

Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Dietl

Vergleich von zwei Kulturmedien für die Kultur menschlicher Embryonen nach
In-vitro-Fertilisation:
Eine prospektiv-randomisierte Studie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Minka Schneider

aus Düsseldorf

Würzburg, Februar 2007

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

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	
2.1 Patientenkollektiv.....	6
2.2 Kulturmedien.....	8
2.3 In-vitro-Fertilisation	
2.3.1 Ovarielle Stimulationstherapie und Eizellgewinnung.....	11
2.3.2 Spermengewinnung und Spermienpräparation.....	12
2.3.3 Extrakorporale Befruchtung.....	13
2.4 Embryokultur.....	16
2.5 Beurteilung der embryonalen Entwicklung	
2.5.1 Vorkern-Score (Pronukleus-Score).....	18
2.5.2 Embryo-Score.....	22
2.5.3 Blastozystenbeurteilung.....	23
2.6 Embryotransfer und Schwangerschaft.....	26
2.7 Statistische Auswertung.....	27
3. Ergebnisse	
3.1 Vergleich des Patientenkollektivs.....	28
3.2 Vergleich von Eizellgewinnung, Fertilisation und Embryotransfer.....	31
3.3 Vergleich der embryonalen Entwicklung.....	35
3.4 Vergleich der embryonalen Entwicklung nach IVF und ICSI.....	37
3.5 Vergleich der Schwangerschaftsraten.....	39

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der Kulturmedien für die embryonale Entwicklung.....41

4.2 Bedeutung des Blastozystentransfers unter besonderer Beachtung der gesetzlichen Bestimmungen in Deutschland.....51

5. Zusammenfassung.....61

6. Referenzen.....64

7. Anhang.....73

8. Abkürzungen.....89

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Seit der Geburt des ersten durch künstliche Befruchtung gezeugten Babys, Louise Brown 1978 in England (Stephoe and Edwards, 1978), hat die Reproduktionsmedizin eine umfassende Weiterentwicklung erlebt. Die Einführung der kontrollierten ovariellen Stimulationstherapie hat eine gezieltere und effizientere Eizellgewinnung ermöglicht, was durch die Verwendung von GnRH-Agonisten und Antagonisten optimiert werden konnte. Die Follikelpunktion, die in den Anfangszeiten laparoskopisch durchgeführt wurde, kann nun durch die weniger invasive, sonografisch gesteuerte transvaginale Punktion erfolgen. Mikromanipulationstechniken haben das Indikationsspektrum der künstlichen Befruchtung erweitert und die Möglichkeit geschaffen, auch die schwere männliche Subfertilität effektiv zu behandeln. Die Spermienpräparationstechniken konnten verfeinert werden und die Kryokonservierung bietet die Möglichkeit, Spermien oder überzählige Embryonen zu erhalten.

Die Kultivierungsbedingungen der Embryonen konnten durch Modifikation der Kulturmedien optimiert werden und führten zu verbesserten Ergebnissen der assistierten Reproduktion. Optimale Kulturbedingungen sind für die durch In-vitro-Fertilisation (IVF) oder Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) geschaffenen Embryonen unabdingbar. Um optimale Bedingungen für den Embryo schaffen zu können, muss ein Kulturmedium die Umgebung, welcher der Embryo in vivo ausgesetzt wäre, in vitro möglichst genau nachempfinden. Eine ständige Weiterentwicklung der Kulturmedien seit Beginn der künstlichen Befruchtung half, sich diesem Ziel zu nähern und zudem die Möglichkeit zu schaffen, die Kulturdauer über Tag 2 hinaus zu verlängern.

Zu Beginn der künstlichen Befruchtung wurden Medien eingesetzt, die aus dem Tiermodell stammten und die für die menschliche assistierte Reproduktion unspezifisch waren (Quinn, 2004).

Die Entwicklung spezifischer Kulturmedien für humane Embryonen begann in den 1980er Jahren (Quinn et al., 1985). In diesen Kulturmedien, die

auf einer einfachen Salzlösung basierten, konnten die Embryonen bis Tag 2 oder 3 kultiviert werden. Zu Beginn der 1990er Jahre erfolgte eine Modifikation der Medien. Die Glucose- und Phosphatkonzentration wurde reduziert und den Medien wurden verschiedene Aminosäuren hinzugegeben (Thompson et al., 1992; Lane et al., 1997; Devreker et al., 1998).

Eine weitere Verbesserung brachte die Einführung der Co-Kultur seit Beginn der 1990er Jahre, bei der den Medien somatische humane oder tierische Helferzellen hinzugefügt wurden, z.B. Nierenepithelien des Affen ("vero cells"), Tubenepithelien des Rindes, humane Tubenepithelien einer Spenderin, autologes Endometrium oder Theka granulosa-Zellen (Schillaci et al., 1994). Die Co-Kultur verbesserte vor allem bei Patientinnen mit vorausgegangenem Implantationsversagen die Ergebnisse (Menezo et al., 1992; Olivennes et al., 1994). Ausserdem konnten von der Co-Kultur viele Erkenntnisse abgeleitet werden, die eine Weiterentwicklung zu den sequenziellen Medien ermöglichten.

Der Einsatz und gewinnbringende Effekt der Co-Kultur wurde in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert und blieb einem selektierten Patientengut vorbehalten (Menezo et al., 1990; Menezo et al., 1992; Olivennes et al., 1994). Nachteile der Co-Kultur bestanden in der Gefahr der Infektionsübertragung von den Helferzellen auf den Embryo, was sich nur durch die Zugabe autologer Zellen aus dem Reproduktionstrakt der Eizellspenderin vermeiden ließ. Zudem war die Co-Kultur mit einem erhöhten Zeit- und Kostenaufwand verbunden und die Kultur war gegenüber Umwelteinflüssen anfälliger als ein herkömmliches Medium.

Ende der 1990er Jahre entwickelten Gardner und Lane ein Kultursystem, das die In-vitro-Entwicklung des Embryos von der Zygote bis zur Blastozyste ermöglichte (Gardner and Lane, 2002). Dieses sequenzielle System unterschied sich von den herkömmlichen Kulturmedien durch eine wechselnde Zusammensetzung der Medien an den verschiedenen Kulturtagen, um damit den sich ändernden Nährstoffbedürfnissen des Embryos während der verschiedenen Entwicklungsstufen bestmöglich gerecht zu werden.

In den folgenden Jahren wurden die sequenziellen Medien in ihrer Zusammensetzung weiter verfeinert, um den wechselnden Bedarf an Nährstoffen, der die Veränderungen in der Umgebung des weiblichen Reproduktionstrakts und in der Physiologie des Embryos widerspiegelt, zu berücksichtigen.

Somit erfolgte Ende der 1990er Jahre eine zunehmende Umstellung von der Co-Kultur auf sequenzielle Medien, da diese einfacher in der Anwendung sind und vergleichbare Ergebnisse lieferten (Jones et al., 1998; Menezo et al., 1998).

Mit der Weiterentwicklung und Verfeinerung der Kultursysteme wurde es möglich, die Embryonen über Tag 2 hinaus zu kultivieren und zu einem späteren Zeitpunkt zu transferieren.

Der frühe Transfer an Tag 2 ist ein willkürlicher Prozess, der daraus resultierte, dass durch die suboptimalen Kulturbedingungen die Lebensfähigkeit der Embryonen eingeschränkt war. Daher wurde angestrebt, den Embryo möglichst schnell in sein natürliches Milieu zurückzusetzen. Doch mit dem frühen Transfer humaner Embryonen an Tag 2 lassen sich nur geringe Implantationsraten erzielen, die 10-15 % nicht übersteigen und die deutlich unter denen für tierische Embryonen liegen (Gardner et al., 1994). Die Gründe hierfür sind vielfältig. Zum einen ist die mangelnde Synchronisation mit dem weiblichen Reproduktionstrakt von Bedeutung. Das Endometrium an Tag 2 oder 3 ist für den extrakorporal befruchteten und transferierten Embryo nur eingeschränkt aufnahmefähig, da sich der Embryo in vivo 48 Stunden nach Befruchtung erst im Eileiter und noch nicht, wie bei der In-vitro-Fertilisation, im Uterus befindet. Zum anderen ist die Auswahl der besten Embryonen anhand von morphologischen Parametern in den frühen Teilungsstadien unsicher. Die Embryonen, bei denen die Genomaktivierung ausbleibt, können nicht identifiziert werden, sondern werden transferiert. Das Entwicklungspotenzial kann an Tag 2 nur unzureichend abgeschätzt werden. Da dies zu keinen zufriedenstellenden Implantations- und Schwangerschaftsraten führte, wurden zur Erhöhung der Erfolgsrate meist mehrere Embryonen transferiert, um die Wahrscheinlichkeit eines Schwangerschaftseintritts zu erhöhen. Der multiple

Embryonentransfer erbrachte kumulative Konzeptionsraten, die mit denen einer natürlichen Konzeption vergleichbar waren (Tan et al., 1990). Dafür musste jedoch eine hohe Rate an Mehrlingsschwangerschaften mit den damit verbundenen Risiken in Kauf genommen werden.

Durch optimierte Kulturbedingungen traten die Bedenken, den Embryo so schnell wie möglich in den Uterus zu transferieren, um einen Verlust seiner Lebensfähigkeit zu verhindern, in den Hintergrund. Dank verbesserter Kulturbedingungen ist es möglich geworden, die Kultivierungsdauer der Embryonen bis Tag 5 zu verlängern und sie somit erst im Blastozystenstadium in den Uterus zu platzieren. Der Blastozystentransfer ermöglicht eine bessere Synchronisation mit den Vorgängen in vivo. Hauptziel des Blastozystentransfers ist es aber, denjenigen Embryo mit dem höchsten Entwicklungspotenzial zu erkennen und somit durch eine höhere Implantationswahrscheinlichkeit einer einzelnen gut entwickelten Blastozyste die Anzahl der transferierten Embryonen zu minimieren, und damit die Mehrlingsschwangerschaften zu verringern. Durch die verlängerte Kultur eröffnet sich bei Patientinnen mit wiederholtem Implantationsversagen ausserdem eine diagnostische Möglichkeit, da die embryonale Entwicklung über einen längeren Zeitraum betrachtet werden kann.

Die Vorteile, die sich aus dem Blastozystentransfer ergeben, sind in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz (ESchG) begrenzt, da nach geltendem Recht eine Auswahl von höchstens drei Embryonen bereits im Pronukleus-Stadium an Tag 1 erfolgen muss. Laut ESchG dürfen nur die drei in diesem frühen Stadium ausgewählten imprägnierten Eizellen weiterkultiviert werden, so dass eine erneute Auswahl zu einem späteren Zeitpunkt, an dem sich das Entwicklungspotenzial des Embryos besser abschätzen ließe, nicht möglich ist. Bei weniger restriktiver Gesetzgebung entsteht durch die verlängerte Kultur jedoch der Vorteil, dass eine mehrfache Beurteilung der Embryonen während verschiedener Entwicklungsstadien erfolgen kann. Somit ergibt sich die Möglichkeit, die am besten entwickelten Embryonen erst im Blastozystenstadium auszuwählen und zu transferieren. In selektierten Patientenkollektiven wurden unter diesen Bedingungen durch

Blastozystentransfer Implantationsraten von 50 % erreicht (Gardner et al., 1998a; Gardner et al., 1998b).

Das ESchG schränkt den Vorteil des Blastozystentransfers, die zu transferierenden Embryonen erst in diesem Stadium auszuwählen, ein und wird daher in Deutschland nur bei besonderer Indikation empfohlen (Zollner et al., 2002a) .

Einen besonderen Stellenwert bei der verlängerten Embryokultur nehmen die sequenziellen Kultursysteme ein. Erst durch die Entwicklung dieser Kulturmedien wurde die Blastozystenkultur routinemäßig möglich. Zwei häufig verwendete und in zahlreichen Studien untersuchte sequenzielle Kultursysteme sind die kommerziell erhältlichen Kulturmedien BlastAssist M1/M2 der Firma MediCult und G 1.2/G 2.2 der Firma Vitrolife (Kovacic et al., 2002; Macklon et al., 2002; Van Langendonck et al., 2001; Vlasisavljevic et al., 2001). Gegenstand der vorliegenden prospektiv-randomisierten Studie war der Vergleich dieser Kultursysteme für die Kultur menschlicher Embryonen nach IVF und ICSI unter den Bedingungen des deutschen ESchG. Embryonale Entwicklung, Implantations- und Schwangerschaftsrate im jeweiligen Kultursystem wurden verglichen. Es wurde untersucht, ob die Verwendung eines der beiden Systeme die Ergebnisse der assistierten Reproduktion verbessern konnte.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 176 Paare, die zwischen November 2000 und August 2001 im Rahmen des Kinderwunschprogramms der Universitäts-Frauenklinik Würzburg behandelt wurden, eingeschlossen.

Die Patienten wurden kontinuierlich, d.h. unabhängig von anamnestischen Parametern wie Alter, Spermienparameter, Anzahl vorausgegangener Zyklen oder Infertilitätsgrund in die Studie aufgenommen. Voraussetzung für die Studienteilnahme war, dass nach 3-5 Tagen Kulturdauer ein Embryotransfer durchgeführt werden konnte, d.h. es musste mindestens eine Eizelle gewonnen werden, die sich befruchtete und weiterentwickelte und somit übertragen werden konnte.

Aus zunächst 198 rekrutierten Paaren wurden insgesamt 22 aus der Studie ausgeschlossen. Bei 13 Paaren erfolgte der Ausschluss wegen Fertilisationsversagen, d.h. 16 bis 18 Stunden nach künstlicher Befruchtung fehlten Fertilisationszeichen. Als Fertilisationszeichen galt das Vorhandensein von zwei Vorkernen (Pronuklei, PN). Weitere Gründe für den Ausschluss aus der Studie waren abnormale Fertilisation mit mehr als zwei Vorkernen (3 Fälle), Tag 2-Transfer (2 Fälle), Embryoarrest während der Kultur (1 Fall), frustrane Eizellentnahme (1 Fall), sowie Azoospermie im gewonnenen Ejakulat (1 Fall). Eine Patientin wurde aus der Studie ausgeschlossen, da unter der Down-Regulation eine spontane Konzeption erfolgt war.

84 Paare wurden mit IVF, 92 mit ICSI behandelt. Die Wahl des Verfahrens wurde durch die Indikation, die zur Aufnahme in das Kinderwunschprogramm geführt hatte, bestimmt.

Die Indikationen für die Wahl der IVF-Methode waren wie folgt:

- Leichte andrologische Subfertilität (95,2 %)
- Tubenfaktor (51,2 %)
- Pathologischer Zyklus/PCO (19,0 %)
- Idiopathische Sterilität (17,9 %)
- Endometriose (11,9 %)

Hauptindikationsstellung für die Wahl der ICSI-Methode waren:

- Schwere andrologische Subfertilität (92,4 %)
- Pathologischer Zyklus/PCO (14,1 %)
- Vorangehendes IVF-Versagen (14,1 %)
- Tubenfaktor (13,0 %)
- Leichte andrologische Subfertilität (7,6 %)
- Endometriose (7,6 %)
- Idiopathische Sterilität (6,5 %)

Die andrologische Subfertilität wurde nach WHO-Kriterien definiert (WHO Laboratory Manual, 3rd edition, 1992).

Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei 33, das ihrer Ehemänner bei 35 Jahren. Die Dauer der ungewollten Kinderlosigkeit betrug durchschnittlich 4,3 Jahre, bei den Paaren waren im Durchschnitt 1,2 Zyklen künstlicher Befruchtung vorausgegangen.

2.2 Kulturmedien

Die randomisierte Zuteilung der Patientinnen zu einem der Kulturmedien erfolgte am Tag vor der Oozytenentnahme.

Bei 87 der 176 Patientinnen (49,4 %) erfolgte die Randomisierung in die Vitrolife-Gruppe (Vitrolife, Göteborg, Schweden). 45 dieser Patientinnen wurden mit IVF, 42 mit ICSI behandelt.

89 Patientinnen (50,6 %) wurden mittels Randomisierung den MediCult-Medien (MediCult, Jyllinge, Dänemark) zugeteilt. Bei 39 der Patientinnen der MediCult-Gruppe wurde die konventionelle IVF-Methode, bei 50 wurde die ICSI-Methode durchgeführt (Abbildung 2.2.1).

In der Vitrolife-Gruppe wurde bis zum Vorkern-Stadium IVF-Medium eingesetzt, es folgte bis Tag 3 G 1.2- und ab Tag 3 G 2.2-Medium. In der MediCult-Gruppe wurde bis zum Vorkern-Stadium Universal IVF-Medium, bis Tag 3 BlastAssist M1 und ab Tag 3 BlastAssist M2-Medium verwendet. Die Zusammensetzung der Kulturmedien ist aus Tabelle 2.2.1 und 2.2.2 zu ersehen.

