) in Überständen aus Kulturen und dem Auftreten von Schwangerschaften gab. PAF spielt möglicherweise eine Rolle in der Qualität der Embryonen oder der Möglichkeit zu einer erfolgreichen Schwangerschaft, da eine Zugabe von PAF zu Kulturmedien die Rate der Implantation von 10,2% als Kontrollgruppe auf 17,3% an hob. Bezüglich dieses Faktors gibt es inkonsistente Meinungen und es kann der Schluß gezogen werden, daß dieser Faktor kaum ausreichenden prädiktiven Wert für klinische Anwendungen hat.

Es konnte nachgewiesen werden, daß ein Interleukin 1- α Spiegel in Überständen 24 bis 48 Stunden bebrüteter Embryonen zu signifikant mehr Schwangerschaften führten als bei solchen mit niedrigen Spiegeln. Interleukin 1- α stimuliert möglicherweise immunsuppressive Faktoren, die für die Implantation benötigt werden (Hamilton *et al.*, 1990).

Mittels Mikrospektrophotometrie konnte der Verbrauch an Sauerstoff von Embryonen bestimmt werden. Magnusson *et al.* (1986) berichteten, daß der O₂-Verbrauch von vital erscheinenden Blastozysten höher war (0,336 nl/h) als bei Embryonen mit pathologischen Auffälligkeiten (0,202 nl/h). Degenerierte

Embryonen zeigten nur einen O_2 -Verbrauch von 0,179 nl/h. Dieser Test war aber ebenfalls nicht selektiv genug, um frühe Embryonen auszuwählen.

Der Verbrauch der Embryonen von Glukose ist bis zum dritten Tag in Kultur nicht effektiv, da die Glykolyse noch nicht ausreichend aktiviert ist. Die Aufnahme von Zucker steigt zwischen dem dritten und vierten Tag der Kultivierung an. Obwohl die Aufnahme bei arretierten Embryonen niedriger war als bei solchen, die sich normal zur Blastozyste entwickelten, scheint dieser Test zur Zeit noch nicht für die frühe Auswahl vitaler Embryonen geeignet zu sein (Gott *et al.*, 1990).

Die Energiequelle für Embryonen vor dem Stadium der Morula ist hauptsächlich Pyruvat. Anhand von 73 Embryonen konnte gezeigt werden, daß bei fragmentierten oder arretierten Embryonen im Gegensatz zu gesunden Embryonen die Metabolisation von Pyruvat erniedrigt war. Interessant war ebenfalls die Feststellung, daß anormale Embryonen nicht in der Lage waren ihren Metabolismus von Pyruvat auf Glukose umzuschalten (Leese, 1987; Hardy *et al.*, 1989).

Das Stadium der Blastozyste scheint ein geeignetes Stadium für die Auswahl von Embryonen zu sein. Denn es erlaubt auf der einen Seite durch das geöffnete Zeitfenster der verlängerten Kulturen eine gute Beurteilbarkeit der Morphologie und der Beobachtung des Wachstums. Auf der anderen Seite könnte sich zukünftig die Möglichkeit anbieten, eine größere Anzahl metabolischer Tests zur Bestimmung der Vitalität der Embryonen durchzuführen.

4.1.2. Invasive Methoden der Bestimmung der Vitalität

Invasive Methoden zur Beurteilung der Vitalität von Embryonen sind nicht selten Verfahren, die zum Tod der Embryonen führen. Methoden wie das Färben von Blastomeren und deren genetisches Material (Hardy *et al.*, 1989) oder die Elektronenmikroskopie (Sathananthan *et al.*, 1982; Motta *et al.*, 1988) führen zwar zu wertvollen Informationen über den Embryo, aber sie zeigen nur einen augenblicklichen Ausschnitt aus der Entwicklung der Embryonen. Darüber hinaus ist man der Möglichkeit beraubt die echte Vitalität anhand des

Vermögens zur Implantation zu verifizieren. Für invasive Prozeduren werden nicht selten aggressive Methoden angewendet, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können. Die Repräsentanz der Vitalität einer Kohorte vitaler Embryonen kann durch alleinige Analyse eines einzigen Embryo möglicherweise verzerrt werden.

4.1.2.1. Detektion chromosomaler Auffälligkeiten

Die chromosomale Normalität ist essenziell für die Vitalität der Embryonen und kann in lebenden Zellen kaum durch morphologische Kriterien bestimmt werden, auch wenn bekannt ist, daß sich bestimmte genetische Störungen in einem bestimmten Ausmaß morphologisch widerspiegeln können. Eine nicht geringe Anzahl von Eizellen ist chromosomal geschädigt oder zeigt eine verfehlte Aktivierung des Genoms am dritten Tag der Bebrütung im Stadium des Mehrzellers. Die FISH Diagnostik menschlicher Embryonen zeigte bei Patientinnen mit schlechter Prognose, daß 57 % der Eizellen chromosomale Auffälligkeiten in sich trugen (Magli *et al.*, 1998). Während der Entwicklung zu Blastozysten selektierte sich eine Kohorte von Embryonen in Kultur selbsttätig (Menezo *et al.*, 1997). Die Kultivierung der Embryonen bis ins Stadium der Blastozyste bot keine absolute Sicherheit, daß diese Embryonen chromosomal normal waren, aber es hatte sich gezeigt, daß die Mehrheit der Embryonen, welche sich in einer verlängerten Kultur nicht zur Blastozyste entwickelten, häufig multiple chromosomale Aneuploidien auf den Chromosomen 16, 18, 21, X, Y aufgewiesen hatten (Jones *und* Trounson, 1998). Munné *et al.* (1998) fanden, daß die Aneuploidie signifikant mit dem Alter der Frauen anstieg. Da sich zur Zeit nur etwa 45 % aller befruchteten Eizellen zur Blastozyste entwickeln, favorisierte sich die Idee, daß die Bebrütung väterliche chromosomale Störungen aus der Kultur filtern könnte, weil in diesen Kulturen eine Tendenz der Degeneration aberranter Embryonen beobachtet wurde. Gianaroli *et al.* (1997) fanden, daß die genetische Präimplantationsdiagnostik zur Vermeidung des Transfers chromosomal abnormaler Embryonen führen kann. Infertile Patienten mit schlechter Prognose hatten eine hohe Rate chromosomal abnormaler Embryonen. Die Auswahl und der Transfer von

Embryonen mit normaler in-situ-Hybridisierung zeigte signifikante Auswirkungen auf die Implantation. Möglicherweise werden vitale Embryonen in einer Schar von Embryonen im verlängerten Kulturmedien begünstigt (Jones *und* Trounson, 1999). Anormale Veränderungen des väterlichen Genoms manifestieren sich aber phenotypisch nicht vor der Implantation im Uterus. Zwar eröffnet die Kultivierung der Blastozysten keine genaue Einsicht in genetische Abläufe, aber in Grenzen kann die normale morphologische Entwicklung der Embryonen beobachtet werden, wie sie am dritten Tag im Stadium des Achtzellers den Embryo über die Aktivierung des Genoms zur Morula und schließlich zur Blastozyste heranreifen läßt.

4.2. Methodik der Auswahl der Blastozysten

Der Transfer von Blastozysten erscheint gerechtfertigt, wenn dadurch ein Benefit für die betroffenen Patienten zustande kommt. Ein möglicher Vorteil der Auswahl vitaler Blastozysten kann sein, daß nur noch ein oder zwei Embryonen in den Uterus zurückgesetzt werden und dabei die Wahrscheinlichkeit der Schwangerschaft mit Mehrlingen minimiert werden kann. Ein weiterer Vorteil der Auswahl potenter Blastozysten liegt in den verlängerten Bedingungen der Kultur, die zwar nicht die Qualität der Embryonen verbessert, aber Störungen offenbaren kann. Nach dem Stadium des Achtzellers kann durch die Aktivierung des Genoms die echte innere Physiologie der Embryonen beobachtet werden. Weiterhin eröffnet eine Biopsie im Stadium einer gut differenzierten Blastozyste die Entnahme von Trophektoderm und ermöglicht die Suche nach genetischen Krankheiten. Der Embryo selbst bleibt unbeschadet und der theoretische Schaden am Embryo kann minimiert werden.