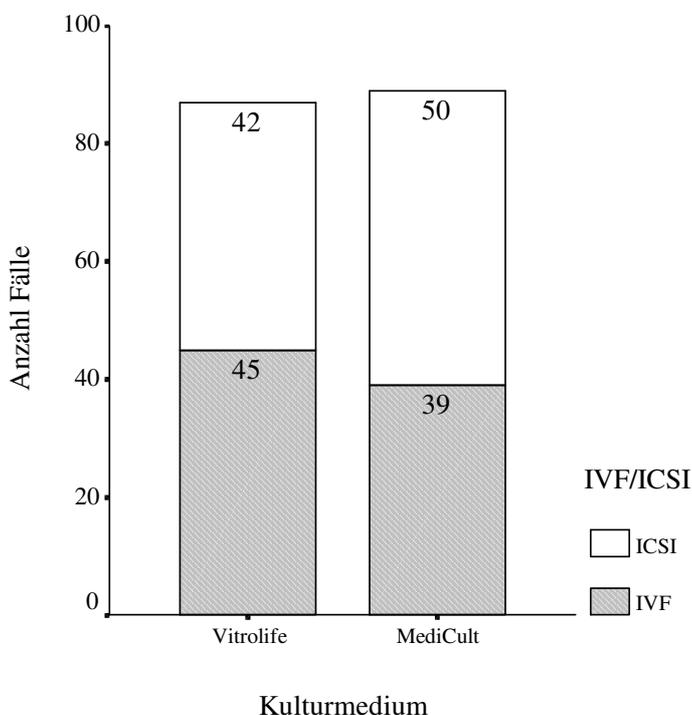


Abb. 2.2.1: Zuteilung der Patientinnen zu den Kulturmedien

G 1.2 (Vitrolife)	M1 (MediCult)
Alanin	Glukose
Alanylglutamin	HEPES
Asparagin	HSA
Asparaginsäure	Kaliumsulfat
Calciumchlorid	Laktat
EDTA	L-Glutamin
Glukose	Magnesiumsulfat
Glutaminsäure	Natriumbikarbonat
Glycin	Natriumchlorid
HSA	Natriumhydrogenphosphat
Kaliumchlorid	Natriumpyruvat
Magnesiumsulfat	Nicht-essenzielle Aminosäuren
Natriumbikarbonat	Penicillin
Natriumchlorid	Phenolrot
Natriumdihydrogenphosphat	Streptomycin
Natriumlaktat	Synthetischer Serum Ersatz
Natriumpyruvat	Taurin
Penicillin G	
Prolin	
Serin	
Taurin	

Tab. 2.2.1: Zusammensetzung der Kulturmedien
G 1.2- (Vitrolife) und BlastAssist M1-Medium (MediCult) im Vergleich
EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES = Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HSA = Humanes Serum Albumin

G 2.2 (Vitrolife)	M2 (MediCult)
Alanin	Essenzielle Aminosäuren
Alanylglutamin	Glukose
Arginin	HSA
Asparagin	Kaliumsulfat
Asparaginsäure	L-Glutamin
Calciumchlorid	Magnesiumsulfat
Calciumpantothenat	Milchsäure
Cholinchlorid	Natriumbikarbonat
Cystein	Natriumchlorid
Folsäure	Natriumhydrogenphosphat
Glukose	Natriumpyruvat
Glutaminsäure	Nicht-essenzielle
Glycin	Aminosäuren
Histidin	Penicillin
HSA	Phenolrot
i-Inositol	Streptomycin
Isoleucin	Synthetischer Serum Ersatz
Kaliumchlorid	
Leucin	
Lysin	
Magnesiumsulfat	
Methionin	
Natriumbikarbonat	
Natriumchlorid	
Natriumdihydrogenphosphat	
Natriumlaktat	
Natriumpyruvat	
Nicotinamid	
Penicillin G	
Phenylalanin	
Prolin	
Pyridoxal-HCl	
Riboflavin	
Serin	
Thiamin	
Threonin	
Tryptophan	
Tyrosin	
Valin	

Tab. 2.2.2: Zusammensetzung der Kulturmedien
G 2.2- (Vitrolife) und BlastAssistM2- Medium (MediCult) im Vergleich
HSA = Humanes Serum Albumin
HCl = Salzsäure

2.3. In-vitro-Fertilisation

Ovarielle Stimulation, Oozytengewinnung sowie IVF- und ICSI-Verfahren wurden, wie in Standardprotokollen beschrieben, durchgeführt (Steck, Praxis der Fortpflanzungsmedizin, 2001).

2.3.1. Ovarielle Stimulationstherapie und Eizellgewinnung

Um eine polyfollikuläre Eizellreifung zu induzieren, wurde eine kontrollierte ovarielle Überstimulation mit einem Gonadotropin nach hypophysärer Blockade mit einem GnRH-Analogon im "langen" Protokoll eingeleitet.

Hierfür erfolgte zunächst eine Vorbehandlung 6-8 Tage vor der erwarteten Regelblutung mit Nafarelin (Synarela®, Heumann, Nürnberg, Deutschland), das zweimal täglich intranasal appliziert wurde. Ein Sprühstoß entspricht 0,2 mg Nafarelin. Ziel dieser Vorbehandlung war es, eine Down-Regulation der Hypophyse zu erzielen und eine vorzeitige Ovulation bzw. Luteinisierung zu verhindern.

Die ovarielle Stimulation wurde ab Tag 3 des Zyklus mit 150-300 IE eines HMG- (Menogon®, Ferring, Kiel, Deutschland) oder FSH-Präparates (Gonal F®, Serono, Unterschleissheim, Deutschland; Puregon®, Organon, Oberschleissheim, Deutschland) herbeigeführt. Die weitere Dosierung wurde individuell festgelegt und richtete sich nach dem Alter der Patientin sowie dem Ansprechen auf die Stimulationsbehandlung. Dieses wurde anhand der Anzahl und Größe der Follikel, die sonografisch beurteilt wurden, sowie mit Hilfe des E₂-Spiegels abgeschätzt. Die Stimulationsdauer betrug durchschnittlich 12 Tage.

Erreichte der Leitfollikel einen Durchmesser von ≥ 18 mm und konnte über 6-7 Tage ein ständiger Anstieg der Serum-Östradiolkonzentration verzeichnet werden, erfolgte die Ovulationsinduktion mit 5000-10000 IE eines HCG-Präparates (Pregnesin®, Serono, Unterschleissheim, Deutschland), das 34-36 Stunden vor der geplanten Eizellentnahme verabreicht wurde.

Da 36-38 Stunden nach der Ovulationsinduktion durch das HCG-Präparat mit einer Ovulation zu rechnen ist, wurde die sonografisch gestützte transvaginale Follikelpunktion kurz vorher vorgenommen. Nach Durchstechen des hinteren Scheidengewölbes mit einer Punktionskanüle konnte die Follikelflüssigkeit mit kontrolliertem Sog aspiriert werden, um die Eizelle von der Wand des Follikels zu lösen. Bei Bedarf erfolgte zudem eine Spülung mit dem jeweiligen Kulturmedium.

Das Punktat wurde zum Aufsuchen der Eizellen in eine Petrischale gegossen und lichtmikroskopisch bei schwacher Vergrößerung betrachtet, um die Eizellen bzw. den Komplex aus Cumulus oophorus und Oozyte ("cumulus oocyte complex", COC) aufzusuchen. Es folgte eine mechanische Reinigung des COC, ohne jedoch den Cumulus oophorus zu verletzen.

Die gereinigten Eizellen wurden in Schälchen mit Kulturmedium gegeben und bis zur Durchführung der extrakorporalen Befruchtung im Inkubator aufbewahrt.

2.3.2 Spermengewinnung und Spermienpräparation

Die Samenproben wurden durch Masturbation gewonnen, der eine sexuelle Karenzzeit von 2-5 Tagen vorausging. Die Ejakulation erfolgte in ein steriles Gefäß. Die Ejakulatanalyse führten wir nach einer Verflüssigungszeit von ca. 30 Minuten durch. Uhrzeit der Gewinnung sowie die Verflüssigungszeit wurden notiert.

Wir untersuchten das Nativ- und das aufgearbeitete Ejakulat nach den Richtlinien der WHO (WHO Laboratory Manual, 3rd edition, 1992). Farbe, Beschaffenheit, pH, Volumen (ml), Spermienkonzentration (Mio./ml), Menge (Mio.), Leukozyten/Rundzellen (Mio./ml), Bakterien/Detritus (0-3), sowie Beweglichkeit (%), Vitalität (%) und Morphologie (%) gingen in die Beurteilung ein.

Die Aufarbeitung des Ejakulats erfolgte durch eine PureSperm-Kissenzentrifugation (Nidacon, Schweden) und anschließendem Swim-up. Bei der Spermienpräparation durch Zentrifugation und Waschen wurde das

verflüssigte Ejakulat vorsichtig auf das Pure-Sperm-Kissen pipettiert und über 5-10 Minuten bei 300-500 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgezogen. Der Bodensatz (Pellet), der die Spermien enthielt, wurde erneut mit mehreren Millilitern des Waschmediums versetzt und für weitere 3 Minuten zentrifugiert. Der neu entstandene Überstand wurde wiederum abgezogen und das Pellet mit Medium in Suspension gegeben und gemischt.

Nach diesen verschiedenen Zentrifugations- und Waschschritten erfolgte die Inkubation der Spermiesuspension bei 37 °C für das Swim-up. Hierfür wurde die Spermiesuspension mit Medium überschichtet, in das die motilen Spermien hochschwimmen. Die Entnahme der ersten Swim-up Fraktion erfolgte nach 20 Minuten, die zweite Swim-up Fraktion wurde nach weiteren 20 Minuten entnommen. Weitere Abnahmen des Swim-ups erfolgten je nach Erfordernis. Bei der IVF-Methode waren meist weniger Swim-up Entnahmen erforderlich als bei der ICSI-Methode, bei der zwar nur sehr wenige Spermien benötigt werden, das Ejakulat jedoch hochgradig eingeschränkt ist.

Bei der IVF-Methode erfolgte eine Resuspension der abgehobenen Spermien. Bei der ICSI-Methode wurde der Überstand abgehoben und die gewonnenen Spermien in ICSI-Schälchen in Polyvinylpyrrolidon- (PVP-) Tropfen pipettiert.

2.3.3 Extrakorporale Befruchtung

Vier Stunden nach der Eizellgewinnung erfolgte die Insemination der Eizellen mit den aufgearbeiteten Spermien des Ehemanns.

Beim IVF-Verfahren wurde jede Eizelle mit 40000-80000 motilen Spermien inkubiert.

Bei der ICSI-Methode wurde der Cumulus oophorus und die Corona radiata enzymatisch und mechanisch von der Oozyte entfernt. Nur Oozyten, bei denen die Ausstoßung des ersten Polkörperchens erkennbar war, d.h. die sich in der Metaphase II befanden, konnten für die Mikroinjektion verwendet werden. Es wurde ein vitales und möglichst motiles Spermium für die Injektion ausgewählt. Die Apparatur zur Durchführung der ICSI-Methode ist in Abbildung

2.3.1 und 2.3.2 dargestellt. Abbildung 2.3.3 zeigt die Methode der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion.

Nach dem Einbringen des Spermiums in die Oozyte wurde jede Eizelle einzeln in eine Petrischale mit neuem IVF-Medium bzw. Universal-IVF-Medium gegeben, das bei Vitrolife mit Ovoil™, bei MediCult mit Paraffinöl überzogen war.

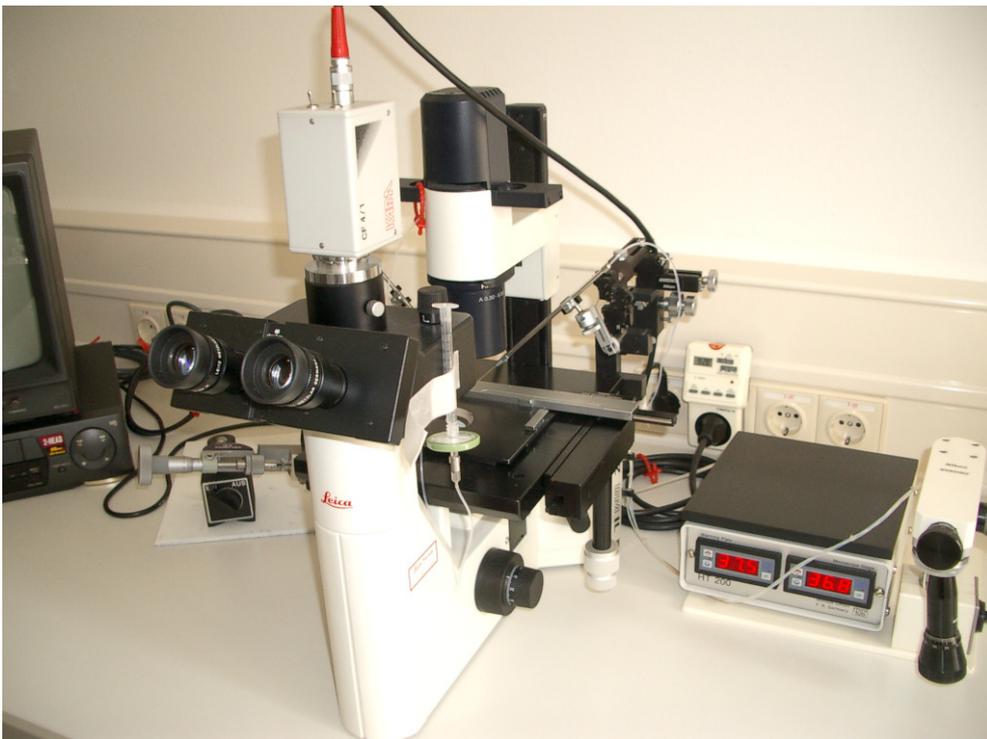


Abb. 2.3.1: Apparatur zur Durchführung der ICSI-Methode

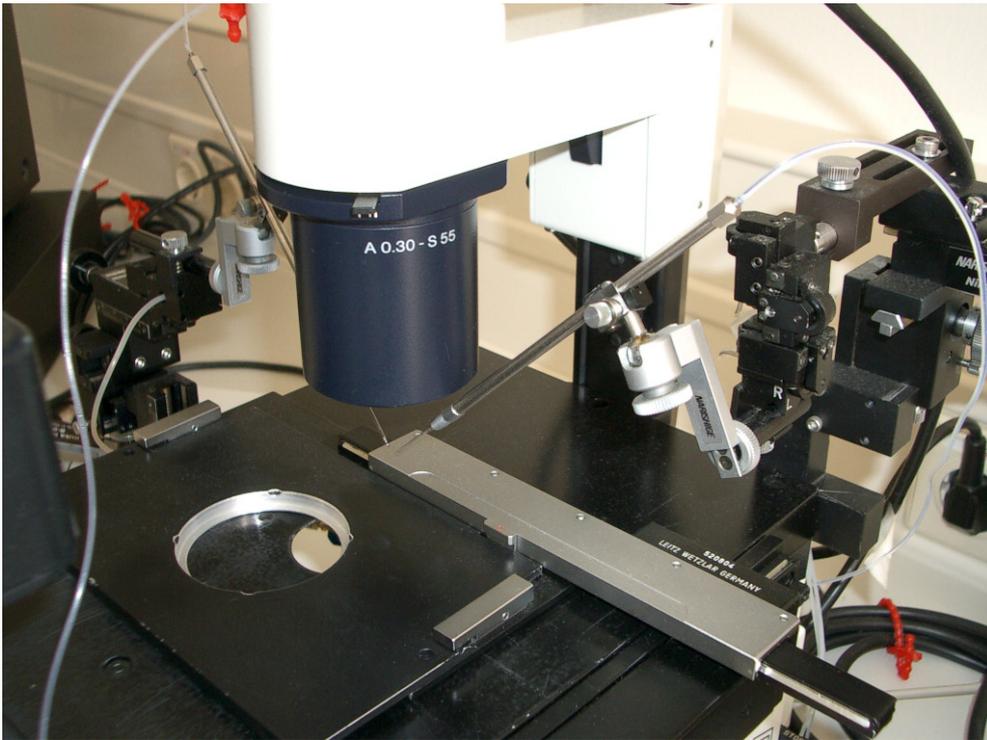


Abb. 2.3.2: Detailansicht der ICSI-Apparatur



Abb. 2.3.3: Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

2.4 Embryokultur

Am Tag vor der Oozytenentnahme erfolgte die Randomisierung zur Vitrolife- oder MediCult-Gruppe. Bei 87 Patientinnen erfolgte die Embryokultur in Vitrolife- (Vitrolife, Göteborg, Schweden), bei 89 Patientinnen in MediCult-Medien (MediCult, Jyllinge, Dänemark).