Mit zunehmendem Alter der Frauen sinkt deren Fertilität und es kommt zur Reduktion der Anzahl vitaler Embryonen, die das Stadium der Blastozyste erreichen. Damit ist die Rate der expandierten Blastozysten reduziert. Wenn jedoch das Stadium der Blastozyste erreicht wurde und ein Embryotransfer folgen konnte, so waren trotzdem hohe Implantationsraten auch für Patienten, die älter als 40 Jahre waren, beobachtet worden. Nach dem Transfer von

Blastozysten ist der Anteil der Aborte nicht linear mit dem Alter der Patienten gestiegen (Janny *und* Menezo 1996).

Die in bisherigen Programmen transferierten Mehrzeller sind für die Implantation in die Gebärmutter um etwa einen bis zwei Tage zu jung. Im natürlichen Reproduktionstrakt wären sie noch im Eileiter. Die Reifung bis zur Blastozyste kann zu einer physiologischen Synchronisation der Embryonen mit dem weiblichen Reproduktionstrakt führen. Nicht alle Embryonen, die das Stadium der Blastozysten erreichen sind qualitativ gleichwertig. Die Rate der Bildung von Blastozysten beträgt ca. 45-55% und die Rate der verwendbaren Blastozysten etwa 35-40%. Tucker *et al.* (1999) empfehlen, den ICM/TE-Quotienten zu bilden und darüber hinaus die Integrität der Blastozyste zu bestimmen, um die embryonale Vitalität vorherzusagen. Es gibt eine starke Relation der embryonalen Entwicklung mit der potentiellen Vitalität, aber eine langsamere Entwicklung bestimmter Subpopulationen ist nicht völlig inkompatibel mit der Möglichkeit erfolgreicher Schwangerschaften. Die frühe Bestimmung der embryonalen Morphologie im Stadium der Zygote oder der Mehrzeller sind wichtig und haben ihren Platz, aber sie können kaum der Evaluierung der Morphologie in späteren Stadien der embryonalen Entwicklung überlegen sein, wenn man optimale Bedingungen der Kultur voraussetzt. Hochwertige Blastozysten entwickeln sich aus hochwertigen Oozyten und vitalen Spermien. Die erweiterte Kultur mit dem Stadium der Blastozysten verbessert die Qualität der Embryonen nicht, sondern enthüllt lediglich deren Potential.

Obwohl die Verfahrensweise der Züchtung von Embryonen bis zur Blastozyste Vorteile anbieten kann, gibt es auch Nachteile.

Einige Patienten (ca. 7%) werden mit der Enttäuschung konfrontiert, daß keine vitalen Embryonen zur Verfügung stehen, weil sich alle Embryonen in der Kultur nicht über den Mehrzeller hinaus entwickelten oder die Blastozysten vor dem Transfer abgestorben sind.

Weiterhin ist bekannt, daß die heutigen Verfahren der Bebrütung gehäuft zu monozygoten Zwillingen und den damit verbundenen Risiken einer iatrogen induzierten Schwangerschaft mit Mehrlingen führen können.

Als weiterer Nachteil ist zu nennen, daß Embryonen im Stadium der Blastozyste im Ausland tiefgefroren werden dürfen und diese Stadien empfindlicher auf die Tiefkühlung reagieren als frühe Zygoten oder Mehrzeller. Im Falle eines Scheiterns des Transfers stehen dann im ungünstigen Fall keinerlei Embryonen zur Verfügung.

Ein anderer Aspekt ist, daß Blastozysten in Kultur eine zunehmende Aushärtung der Zona pellucida zeigten. Dies kann ein verzögertes Schlüpfen begünstigen und die Implantation ungünstig beeinflussen. Gonzales und Bavister (1995) konnten bei tierischen Embryonen zeigen, daß der Vorgang des Schlüpfens *in vitro* durch die Vorgänge der Ausdehnung des Blastozoels, der Ausdünnung der Zona pellucida und das Ausschlüpfen unter hydrostatischem Druck durch eine Schwachstelle in der Zona pellucida erfolgte. Im Gegensatz dazu konnten sie aufzeigen, daß *in vivo* die Blastozysten eine schmale Zona pellucida und ein nicht bis zum perivitellinen Raum expandiertes Blastozoel hatten. Das Schlüpfen erfolgte vielmehr durch eine kontinuierliche Auflösung der Zona pellucida mittels proteolytischer Enzyme, die am Vorgang der Implantation beteiligt waren (Gonzales *und* Bavister, 1995). Es ist anzunehmen, daß dieser Zusammenhang auch bei menschlichen Embryonen besteht und die Kulturen bis zur Blastozyste die Aushärtung der Zona pellucida mit erschwertem Schlüpfen begünstigen können.

Um das Schlüpfen der Embryonen assistiert zu erleichtern, gibt es mittlerweile mehrere Verfahren, wie zum Beispiel das enzymatische Aufbohren der Zona pellucida (zona drilling) oder die partielle Dissektion der Zona. Als weiteres besteht die Möglichkeit durch den tangentialen Beschuß der Eihaut mit einem feinen Laserstrahl eine rillenförmige Sollbruchstelle in der Zona pellucida zu etablieren. Cohen *et al.* (1990) empfahlen das assistierte Schlüpfen bei Embryonen mit dicker Zona pellucida, einem Patientenalter > 38 Jahre und Frauen mit einem erhöhten FSH-Spiegel im Blut.

4.3. Diskussion des Transfers von Mehrzellern oder Blastozysten

Weiterhin wird kontrovers diskutiert, ob der Transfer von Blastozysten dem Transfer von Mehrzellern überlegen ist. Einige Studien empfahlen den Transfer von Zygoten (Scott *et al.*, 1998) oder Mehrzellern (Ziebe *et al.*, 1997; Steer *et al.*, 1992), andere Studien favorisierten den Transfer von Blastozysten (Bongso *et al.*, 1994; Gardner *et al.*, 1998a/b; Del Marek *et al.* 1999). Wiederum andere sahen keinen Unterschied zwischen dem Transfer von Mehrzellern oder Blastozysten (Scholtes *et al.*, 1996; Coskun und Hollander 2000; Racowski *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2000).

Coskun und Hollander (2000) verglichen die Resultate von Transfers am dritten mit dem fünften Tag in einer prospektiven randomisierten Studie. Sie fanden, daß die Raten der Implantation und der Schwangerschaften des Transfers am fünften Tag signifikant durch die Anwesenheit mindestens einer Blastozyste und der Anzahl der verfügbaren Zygoten am ersten Tag abhing, daß aber Mehrzeller am dritten Tag mit guter Morphologie zu ähnlichen Raten führten. Sie kamen zu dem Schluß, daß zur Zeit kein Vorteil zwischen dem Transfer am dritten oder fünften Tag besteht.

Racowski *et al.* (2000) sahen in der Anzahl der gewonnenen Achtzeller einen Schlüssel zur Entscheidung für die Auswahl eines Transfers am dritten oder fünften Tag. Wenn ein oder zwei Achtzeller am dritten Tag zur Verfügung standen, so waren im Vergleich zum Transfer am fünften Tag keine Unterschiede hinsichtlich der Implantation nachweisbar und sie favorisierten den Transfer am dritten Tag. Mit mehr als drei Embryonen am dritten Tag favorisierten sie den Transfer am fünften Tag, der zur Reduktion der Gestation mit Mehrlingen führen kann. Dieser Transfer wies aber keine Unterschiede zum Transfer am dritten Tag bezüglich der angehenden Schwangerschaften auf.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Scholtes *et al.* (1996) und Banerjee *et al.* (2000). Unter der deutschen Bedingung, daß bestenfalls drei Eizellen ausgewählt oder höchstens drei Eizellen bebrütet werden dürfen, bietet der Transfer von Blastozysten im Vergleich zum konventionellen zweitägigen oder dreitägigen Transfer von Mehrzellern kaum einen zusätzlichen Nutzen an.

Del Marek *et al.* (1999) kamen zu dem Schluß, daß der Transfer von Blastozysten zu erhöhten Erfolgsraten führt und empfahlen, daß bei Patienten, die jünger als 35 Jahre sind ein singulärer Transfer von Blastozysten erfolgen sollte. Eine Auswahl der Embryonen im Stadium der Blastozyste mit entsprechenden morphologischen Kriterien kann die Möglichkeiten einer akzeptablen Implantationsrate verbessern (Bongso *et al.*, 1994). Gardner *et al.* (1998) berichteten, daß die durchschnittliche Anzahl vitaler Blastozysten in Kultur pro Zyklus und Patientin bei 5,4 Blastozysten lag. Dies könnte es ermöglichen zwei oder drei hochwertige und vitale Blastozysten nach fünf Tagen Bebrütung mittels morphologischer Kriterien aus einer Gruppe von Blastozysten auszuwählen.