In der Vitrolife-Gruppe wurde je nach embryonalem Entwicklungsstadium IVF-Medium, G 1.2- oder G 2.2-Medium eingesetzt. In der MediCult-Gruppe wurde Universal IVF-Medium, BlastAssist M1- oder BlastAssist M2-Medium verwendet (Tabelle 2.4.1). Abbildung 2.4.1 zeigt Beispiele von Kulturmedien.

Entwicklungsstadium	Vitrolife	MediCult
Fertilisation	IVF-Medium	Universal-IVF-Medium
Tag 1 (bis Vorkern-Stadium)	IVF-Medium	Universal-IVF-Medium
Tag 2, Tag 3 (< 6 Blastomeren)	G 1.2	BlastAssist M1
ab Tag 3 (> 6 Blastomeren)	G 2.2	BlastAssist M2

Tab. 2.4.1: Abfolge der Kulturmedien



Abb. 2.4.1: Beispiele für Kulturmedien

Quelle: Linkes Bild Kulturmedien der Firma MediCult

Rechtes Bild Kulturmedien der Firma Vitrolife

Bis zum Vorkern-Stadium wurden die imprägnierten Eizellen in IVF-Medium (Vitrolife) bzw. in Universal-IVF-Medium (MediCult) kultiviert. Zeigten die Embryonen nach 48-stündiger Kultivierung in G 1.2-Medium (Vitrolife) bzw. BlastAssist M1-Medium (MediCult) mindestens sechs Blastomeren, wurde das Medium gewechselt. In der Vitrolife-Gruppe wurde nun G 2.2-Medium verwendet. In der MediCult-Gruppe setzten wir BlastAssist M2-Medium ein. Während das MediCult-Medium täglich gewechselt werden musste, konnte das Vitrolife-Medium für 48 Stunden belassen werden. Embryonen mit weniger als sechs Blastomeren wurden für weitere vier Stunden im G 1.2- bzw. BlastAssist M1-Medium belassen und danach erneut betrachtet. War das 6-Zell-Stadium erreicht, wurden die Embryonen in G2.2- bzw. BlastAssist M2-Medium gegeben. Die Embryonen, die bei der Kontrolle nach vier Stunden das 6-Zell-Stadium nicht erreicht hatten, wurden nach weiteren zwei Stunden in G1.2 bzw. BlastAssist M1-Medium erneut beurteilt. War das 6-Zell-Stadium erreicht, wurden sie in G 2.2- bzw. BlastAssist M2-Medium weiterkultiviert, die übrigen wurden im ursprünglichen Medium belassen.

Die imprägnierten Eizellen wurden einzeln in einen Mikrotropfen von Kulturmedium gegeben, um die individuelle Entwicklung jeder einzelnen Zygote beurteilen zu können. In der Vitrolife-Gruppe wurde eine Mikrokultur in kleinen Tröpfchen von 5-10 µl des G 1.2-Mediums angelegt, in der MediCult-Gruppe von BlastAssist M1-Medium. Es erfolgte eine Überschichtung mit Ovoil™ (Vitrolife) bzw. Paraffinöl (MediCult), die dazu diente, die befruchtete Eizelle vor Kontamination, pH-, Konzentrations-, Osmolaritätsänderungen und extremen Temperaturschwankungen zu schützen.

Die Inkubation erfolgt bei 37 °C mit 5 % CO₂ (IVF-Medium, Universal-IVF-Medium, M1 und M2) bzw. 6 % CO₂ (G 1.2 und G 2.2).

Die Beurteilung der Entwicklung jeder einzelnen Zygote erfolgte standardisiert mit Hilfe verschiedener Scores. Nach 16-18 Stunden wurden die Zygoten lichtmikroskopisch betrachtet und der Vorkern-Score erhoben (Zollner et al., 2002b). An Tag 3 erfolgte die Beurteilung der embryonalen Entwicklung mittels Embryo-Score (Steer et al., 1992) und an Tag 4 und 5 wurde der Blastozysten-Score erhoben (Bongso, 1999).

Der Embryotransfer erfolgte zwischen Tag 3 und Tag 5 nach Oozytenentnahme, d.h. nach einer Kulturdauer von vier bis sechs Stunden (Tag 3-Transfer), einem Tag (Tag 4-Transfer) bzw. zwei Tagen (Tag 5-Transfer) in G2.2 bzw. M2-Medium.

2.5 Beurteilung der embryonalen Entwicklung

2.5.1 Vorkern-Score (Pronukleus-Score)

16-18 Stunden nach Insemination bzw. Injektion wurden die Oozyten lichtmikroskopisch bei einer 250-fachen Vergrößerung betrachtet. Es wurde kontrolliert, ob Fertilisationszeichen vorhanden waren und der Vorkern-Score erhoben (Zollner et al., 2002b). Zur Dokumentation wurden die imprägnierten Eizellen fotografiert. Eine normale Fertilisation lag definitionsgemäß vor, wenn zwei Vorkerne zu erkennen waren.

Der Vorkern-Score (Zollner et al., 2002b) schloss die Parameter Anzahl an Vorkernen, Nebeneinanderstellung und Größe der Vorkerne, zytoplasmatischen Halo-Effekt, Anordnung und Anzahl der Nukleoli in den Vorkernen, Vorkommen von Vakuolen und Aussehen des Ooplasmas in die Beurteilung ein und half, anhand dieser morphologischen Kriterien die Wahrscheinlichkeit für eine normale embryonale Entwicklung abzuschätzen (Tabelle 2.5.1). Beispiele für die Erhebung des Vorkern-Scores zeigt Abbildung 2.5.1.

	1	2	3	4
Anzahl an Vorkernen	2 Vorkerne	-	-	1 Vorkern
Nebeneinanderstellung der Vorkernen	Eng beieinander	Nah	Getrennt voneinander	Nur 1 Vorkern
Größe der Vorkerne	Gleich	Ungleich	-	Nur 1 Vorkern
Zytoplasmatischer Halo-Effekt	Normal	Schwach	Stark	Kein Halo-Effekt
Anordnung der Nukleoli in Vorkern 1	In einer Reihe	Beginnend in einer Reihe	Ungeordnet	Keine Nukleoli oder kein Vorkern
Anordnung der Nukleoli in Vorkern 2	In einer Reihe	Beginnend in einer Reihe	Ungeordnet	Keine Nukleoli oder kein Vorkern
Anzahl an Nukleoli in Vorkern 1	3-5	>5	<3	Keine Nukleoli oder kein Vorkern
Anzahl an Nukleoli in Vorkern 2	3-5	>5	<3	Keine Nukleoli oder kein Vorkern
Vorkommen von Vakuolen	Keine Vakuolen	Schwach vakuolisiert	Stark vakuolisiert	-
Aussehen des Ooplasmas	Homogen granuliert	Stark granuliert	-	-

Tab. 2.5.1: Vorkern-Score (Zollner et al., 2002b)

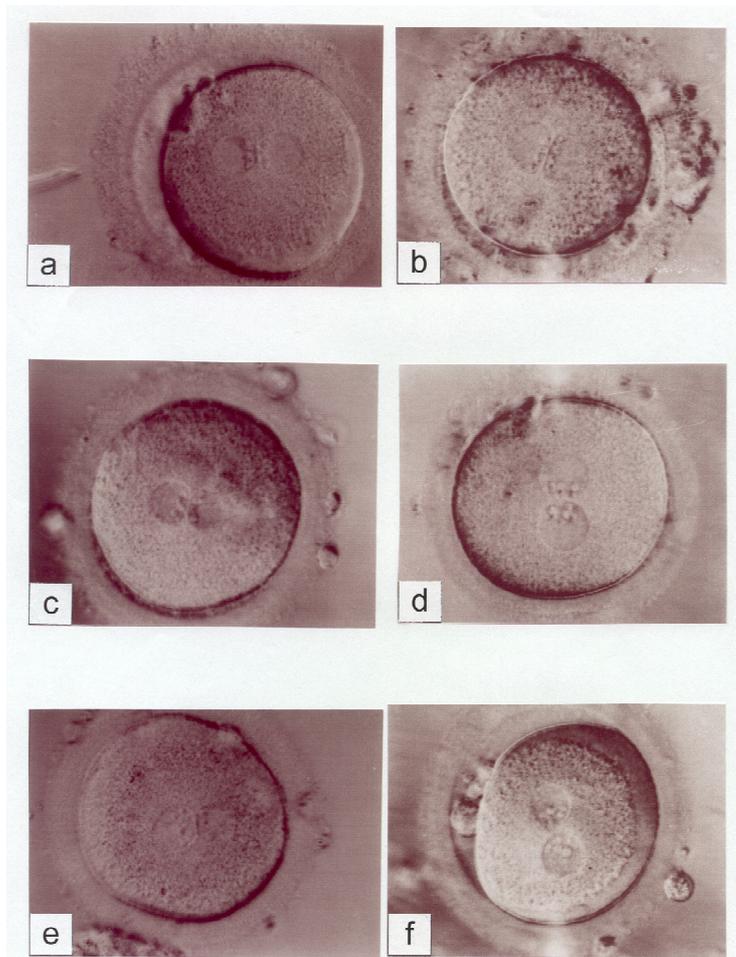


Abb. 2.5.1: Beispiele zur Erhebung des Vorkern-Scores (Zollner et al., 2002b)

a) Score = 10 (2 Vorkerne; Nebeneinanderstellung der Vorkerne: eng beieinander; Größe der Vorkerne: gleich; normaler Halo Effekt; Anordnung der Nukleoli in beiden Vorkernen: in einer Reihe; Anzahl an Nukleoli in beiden Vorkernen: 3-5; Keine Vakuolen; Aussehen des Ooplasmas: homogen granuliert)

b) Score = 11 (schwacher Halo Effekt)

c) Score = 12 (schwacher Halo Effekt; Größe der Vorkerne: ungleich)

d) Score = 16 (Nebeneinanderstellung der Vorkerne: nah; kein Halo-Effekt; Anzahl an Nukleoli in beiden Vorkernen: >5)

e) Score = 17 (Nebeneinanderstellung der Vorkerne: nah; Größe der Vorkerne: ungleich; kein Halo-Effekt; Anordnung der Nukleoli in Vorkern 2: beginnend in einer Reihe; Anzahl an Nukleoli in Vorkern 2: >5)

f) Score = 17 (Nebeneinanderstellung der Vorkerne: getrennt voneinander; starker Halo Effekt; Anordnung der Nukleoli in Vorkern 2: beginnend in einer Reihe; Anzahl an Nukleoli in beiden Vorkernen: >5)

Basierend auf diesem Score wurden die besten Vorkernstadien (Pronukleusstadien, Score < 15) für die weitere Kultivierung ausgewählt, wobei die Anzahl durch das ESchG auf maximal drei beschränkt war.

Abhängig vom Alter der Patientin, von der Vorgeschichte und vom Wunsch der Paare wurden zwei bis drei PN-Stadien mit dem besten Entwicklungspotenzial (niedrigster Vorkern-Score) weiterkultiviert. Überzählige befruchtete Eizellen wurden je nach Wunsch der Paare kryokonserviert oder verworfen. Der mittlere Vorkern-Score wurde berechnet, indem die Summe der Vorkern-Scores der ausgewählten PN-Stadien durch deren Anzahl dividiert wurde.

In den IVF-Zyklen wurden verbliebene Cumulus- und Corona-Zellen mechanisch abpräpariert. IVF- und ICSI-Pronuklei wurden einzeln in einen Mikrotropfen von Kulturmedium gegeben, um die individuelle Entwicklung jedes einzelnen Pronukleus verfolgen und beurteilen zu können. Eine weitere Beurteilung der Entwicklung folgte an Tag 3, 4 und 5 und wurde wiederum fotodokumentiert.

Eine Übersicht über die embryonale Entwicklung an den verschiedenen Kulturtagen gibt Tabelle 2.5.2.

Tag	Stadium
1	2 Pronuklei
2	2- bis 8-Zeller
3	8- bis 16-Zeller, „compacting embryo“
4	16-Zeller, Morula („compacted embryo“) oder frühe Blastozyste („early cavitating blastocyst“)
5	Verschiedene Stadien der Blastozyste („late cavitating“, „early“ oder „expanded blastocyst“)
6	Schlüpfende oder geschlüpfte Blastozyste („fully expanded“, „hatching“ oder „hatched blastocyst“)

Tab. 2.5.2: Normale Entwicklung der Furchungsstadien in Abhängigkeit von der Dauer der Embryokultur
 Tag 0 = Tag der Eizellentnahme und Insemination (Steck, Praxis der Fortpflanzungsmedizin, 2001)

2.5.2 Embryo-Score

Eine erneute Beurteilung des Entwicklungsstadiums der Embryonen erfolgte an Tag 3 anhand eines Embryo-Scores, der das Potenzial für eine weitere normale Entwicklung abzuschätzen half (Steer et al., 1992). Der Embryo-Score nach Steer bezieht die Zahl und Beschaffenheit der Blastomeren sowie deren Fragmentation in die Beurteilung ein (Tabelle 2.5.3).

Grad	Blastomere	Fragmente
4	Regelmäßig, gleiche Größe	< 10 % der Blastomeren
3	Unregelmäßig, ungleiche Größe	< 10 % der Blastomeren
2	Unregelmäßig, ungleiche Größe	10-50 % der Blastomeren
1	Unregelmäßig, ungleiche Größe	>50 % der Blastomeren

Tab. 2.5.3: Embryo-Score (Steer et al., 1992)

Für die Berechnung des Embryo-Scores nach Steer wurde der morphologische Grad (Grad 1-4) mit der Anzahl an Blastomeren multipliziert. Der mittlere Embryo-Score wurde berechnet, indem die Summe aus den Embryo-Scores der transferierten Embryonen durch deren Anzahl dividiert wurde.

2.5.3 Blastozystenbeurteilung

Embryonen, bei denen kein Tag 3-Transfer erfolgte, wurden die folgenden ein bis zwei Tage in G 2.2- bzw. BlastAssist M2-Medium kultiviert.

An Tag 5 erfolgte erneut eine Beurteilung der embryonalen Entwicklung, basierend auf morphologischen Kriterien und der Teilungsgeschwindigkeit des Embryos (Bongso, 1999). Acht verschiedene Grade der embryonalen Entwicklung wurden unterschieden:

- 1 = voll expandierte Blastozyste ("*fully expanded blastocyst*")
Charakteristika: deutliche innere Zellmasse und Trophoektoderm erkennbar; dünne Zona pellucida; Blastocoel füllt den Embryo aus
- 2 = expandierende Blastozyste ("*expanding blastocyst*")
Charakteristika: deutliche innere Zellmasse und Trophoektoderm erkennbar; Ausdünnung der Zona pellucida; Größenzunahme des Blastocoel, aber noch keine vollständige Ausfüllung des Embryos
- 3 = frühe Blastozyste ("*early blastocyst*")
Charakteristika: deutliche innere Zellmasse, Trophoektoderm und Blastocoel erkennbar
- 4 = spät kavitierender Embryo mit > 50 % Blastocoel ("*late cavitating embryo*")
Charakteristika: deutliches Blastocoel, das >50 % des Embryos ausfüllt; innere Zellmasse und Trophoektoderm noch nicht differenziert
- 5 = früh kavitierender Embryo mit < 50 % Blastocoel ("*early cavitating embryo*")
Charakteristika: Blastocoel füllt <50 % des Embryos aus

- 6 = kompaktierter Embryo ("*compacted embryo*")
Charakteristika: Blastomeren sind vollständig fusioniert; beginnende Differenzierung in eine innere und äußere Zellmasse
- 7 = kompaktierender Embryo ("*compacting embryo*")
Charakteristika: beginnende Verschmelzung der Blastomeren
- 8 = in der Entwicklung stehengebliebener Embryo ("*arrested embryo*")

Die mittlere Blastozystenbeurteilung errechnete sich aus der Summe der einzelnen Blastozystengrade dividiert durch die Anzahl der ausgewählten Embryonen.

Beispiele für unterschiedliche embryonale Entwicklungsstufen gibt Abbildung 2.5.2.

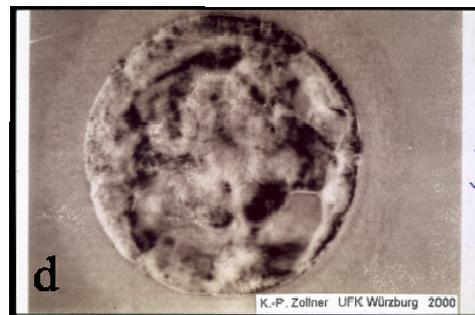
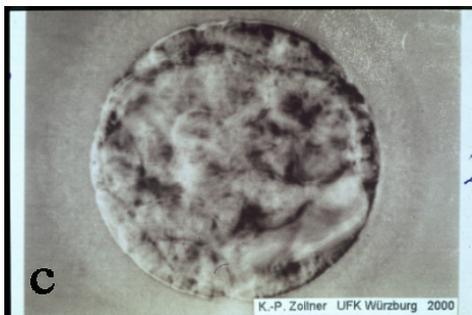


Abb. 2.5.2: Embryonale Entwicklungsstadien
 a) kompaktierender Embryo
 b) 8-Zeller
 c) früh kavitierender Embryo
 d) spät kavitierender Embryo
 e) voll expandierte Blastozyste
 f) arretierter Embryo am Tag 5

2.6 Embryotransfer und Schwangerschaft

Der Embryotransfer erfolgte zwischen Tag 3 und Tag 5 nach Oozytenentnahme. Der Zeitpunkt des Embryotransfers war abhängig von vorangehenden erfolglosen IVF-Zyklen, Wünschen der Paare und terminlichen Gründen (z.B. Wochenende).

Es wurden maximal drei Embryonen intrauterin transferiert. Abhängig vom Alter der Patientin (< 35 Jahre), Vorbehandlung und Ansprechen auf die Ovarstimulation wurden zwei bis drei Embryonen in den Fundus des Uterus platziert. In Ausnahmefällen, in denen sich nur ein Embryo entwickelt hatte, wurde nur dieser transferiert.

Die Lutealphase wurde durch vaginale Applikation von Progesteron (Crinone®, Serono, Unterschleissheim, Deutschland oder Utrogest®, Kade/Besins, Berlin, Deutschland) und manchmal durch eine Injektion von 5000 IE HCG gestützt.

Die Feststellung einer Schwangerschaft erfolgte durch Bestimmung des Serum- β -HCG 14 Tage nach dem Embryotransfer. Eine klinische Schwangerschaft lag definitionsgemäß vor, wenn sonografisch eine Embryonalanlage festgestellt werden konnte.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS 10.0.

Da nicht alle erhobenen Daten normalverteilt waren, wurden die Ergebnisse als Median, Minimum und Maximum angegeben.

Der Mann-Whitney-U-Test diente dazu, Unterschiede zwischen Gruppen festzustellen. Die χ^2 -Analyse half, Abhängigkeiten zwischen zwei qualitativen Variablen zu ermitteln. Mit Hilfe der Spearman'schen Rangkorrelation wurde festgestellt, ob zwischen zwei Parametern eine Korrelation besteht.

Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich des Patientenkollektivs

Die Vitrolife- und die MediCult-Gruppe waren aus einem vergleichbaren Patientenkollektiv zusammengesetzt. In keinem der folgenden, in der Anamnese erhobenen Parametern fand sich ein signifikanter Unterschied. Das Alter der Patientinnen und ihrer Ehemänner, die Dauer der ungewollten Kinderlosigkeit, die Anzahl vorausgegangener Behandlungszyklen, Vorbehandlungen durch verschiedene reproduktionsmedizinische Verfahren, die Anzahl an Raucherinnen, Vorhandensein von Hirsutismus oder Hyperandrogenämie sowie die Zyklusanamnese unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant (Tabelle 3.1.1).

	Vitrolife (n=87)	MediCult (n=89)	p
Alter Patientin [Jahre]	34 (23-42)	32 (22-42)	ns
Alter Ehemann [Jahre]	36 (27-54)	34 (21-47)	ns
Dauer Kinderlosigkeit [Jahre]	4 (1-12)	4 (1-12)	ns
Aktueller Zyklus [Anzahl]	2 (1-6)	2 (1-11)	ns
BMI [kg/m²]	22,3 (17,0-37,7)	22,6 (16,9-43,3)	ns
Vorbehandlung Hormonstimulation [Anzahl]	1 (0-12)	0 (0-20)	ns
Vorbehandlung Insemination [Anzahl]	2 (0-16)	1 (0-10)	ns
Vorbehandlung IVF-Zyklen [Anzahl]	0 (0-5)	0 (0-10)	ns
Vorbehandlung ICSI-Zyklen [Anzahl]	0 (0-5)	0 (0-7)	ns
Vorbehandlung KET's [Anzahl]	0 (0-8)	0 (0-5)	ns

Tab. 3.1.1: Anamnestische Daten der Vitrolife- und MediCult-Gruppe im Vergleich
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben
ns = nicht signifikant

Von den 87 Patientinnen der Vitrolife-Gruppe lag bei 74 (85,1 %) eine Eumenorrhoe und bei 13 Patientinnen (14,9 %) eine Oligomenorrhoe vor. Bei den 89 Patientinnen der MediCult-Gruppe wurde bei 73 (82,0 %) eine Eumenorrhoe und bei 16 Patientinnen (18,0 %) eine Oligomenorrhoe festgestellt.

Die basale Hormonanalyse, die vor der Behandlung bei den Patientinnen durchgeführt wurde, zeigte ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen der Vitrolife- und der MediCult-Gruppe (Tabelle 3.1.2).

	Vitrolife (n=87)	MediCult (n=89)	p
FSH [mU/ml]	5,4 (1,5-9,0)	5,5 (1,5-9,8)	ns
LH [mU/ml]	5,0 (0,7-15,2)	5,2 (0,7-18,0)	ns
Östradiol [pg/ml]	64,5 (10,0-626,0)	68,5 (17,0-231,0)	ns
Progesteron [ng/ml]	0,4 (0,1-17,3)	0,4 (0,1-17,3)	ns
Prolaktin [ng/ml]	10,6 (5,9-48,6)	13,8 (1,0-175,0)	ns
Testosteron [pg/ml]	345,0 (0,5-880,0)	325,5 (0,5-817,0)	ns
DHEAS [ng/ml]	1560 (412-3425)	1751 (127-4138)	ns
17-OH-Progesteron [ng/dl]	99,9 (20,6-256,3)	96,5 (52,0-273,0)	ns
Androstendion [ng/ml]	2,3 (1,1-5,7)	2,3 (1,3-7,3)	ns
TSH basal [mU/ml]	1,25 (0,03-3,7)	1,4 (0,1-5,1)	ns

Tab. 3.1.2: Basale Hormonwerte der Vitrolife- und MediCult-Gruppe im Vergleich
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben.

Das Ejakulat wurde nativ sowie nach Aufarbeitung bezüglich pH, Volumen (ml), Spermienkonzentration (Mio./ml), Menge (Mio.), Leukozyten/Rundzellen (Mio./ml), Bakterien/Detritus (0-3), sowie in Bezug auf Motilität (%), Vitalität (%) und Morphologie (%) untersucht. Die erhobenen Werte unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant.

Da die Spermienqualität bei der ICSI-Methode meist besonders eingeschränkt ist, untersuchten wir das Ejakulat getrennt nach der IVF- und ICSI-Methode (Tabelle 3.1.3 und 3.1.4).

	Vitrolife (n=45)	MediCult (n=39)	p
pH	7,6 (7,2-8,0)	7,7 (7,2-8,0)	ns
Volumen [ml]	0,25 (0,05-0,5)	0,2 (0,05-0,6)	ns
Konzentration [Mio/ml]	19,7 (5,3-50,0)	21,3 (4,1-77,4)	ns
Menge [Mio]	4,4 (1,1-24,0)	4,5 (0,8-31,2)	ns
Leukozyten/Rundzellen [Mio/ml]	0 (0-1)	0 (0-0)	ns
Bakterien/Detritus [Anzahl]	0 (0-2)	0 (0-1)	ns
Motilität a+b [%]	72,5 (50,0-96,0)	83,5 (41,0-91,0)	ns
Vitalität [%]	85 (68-99)	93 (84-99)	0,027
Morphologie [%]	18 (6-79)	20 (10-70)	ns

Tab. 3.1.3: Aufgearbeitetes Ejakulat der Vitrolife- und MediCult-Gruppe: IVF-Methode
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben

	Vitrolife (n=42)	MediCult (n=50)	p
pH	7,7 (7,3-8,0)	7,7 (7,2-8,0)	ns
Volumen [ml]	0,2 (0,1-0,9)	0,2 (0,05-0,5)	ns
Konzentration [Mio/ml]	3,5 (0,5-53,8)	5,3 (0,0-22,5)	ns
Menge [Mio]	1,3 (0,13-21,5)	1,78 (0,15-26,0)	ns
Leukozyten/Rundzellen [Mio/ml]	0 (0-1)	0 (0-0)	ns
Bakterien/Detritus [Anzahl]	0 (0-1)	0 (0-2)	ns
Motilität a+b [%]	54,0 (17,0-98,0)	51,0 (0,0-94,0)	ns
Vitalität [%]	82 (32-98)	76 (0-98)	ns
Morphologie [%]	9 (4-18)	11 (4-18)	ns

Tab. 3.1.4: Aufgearbeitetes Ejakulat der Vitrolife- und MediCult-Gruppe: ICSI-Methode
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben.

3.2 Vergleich von Eizellgewinnung, Fertilisation und Embryotransfer

In der Gesamtbeurteilung (IVF und ICSI) zeigten die Patientinnen der Vitrolife- und der MediCult-Gruppe weder beim Hormonbedarf zur Ovarstimulation, noch bei den E₂-Werten nach ovarieller Stimulation signifikante Unterschiede.

Die ovarielle Stimulation wurde im Median über zwölf Tage mit 26 Ampullen zu je 75 IE Gonadotropin durchgeführt, d.h. die Patientinnen erhielten im Median 1950 IE Gonadotropine. Der Östradiolspiegel betrug an Tag 6 im Median 367,0 pg/ml, vor HCG-Gabe im Median 1786,0 pg/ml.

In 84 IVF- und 92 ICSI-Zyklen konnten insgesamt 2094 Oozyten gewonnen werden, was einem Durchschnitt von 11,9 Eizellen pro Zyklus entspricht. Insgesamt konnten 1618 Oozyten fertilisiert werden und erreichten nach 14-18 Stunden das Pronukleus-Stadium. Die Gesamt-Fertilisationsrate (FR, IVF und ICSI) betrug 84,0 % (Median) und unterschied sich zwischen der Vitrolife- (FR = 87,5 %) und MediCult-Gruppe (FR = 80,0 %) nicht signifikant.

Bei getrennter Beurteilung der ovariellen Stimulation und Eizellgewinnung nach IVF- und ICSI-Methode zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kulturmedien. Die Fertilisationsrate war in der getrennten Betrachtung jedoch bei der ICSI-Methode in der Vitrolife-Gruppe signifikant besser (Tabelle 3.2.1 und 3.2.2).

	Vitrolife (n = 45)	MediCult (n = 39)	p
Stimulationsdauer [Tage]	12 (8-20)	11 (9-27)	ns
Gonadotropinverbrauch [Anzahl Ampullen]	28 (16-92)	25 (11-64)	ns
Östradiol Tag 6 [pg/ml]	289 (10-1215)	350 (10-1349)	ns
Östradiol vor HCG-Gabe [pg/ml]	1853 (259-5419)	1646 (375-5158)	ns
Anzahl gewonnener Kumuluskomplexe	12 (1-29)	9 (2-27)	ns
Anzahl fertilisierter Oozyten	7 (1-27)	6 (1-19)	ns
Fertilisationsrate [%]	79,0 (12,5-100)	75,0 (28,6-100)	ns

Tab. 3.2.1: Ovarielle Stimulation und Fertilisation bei IVF: Vitrolife vs. MediCult
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben

	Vitrolife (n = 42)	MediCult (n = 50)	p
Stimulationsdauer [Tage]	12 (8-19)	11 (9-18)	ns
Gonadotropinverbrauch [Ampullen]	26 (16-51)	25 (13-90)	ns
Östradiol Tag 6 [pg/ml]	366 (10-2008)	399 (33-1279)	ns
Östradiol vor HCG-Gabe [pg/ml]	1934 (411-5463)	1747 (723-6290)	ns
Anzahl gewonnener Kumuluskomplexe	13,5 (2,0-29,0)	11 (2-27)	ns
Anzahl MII-Oozyten	10 (2-21)	9 (2-26)	ns
Anzahl fertilisierter Oozyten	9 (1-19)	7 (1-22)	ns
Fertilisationsrate [%]	92,6 (20,0-100)	83,3 (20,0-100)	0,044

Tab. 3.2.2: Ovarielle Stimulation und Fertilisation bei ICSI: Vitrolife vs. MediCult
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben

Es wurden insgesamt 474 Embryonen kultiviert, davon 235 in Vitrolife- und 239 in MediCult-Medien.

In 128 Fällen (73 %) wurden drei Embryonen, in 42 Fällen (24 %) zwei und in sechs Fällen (3 %) ein Embryo kultiviert. Zwischen der Vitrolife- und MediCult-Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl kultivierter Embryonen. Im Median erfolgte die Kultur von drei Embryonen.

Die überzähligen imprägnierten Eizellen wurden je nach Wunsch des Paares kryokonserviert oder verworfen.

Es wurden ein bis drei Embryonen transferiert, im Median erfolgte der Transfer von drei Embryonen (Abbildung 3.2.1). Die Anzahl transferierter Embryonen zwischen der Vitrolife- und MediCult-Gruppe war vergleichbar.

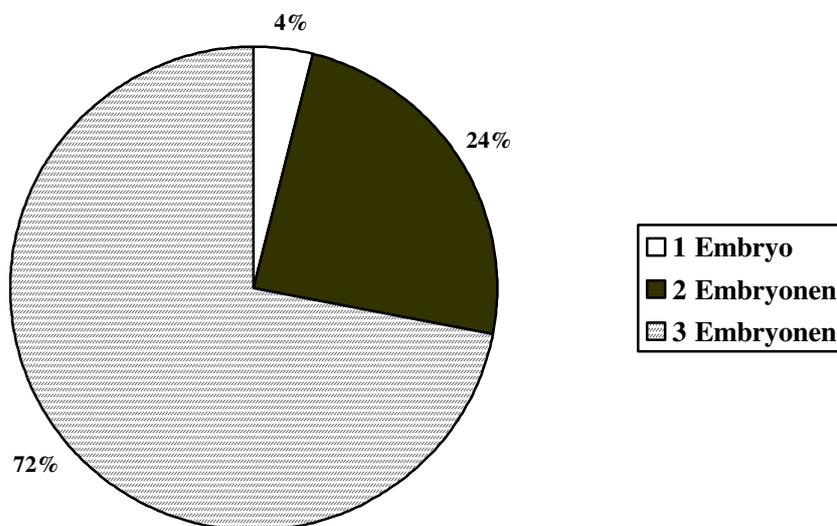


Abb. 3.2.1 : Anzahl transferierter Embryonen

Der Embryotransfer erfolgte zwischen Tag 3 und Tag 5, im Median erfolgte ein Tag 3-Transfer (Abbildung 3.2.2). Der Transfertag unterschied sich zwischen der Vitrolife- und MediCult-Gruppe nicht signifikant.

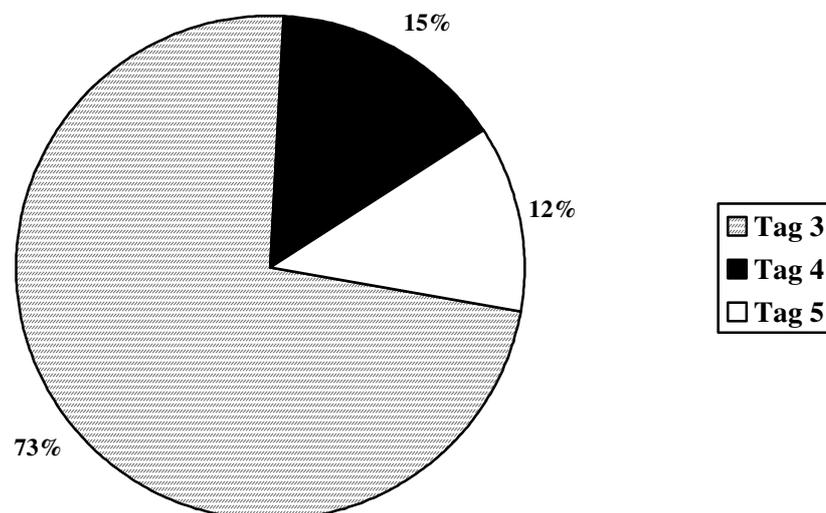


Abb. 3.2.2 : Tag des Embryotransfers

3.3 Vergleich der embryonalen Entwicklung

Bei der embryonalen Entwicklung fanden sich beim Vergleich der frühen Entwicklungsstufen der Embryonen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kulturmedien. Es ergaben sich sowohl in der mittleren Beurteilung aller transferierter Embryonen, als auch in der Einzelbewertung eines jeden Embryos signifikante Differenzen zwischen den untersuchten Gruppen.

Die Beurteilung aller transferierter Embryonen erbrachte beim mittleren Vorkern-Score an Tag 1 und beim mittleren Embryo-Score nach Steer an Tag 3 signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die besseren Bewertungen konnten dabei jeweils in der Vitrolife-Gruppe festgestellt werden.