Gardner *et al.* (1998a) konnten zeigen, daß ausgewählte Embryonen mit folgendem Transfer als Blastozyste verdoppelte Raten der Implantation zeigten als solche Embryonen, welche nur bis zum dritten Tag bebrütet wurden. Zur Erzielung ähnlicher Schwangerschaftsraten mit dreitägigen Embryonen ist der Bedarf an Embryonen höher als bei einem Transfer nach fünf Tagen. Die Blastozysten könnten die Möglichkeit optimal adaptierter Embryonen mit hohem vitalem Potential anbieten (Gardner *et al.*, 1998a). Mit einer hohen Erfolgsrate ist aber nur zu rechnen, wenn Embryonen auf jeder Stufe ihrer Entwicklung ausgewählt werden dürfen, also auch auf der Stufe der Blastozyste. Die Rate der Implantationen mittels Blastozysten war ebenfalls in einer prospektiven randomisierten Studie höher als in einer normalen 3-Tage Kultur (Gardner *et al.*, 1998b).

Ein weiterer wichtiger kontroverser Streitpunkt ist, wie viele Embryonen pro Transfer übertragen werden sollten. Damit beschäftigten sich Studien von Shulman *et al.*, (1993); Kodama *et al.*, (1995); Svendsen *et al.*, (1996); Wu *et al.*, (1996), Hu *et al.*, (1998) und Wheeler *et al.*, (1998).

4.4. Diskussion der Ergebnisse

4.4.1. Das System der Bewertung der Vorkerne

Das Ziel dieser Studie war die prospektive Beschreibung deskriptiver morphologischer Kriterien von Zygoten, um mit hoher Wahrscheinlichkeit die Entwicklung vitaler hochwertiger Blastozysten vorauszusagen. Es galt, ein klinisch applikables aussagekräftiges Schema zur Beurteilung der Qualität und zur Auswahl der Zygoten zu entwickeln, um den Bedürfnissen der in Deutschland geltenden Bestimmungen gerecht zu werden. Das in dieser Studie verwendete Schema zur Beurteilung der Zygoten mit Vorkernen ist detailliert und definiert sowohl nukleäre als auch extranukleäre morphologische Kriterien, die mit der Entwicklung vitaler Blastozysten korrelieren. Es kommt ein eigener Score zur Anwendung, der Aspekte früher beschriebener Möglichkeiten aufgreift und eine Weiterentwicklung darstellt, indem dieser Score dezidierter morphologische Kriterien der Zygoten mit Vorkernen berücksichtigt. Damit kann dieses punktuelle System der embryonalen Beurteilung leicht in ein Protokoll umgesetzt werden, das es einem geübten Embryologen im Labor ermöglicht, Zygoten innerhalb von 30 Sekunden bis einer Minute qualitativ zu bewerten. Dieses System kann einfach in die alltägliche Arbeit der Bewertung der Zygoten mit Vorkernen integriert werden.

4.4.2. Diskussion der Daten zur Fertilität

In den ICSI-Zyklen konnten mehr Eizellen als in den IVF-Zyklen gewonnen werden (7 versus 6, $p = 0,042$) und im Falle einer Therapie mit ICSI wurden mehr Embryonen transferiert (3 versus 2, $p = 0,008$). Das kann damit erklärt werden, daß die ovarielle Reserve der Frauen bei ICSI besser war als bei Frauen, die mittels der IVF-Methode behandelt wurden. Die ovarielle Reserve schien deshalb gut zu sein, weil bei der Anwendung der ICSI-Methode vor allem die männliche Subfertilität der entscheidende Faktor für die Anwendung der Methode war. Wie zu erwarten, waren insgesamt die Parameter des Spermas sowohl vor wie auch nach der Aufarbeitung bei der IVF-Methode besser als bei der ICSI-Methode.

Der Vorkernscore korrelierte mit dem Alter der Frauen ($p = 0,017$). Scott *et al.* (1998) fanden, daß Patienten, die jünger als 35 Jahre waren einen höheren PN-Score erzielten als Frauen, die älter waren oder über eine mangelnde ovarielle Reserve verfügten. Kooij *et al.* (1996) demonstrierten in einem IVF-Programm, daß neben der Morphologie der Embryonen das Alter der Frauen der wichtigste Faktor für den Erfolg des Programmes waren. Ab einem Schwellenalter von 37 Jahren stellten sie einen signifikanten Abfall der Fertilität fest. Laut einer Studie von Scholtes *et al.* (1998) hängt die Ausbildung vitaler Embryonen neben der Anzahl gewonnener Eizellen nicht vom chronologischen Alter, sondern vom ovariellen Alter der Frauen ab.

Der Vorkernscore korrelierte mit der Anzahl gewonnener Eizellen ($p = 0,022$). Daraus kann gefolgert werden, daß Ovarien, die eine ausreichende Menge an Follikeln produzieren konnten, auch eher zu einer guten Morphologie der Zygoten führten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede des PN-Scores zwischen der IVF- und der ICSI-Methode gefunden werden. Bar-Hava *et al.* (1997) fanden, daß Embryonen aus einer IVF Zyklusreihe zu einer besseren Morphologie und einer höheren Fähigkeit zur Implantation führten als die mittels der ICSI- Methode gewonnenen Embryonen.

4.4.3. Diskussion der Signifikanzen zur Morphologie der Zygoten

Der Einfluß der Vakuolisierung der Zygoten wurde in bisherigen Studien noch nicht systematisch bewertet. In einer Studie von Scott (1998) wurde neben anderen Kriterien einzig das Aussehen des Ooplasmas bezüglich der Granulierung erhoben. Zeigten in dieser Studie die Embryonen eine starke Vakuolisierung, so degenerierten 71% versus 27% von ihnen bei leichter Vakuolisierung ($p = 0,019$). Ebenfalls war der Grad der Entwicklung von Blastozysten bei starker Vakuolisierung niedriger als bei leichter Vakuolisierung (6 versus 8, $p = 0,019$). Die Vakuolisierung scheint eine große negative Einflußgröße für die Entwicklung vitaler Embryonen zu sein.

Darüber hinaus waren die Raten der Blastulation niedriger, falls eine ungleiche Größe der beiden Vorkerne bestand. Wenn die Vorkerne gleiche Größe zeigten, so war die Rate der Blastulation 49%, wohingegen nur 36% von

ihnen blastulierten, wenn die Vorkerne ungleich groß waren ($p = 0,015$). Dieses Phänomen lässt sich möglicherweise durch ein ausgeprägtes asynchrones Wachstum des maternalen und paternalen Vorkernes erklären, der zur Reduktion der Vitalität führte. War nur ein Vorkern vorhanden, so entwickelte sich keine einzige Blastozyste, wohingegen Zygoten mit zwei Vorkernen in 47% der Fälle blastulierten.

Bei einem starken oder einem fehlendem Halo-Effekt blastulierten 29% der Embryonen versus 47% bei leichtem oder normalen Halo-Effekt ($p = 0,041$). Ein mäßig ausgeprägter Halo-Effekt wirkte sich günstig auf die weitere Entwicklung der Embryonen aus. Auch Scott *et al.* (1998) fanden in ihrer Studie einen Zusammenhang des Halo-Effektes mit der Entwicklung der Embryonen. In einer neueren Studie von Salumets *et al.* (2001) wurden Zygoten bezüglich des Ausmaßes der nukleolären Polarisierung innerhalb der Vorkerne und des Halo-Effektes untersucht. Sie bildeten zwei Gruppen und transferierten jeweils nur einen Embryo, um zu bestimmen, wie gut ihre Kriterien der Morphologie der Zygoten mit der Entwicklung weiterer Embryonen korrelierte. Embryonen mit normalem Halo-Effekt waren signifikant besser entwickelt (60,9% versus 52,2%). Die nicht polarisierten Stadien mit diffuser Verteilung der Nukleolen innerhalb der Vorkerne zeigten *in vitro* signifikant langsamere Teilungsraten (38,9% versus 54%). Bezüglich der Implantationen konnten sie keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen finden.