Nach 5 Tagen Kulturdauer fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturmedien. Die mittlere Blastozystenbeurteilung, die Anzahl an Blastozysten, die Anzahl an in der Entwicklung stehengebliebener Embryonen ("arrested embryos"), sowie die Anzahl transferierter Embryonen unterschieden sich in den beiden Kultursystemen nicht signifikant. Auch die Implantationsrate pro transferiertem Embryo und die Schwangerschaftsrate waren in beiden Gruppen ähnlich (Tabelle 3.3.1).

Bei der Embryoeinzelbewertung bestätigten sich die in der frühen embryonalen Entwicklung festgestellten signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturmedien. Die Blastozystenbeurteilung zeigte bei der Embryoeinzelbewertung, wie auch beim Vergleich aller transferierter Embryonen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 3.3.2).

	Vitrolife (n = 87)	MediCult (n = 89)	p
Mittlerer Vorkern-Score	12 (10-30)	12,7 (10-31)	0,035
Mittlerer Embryo-Score nach Steer	23 (8,7-48)	19,7 (3,3-48)	0,047
Mittlerer Blastozystenbeurteilung	6,8 (4-8)	6,7 (2,3-8)	ns
Anzahl Blastozysten	1 (0-3)	1 (0-3)	ns
Anzahl "arrested embryos"	1 (0-3)	2 (0-3)	ns
Anzahl transferierter Embryonen	3 (1-3)	3 (1-3)	ns
Schwangerschaftsrate gesamt [%]	31,0	28,1	ns
Implantationsrate pro transferiertem Embryo [%]	13,2	13,0	ns

Tab. 3.3.1: Vergleich der embryonalen Entwicklung aller transferierter Embryonen:
 Vitrolife vs. MediCult
 Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben

	Vitrolife (n = 235)	MediCult (n = 239)	p
Zygoten-Score	12 (10-42)	13 (10-44)	0,004
Embryobeurteilung	4 (2-4)	3 (1-4)	0,027
Anzahl Blastomeren	6 (2-12)	6 (1-12)	0,003
Embryo-Score nach Steer	24 (4-48)	18 (2-48)	0,001
Blastozystenbeurteilung	7 (2-8)	7,5 (1-8)	ns

Tab. 3.3.2: Vergleich der embryonalen Entwicklung (Embryoeinzelbewertung):
 Vitrolife vs. MediCult
 Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben

3.4 Vergleich der embryonalen Entwicklung nach IVF und ICSI

Der Vergleich der embryonalen Entwicklung zwischen den beiden Kulturmedien, getrennt nach dem für die Befruchtung verwendeten Verfahren (IVF oder ICSI), erbrachte unterschiedliche Ergebnisse in der IVF- und der ICSI-Gruppe.

In der Embryoeinzelbewertung nach IVF zeigte sich ein signifikant besserer Vorkern-Score in der Vitrolife-Gruppe. Die übrigen Beurteilungen der embryonalen Entwicklung (morphologische Beurteilung des Embryos an Tag 3, Anzahl der Blastomeren, Embryo-Score nach Steer, sowie Blastozystenbeurteilung) waren nach IVF bei beiden Kulturmedien ähnlich (Tabelle 3.4.1).

Nach ICSI hingegen fanden sich in allen frühen Beurteilungen bis Tag 3 (Vorkern-Score, morphologische Beurteilung des Embryos an Tag 3, Anzahl der Blastomeren und Embryo-Score nach Steer) signifikant bessere Werte in der Vitrolife-Gruppe (Tabelle 3.4.2).

Die Blastozystenbeurteilung sowie die Implantationsrate zeigten bei der ICSI-, wie auch bei der IVF-Methode, zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3.4.1 und Tabelle 3.4.2).

	Gesamt (n = 222)	Vitrolife (n = 120)	MediCult (n = 102)	p
Vorkern-Score	13 (10-44)	12 (10-42)	8 (10-44)	0,043
Embryobeurteilung	4 (1-4)	4 (2-4)	4 (1-4)	ns
Anzahl Blastomeren	7 (2-12)	6 (2-12)	7 (2-12)	ns
Embryo-Score nach Steer	24 (2-48)	24 (4-48)	24 (2-48)	ns
Blastozystenbeurteilung	7 (1-8)	7 (3-8)	6 (1-8)	ns

Tab. 3.4.1: Vergleich der embryonalen Entwicklung (Embryoeinzelbewertung) nach IVF:
Vitrolife vs. MediCult
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben

	Gesamt (n = 252)	Vitrolife (n = 115)	MediCult (n = 137)	p
Vorkern-Score	12 (10-42)	12 (10-42)	13 (10-42)	0,037
Embryobeurteilung	3,5 (2-4)	2 (2-4)	3 (2-4)	<0,01
Anzahl Blastomeren	6 (1-12)	7 (2-12)	5 (1-12)	<0,01
Embryo-Score nach Steer	18 (2-48)	24 (6-48)	16 (2-48)	<0,01
Blastozystenbeurteilung	7 (1-8)	7 (2-8)	8 (1-8)	ns

Tab. 3.4.2: Vergleich der embryonalen Entwicklung (Embryoeinzelbewertung) nach ICSI:
Vitrolife vs. MediCult
Die Werte sind als Median, Minimum und Maximum angegeben

3.5 Vergleich der Schwangerschaftsraten

Insgesamt konnten 52 Schwangerschaften festgestellt werden, was einer Schwangerschaftsrate von 29,5 % pro Transfer entspricht.

In der Vitrolife-Gruppe wurde bei 27 der 87 (31,0 %), in der MediCult-Gruppe bei 25 der 89 Patientinnen (28,1 %) eine Schwangerschaft dokumentiert.

Bei der konventionellen IVF konnten 26 Schwangerschaften, bei der ICSI ebenfalls 26 Schwangerschaften erreicht werden (Abbildung 3.5.1).

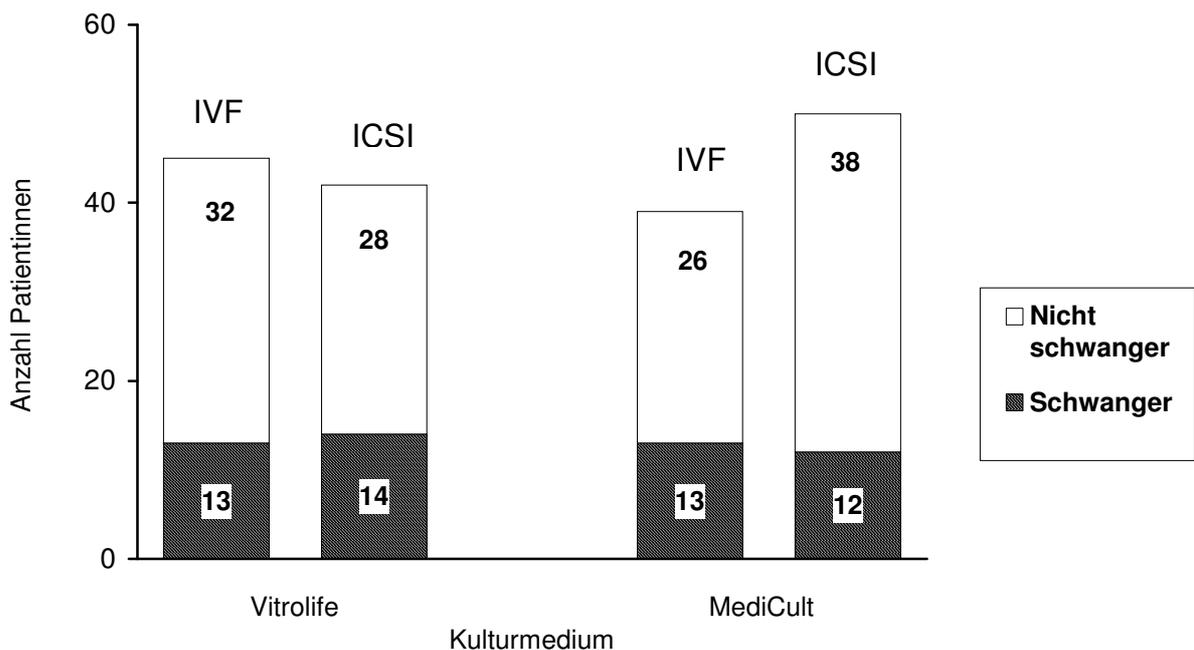


Abb. 3.5.1: Vergleich der Schwangerschaften der Vitrolife- und MediCult-Gruppe nach IVF/ICSI

Von den 52 festgestellten Schwangerschaften endeten 12 in einem Abort. Des Weiteren trat eine ektopische Schwangerschaft ein.

Insgesamt wurden 39 Schwangerschaften ausgetragen, was einer Baby-take-home Rate von 22,2 % entspricht.

Die Wahl des Kulturmediums erbrachte in Bezug auf den Schwangerschaftseintritt keinen signifikanten Unterschied (χ^2 -Test). Auch die Art des gewählten Reproduktionsverfahrens (IVF oder ICSI) erbrachte ähnliche Ergebnisse bezüglich des Schwangerschaftseintritts (χ^2 -Test).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transfertagen 3, 4 und 5 in Bezug auf die Schwangerschaftsrate. Ausserdem war die Schwangerschaftsrate an Tag 3, 4 und 5 weder zwischen den Vitrolife- und MediCult-Medien, noch zwischen der IVF- und ICSI-Methode signifikant unterschiedlich (Tabelle 3.5.1 und 3.5.2).

	SSR gesamt [%]	SSR Vitrolife [%]	SSR MediCult [%]	p
Tag 3 (n = 345)	31,0	29,9	32,3	ns
Tag 4 (n = 70)	26,9	41,7	14,3	ns
Tag 5 (n = 56)	23,8	25,0	23,1	ns
p	ns	ns	ns	

Tab. 3.5.1: Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Transfertag:
Vitrolife- vs. MediCult-Medien
SSR = Schwangerschaftsrate

	SSR gesamt [%]	SSR IVF [%]	SSR ICSI [%]	p
Tag 3 (n = 345)	31,0	33,3	28,8	ns
Tag 4 (n = 70)	26,9	33,3	21,4	ns
Tag 5 (n = 56)	23,8	11,1	33,3	ns
p	ns	ns	ns	

Tab. 3.5.2: Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Transfertag:
IVF vs. ICSI
SSR = Schwangerschaftsrate

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der Kulturmedien für die embryonale Entwicklung

Diese randomisierte Studie ergab, dass bei der sequenziellen Kultur humaner Embryonen in Vitrolife- und MediCult-Medien ähnliche Implantations- und Schwangerschaftsraten bei der künstlichen Befruchtung erzielt werden konnten. Die Fertilisationsrate war in den ICSI-Zyklen in der Vitrolife-Gruppe signifikant besser. Ausserdem zeigten sich signifikante Unterschiede während der frühen embryonalen Entwicklung. In den IVF-Zyklen war der Vorkern-Score (Tag 1) der Vitrolife-Gruppe signifikant besser, in den ICSI-Zyklen zudem der Embryo-Score (Tag 3). Der Vergleich der Ergebnisse der verlängerten Kultur bis Tag 5 erbrachte jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Kulturmedien. Die Blastozystenformationsrate sowie die Schwangerschaftsrate unterschieden sich zwischen den beiden untersuchten Medien nicht signifikant.

Ähnliche Ergebnisse beim Vergleich unterschiedlicher Kultursysteme wurden auch in anderen Studien beschrieben (Van Langendonck et al., 2001; Staessen et al., 1998; Cooke et al., 2002).

Van Langendonck et al. (2001) verglichen die sequenziellen Medien G 1.2/G 2.2 (Scandinavian IVF Science, Gothenburg, Sweden) und Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential (Cook, Brisbane, Australia) in 249 IVF-Zyklen (Tag 3- und Tag 5-Transfer). Die Studie zeigte, dass die Embryonen, die in G 1.2/G 2.2-Medium kultiviert wurden, bei Teilung, Kompaktion, Blastozystenformationsrate und Hatching eine schnellere Kinetik aufwiesen. Ausserdem war die Implantationsrate bei Tag 3-Transfer für die Fälle, in denen mehr als 5 Vorkernstadien kultiviert wurden, in der G 1.2/G 2.2-Gruppe signifikant höher. Bei Transfer im Blastozystenstadium waren die Ergebnisse beider Medien, wie auch in der vorliegenden Studie, ähnlich.

Staessen et al. (1998) verglichen im IVF-Programm (Tag 2-Transfer) die kommerziell erhältlichen sequenziellen Medien Menezo B2 in einer ersten

Studie mit MediCult-Medien (416 Zyklen) und in einer zweiten mit BM 1-Medien (117 Zyklen). In beiden Studien erreichten signifikant mehr Embryonen der Menezo B2-Gruppe bis 41 Stunden nach Insemination ein 2-8-Zellstadium. Die Fertilisations-, Implantations- und Schwangerschaftsrate waren zwischen den Medien vergleichbar.

Eine andere Studie bestätigte signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Kulturmedien bei der frühen embryonalen Entwicklung (Cooke et al., 2002). Die Modifikation eines sequenziellen Mediums durch Veränderung der Konzentration von Komponenten oder Hinzufügen von Inhaltsstoffen auf Grundlage von Erkenntnissen vorangegangener Studien, erbrachte für das veränderte Medium eine signifikant höhere Fertilisationsrate. Alle Parameter, die in Bezug auf die frühe embryonale Entwicklung bis Tag 2 gemessen wurden, waren im modifizierten Medium signifikant besser. Die Implantations- und Schwangerschaftsrate waren nicht Gegenstand dieser Studie.

Die aufgeführten Studien erbrachten, wie auch die vorliegende Studie, signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Kulturmedien bei der Beurteilung der frühen embryonalen Entwicklung bis Tag 2 und Tag 3. In den Studien, in denen eine verlängerte Kultur zum Blastozystenstadium erfolgte, waren die Ergebnisse der weiteren Entwicklung, sowie die Implantations- und Schwangerschaftsrate vergleichbar.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse, die die Embryokultur in den verschiedenen Medien erbrachte, liegt in der verschiedenartigen Zusammensetzung der Kulturmedien. In der vorliegenden Studie ist es nicht möglich, die Komponenten der Medien exakt zu vergleichen und damit möglicherweise den Grund für die bessere frühe embryonale Entwicklung in den Vitrolife-Medien zu finden, da die genaue Zusammensetzung der Medien mit Konzentrationsangaben von den Herstellern nicht bekannt gegeben wird. Eine Liste der Inhaltsstoffe findet sich in Tabelle 2.2.1 und in Tabelle 2.2.2. Das Kulturmedium G1.2 enthält z.B. die nicht-essenziellen Aminosäuren Alanin, Asparagin, Glutaminsäure, Glycin und Prolin, während als Komponenten für das Kulturmedium M1 nicht-essenzielle Aminosäuren genannt werden, nur

Glutamin wird explizit erwähnt. Ein exakter Vergleich der Inhaltsstoffe ist somit nicht möglich.

Es ist denkbar, dass der Embryo besonders während der frühen embryonalen Phase empfindlich auf Umwelteinflüsse reagiert, was sich in der unterschiedlichen Entwicklung des Embryos in den Medien widerspiegeln könnte. Bei verlängerter Kultur scheint der Embryo in der Lage zu sein, einen Entwicklungsrückstand aufzuholen.

Eine andere Studie hat das auch in der vorliegenden Studie verwendete sequenzielle Kulturmedium G 1.2/G 2.2 mit einem einfachen Medium (Rotterdam-Medium) verglichen. Die Autoren stellten eine ähnliche morphologische Beurteilung der Embryonen an Tag 3 fest (Macklon et al., 2002). Auch die morphologische Beurteilung der Embryonen an Tag 5, die Zahl an Blastozysten, sowie die Implantations- und Schwangerschaftsrate waren bei beiden Medien ähnlich. Macklon et al. folgerten aus den Ergebnissen, dass die einfachen Medien gegenüber den sequenziellen Medien gleich effektiv seien.

Zahlreiche Studien an Embryonen unterschiedlicher Spezies (Jung et al., 1987; Gardner and Leese, 1990; Gardner and Lane, 1993) beschrieben jedoch den ungünstigen Einfluss von suboptimalen Kulturbedingungen auf die embryonale Entwicklung und sehen diese nicht-optimalen Kulturbedingungen als möglichen Grund für einen Entwicklungsstillstand oder eine eingeschränkte Lebensfähigkeit des Embryos nach dem Transfer.

Gardner (1998) untersuchte am Säugetierembryo, wie sich der Bedarf an und der Verbrauch von Nährstoffen während der Präimplantationsphase verändert und formulierte Anforderungen an ein optimales Medium.

Während der Entwicklung vom mütterlichen zum embryonalen Genom durchläuft der Säugetierembryo signifikante Veränderungen in seiner Physiologie, die mit veränderten Bedürfnissen an Nährstoffen einhergehen. Als wichtigste Nährstoffe des Präimplantationsembryos nennt Gardner Kohlenhydrate und Aminosäuren, die der Energiebereitstellung dienen und dem Embryo helfen, seine Funktion trotz zellulären Stress´, der durch die suboptimalen Kulturbedingungen in vitro entstehe, aufrechtzuerhalten. Gardner gibt zu bedenken, dass sich der Energiebedarf während der

Embryonalentwicklung ändere. Je komplexer der Embryo werde, desto höher sei der Energiebedarf.

Der Embryo unterliegt in seiner Entwicklung zwei wesentlichen Veränderungen: der Kompaktion und der Blastocoelentwicklung. Während dieser Vorgänge erfolgt die sequenzielle Aktivierung des embryonalen Genoms mit der folgenden Inaktivierung maternaler DNA und Proteine (Epstein and Smith, 1973; Flach et al., 1982; Harper and Monk, 1983; Braude et al., 1988; Telford et al., 1990). Vor der Aktivierung des embryonalen Genoms weist der Embryo einen geringen Metabolismus auf. Nach der Aktivierung des embryonalen Genoms steigt die DNA-Replikation und Protein-Synthese stark an, die Biosynthese-Aktivität nimmt zu (Epstein and Smith, 1973; Braude et al., 1988). Mit der weiteren Entwicklung steigt der Bedarf des Embryos an Nährstoffen. Er benötigt Aminosäuren, Vitamine und Fettsäuren, um die unterschiedlichen Biosynthesen zu unterstützen (Barnett and Bavister, 1996; Gardner and Lane, 1997).

Diese Zusammenhänge sind für die Entwicklung und Beurteilung von Kulturmedien von besonderer Bedeutung. Sie zeigen, dass der Embryo während verschiedener Entwicklungsstufen unterschiedliche Nährstoffe benötigt. Medien, die für die Kultur des frühen Embryos vorteilhaft sind, sind für den weiterentwickelten Embryo suboptimal. Andererseits können Medien, die die Blastozystenentwicklung unterstützen, auf die Zygotenentwicklung inhibitorisch wirken.

Gardner (1998) formulierte zwei Anforderungen an ein optimales Kulturmedium: Zum einen müsse ein optimales Medium in der Lage sein, die Zellfunktion des Embryos aufrechtzuerhalten. Zum anderen müsse es den zellulären Stress, der durch in vitro Kulturbedingungen hervorgerufen wird, minimieren können. Ein Marker für den Stress könne der Energiemetabolismus sein. Gardner (1998) schlussfolgerte in seiner Arbeit, dass es unter Berücksichtigung der Physiologie und des Metabolismus', die sich während der Entwicklung des Embryos ändern, sinnvoll erscheine, sequenzielle Medien zu verwenden. Dabei solle jedes der Medien die geänderten Bedürfnisse des Embryos reflektieren.

Zahlreiche Studien haben den Einfluss von verschiedenen Nährstoffen auf die Entwicklung des Embryos untersucht.

Kohlenhydrate spielen während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle. Bis zur Kompaktion besitzt der Embryo nur eine begrenzte Kapazität, Kohlenhydrate zu nutzen (Brinster and Thomson, 1966; Schini and Bavister, 1988; Thompson et al., 1992; Conaghan et al., 1993). Hauptenergiequellen in diesem Stadium sind Pyruvat, Laktat sowie Aminosäuren (Leese and Barton, 1984; Hardy et al., 1989; Gardner and Sakkas, 1993; Leese et al., 1993). Wird dem Embryo Glukose im konventionellen Medium während des Zygotenstadiums dargeboten, kann es sogar inhibitorische Effekte auf die embryonale Entwicklung haben (Conaghan et al., 1993). Es scheint jedoch nicht sinnvoll zu sein, Glukose vollständig aus dem Kulturmedium zu entfernen, da auch im weiblichen Reproduktionstrakt Glukose nachweisbar ist (Dickens et al., 1995; Tay et al., 1997; Quinn, 2004). Diese Hypothese wird durch eine weitere Studie, in der in verschiedenen Kulturmedien Glukose in unterschiedlicher Konzentration enthalten war, bestätigt (Mahadevan et al., 1997). In den Medien ohne Glukose war die Fertilisationsrate und Spermienbeweglichkeit signifikant schlechter, was gegen die vollständige Entfernung von Glukose aus den Kulturmedien spricht.

Während und nach der Kompaktion zeigte sich ein Anstieg der Glukoseaufnahme und des Glukoseverbrauchs (Hardy et al., 1989).

Sowohl die in der vorliegenden Studie untersuchten Vitrolife-, als auch die MediCult-Medien weisen in beiden der sequenziellen Medien Glukose auf. Die Glukosekonzentration der Medien ist nicht bekannt, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob eine unterschiedliche Glukosekonzentration eine Rolle für die Entwicklungsunterschiede gespielt hat.

Die Bedeutung von Aminosäuren für die embryonale Entwicklung wird kontrovers diskutiert. Studien an Embryonen unterschiedlicher Spezies ergaben, dass Aminosäuren, abhängig vom Entwicklungsstadium des Embryos, gewinnbringende Effekte auf die Entwicklung zeigten. Lane und Gardner (1997) fanden heraus, dass sich die Dauer der Zellteilung bis zum 8-Zellstadium bei Kultur von Mäuseembryonen in Medien mit Eagle's nicht-essenziellen

Aminosäuren und Glutamin im Vergleich zur Kultur ohne Aminosäuren signifikant verkürzte. Einen günstigen Effekt von Aminosäuren auf die Dauer der Zellteilung beschrieb auch eine andere Studie an Rinderembryonen (Steeves and Gardner, 1999). Durch Zugabe von Eagle's nicht-essenziellen Aminosäuren und Glutamin zu einem Kulturmedium während der ersten 72 Stunden der Kultur vollzog sich die Entwicklung zum 8- und 16-Zellstadium schneller als in Medien, die diese Komponenten nicht enthielten. Ausserdem zeigte die Untersuchung, dass die Wirkung der Aminosäuren abhängig vom Entwicklungsstadium des Embryos ist. Nach dem 8-Zellstadium beeinflusste die Zugabe aller Aminosäuren die Zellzahl und Blastozystenentwicklung günstig.

Andere Autoren bestätigten einen günstigen Einfluss von nicht-essenziellen Aminosäuren auf den Rinderembryo (Pinyopummintr and Bavister, 1996). Auch auf die Entwicklung von Mäuseembryonen konnte ein günstiger Effekt von nicht-essenziellen Aminosäuren nachgewiesen werden (Gardner and Lane, 1993). In der Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Blastozystenentwicklung in Medien, die nur die nicht-essenziellen Aminosäuren enthielten, signifikant besser vollzog als in Medien, in denen alle 20 Aminosäuren enthalten waren.

Über die Auswirkungen von Aminosäuren auf den menschlichen Embryo ist weniger bekannt. Devreker et al. (1998; 1999) untersuchten die Bedeutung von Glutamin und der Aminosulfonsäure Taurin für die Entwicklung des menschlichen Embryos. Sie stellten fest, dass sich Glutamin fördernd auf die Entwicklung des menschlichen Embryos auswirkt. Auch für Taurin wiesen Devreker et al. einen günstigen Effekt nach. So war die Entwicklung vom 2-Zeller zur Blastozyste in Medien, in denen Glutamin durch Taurin substituiert war, ähnlich, wenngleich die zusätzliche Gabe von Taurin zu Medien, die Glutamin enthielten, den günstigen Effekt von Glutamin nicht steigern konnte. Eine weitere Studie bestätigte den günstigen Effekt von Aminosäuren auf die Blastozystenentwicklung menschlicher Embryonen (Devreker et al., 2001). Diese Studie zeigte eine signifikant höhere Zellzahl der Blastozysten an Tag 6, die in Medien mit einer Kombination verschiedener Aminosäuren kultiviert

wurden im Vergleich zu Blastozysten, die in einem einfachen Medium nur unter Zugabe von Glutamin kultiviert wurden.

Zudem spricht das Vorhandensein von spezifischen Carriern für Aminosäuren für eine wichtige Rolle von Aminosäuren während der Embryonalentwicklung (Van Winkle, 1988). Ausserdem enthalten Eileiter und Uterus signifikante Konzentrationen an freien Aminosäuren. Besonders hohe Konzentrationen wurden für Arginin, Alanin, Glutamat und die Aminosulfonsäure Taurin gemessen (Casslen, 1987; Gardner and Leese, 1990; Tay et al., 1997). Besonders für die Aminosäuren, die in hoher Konzentration im Eileiter nachgewiesen wurden, konnte ein günstiger Effekt auf den Embryo nachgewiesen werden (Gardner and Lane, 1993).

Vitrolife- und MediCult-Medien enthalten unterschiedliche Aminosäuren. Vitrolife enthält z.B. in der zweiten Sequenz G 2.2 bis auf Glutamin alle proteinogenen Aminosäuren, darunter alle essenziellen Aminosäuren. Für die MediCult-Medien wird vom Hersteller lediglich bekannt gegeben, dass in der ersten Sequenz M1 nicht-essenzielle Aminosäuren enthalten sind, wobei L-Glutamin explizit aufgeführt wird. M2 enthält essenzielle und nicht-essenzielle Aminosäuren, L-Glutamin wird namentlich genannt.

Unter Berücksichtigung der Studien, die die wichtige Rolle der Aminosäuren für die embryonale Entwicklung hervorheben, ist anzunehmen, dass die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung diese beeinflusst hat.

Der Unterschied, der sich bei der Fertilisationsrate und in der embryonalen Entwicklung nur in den ICSI-, jedoch nicht in den IVF-Zyklen fand, ist schwierig zu deuten. Möglicherweise reagiert der Embryo nach Mikromanipulation in der frühen Kulturphase besonders empfindlich auf die Kulturbedingungen. Diese Hypothese steht jedoch im Widerspruch zu Erkenntnissen einer Studie, in der IVF- mit ICSI-Zyklen im Hinblick auf die embryonale Entwicklung nach Mikromanipulation verglichen wurden (Westphal et al., 2003). Diese Studie zeigte keine Veränderung der embryonalen Entwicklung nach Mikromanipulation durch die ICSI-Methode. Die Anzahl an

Zygoten, 8-Zell-Embryonen und Blastozysten an Tag 5 oder 6 unterschied sich zwischen den angewandten Methoden nicht signifikant.

Es kann nicht bewiesen werden, dass die besseren Ergebnisse, die die Vitrolife-Medien erzielt haben, in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Medien begründet lagen. Möglicherweise zeigen die Ergebnisse auch, dass die Embryomorphologie kein sicherer Parameter für die Voraussage von Schwangerschaftsraten ist. Rijnders und Jansen (1998) diskutierten diese Vermutung. Sie zeigten in ihrer Studie, dass an Tag 3 anhand morphologischer Kriterien keine sichere Vorhersage bezüglich der Implantationsfähigkeit eines Embryos zu treffen ist. Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen und unterstützten diese Behauptung (Van Langendonck et al., 2001; Jones et al., 1998; Braude et al., 1988). Van Langendonck et al. (2001) zeigten, dass Embryonen nach Kultur auf Sydney-Medien zwar eine bessere Embryonenmorphologie als Embryonen nach Kultur auf G 1.2/G 2.2-Medien aufwiesen, jedoch zu niedrigeren Implantationsraten führten. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Embryomorphologie damit kein zuverlässiger Parameter sei, die Effizienz zweier Kultursysteme zu vergleichen. Eine andere Studie bezeichnete die Aufgabe, Embryonen für den Tag 2 oder 3-Transfer anhand morphologischer Parameter zu wählen, als das schwerwiegendste Problem des frühen Embryotransfers (Jones et al., 1998). Die Embryonen, bei denen sich die Entwicklung vom maternalen zum aktivierten embryonalen Genom nicht vollzöge, könnten nur bei der verlängerten Kultur identifiziert werden (Braude et al., 1988).

Ergebnisse, die durch Beobachtungen an tierischen Embryonen gewonnen wurden, lassen jedoch annehmen, dass die Geschwindigkeit, mit der sich Embryonen entwickeln, einen Einfluss auf die Implantation haben (Gardner and Sakkas, 1993; McKiernan and Bavister, 1994).

Auch bei menschlichen Embryonen konnte ein Zusammenhang zwischen der Teilungsgeschwindigkeit und Morphologie und dem Entwicklungspotenzial eines Embryos belegt werden (Muggleton-Harris et al., 1995). Diese Studie zeigte, dass Embryonen, die den höchsten kombinierten Score für Teilungsgeschwindigkeit und Morphologie aufwiesen, ein größeres Potenzial

hatten, sich in vitro zu Blastozysten zu entwickeln. Andere Autoren bestätigten den Zusammenhang zwischen morphologischer Beurteilung und Teilungsgeschwindigkeit eines Embryos und dem weiteren Entwicklungspotenzial. In einer Studie wurde festgestellt, dass sich die Anzahl an Blastomeren an Tag 3 und der Anteil an zu Blastozysten entwickelten Embryonen proportional zueinander verhalten (Langley et al., 2001). Eine andere Studie fand heraus, dass menschliche Embryonen, die zum Zeitpunkt des Transfers (44 bis 48 Stunden nach Insemination) mindestens das 4-Zellstadium erreicht hatten, bessere Implantationsraten als 2-Zeller erbrachten (Staessen et al., 1992). Balaban et al. (2001) prüften den Zusammenhang zwischen der Morphologie eines Embryos im PN-Stadium und dessen Potenzial, sich zu einer Blastozyste zu entwickeln und zu implantieren. Zygoten mit als ideal beschriebener Morphologie im PN-Stadium zeigten im Blastozystenstadium ein erhöhtes Potenzial, zu implantieren. Eine weitere Studie zeigte, dass sich früh teilende Embryonen ("early cleavage embryos") zu einer signifikant höheren Schwangerschaftsrate führten (Sakkas et al., 1998).

Die verschiedenen Beobachtungen werfen die Frage auf, wie sich Beurteilung und Kultur der Embryonen in Zukunft verbessern lassen. Einen Fortschritt für die Beurteilung der embryonalen Qualität könnte die Einführung nicht-invasiver Tests darstellen, die Substrataufnahme und Metabolismus des Embryos analysieren und somit helfen, die Embryonen mit dem besten Entwicklungspotenzial zu erkennen (Gardner, 1998; Brison et al., 2004).

Der Nutzen von Wachstumsfaktoren (z.B. "epidermal growth factor" oder "insulin-like growth factor") und Zytokinen (z.B. "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor") für die Kultur menschlicher Embryonen wird in Studien erforscht und die Zugabe zum Kulturmedium günstig bewertet (Sjoblom et al., 1999; Robertson et al., 2001; Sirisathien et al., 2003). Dies ist aber bislang kein Standard in der klinischen Routine.

Ein Fortschritt für die Zusammensetzung von Kulturmedien kann möglicherweise auch durch Substitution des Serumalbumins durch das Glykosaminoglykan Hyaluronat erzielt werden. Gardner et al. (1999) zeigten, dass in der Kultur von Mäuseembryonen Serumalbumin durch Hyaluronat

ersetzbar war und die Substitution die Implantationsrate der kultivierten Blastozysten signifikant erhöhte. Als Vorteil von Hyaluronat wird zudem hervorgehoben, dass es einer geringeren biologischen Variation als das Blutprodukt Albumin unterliegt und zudem nicht das Risiko der Kontamination birgt (Gardner and Lane, 1998).

Die Einführung der Mikrofluid-Kultur könnte die Kulturbedingungen menschlicher Embryonen weiter verbessern. In einer Studie an Mäuseembryonen konnte gezeigt werden, dass die Kultur der Embryonen im Mikrofluidsystem zu einer schnelleren Teilungsgeschwindigkeit der Embryonen und zu einer größeren Anzahl an Blastozysten führte, als die Kultur im Mikrotropfen (Raty et al., 2004). Im Gegensatz zur Kultur im Mikrotropfen wird der Embryo bei der Mikrofluid-Kultur in einem dynamischen System kultiviert, um die In-vivo-Bedingungen besser zu imitieren (Beebe et al., 2002).

Die Verbesserung der Kulturmedien wird in nächster Zeit Gegenstand zahlreicher Forschungsvorhaben sein.

4.2 Bedeutung des Blastozystentransfers unter besonderer Beachtung der gesetzlichen Bestimmungen in Deutschland

In dieser Studie erfolgte der Embryotransfer in der Mehrzahl der Fälle (73 %) an Tag 3. Die Schwangerschaftsraten nach Tag 3-, 4-, oder 5-Transfer unterschieden sich nicht signifikant.