Im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Studien (Payne *et al.*, 1997; Scott und Smith 1998; Tesarik und Greco 1999; Tesarik *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000) konnten in der vorliegenden Arbeit keine offensichtlichen positiven Zusammenhänge in bezug auf die Abstände der Vorkerne, der Reihung und der Anzahl der Nukleolen, sowie der Granulierung des Ooplasma nachvollzogen werden. In dieser Studie wurden nicht die Größen der einzelnen Nukleoli in den Vorkernen evaluiert. Hinsichtlich der Bewertung der Verteilung der Nukleolen wurde eine Dreiteilung vorgenommen, nämlich die diffuse, beginnende und die sichtbare Reihenbildung der Nukleolen und es konnte kein Zusammenhang mit dem weiteren Potential der Entwicklung der Embryonen gefunden werden.

Auch wenn mehrere Studien den großen Einfluß der Verteilung der Nukleolen auf die qualitative Entwicklung der Embryonen in den Mittelpunkt rücken, so stellt sich die Frage, ob der alleinige Blick auf das Kriterium der Verteilung der Nukleolen und deren Größe das qualitative Potential der gesamten embryonalen Zellmasse ausreichend reflektieren können. Bestärkt wird diese Ansicht durch eine Studie von Wittemer *et al.* (2000). Sie fanden ebenfalls keinen belegbaren Zusammenhang mit den Mustern der Verteilung der Nukleolen.

4.4.4. Diskussion der Entwicklung der Blastozysten

In dieser Studie wurde nach der Auswahl der Embryonen im Stadium der Vorkerne eine Blastulationsrate von 46 % erreicht, aber nur 2 % entwickelten den optimalen Grad der voll expandierten Blastozyste. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit anderen Studien, deren Embryonen bis zu 47 % (Gardner *et al.*, 1998b) und 66 % (Gardner *et al.*, 1998a) blastulierten. Es war ihnen aber nicht möglich, die Qualität der Blastozysten bereits anhand früher Stadien vorauszusagen. Diese Beobachtung wird durch diese Studie bestätigt, in der zwar eine positive Relation zwischen der Morphologie der Zygoten und der Morphologie der Blastozysten bestand, aber aus einer Gruppe von befruchteten Eizellen ließ sich nicht mit absoluter Sicherheit derjenige kultivierte Embryo lokalisieren, der sich zu einer hochwertigen vitalen Blastozyste entwickelte. In 67 ICSI-Zyklen konnte gezeigt werden, daß morphologische Kriterien der Zygoten mit der Entwicklung vitaler Blastozysten korrelierten. Mit einem mittleren Vorkern-Score, der >15 Einheiten war, konnte eine geringere prozentuale Entwicklung zu Blastozysten (30% versus 47,8, p = ns), ein ungünstigerer Grad der Entwicklung der Blastozysten (6 versus 7, p = 0,012), eine häufigere Arretierung der Embryonen (45% versus 22,6%, p = 0,03) und eine niedrigere Schwangerschaftsrate (14,3% versus 21,7%, p = ns) gefunden werden. Diese Embryonen sollten möglichst nicht ausgewählt werden, sofern andere Embryonen zur weiteren Bebrütung zur Verfügung stehen. Dieses Resultat korreliert gut mit einer retrospektiven Studie von Scott *et al.* (1998). Sie transferierten jedoch 24-26 Stunden alte Zygoten. Wenn ihr korrigierter Score

(CS) > 15 Einheiten war, so führte das zu erhöhten Schwangerschaftsraten (71% versus 8%, $p < 0,001$). Die durchschnittliche Rate der Implantation lag bei 28%. Ebenfalls gibt es eine positive Korrelation des gefundenen Schwellenwertes mit einer Studie von Ludwig *et al.* (2000). Sie ermittelten einen Schwellenwert ihres PN-Scores von 13 Einheiten. Ein mittlerer Score von < 13 Einheiten zeigte eine Schwangerschaftsrate von 4% an, während ein PN-Score von ≥ 13 zu einer Schwangerschaftsrate von 22% führte.

4.4.5. Diskussion der Ergebnisse der Schwangerschaft

Frauen, die mittels der IVF-Methode behandelt wurden hatten im elektiven Transfer signifikant mehr Eizellen (9 versus 4, $p = 0,001$). Jedoch war die Rate der Fertilisation etwas geringer (85,7% versus 92,3%, $p = \text{ns}$) und sie hatten eine signifikant höhere Anzahl an Embryonen transferiert bekommen (3 versus 2, $p = 0,0031$). Bei ihnen war der mittlere Vorkern-Score besser als bei den Frauen, die sich im nicht auswählenden Transfer befanden (12 versus 13,3, $p = 0,001$). Frauen, die schwanger wurden, hatten einen besseren kumulativen Embryoscore (80 versus 56, $p = 0,024$) und eine bessere Entwicklung der Blastozysten (6 versus 3, $p = 0,001$). Die Rate der Schwangerschaften war in den elektiven Transfers zwar höher, aber nicht signifikant verschieden zu den nicht auswählenden Transfers (20% versus 15%).

In der Gruppe der Frauen, die mittels der ICSI-Methode therapiert wurden, konnten signifikant mehr Eizellen in den elektiven Zyklen gewonnen werden (11 versus 6, $p = 0,001$). Der mittlere Vorkernscore war signifikant besser (12,7 versus 14, $p = 0,11$). Bezüglich der Grade der Entwicklung der Blastozysten ließen sich keine Signifikanzen zwischen dem elektiven und dem nicht elektiven Transfer finden (5,6 versus 5,3, $p = \text{ns}$). Jedoch war der mittlere Grad der Blastozysten in der Gruppe der Frauen besser, die schwanger wurden (4,2 versus 6, $p = 0,001$). Die Raten der Schwangerschaften waren in den elektiven Zyklen zwar höher, jedoch nicht signifikant (23,9% versus 14,3%).

Es ist zwar möglich, hochwertige Zygoten auszuwählen und im Stadium der Blastozyste zu transferieren, aber die hohe Rate arretierter Embryonen (30%) schränkten die Möglichkeiten der erfolgreichen Konzeption stark ein. Es gestaltet sich schwierig bereits im frühen Stadium der Zygoten über deren Morphologie sichere Aussagen über das weitere Potential der Embryonen aufzustellen.

Es konnte belegt werden, daß unabhängig von der Anzahl der transferierten Embryonen der auswählende Transfer dem nicht elektiven Transfer im Resultat der Rate klinischer Schwangerschaften überlegen war und einen besseren PN-Score und eine bessere Entwicklung der Blastozysten aufwies. Es war zu erwarten, daß bei Patientinnen denen insgesamt nur zwei oder drei Embryonen in Kultur zur Verfügung standen der mittlere PN-Score höher lag als bei Patientinnen denen durch die überzählige Zahl an Embryonen eine Auswahl der drei besten Embryonen möglich war.

Der Score dieser Studie kann helfen, die Häufigkeit von Mehrlingen zu reduzieren ohne die Rate des Erfolges zu beeinträchtigen, da es unabhängig von der Anzahl der transferierten Embryonen in den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Schwangerschaftsrate gab.

Nur Patientinnen, die mindestens einen blastulierenden Embryo transferiert bekommen hatten, wurden schwanger. Nicht schwanger wurden jene Patientinnen, denen Embryonen im Stadium der Morula oder morphologisch arretiert erscheinende Embryonen transferiert wurden. Es ist anzunehmen, daß nur der Transfer von Blastozysten zu einer erfolgreichen Schwangerschaft führen konnte. Die durchschnittliche Rate der Implantation pro Embryo lag bei 9,2 %. Die Wahrscheinlichkeit der Schwangerschaft pro transferierte Blastozyste war sowohl bei IFV- wie auch bei den ICSI-Zyklen mit zirka 20 % ähnlich. Die Fähigkeit der Embryonen das Stadium der Blastozyste zu erreichen, scheint eine wichtige grundsätzliche Voraussetzung für die Möglichkeit einer erfolgreichen Schwangerschaft zu sein.

Zusammenfassung

Mit der Geburt von Luise Brown in Bristol, England 1978 feierte die in-vitro-Fertilisation ihren ersten großen Erfolg. Neuere Techniken und verbesserte Methoden führten zu einer Erweiterung des Indikationsspektrums und sukzessiv zu höheren Schwangerschafts- und Geburtenraten.

Die deskriptive Beurteilung der Morphologie der Embryonen steht an zentraler Stelle, um die Entwicklung vitaler Embryonen vorhersagen zu können und hochwertige Embryonen für den Transfer von Embryonen auszuwählen. Mit der Einführung von Systemen zur Bewertung auf Grundlage einer dezidierten Evaluierung der Morphologie gelang es in den letzten Jahren immer besser das Potential der Entwicklung der Zygoten mit Vorkernen, der Mehrzeller und sogar der Blastozyste besser zu bestimmen.

Ziel dieser Untersuchung war es, mit einem eigenen detaillierten System zur Beurteilung der Zygoten unter Berücksichtigung der deutschen Restriktionen Zygoten mit Vorkernen morphologisch zu bewerten und auszuwählen. Es wurden morphologische Kriterien früher Zygoten mit der Entwicklung der Mehrzeller und der weiteren Entwicklung zur Blastozyste verglichen. Das in dieser Studie angewendete Punktesystem ist detailliert und definiert morphologische Kriterien der Stadien mit Vorkernen, die mit der Entwicklung vitaler Blastozysten korrelieren.

Gegenstand dieser Studie waren 168 ungewollt kinderlose Paare, die an der Universitäts-Frauenklinik Würzburg wegen unterschiedlicher Indikationen das IVF/ICSI-Programm durchliefen. Neben der Bestimmung der Samenparameter erfolgte eine genaue Beurteilung deskriptiver morphologischer Kriterien der Zygoten mit Vorkernen, der Mehrzeller und der Blastozysten. Von den insgesamt 1450 Eizellen erreichten 1119 Oozyten das Vorkernstadium. Degenerierte, unbefruchtete oder Embryonen mit gestörter Fertilisation wurden ausgeschlossen. In den 67 ICSI-Zyklen konnten signifikant mehr Eizellen gewonnen werden als in den 101 IVF-Zyklen (10 versus 7, $p = 0,004$). Sämtliche Parameter der Ejakulate der IVF-Paare waren signifikant besser als bei den ICSI-Paaren. Bei dem Verfahren der ICSI wurden signifikant

mehr Eizellen fertilisiert als bei der IVF-Methode (7 versus 6, $p = 0,042$) und in den ICSI-Zyklen konnten signifikant mehr Embryonen transferiert werden (3 versus 2, $p = 0,008$). Es gab keine signifikanten Differenzen des mittleren PN-Scores der IVF- und ICSI-Paare (12,3 versus 13,0).

Die beste Korrelation bezüglich der Morphologie der Vorkernstadien und der späteren Blastulation bestand darin, daß Zygoten mit starker Vakuolisierung in 71% der Fälle degenerierten. Im Gegensatz dazu zeigten nur 27% der Zygoten mit Vorkernen mit leichter oder fehlender Vakuolisierung eine Degeneration ($p = 0,019$). Bei starker Vakuolisierung war der Grad der Entwicklung zur Blastozyste signifikant reduziert (8 versus 6, $p = 0,019$).

Zygoten mit starkem oder fehlendem Halo-Effekt blastulierten in 29% der Fälle, wohingegen 47% der Zygoten mit normalen und leichten Halo-Effekt sich zur Blastozyste entwickelten ($p = 0,041$). In Fällen gleicher Größe der Vorkerne blastulierten 49%, während solche mit ungleichen Vorkernen nur in 37% der Fälle blastulierten ($p = 0,015$). Die anderen erhobenen Parameter wie Abstand der Vorkerne, Reihung und Anzahl der Nukleolen, die Granulierung des Ooplasmas waren nicht signifikant.

Der Vorkern-Score korrelierte mit dem Alter der Patientinnen ($p = 0,017$) und der Anzahl der gewonnenen Eizellen ($p = 0,022$). Der ermittelte Grenzwert bei den 67 ICSI-Zyklen zeigte, daß die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung zur Blastozyste signifikant erhöht war, wenn dieser Wert ≤ 15 Bewertungseinheiten war.

Der Grad der Entwicklung der Blastozysten war deutlich besser (6 versus 7, $p = 0,012$) und der Anteil arretierter Embryonen war deutlich reduziert (22,6% versus 45%, $p = 0,03$). Damit war auch die Rate der Schwangerschaften verbessert (21,7% versus 14,3%), aber nicht signifikant verschieden.

Bezüglich der Korrelation des Vorkern-Scores mit der Entwicklung der Blastozysten, war dieser in den elektiven Zyklen im Vergleich zu den nicht elektiven sowohl für die IVF- (12 versus 13,3, $p = 0,001$) als auch für die ICSI-Methode (12,7 versus 14, $p = 0,011$) signifikant niedriger.

Die durchschnittliche Schwangerschaftsrate lag bei 20% und war sowohl in IVF- als auch ICSI-Zyklen ähnlich. Es kam zu 33 klinischen Schwangerschaften mit einer durchschnittlichen Implantationsrate von 9,2% pro Embryo. Frauen mit anschließender Schwangerschaft zeigten eine signifikant bessere Entwicklung der Blastozysten als solche, die nicht schwanger wurden (4 versus 6, $p = 0,001$). Frauen, die mittels der IVF-Methode schwanger wurden, hatten darüber hinaus einen signifikant besseren kumulativen Embryo-Score (80 versus 56, $p = 0,024$).

Die erhobenen Daten zeigen, daß deskriptive morphologische Kriterien des Stadiums der Vorkerne mit der Entwicklung vitaler Blastozysten und der Implantations- und Schwangerschaftsrate korrelieren. Die Fähigkeit der Embryonen das Stadium der Blastozyste zu erreichen, scheint eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft zu sein. Es ist möglich, hochwertige vitale Blastozysten im Stadium der Vorkerne auszuwählen, aber die hohe Rate arretierter Embryonen (30%), schränkt die Möglichkeit einer erfolgreichen Konzeption unter den strengen Auflagen des deutschen Gesetzes zum Schutz der Embryonen stark ein.

Von einer Kohorte unterschiedlich bewerteter Zygoten ist es nicht genau möglich, jene Embryonen zu identifizieren, die sich mit absoluter Sicherheit zu einer hochwertigen Blastozyste entwickeln werden. Unter den derzeit gegebenen gesetzlichen Bedingungen in Deutschland, kann die Kultivierung von Blastozysten die Schwangerschaftsrate nicht signifikant verbessern, auch wenn diese Studie einen positiven Zusammenhang zwischen der deskriptiven Morphologie der Zygoten mit der Morphologie der Blastozysten und der Schwangerschaftsrate ergeben hatte. In dieser Studie wurden nicht die Schwangerschaften von ausgewählten dreitägigen Mehrzellern zu fünftägigen Blastozysten verglichen, die im Stadium der Vorkerne ausgewählt wurden, aber im Vergleich zu früheren Jahren, in denen Embryonen stets am zweiten oder dritten Tag transferiert wurden, hat sich mit der verlängerten Kultur bis zur Blastozyste die Schwangerschaftsrate nicht signifikant erhöht. Zwar ermöglicht die Kultur bis zum Stadium der Blastozyste physiologisch optimal an den Uterus adaptierte Embryonen, aber es gestaltet sich schwierig, bereits im frühen

Stadium der Entwicklung der Zygoten sichere Prognosen über das weitere Potential der Embryonen aufzustellen. Die Möglichkeiten der Bebrütung bis zur Blastozyste können momentan nur sehr begrenzt angewendet werden. Jedoch kann die verlängerte Kultivierung der Blastozysten solchen Paaren helfen, die mit wiederholten Versuchen einer konventionellen dreitägigen Bebrütung von Embryonen gescheitert sind. Die verlängerte Kultur bietet die Möglichkeit der natürlichen in-vitro Selektion und kann damit zu einer Reduktion chromosomal auffälliger Embryonen führen.