Der Blastozystentransfer ist eine zum Tag 3-Transfer intensiv diskutierte Alternative. Durch die Entwicklung sequenzieller Medien ist es möglich geworden, Embryonen routinemäßig bis zum Blastozystenstadium zu kultivieren. Der Vorteil der Blastozystenkultur besteht vor allem darin, dass die Auswahl der zu transferierenden Embryonen in einem späteren Entwicklungsstadium erfolgen kann. Dieser Vorteil ist in Deutschland aufgrund des Embryonenschutzgesetzes nicht gegeben, da eine Auswahl bereits im Vorkernstadium erfolgen muss und danach maximal drei Embryonen weiterkultiviert werden dürfen. In anderen Ländern hat der Tag 5-Transfer jedoch den Vorteil der späteren Auswahlmöglichkeit der zu transferierenden Embryonen. Embryonen, die in der Entwicklung zurückbleiben, können somit erkannt, und es können die lebensfähigsten Embryonen für den Transfer rekrutiert werden. Zudem entspricht der Blastozystentransfer am ehesten der Implantationszeit im natürlichen Zyklus, so dass eine bessere Synchronisation mit dem weiblichen Reproduktionstrakt erreicht wird. In zahlreichen Studien wurden nach Blastozystentransfer signifikant höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten als nach Tag 3-Transfer beschrieben (Gardner et al., 1998a; Gardner et al., 1998b; Marek et al., 1999; Gardner et al., 2000; Milki et al., 2000; Schoolcraft and Gardner, 2000; Schwärzler et al., 2004). Durch den Blastozystentransfer ergibt sich der Vorteil, mit einer reduzierten Anzahl transferierter Embryonen gleiche Schwangerschaftsraten zu erzielen und damit die Rate an Mehrlingsschwangerschaften nach künstlicher Befruchtung zu senken.

Doch die Ergebnisse unterschiedlicher Studien variieren stark. Dies mag zum einen daran liegen, dass sich die Patientenkollektive, die untersucht wurden, nicht vergleichen lassen. Zum anderen wurden die Embryonen in den

Studien nach verschiedenartigen Kriterien für den Transfertag ausgewählt (Tabelle 4.2.1a/b und 4.2.2).

Verschiedene Studien sehen im Blastozystentransfer im Vergleich zum Tag 3-Transfer einen Vorteil (Tabelle 4.2.1 a/b). Eine dieser Studien sprach sich für den Blastozystentransfer aus, da dadurch signifikant höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten erzielt wurden als nach Tag 3-Transfer (Gardner et al., 2000). Ausserdem geben die Autoren zu bedenken, dass überzählige Blastozysten nach Kryokonservierung zu guten Implantationsraten führten. Gardner et al. (2000) beschrieben, dass der Blastozysten-Score, der nach Kultur in sequenziellen Medien erhoben werden kann, direkt mit der Implantations- und Schwangerschaftsrate korreliert. Somit könne bestimmten Patientinnen der Transfer von nur einem Embryo angeboten werden, was die Rate an Mehrlingsschwangerschaften reduziere.

Auch in anderen Studien wurde über signifikant höhere Implantationsraten nach Blastozystentransfer als nach Tag 3-Transfer berichtet (Gardner et al., 1998b). Für das Erzielen ähnlicher Schwangerschaftsraten wie nach Blastozystentransfer mussten an Tag 3 signifikant mehr Embryonen transferiert werden. Andere Studien bestätigten diese Ergebnisse. Marek et al. (1999) beschrieben nach Tag 5-Transfer signifikant höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten als nach Tag 3-Transfer, trotz einer geringeren Anzahl transferierter Embryonen. Bei Patientinnen, die jünger als 35 Jahre alt waren, beobachteten sie häufiger Mehrlingsschwangerschaften als bei über 35-jährigen. Dies führte die Autoren zu der Überlegung, ob diesem Patientenkollektiv der Transfer nur eines Embryos empfohlen werden sollte. Eine weitere Studie (Milki et al., 2000) bestätigte die Ergebnisse, indem sie ebenfalls signifikant höhere Implantations- und Schwangerschaftsraten nach Blastozystentransfer beschrieb. Der Blastozystentransfer wurde in dieser Studie empfohlen, da bei einer geringeren Anzahl an transferierten Embryonen verbesserte Schwangerschaftsraten zu erzielen waren. Schwärzler et al. (2004) stellten in ihrer Studie fest, dass durch Blastozystentransfer höhere Schwangerschafts- und Baby-take-home Raten erzielt werden konnten. Als Nachteil wurde der Anstieg der Mehrlingsschwangerschaften und die Zunahme

der Frühgeburtenrate beschrieben. Andere Autoren (Schoolcraft and Gardner, 2000) beobachteten bei Patientinnen, denen Donor-Embryonen transferiert wurden, nach Tag 5-Transfer eine signifikant höhere Implantations- und Schwangerschaftsrate als nach Tag 3-Transfer.

Den beschriebenen Studien steht eine zweite Gruppe von Studien gegenüber, die zwischen Tag 3- und Tag 5-Transfer bei Implantations- und Schwangerschaftsrate keine signifikanten Unterschiede feststellte. Trotzdem sprechen sich die Autoren dieser Studien für den Blastozystentransfer aus. Scholtes und Zeilmarker (1996) konnten mit dem Transfer von nur ein bis zwei Blastozysten eine durchschnittliche Implantationsrate von über 23% erreichen, was zur Senkung der Drillingsschwangerschaften beitrug. Eine andere Studie stellte in der Implantations- und Schwangerschaftsrate zwischen Tag 3- und Tag 5-Transfer beim Transfer von maximal zwei Embryonen ebenso keine signifikanten Unterschiede fest, gab jedoch zu bedenken, dass es durch den Blastozystentransfer möglich sei, zum Erzielen gleicher Schwangerschaftsraten weniger Embryonen zu transferieren und damit die Rate an Mehrlingsschwangerschaften zu senken (Huisman et al., 2000). Diese Studie zeigt zudem, dass beim Vergleich von Tag 3- und Tag 5-Transfer auch immer die Anzahl an transferierten Embryonen in die Beurteilung eingehen müssen.

Eine weitere Gruppe von Studien sieht im Blastozystentransfer keinen Vorteil und spricht sich gegen den Tag 5-Transfer aus (Tabelle 4.2.2). Eine kontrolliert-randomisierte Studie ergab ähnliche Implantations- und Schwangerschaftsraten für den Tag 3- und Tag 5-Transfer (Coskun et al., 2000). Die Autoren folgerten aus den Ergebnissen, dass der Blastozystentransfer gegenüber dem Tag 3-Transfer keinen Vorteil brächte. Sie warnten zudem vor möglichen negativen Effekten der verlängerten Kultur bei Patienten, die morphologisch schlechte Embryonen aufwiesen. Die Autoren der Studie sahen, auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse einer anderen Studie (Racowsky et al., 2000), die Gefahr, dass Embryonen, die sich in vitro suboptimal entwickeln, während der Blastozystenkultur in ihrer Entwicklung stehen bleiben könnten. Dies führte sie zu der Überlegung, dass einige dieser Embryonen nach einem Tag 3-Transfer durch Zurückversetzen in die In-vivo-

Bedingungen möglicherweise hätten gerettet werden können. Eine Erklärung für die von den zuvor genannten Studien abweichenden Ergebnisse dieser Studie könnte im unterschiedlichen Studiendesign begründet liegen. Die Patienten wurden nicht, wie in den anderen Studien, nach der Embryoqualität einem Transfertag zugeordnet, sondern die Zuteilung erfolgte durch Randomisierung.

Eine andere Studie empfiehlt den Blastozystentransfer nur einem ausgewählten Patientengut (Racowsky et al., 2000). Diese Studie beschreibt, dass es sowohl für den Tag 3-, als auch für den Tag 5-Transfer Indikationen gebe. Die Autoren sehen den Tag 5-Transfer als sinnvoll an, wenn mehr als drei 8-Zeller an Tag 3 zur Verfügung stehen. Dem Tag 3-Transfer gleichwertig sei der Tag 5-Transfer, wenn an Tag 3 Embryonen mit durchschnittlicher Qualität vorlägen, jedoch mindestens ein 8-Zeller. Der zusätzliche Labor- und Kostenaufwand spreche in diesem Fall eher für den Tag 3-Transfer. Der Tag 5-Transfer sei von Nachteil, wenn an Tag 3 keine 8-Zellembryonen vorlägen. Alper et al. (2001) stellten ähnliche Überlegungen wie die beschriebenen Studien (Coskun et al., 2000 ; Racowsky et al., 2000) an. Sie verglichen verschiedene Studien, in denen eine verlängerte Kultur erfolgt war, miteinander. Die Autoren beobachteten, dass sich die meisten der kultivierten Embryonen nicht zu Blastozysten entwickelt hatten und stellten die Frage, wieviele dieser Embryonen implantiert hätten, wenn sie zu einem früheren Zeitpunkt transferiert worden wären. Die Autoren geben zudem die mangelnde Erfahrung mit der Kryokonservierung von Blastozysten zu bedenken.

Die Einschätzung, den Blastozystentransfer einem ausgewählten Patientengut vorzubehalten, teilt eine weitere Studie, in der die guten Ergebnisse vorangegangener Studien ebenfalls nicht bestätigt wurden (Utsunomiya et al., 2002). Die Implantations- und Schwangerschaftsraten waren nach Tag 3- und Tag 5-Transfer vergleichbar. Die Studie kam zur Schlussfolgerung, dass der Blastozystentransfer keine Methode sei, die routinemäßig bei allen Patienten angewendet werden solle.

Eine andere Studie befasste sich mit der Frage, ob der Blastozystentransfer für Patienten, bei denen an Tag 2 nur eine limitierte Anzahl

von ein oder zwei Embryonen für den Transfer zur Verfügung stehen, einen Vorteil erbrächte (Kovacic et al., 2002). Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass dieses Patientengut von dem Blastozystentransfer nicht profitieren könne, da die Möglichkeit der späten Auswahl der lebensfähigsten Blastozysten entfalle.

	Gardner et al. (1998b)	Marek et al. (1999)	Milki et al. (2000)	Schwärzler et al. (2004)
Studiendesign	Prospektiv- randomisierte Studie	Retrospektive Studie	Retrospektive Studie	Retrospektive Studie
Patientenkollektiv	IVF, 92 nicht- selektierte Paare	IVF, 790 nicht- selektierte Paare	IVF/ICSI, 100 Paare <40 Jahre, >drei 8-Zell- Embryos an Tag 3	1259 konsekutive Zyklen
Kulturmedium bis Tag 3	Ham's F-10 Medium mit 15 % fetalem Nabelschnurblut	Human tubal fluid mit 12 % synthetischem Serum- Zusatz	P1- Medium mit 10 % synthetischem Serum- Zusatz (Irvine Scientific)	IVF 20 Medium (ScSc);4-well multi-dishes (Nunc); G 1-2 Medium (ScSc)
Kulturmedium bis Tag 5	Sequenzielles Medium (G 1.2./G 2.2)	Sequenzielles Medium (S1 und S2)	Blastocyst- Medium (Irvine Scientific)	CCM-Medium (ScSc)
Anzahl transferierter Embryonen (+/- SD)	Tag 3: 3,7 (+/- 0,1) Tag 5: 2,2 (+/- 0,1)	Tag 3: 3,0 Tag 5: 2,5	Tag 3: 4,6 (+/- 1,3) Tag 5: 2,4 (+/- 0,6)	Tag 3: 2,1 (+/- 0,5) Tag 5: 2,0 (+/- 0,3)
Implantationsrate Tag 3/Tag 5 (%)	30,1/50,5	23,3/32,4	20,0/47,0	22,0/37,0
Statistische Beurteilung	*	*	*	*
Schwangerschafts- rate Tag 3/Tag 5 (%)	66,0/71,0	35,9/43,8	46,0/68,0	28,0/44,0
Statistische Beurteilung	ns	*	*	*

Tab. 4.2.1a: Tag 2/3- vs. Tag 5-Transfer: Studien, die sich für den Blastozystentransfer aussprechen
SD = standard deviation; h = Stunden; ScSc = Scandinavian Science
* = signifikant

	Schoolcraft and Gardner (2000)	Scholtes and Zeilmaker (1996)	Huisman et al. (2000)
Studiendesign	Retrospektive Studie	Retrospektiv-randomisierte Studie	Prospektiv-randomisierte Studie
Patientenkollektiv	IVF, 229 Patientinnen (Transfer von befruchteten Donor-Oozyten)	IVF, 643 nicht-selektierte Embryotransfers	1. Zyklus IVF, 1787 Paare
Kulturmedium bis Tag 3	Ham`s F-10 Medium mit 15 % fetalem Nabelschnurblut/G1.2	Earle`s und Ham`s F-10-Medium mit 8,8 % Plasmaprotein-Lösung	Earle`s und Ham`s F-10-Medium mit Plasmaprotein-Lösung
Kulturmedium bis Tag 5	Sequenzielles Medium (G 1.2./G 2.2)	Earle`s und Ham`s F-10-Medium mit 8,8 % Plasmaprotein-Lösung	Earle`s und Ham`s F-10-Medium mit Plasmaprotein-Lösung
Anzahl transferierter Embryonen (+/- SD)	Tag 3: 3,2 (+/- 0,05) Tag 5: 2,1 (+/- 0,04)	Tag 3: maximal Transfer von 3 Embryonen Tag 5: maximal Transfer von 2 Embryonen	Tag 3: 1,9 Tag 5: 1,9
Implantationsrate Tag 3/ Tag 5 (%)	47,1/65,8	13,0/12,0	14,4/15,5
Statistische Beurteilung	*	ns	ns
Schwangerschaftsrate Tag 3/ Tag 5 (%)	75,0/87,6	26,0/25,0	25,3/27,8
Statistische Beurteilung	*	ns	ns

Tab. 4.2.1b: Tag 2/3- vs. Tag 5-Transfer: Studien, die sich für den Blastozysten transfer aussprechen
SD = standard deviation; * = signifikant

	Coskun et al. (2000)	Racowsky et al. (2000)	Utsunomiya et al. (2002)	Kovacic et al. (2002)
Studiendesign	Prospektiv-randomisierte Studie	Retrospektive Studie	Prospektiv-randomisierte Studie	Retrospektive Studie
Patientenkollektiv	IVF/ICSI, 201 Paare, ≥ 4 Zygoten	IVF/ICSI, 369 Zyklen, ≥ 8 Zygoten	IVF, 235 nicht-selektierte Paare mit 275 Zyklen	IVF/ICSI, 265 Zyklen, 1-2 Embryos an Tag 2
Kulturmedium bis Tag 3	MediCult IVF-Medium	IVF- 500- Medium	Human tubal fluid mit 10 % Patientenserum	MediCult IVF-Medium
Kulturmedium bis Tag 5	Tag 5- Transfer: Tag 1-3: G 1.2 Ab Tag 3: G 2.2	Sequenzielles Medium (S2, Scandinavian IVF Science)	Sequenzielle Medien (Irvine blastocyst medium, G 1.2/G 2.2, Cook blastocyst medium)	Sequenzielles Medium (M1/M2)
Anzahl transferierter Embryonen (+/- SD)	Tag 3: 2,3 (+/- 0,6) Tag 5: 2,2 (+/- 0,5)	Tag 3: (i) 4,7 (+/- 2,0) (ii) 4,0 (+/- 0,9) (iii) 3,7 (+/- 0,9) Tag 5: (i) 1,6 (+/- 1,1) (ii) 2,2 (+/- 0,8) (iii) 2,2 (+/- 0,5)	Tag 3: 2,9 (+/- 0,8) Tag 5: 3,0 (+/- 1,0)	Tag 3: 1,5 (+/- 0,6) Tag 5: 1,4 (+/- 0,5)
Implantationsrate Tag 3/ Tag 5 (%)	21,0/24,0	(i) 7,9/0,0 (ii) 17,6/23,6 (iii) 24,2/35,9	11,7/9,2	18,0/18,0
Statistische Beurteilung	ns	(i)- (ii) ns (iii) *	ns	ns
Schwangerschaftsrate Tag 3/ Tag 5 (%)	39,0/39,0	(i) 33,3/0,0 (ii) 36,4/40,0 (iii) 51,3/50,6	26,5/25,9	23,0/21,0
Statistische Beurteilung	ns	(i) * (ii), (iii) ns	ns	ns

Tab. 4.2.2: Tag 2/3- vs. Tag 5-Transfer: Studien, die keinen Vorteil im routinemäßig durchgeführten Blastozystentransfer sehen

SD = standard deviation; * = signifikant

(i) = 0x8-Zeller; (ii) = 1-2x8-Zeller; (iii) = ≥ 3 x8-Zeller

Eine andere Studie prüfte die Blastozystenkultur unter den besonderen Bedingungen des Deutschen Embryonenschutzgesetzes (Zollner et al., 2002a). Die Autoren prüften, ob die Blastozystenkultur unter den restriktiven Bedingungen des Deutschen Embryonenschutzgesetzes Vorteile erbrächte. Die deutsche Gesetzgebung schreibt die Auswahl der Embryonen im Vorkernstadium vor, so dass im Blastozystenstadium keine weitere Auswahlmöglichkeit besteht. In der Studie wurde bei 100 Paaren eine Blastozystenkultur durchgeführt. Es konnte eine Schwangerschaftsrate von 26 % erzielt werden, die im Vergleich zur Schwangerschaftsrate nach routinemäßiger Dreitagekultur der Vorjahre (ca. 25 %) keine Steigerung darstellte. Zollner et al. (2002a) beschrieben, dass unter den besonderen Bedingungen in Deutschland der Blastozystentransfer keinen Vorteil bringe. Sie empfahlen jedoch einer ausgewählten Patientengruppe den späten Transfer. Fälle, bei denen wiederholt Implantationsversagen aufgetreten sei, könnten von den diagnostischen Möglichkeiten der Blastozystenkultur profitieren.