7. Literaturverzeichnis

- Balaban B., Urman B., Sertac A., Alatas C., Aksoy S., Mercan R. (2000) Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil. Steril.*, **74**, 282-287
- Balakier H., MacLusky N. J. and Caspar R.F. (1993) Characterisation of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertil. Steril.*, **59**, 359-365
- Banerjee S., Lamond S., McMahon A., Campbell S. and Nargund G. (2000) Does blastocyst culture eliminate paternal chromosomal defects and select good embryos? *Hum. Reprod.*, **15**, 2455-2459
- Bar-Hava I., Ashkenazi J., Shelef M., Schwartz A., Brengauz M., Feldberg D., Orvieto R., Ben-Rafael Z. (1997) Morphology and clinical outcomes of embryos after in vitro fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, **68**, 653-657
- Basak B., Urman B., Sertac A., Alatas C., Aksoy S., Merkan R. (2000) Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil. Steril.*, **74**, 282-287
- Bergh M., Baszó I., Biramane J., Bertrand J., Devreker F., Englert Y. (1996) Quality control in IVF with mouse bioassays: A four years' experience. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **13**, 733-738
- Bolton V.N., Hawes S.M., Taylor C.T. and Parsons J.H. (1989) Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J. in-vitro Fertil. and Embryo Transfer.* **6**, 30-35

- Bolton V.N., Wren M.E. and Parson J.H. (1991) Pregnancies after in vitro fertilisation and transfer of human blastocysts. *Fertil. Steril.*, **55**, 830-832
- Bongso T.A., Fong C.Y., Ng S.C. and Ratnam S.S. (1994) Blastocyst transfer in human in vitro fertilization: The use of embryo co-culture. *Cell Biol. Int.*, **18**, 1181-1189
- Bongso A. (1996) Behaviour of human embryos in vitro in the first 14 days: blastocyst transfer and embryonic stem cell production. *Clin. Sci. Colch.*, **91**, 248-249
- Bongso A. (1999) Handbook on blastocyst culture. Printed by Sydney Press Indusprint (S) Pte Ltd
- Braude P., Bolton V. und Moore S. (1988) Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* **332**, 459-461
- Calderon G., Veiga A., Penella J., Barri P.N. (1993) Two years of assisted fertilization by partial zona dissection in male factor infertility patients. *Fertil. Steril.*, **60**, 105-109
- Clerk D.A., Quarrington C., Banwatt D., Manuel J. and Fulop G. (1994) Spontaneous abortion in immunodeficient SCID Mice. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **32**, 15-25
- Cohen J. Elsner C., Kort H., Malter H., Massey J., Mayer M. (1990) Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum. Reprod.*, **5**, 7-13

- Cohen J., Alikani M., Malter H.E., Adler A., Talansky B.E., Rosenwaks Z. (1991) Partial zona dissection or subzonal sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperm and embryo morphology. *Fertil. Steril.*, **56**, 696-1035
- Collier M. O'Neill C., Ammit A.J. and Sauners D.M. (1990) Measurement of human embryo-derived platelet-activating factor (PAF) using quantitative bioassay of platelet aggregation. *Hum. Reprod.*, **5**, 323-328
- Conaghan J., Hardy K., Handyside A.H., Winston R.M.L. and Leese H.J. (1993) Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **10**, 21-30
- Copperman A.B., Selick C.E., Grunfeld L., Sandler B., Bustillo M. (1995) Cumulative number and morphological score of embryos resulting in success: realistic expectations from in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil. Steril.*, **64**, 88-92
- Coskun S., Hollanders H., Al-Hassan S., Al-Sufyan H., Al-Mayman H., Jaroudi K. (2000) Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum. Reprod.*, **15**, 1947-1952
- Croxatto H.B., Fuentealba B., Diaz S., Pastene L. and Tatum G. (1972) A simple non surgical technique to obtain unimplanted eggs from human uteri. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **112**, 662
- Cui K.H., Verma P.J. and Matthews C.D. (1993) Hatching rate: an optimal discriminator for the assessment of single blastomere biopsy. *J. assisted Reprod. Genet.*, **10**, 157-162
- Cummins J.M., Breen T.M., Harrison K.L., (1986) A formula for scoring human embryo growth rates in in-vitro fertilisation: its value in predicting

pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J. in-vitro Fertil. and Embryo Transfer*, **3**, 284-295

Del Marek, Langley M., Gardner D., Confer N., Doody K. M., Doody K.J. (1999) Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilisation program. *Fertil. Steril.*, **72**, 1035-1040

Dokras A., Sargent I.L. and Barlow D.H. (1993) Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum. Reprod.*, **8**, 2119-2127

Dunaiski V., Dunshea F.R., Walton P.E. and Goddard C. (1997) Long [R³] insulin-like growth factor-1 reduces growth, plasma growth hormone, IGF binding protein-3 and endogenous IGF-1 concentration in pigs. *J. Endocrinol.*, **155**, 559-565

Dunlison G.F., Barlow D.H., Sargent I.L. (1996) Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum. Reprod.*, **11**, 191-196

Edwards Robert G., Brody Steven A. (1995) Principles and practice of assisted human reproduction. Printed by W.B. Saunders Company

Fisch J.D., Milky A.A. and Behr B. (1999) Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40. *Fertil. Steril.*, **71**, 750-752

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

- Fishel S.B., Cohen J, Fehilly C. (1985) Factors influencing human embryonic development in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **442**, 342-356
- Gardner D.K. and Leese H.J. (1986) Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured preimplantation mouse embryos. *Hum. Reprod.*, **1**, 25-27
- Gardner D.K. and Lane M. (1993c) Amino acids and ammonium regulate the development of mouse embryos in culture. *Biol. Reprod.*, **48**, 377-385
- Gardner D.K. (1994) Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell. Biol. Int.*, **18**, 1163-1179.
- Gardner D.K., Lane M. (1997) Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum. Reprod.*, **3**, 367-382
- Gardner D.K. (1998) Changes in requirement and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, **49**, 83-102
- Gardner D.K., Vella P., Lane M., Wagley L., Schlenker T. and Schoolcraft W.B. (1998a) Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil. Steril.*, **69**, 84-88
- Gardner D.K., Schoolcraft W.B., Wagley L., Schlenker T., Stevens J. and Hesla J. (1998b) A prospective randomised trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilisation. *Hum. Reprod.*, **13**, 3434-3440
- Garello C. , Baker H., Rai J., Montgomery S., Wilson P., Kennedy C.R., Hartshorne G.M. (1999) Pronuclear orientation, polar body placement,

and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum. Reprod.*, **14**, 2588-2595

Reprod., **14**, 2588-2595

Giorgetti C., Terriou P., Auquier P., Hans E., Spach J-L., Salzman J. and Roulier R. (1995) Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum. Reprod.*, **10**, 2427-2431

Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Fiorentino A., Garrisi J., Munné S. (1997) Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil. Steril.*, **68**, 1128-1131

Gonzales D. S. and Bavister B.D. (1995) Zona pellucida escape by hamster blastocysts in-vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in-vivo. *Biol. Reprod.*, **52**, 470-480

Gott A.L., Hardy K., Winston R.M.L. and Leese H.J. (1990) Non invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, **5**, 104-108

Goud P.T., Goud A.P., Rybouchkin A.V., De Sutter P. and Dhont M. (1998) Chromatin decondensation, pronucleus formation, metaphase entry and chromosome complements of human spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection into hamster oocytes. *Hum. Reprod.*, **13**, 1336-1345.

Gregory L., Booth A.D., Wells C. and Walker S.M. (1994) A study of the cumulus - corona cell complex in-vitro fertilization and embryo transfer; a prognostic indicator of the failure of implantation. *Hum. Reprod.*, **9**, 1308-1317

- Hamilton C.J., Sheth K.V., Al-Sedairy S.T., Roca G. and Al-Abdul Jabbar F. (1990) Comparison of interleukin-1 in supernatant of embryo culture fluid versus embryo quality as predictors of implantation. *Abstracts of the II. Joint ESCO-ESHRE Meeting, Milan, August 30th September*
- Hardarson T., Hanson C., Sjögren A. and Lundin K (2001) Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.*, **16**, 313-318.
- Hardy K., Hooper M.A.K., Handyside A.H. et al (1989b) Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, **4**, 188-191
- Hardy K, Handyside A.H. and Winston R.M.L. (1989) The human blastocyst: cell number, death and allocation during late implantation development in vitro. *Development*, **107**, 597-604
- Hu Y., Wayne B.S., Maxson W.S., Hoffman D.I., Ory S.J., Eager S., Dupre J., Lu C. (1998) Maximising pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality. *Fertil. Steril.*, **69**, 650-657
- Hu Y., Hoffman D.I., Maxon W.S., Ory S.J. (1996) Clinical application of nonselective assisted hatching of human embryos. *Fertil. Steril.*, **66**, 991-994
- Hwang F.R., Chang M.Y., Soong Y.K. (1993) Gonadotropin stimulation after pituitary desensitization with Leuprolide Acetate, Comparison of FSH/hMG and hMG alone cycles - a study of 166 cases. *Chang Gung Med. J.*, **16**, 223-230

- Janny L. and Menezo Y.J.R. (1996) Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol. Reprod. Devel.*, **45**, 31-37
- Joesbury K.A., Edirisinghe W.R., Phillips M.R. and Yovich J.L. (1998) Evidence that male smoking affects the likelihood of a pregnancy following IVF treatment: application of the modified cumulative embryo score. *Hum. Reprod.*, **13**, 1506-1513
- Jones G.M., Trounson A.O., Lolatgis N., Wood C. (1998) Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.*, **70**, 1022-1029
- Jones G.M., Trounson A.O. (1999) Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. *Hum. Reprod.*, **14**, 1405-1408
- Kodama H., Fukuda J., Karube H., Matsui T., Shimizu Y., Tasdemir M., Tasdemir I. and Tanaka T. (1995) Prospective evaluation of simple morphological criteria for embryo selection in double embryo transfer cycles. *Hum. Reprod.*, **10**, 2999-3003
- Kooij R.J., Looman C.W.N., Habbema J.D.F., Dorland M., Velde E.R. (1996) Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, **66**, 769-775
- Leese H.J. (1987) Analysis of embryos by non-invasive methods. *Hum. Reprod.*, **2**, 37-40
- Lim J., Bongso A. and Ratnam S. (1993) Mitogenic and cytogenic evaluation of transforming growth factor- β on murine preimplantation embryonic development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **36**, 482-487

- Lopata A. and Lachlan Hay D. (1989) The surplus human embryo: its potential for growth, blastulation, hatching, and human chorionic gonadotropin production in culture. *Fertil. Steril.*, **51**, 984-991
- Ludwig M., Finas D.F., Hanasi S.A., Diedrich K. and Ortmann O. (1999) Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Hum. Reprod.*, **14**, 354-358
- Ludwig M., Schöpfer B., Al-Hasani S. and Diedrich K. (2000) Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum. Reprod.*, **15**, 325-329.
- McLaren A, Biggers J.D. (1958) Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos, *Nature (London)*, **182**, 877
- Macas E., Imthurn B., Boros M., Rosselli M., Maurer-Mayor E., Keller P.J. (1998) Impairment of the developmental potential of frozen-thawed human zygotes obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, **69**, 630-635
- Magli M.C., Gianaroli L., Munné S. and Ferraretti A. P. (1998) Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **15**, 297-301
- Magnusson C., Hillensjö T., Hamberger L. and Nilsson L. ((1986) Oxygen consumption by human oocytes and blastocytes grown in vitro. *Hum. Reprod.*, **1**, 183-184

- Mandelbaum J., Belaisch-Allart J., Junca A., Antoine J., Plachot M., Alvarez S., Alnot M. and Salat-Baroux J. (1998) Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum. Reprod.*, **13**,161-174
- Ménézo Y.J.R., Bellec V., Zaroukian A. and Benkhalifa M. (1997) Embryo selection by IVF, co-culture and transfer at the blastocyst stage in case of translocation. *Hum. Reprod.*, **12**, 2802-2803
- Miller J.G.O. and Schulz G.A. (1987) Amino acids content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol. Reprod.*, **36**, 125-129
- Moessner J., Dodson W.C. (1995) The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. *Fertil. Steril.*, **64**, 1034-1035
- Moilanen J.M., Tulppala M., Reima I., Hovatta O. (1999) Fertilization, embryo quality, and cryosurvival in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **16**, 17-23
- Monks N.J., Turner K., Hooper M.A.K. (1993) Development of embryos from natural cycle in-vitro fertilisation: impact of medium type and female infertility factors. *Hum. Reprod.* **8**, 266-271
- Motta P.M., Nottola S.A., Micara G. and Familiari G. (1988) Ultrastructure of human unfertilized oocytes and polyspermic embryos in an IVF-ET program. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **541**, 367-383
- Muggleton-Harris A.L., Glazier A.M. and Wall M. (1995) A retrospective analysis of the in-vitro development of 'spare' human in-vitro fertilization

preimplantation embryos using 'in-house' prepared medium and 'Medi-Cult' commercial medium. *Hum. Reprod.*, 10, 2976-2984

Munné S., Alikani M., Tomkin G., Grifo J., Cohen J. (1995) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.*, **64**, 382-391

Munné S., Márquez C., Reing A., Garrisi J., Alikani M. (1998) Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, **69**, 904-908

Nieto F.S., Watkins W.B., Lopata A., Gordon Baker H.W. and Edgar D.H. (1996) The effects of coculture with autologous cryopreserved endometrial cells on human in vitro fertilization and early embryo morphology: a randomized study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **13**, 386-389

Oehninger S., Kruger T.F., Simon T., Jones D., Mayer J., Lanzendorf S., Toner J.P. and Muasher S.J. (1996) A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, **11**, 1086-1089

O'Neil C., Collier M. and Saunders D.M. (1988) Embryo derived platlet-activating factor: its diagnostic and therapeutic future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **541**, 398-406

Paria B.C., Huet-Hudson Y.M. and Dey S.K. (1993) Blastocyst's stage of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Dev. Biol.*, **90**, 10159-10162

Paria B.C., Lim H., Wang X.N., Liehr J., Das S.K., Dey S.K. (1998) Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two

distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinol.*, **139**, 5235-5246

Parinaud J., Mieusset R., Vieitez G., Labal B., Richoille G. (1993) Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil. Steril.*, **60**, 888-892

Payne D. (1994) Embryo viability associated with microassisted fertilization. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.*, **8**, 157-175

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

Plachot M. (1992) Viability of preimplantation embryos. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.*, **6**, 327-38

Polani B., Bavister B.D. (1990) Assessment of hamster blastocysts derived from eight-cell embryos cultured in hamster embryo culture medium 2 (HECM-2): Cell number and viability following embryo transfer. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer*, **7**, 229-235

Puissant F., Rysselberg M.V., Barlow P., Deweze J. and Leroy F. (1987) Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum. Reprod.*, **2**, 705

Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen und Nomina Anatomica (1990) Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York

Racowski C., Jackson K.V., Cekleniak N.A., Fox J.H., Hornstein M.D., Ginsburg E.S. (2000) The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil. Steril.*, **73**, 558-564

- Ron-El R., Strassburger D., Friedler S., Komarovski D., Bern O., Soffer Y. and Raziel A. (1997) Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, **12**, 1222-1226
- Saith R.R., Bersinger N.A., Barlow D.H. and Sargent I.L. (1996) The role of pregnancy-specific β -1 glycoprotein (SP1) in assessing human blastocyst quality in vitro. *Hum. Reprod.*, **11**, 1038-1042
- Sakkas D., Jaquenoud N., Leppens G. and Campana A. (1994) Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and in co-culture on Vero cells: a randomised study. *Fertil. Steril.*, **61**, 521-525
- Salumets A., Hydén-Granskog C., Suikkari A.M., Tiitinen A., and Tuuri T. (2001) The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum. Reprod.*, **16**, 2177-2181
- Sathananthan A.H., Wood C. and Leeton J.F. (1982) Ultrastructural evaluation of 8-16 cell human embryos cultured in vitro. *Micron*, **13**, 193-203
- Scholtes M.C.W., Zeilmaker G.H. (1996) A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, **65**, 1245-1248
- Scholtes M.C.W., Zeilmaker G.H. (1998) Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. *Fertil. Steril.*, **69**, 78-83

- Scott R.T., Hofmann G.E., Veeck L.L. (1991) Embryo quality and pregnancy rates in patients attempting pregnancy through in vitro fertilisation. *Fertil. Steril.* **55**, 426-428
- Scott L.A. and Smith S. (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum. Reprod.*, **13**, 1003-1013
- Scott L., Alvero R., Leondires M., Miller B. (2000) The morphology of human pronuclear embryo is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum. Reprod.*, **15**, 2394-2403
- Seshagiri P.B., Bavister B.D. (1990) Assessment of hamster blastocysts derived from eight-cell embryos cultured in hamster embryo culture medium-2 (HECM-2): cell numbers and viability following embryo transfer. *J. Vitro Fert. Embryo Transf.*, **7**, 229-235
- Shulman A., Ben-Nun I., Ghetler Y., Kaneti H., Shilon M., Beyth Y. (1993) Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil. Steril.*, **60**, 123-126
- Steer C.V., Mills C.L., Tan S.L., Campbell S., Edwards R.G. (1992) The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum. Reprod.*, **7**, 117-119
- Stephoe P.C. und Edwards R.G. (1978) Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, **2**, 8079-8092
- Svendsen T.O., Jones D., Butler L., Muasher S.J. (1996) The incidence of multiple gestations after in vitro fertilization is dependent on the number of embryos transferred and maternal age. *Fertil. Steril.*, **65**, 561-565

- Tan S.L., Royston P. and Cambell S. (1992) Cumulative conception and live birth rates after in-vitro fertilisation. *Lancet*, **339**, 1390-1394
- Terriou P., Giorgetti C., Auquier P., Jouve E., Hans E., Spach J.L., Salzman J., Roulier R. (1996) Intérêt d'un score embryonnaire pour le pronostic implantatoire. *Contracept. Fertil. Sex.*, **24**, 657-660
- Tesarik J., Kopecny V., Plachot M. and Mandelbaum J. (1986) Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos development in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **78**, 463
- Tessarik J., Greco E. (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.*, **14**, 1318-1323
- Tessarik J., Junca A.M., Hazout A., Aubriot F.X., Nathan C., Cohen-Bacrie P., Dumont-Hassan M. (2000) Embryos with high implantation potential after intracytoplasmatic sperm injection can be recognised by a single, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum. Reprod.*, **15**, 1396-1399
- Tucker M. J. (1999) Relevance of assisted hatching with blastocyst transfer. *The 1st Congress on Controversies in Obstet., Gynecol. and Infertility. Prague, Czech Rep., Oct 28-31.*
- Trounson A.O. and Gardner D.K. (1999) Handbook of In Vitro Fertilisation, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C.
- Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D., Laureys I., Ryckaert G. and Gerris J. (2001) Calculating the implantation potential of day 3 embryos

in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum. Reprod.*, **16**, 326-332.

Van Blerkom J., Davis P., Merriam J. and Sinclair J. (1995b) Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organisation during fertilisation and early preimplantation development in the human. *Hum. Reprod. Update*, **1**, 429-461

Vidaeff A. C., Racowsky C. (2000) Blastocyst transfer in human in vitro fertilisation - A solution to the multiple pregnancy epidemic. *J. Reprod. Med.*, **45**, 529-540

Visser D.S., Fourie F.R. (1993) The applicability of the cumulative embryo score system for embryo selection and quality control in an in-vitro fertilization/embryo transfer programme. *Hum. Reprod.*, **8**, 1719-1722

Walker B.E. and Kurth L.A. (1995) Multi-generational carcinogenesis from diethylstilbestrol investigated by blastocyst transfers in mice. *Int. J. Cancer*, **61**, 249-252

Walker B.E., Zhou M. (1997) Stage of susceptibility to carcinogenicity of prenatal dietary fat exposure tested by blastocyst transfer. *Cancer Lett.*, **112**, 177-180

Walter S.K., Heart T.M. and Seamark R.F. (1992) In vitro culture of sheep embryos without coculture: success and perspectives. *Theriogenology*, **37**, 111-126

Wallace J.M., Aitken R.P. and Cheyne M.A. (1993) Conceptus development in vivo, endometrial and conceptus protein release in vitro following blastocyst transfer to ewes included to ovulate at 28 days post partum. *Reprod. Fertil. Dev.*, **5**, 191-200

- World Health Organisation (1992) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaktion, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wittemer C., Bettahar-Lebugle K., Ohl J., Rongières C., Nisand I., Gerlinger P. (2000) Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum. Reprod.*, **15**, 2591-2597
- Wright G., Wickers S., Elsner C., Kort H., Massey J., Mitchell D., Toledo A. and Cohen J. (1990) Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservations. *Hum. Reprod.*, **5**, 109-115
- Wu, M., Chen S.U., Chen H.F., Chao K.H., Chen C.D., Ho H.N., Huang S.C., Lee T.Y., Yang Y.S. (1996) How many embryos should be transferred in in vitro fertilization and tubal embryo transfer? *J. Formos Med. Assoc.*, **95**, 617-622
- Wheeler C.A., Cole B.F., Frishman G.N., Seifer D.B., Lovegreen S.B., Hackett R.J. (1998) Predicting probabilities of pregnancy and multiple gestation from in vitro fertilization - a new model. *Obstet. Gynecol.*, **91**, 696-700
- Younis J.S., Simon A., Koren R., Dorembus D., Schenker J.G., Laufer N. (1992) The effect of growth hormone supplementation on in vitro fertilization outcome: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Fertil. Steril.*, **58**, 575-580
- Ziebe S., Petersen K., Lindenberg S., Andersen A.G., Gabrielsen A., Andersen A.N. (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, **12**, 1545-1549

Zollner U., Schleyer M., Steck T. (1996) Evaluation of a cut-off value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum. Reprod.*, **11**, 2155-2161

Zollner U., Schleyer M., Steck T. (1998) Percoll cushion centrifugation and swim-down: a new method combining two efficient steps for selecting a great number of high-quality motile and morphologically normal spermatozoa. *Fertilität*, **13**, 220-226

Zollner U., Zollner K-P., Dietl J. and Steck T. (2001) Semen sample collection in medium enhances the implantation rate following ICSI in patients with severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum. Reprod.*, **16**, 1110-1114

Zollner U., Zollner K.-P., Hartl G., Dietl J., Steck T. (2002) The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum. Reprod.*, **17**, 1327-1333

ANHANG

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 Frauenklinik und Hebammenschule
 Direktor Prof. Dr. med. J. Dietl
Labor für In Vitro Fertilisierung und Assistierte Reproduktionsmedizin
 Josef-Schneider-Straße 4
 97080 Würzburg
 Tel: 0931 / 201 - 3621
 Fax: 0931 / 201 - 3406



Pronucleus -Scoring Name: _____ geb: _____

Number of oocyte	Juxtaposition of PN:	Halo:	Alignment of nucleoli:	Size of PN:	Vacuoles:	Number of nucleoli:	Number of PN:	Ooplasma:	Judgement:	Sperm binding on z.a. Pellucida 1 or 2 or 3 19
	1 or 2 or 3 12	1 or 2 or 3 or 4 13	1 or 2 or 3 or 4 11	1 or 2 14	1 or 3 or 6 15	1 or 2 or 3 or 4 16	1 or 4 or 8 18	1 or 2 20	Σ	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										

Fertilizationrate in %: _____

Stage of oocyte: fully exp. A / not fully exp. B

Diameter of zona pellucida: _____ μm

Notes:

- | | | |
|---|---|---|
| 11: 1 = row
2 = beginning row
3 = confuse
4 = no nucl. | 14: 1 = equal
2 = unequal | 18: 1 = 2 PN
4 = 1 PN
8 = ≥ 3 PN |
| 12: 1 = strong together
2 = near by
3 = disjunction | 15: 1 = no
3 = light vacuolized
6 = strong vacuolized | 16: 1 = ≥ 3-5
2 = > 5 -
3 = < 3
4 = no nucl. |
| 13: 1 = normal
2 = light
3 = extrem
4 = no halo | 20: 1 = granulated
2 = scattered | 19: 1 = > 50
2 = ≤ 50
3 = < 20 |

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Steck möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, seinen freundlichen Anweisungen und Beratungen als auch für seine hilfreichen Bemühungen um die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Klaus-Peter Zollner ohne dessen lebendige Unterstützung und ständigen Ansporn diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bei Frau Dr. med. Ursula Zollner bedanke ich mich herzlich für Ihre geduldige Betreuung und der freundlichen Hilfe zu den statistischen Auswertungen der Daten.

Bei Herrn Direktor Prof. Dr. med. Josef Dietl bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Curriculum vitae

persönliche Daten:

Name: Guido Hartl
Geburtsdatum/ -ort: 24.11.71 / Friedberg
Adresse: Blumenstraße 45, D-86551 Aichach
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978-1987 Volksschule Aichach
1987-1991 Berufsausbildung Elektromechaniker, Augsburg
2/1991 Gesellenprüfung Elektromechanik
1991-1992 Berufsaufbauschule (BAS)
7/1992 Mittlere Reife
1992-1994 Berufsoberschule (BOS)
7/1994 Abitur
1994-1995 Zivildienst Lebenshilfe Aichach

Hochschulstudium:

1995-2002 Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
8/1997 Ärztliche Vorprüfung
8/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
8/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
6/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

1999-2003 Promotionsthema: Beurteilung der Pronukleus- und Embryonalstadien bei der extrakorporalen Befruchtung

Famulaturen:

10/1995 Orthopädie, Theresienklinik, Würzburg
3/1998 Pädiatrie, Kinderklinik am Mönchberg, Würzburg
10/1998 Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik, Würzburg
3/2000-4/2000 Allgemeinmedizin, Dr. med. Pfundmair, Aichach

Praktisches Jahr:

4/2001-8/2001 Gynäkologie, Universitätsklinik Würzburg
8/2001-12/2001 Innere Medizin, Spital Meyriez / Schweiz
12/2001-3/2002 Chirurgie, Universitätsklinik Würzburg