Mit den Ergebnissen dieser Studie in Einklang steht eine weitere Studie, in der der Blastozystentransfer bei Patienten, denen eine limitierte Anzahl von einem oder zwei Embryonen für den Transfer zur Verfügung standen, untersucht wurde (Kovacic et al., 2002). Die Implantations- und Schwangerschaftsraten nach Tag 2- und Tag 5-Transfer unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Autoren führten die Ergebnisse darauf zurück, dass aufgrund der limitierten Embryonenanzahl keine Auswahlmöglichkeit gegeben war, dieses Patientengut somit nicht vom Blastozystentransfer profitieren könne. Die Studie von Kovacic et al. (2002) erfolgte unter ähnlichen Bedingungen, wie sie das Deutsche Embryonenschutzgesetz vorgibt. Im Blastozystenstadium konnte in der Studie keine Auswahl der am besten entwickelten Embryonen erfolgen, da nur maximal zwei Embryonen zur Verfügung stand. Diese Situation liegt nach dem Deutschen Embryonenschutzgesetz ebenfalls vor, da die Auswahl schon im Vorkernstadium erfolgen muss.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Blastozystenkultur unter den Vorgaben des Deutschen Embryonenschutzgesetzes. Im Vergleich des Tag 3-

mit dem Tag 5-Transfer ergaben sich ähnliche Schwangerschaftsraten. In Zusammenschau der Studien, in denen Bedingungen wie unter den Vorgaben des Deutschen Embryonenschutzgesetzes vorliegen (Zollner et al., 2002a; Kovacic et al., 2002) und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Studie, zeigt sich, dass der routinemäßige Blastozystentransfer unter den Bedingungen des Deutschen Embryonenschutzgesetzes keinen Vorteil erbringt.

5. Zusammenfassung

Optimale Kulturbedingungen der Embryonen stellen eine unverzichtbare Grundlage für die assistierte Reproduktion dar. Seit Beginn der künstlichen Befruchtung erfolgte eine stetige Weiterentwicklung der Kulturmedien. In den Anfangszeiten der assistierten Reproduktion wurden Medien verwendet, die aus dem Tiermodell stammten und für die Kultivierung menschlicher Embryonen unspezifisch waren. Eine Verbesserung der Kultursysteme konnte durch die Entwicklung für menschliche Embryonen spezifischer Kulturmedien erreicht werden, die in ihrer Zusammensetzung fortwährend modifiziert wurden, um den Nährstoffbedürfnissen des Embryos in vitro bestmöglich gerecht zu werden.

Einen großen Fortschritt erbrachte die Einführung sequenzieller Kulturmedien, die an den verschiedenen Kulturtagen in ihrer Zusammensetzung variieren und somit den wechselnden Nährstoffbedarf des Embryos während der verschiedenen Entwicklungsstufen berücksichtigen. Die sequenziellen Kulturmedien ermöglichten, die Embryonen routinemäßig mehr als 3 Tage zu kultivieren und erst nach 5 Tagen im Blastozystenstadium zu transferieren. Vorteile des Blastozystentransfers bestehen zum einen in der besseren Synchronisation mit dem natürlichen Reproduktionszyklus. Zum anderen ermöglicht die verlängerte Kultur, die Embryonen zu einem späteren Entwicklungsstadium für den Transfer auszuwählen und damit das Entwicklungspotenzial besser abschätzen zu können. Der Vorteil der späteren Auswahlmöglichkeit besteht in Deutschland jedoch nicht, da nach den Vorgaben des Deutschen Embryonenschutzgesetzes die Auswahl der Embryonen bereits im Vorkernstadium erfolgen muss und danach maximal drei Embryonen weiterkultiviert werden dürfen.

Zwei häufig verwendete und kommerziell erhältliche sequenzielle Kulturmedien sind die Medien BlastAssist M1/M2 der Firma MediCult und G 1.2/G 2.2 der Firma Vitrolife.

Gegenstand der vorliegenden prospektiv-randomisierten Studie war der Vergleich dieser beiden Kulturmedien für die Kultur menschlicher Embryonen nach IVF/ICSI. Wir schlossen 176 Paare, die im Rahmen des Kinderwunschprogramms der Universitäts-Frauenklinik Würzburg zwischen November 2000 und August 2001 behandelt wurden, in die Studie ein. 89 Paare wurden durch Randomisierung den MediCult-Medien zugeordnet, davon wurden 39 durch die IVF- und 50 durch die ICSI-Methode behandelt. 87 Paare wurden in die Vitrolife-Gruppe randomisiert, bei 45 führten wir die IVF- und bei 42 die ICSI-Methode durch. Der Embryotransfer erfolgte zwischen Tag 3 und Tag 5.

Es fand sich eine signifikant bessere Fertilisationsrate in den ICSI-Zyklen der Vitrolife-Gruppe im Vergleich zu den ICSI-Zyklen der MediCult-Gruppe. Zudem stellten wir signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kulturmedien in der frühen embryonalen Entwicklung fest: Sowohl in den IVF-, als auch in den ICSI-Zyklen war der Vorkern-Score (erhoben an Tag 1) in der Vitrolife-Gruppe signifikant besser als in der MediCult-Gruppe. In den ICSI-Zyklen zeigte sich in der Vitrolife-Gruppe zudem ein signifikant besserer Embryo-Score (erhoben an Tag 3) als in der MediCult-Gruppe. In den IVF-Zyklen war der Embryo-Score zwischen den beiden Kulturmedien vergleichbar.

Die Ergebnisse der verlängerten Kultur bis Tag 5 waren zwischen den beiden Kulturmedien vergleichbar. Ferner konnten in der Vitrolife- und MediCult-Gruppe ähnliche Implantationsraten erzielt werden. Die Vitrolife- und MediCult-Gruppe erbrachten ähnliche Schwangerschaftsraten.

Eine Ursache für die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kulturmedien in der frühen embryonalen Entwicklung liegt in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kulturmedien begründet. Die genaue Zusammensetzung der Kulturmedien wird von den Herstellern nicht bekannt gegeben, so dass ein exakter Vergleich der beiden Kulturmedien nicht möglich ist. Zahlreiche Studien an Embryonen verschiedener Spezies haben den Einfluss unterschiedlicher Inhaltsstoffe von Kulturmedien auf die Ergebnisse der assistierten Reproduktion untersucht. Besonders Kohlenhydrate und Aminosäuren sind wichtige Nährstoffe des Präimplantationsembryos. Der

Nährstoffbedarf ändert sich während der embryonalen Entwicklung. Der Embryo scheint besonders während der frühen embryonalen Phase empfindlich auf äußere Einflüsse zu reagieren, was sich in der unterschiedlichen Entwicklung des Embryos in den verschiedenen Kulturmedien widerspiegelt. Bei der verlängerten Kultur scheint der Embryo in der Lage zu sein, den Entwicklungsrückstand aufzuholen.

Der signifikante Unterschied, der sich bei der Fertilisationsrate nur in den ICSI-, jedoch nicht in den IVF-Zyklen fand, könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Embryo nach Mikromanipulation in der frühen Kulturphase besonders empfindlich auf Umwelteinflüsse reagiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beiden Kulturmedien in Bezug auf die Blastozystenentwicklung, die Implantations- und die Schwangerschaftsrate vergleichbare Ergebnisse erbrachten. Während der frühen embryonalen Entwicklung bis Tag 3 zeigten sich in der Vitrolife-Gruppe signifikant bessere Ergebnisse als in der MediCult-Gruppe, die sich jedoch im weiteren Verlauf egalisierten. Aufgrund der ähnlichen Schwangerschaftsraten sind beide Kultursysteme als gleichwertig einzustufen. Der Blastozystentransfer scheint unter den deutschen gesetzlichen Bedingungen keine Vorteile zu erbringen.

6. Referenzen

Alper, M. M., P. Brinsden, R. Fischer and M. Wikland (2001). "To blastocyst or not to blastocyst? That is the question." Hum Reprod **16**(4): 617-9.

Balaban, B., B. Urman, A. Isiklar, C. Alatas, S. Aksoy, R. Mercan, A. Mumcu and A. Nuhoglu (2001). "The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome." Hum Reprod **16**(11): 2357-61.

Barnett, D. K. and B. D. Bavister (1996). "What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence?" Mol Reprod Dev **43**(1): 105-33.

Beebe, D., M. Wheeler, H. Zerinye, E. Walters and S. Raty (2002). "Microfluidic technology for assisted reproduction." Theriogenology **57**(1): 125-35.

Bongso, A.: Handbook on blastocyst culture. Sydney Press Indusprint, 1999.

Braude, P., V. Bolton and S. Moore (1988). "Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development." Nature **332**(6163): 459-61.

Brinster, R. L. and J. L. Thomson (1966). "Development of eight-cell mouse embryos in vitro." Exp Cell Res **42**(2): 308-15.

Brison, D. R., F. D. Houghton, D. Falconer, S. A. Roberts, J. Hawkhead, P. G. Humpherson, B. A. Lieberman and H. J. Leese (2004). "Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover." Hum Reprod. **19**(10):2319-24.

Casslen, B. G. (1987). "Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration." J Reprod Med **32**(3): 181-4.

Conaghan, J., A. H. Handyside, R. M. Winston and H. J. Leese (1993). "Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro." J Reprod Fertil **99**(1): 87-95.

Cooke, S., P. Quinn, L. Kime, C. Ayres, J. P. Tyler and G. L. Driscoll (2002). "Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media." Fertil Steril **78**(6): 1254-60.

Coskun, S., J. Hollanders, S. Al-Hassan, H. Al-Sufyan, H. Al-Mayman and K. Jaroudi (2000). "Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial." Hum Reprod **15**(9): 1947-52.

Devreker, F., K. Hardy, M. Van den Bergh, A. S. Vannin, S. Emiliani and Y. Englert (2001). "Amino acids promote human blastocyst development in vitro." Hum Reprod **16**(4): 749-56.

Devreker, F., M. Van den Bergh, J. Biramane, R. L. Winston, Y. Englert and K. Hardy (1999). "Effects of taurine on human embryo development in vitro." Hum Reprod **14**(9): 2350-6.

Devreker, F., R. M. Winston and K. Hardy (1998). "Glutamine improves human preimplantation development in vitro." Fertil Steril **69**(2): 293-9.

Dickens, C. J., S. D. Maguiness, M. T. Comer, A. Palmer, A. J. Rutherford and H. J. Leese (1995). "Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube." Hum Reprod **10**(3): 505-8.

Epstein, C. J. and S. A. Smith (1973). "Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation mouse embryos." Dev Biol **33**(1): 171-84.

Flach, G., M. H. Johnson, P. R. Braude, R. A. Taylor and V. N. Bolton (1982). "The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo." Embo J **1**(6): 681-6.

Gardner, D. K. (1998). "Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture." Theriogenology **49**(1): 83-102.

Gardner, D. K. and M. Lane (1993). "Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture." Biol Reprod **48**(2): 377-85.

Gardner, D. K. and M. Lane (1997). "Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?" Hum Reprod Update **3**(4): 367-82.

Gardner, D. K. and M. Lane (1998). "Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media." Hum Reprod **13**(Suppl 3): 148-59; discussion 160.

Gardner, D. K. and M. Lane (2002) Development of viable mammalian embryos in vitro: evolution of sequential media. In: Cibelli J., Lanza R., Campbell K., West M. D., eds. Principles of cloning. San Diego: Elsevier Science: 187-213.

Gardner, D. K., M. Lane and W. B. Schoolcraft (2000). "Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF." Hum Reprod **15**(Suppl 6): 9-23.

Gardner, D. K., M. Lane, A. Spitzer and P. A. Batt (1994). "Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development." Biol Reprod **50**(2): 390-400.

Gardner, D. K. and H. J. Leese (1990). "Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro." J Reprod Fertil **88**(1): 361-8.

Gardner, D. K., H. Rodriegez-Martinez and M. Lane (1999). "Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer." Hum Reprod **14**(10), 2575-80.

Gardner, D. K. and D. Sakkas (1993). "Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition." Hum Reprod **8**(2): 288-95.

Gardner, D. K., W. B. Schoolcraft, L. Wagley, T. Schlenker, J. Stevens and J. Hesla (1998a). "A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization." Hum Reprod **13**(12): 3434-40.

Gardner, D. K., P. Vella, M. Lane, L. Wagley, T. Schlenker and W. B. Schoolcraft (1998b). "Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers." Fertil Steril **69**(1): 84-8.

Hardy, K., M. A. Hooper, A. H. Handyside, A. J. Rutherford, R. M. Winston and H. J. Leese (1989). "Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos." Hum Reprod **4**(2): 188-91.

Harper, M. I. and M. Monk (1983). "Evidence for translation of HPRT enzyme on maternal mRNA in early mouse embryos." J Embryol Exp Morphol **74**: 15-28.

Huisman, G. J., B. C. Fauser, M. J. Eijkemans and M. H. Pieters (2000). "Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture." Fertil Steril **73**(1): 117-22.

Jones, G. M., A. O. Trounson, D. K. Gardner, A. Kausche, N. Lolatgis and C. Wood (1998). "Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy." Hum Reprod **13**(1): 169-77.

Jung, T., B. Fischer and H. M. Beier (1987). "Quantitative aspects of protein synthesis in non-cultured and cultured rabbit blastocysts." Hum Reprod **2**(1): 23-7.

Kovacic, B., V. Vlasisavljevic, M. Reljic and V. Gavric Lovrec (2002). "Clinical outcome of day 2 versus day 5 transfer in cycles with one or two developed embryos." Fertil Steril **77**(3): 529-36.

Lane, M. and D. K. Gardner (1997). "Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro." J Assist Reprod Genet **14**(7): 398-403.

Langley, M. T., D. M. Marek, D. K. Gardner, K. M. Doody and K. J. Doody (2001). "Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments." Hum Reprod **16**(5): 902-8.

Leese, H. J. and A. M. Barton (1984). "Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos." J Reprod Fertil **72**(1): 9-13.

Leese, H. J., J. Conaghan, K. L. Martin and K. Hardy (1993). "Early human embryo metabolism." Bioessays **15**(4): 259-64.

Macklon, N. S., M. H. Pieters, M. A. Hassan, P. H. Jeucken, M. J. Eijkemans and B. C. Fauser (2002). "A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development." Hum Reprod **17**(10): 2700-5.

Mahadevan, M. M., M. M. Miller and D. M. Moutos (1997). "Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro." Hum Reprod **12**(1): 119-23.

Marek, D., M. Langley, D. K. Gardner, N. Confer, K. M. Doody and K. J. Doody (1999). "Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program." Fertil Steril **72**(6): 1035-40.

McKiernan, S. H. and B. D. Bavister (1994). "Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis." Hum Reprod **9**(11): 2123-9.

Menezo, Y., A. Hazout, M. Dumont, N. Herbaut and B. Nicollet (1992). "Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans." Hum Reprod **7**(Suppl 1): 101-6.

Menezo, Y. J., J. F. Guerin and J. C. Czyba (1990). "Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells." Biol Reprod **42**(2): 301-6.

Menezo, Y. J., S. Hamamah, A. Hazout and B. Dale (1998). "Time to switch from co-culture to sequential defined media for transfer at the blastocyst stage." Hum Reprod **13**(8): 2043-4.

Milki, A. A., M. D. Hinckley, J. D. Fisch, D. Dasig and B. Behr (2000). "Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations." Fertil Steril **73**(1): 126-9.

Muggleton-Harris, A. L., A. M. Glazier and M. Wall (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**(11): 2976-84.

Olivennes, F., A. Hazout, C. Lelaidier, S. Freitas, R. Fanchin, D. de Ziegler and R. Frydman (1994). "Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage." Hum Reprod **9**(12): 2367-73.

Pinyopummintr, T. and B. D. Bavister (1996). "Effects of amino acids on development in vitro of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts." Reprod Fertil Dev **8**(5): 835-41.

Quinn, P. (2004). "The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies." Fertil Steril **81**(1): 27-9.

Quinn, P., J. F. Kerin and G. M. Warnes (1985). "Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid." Fertil Steril **44**(4): 493-8.

Racowsky, C., K. V. Jackson, N. A. Cekleniak, J. H. Fox, M. D. Hornstein and E. S. Ginsburg (2000). "The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer." Fertil Steril **73**(3): 558-64.

Raty, S., E. M. Walters, J. Davis, H. Zeringue, D. J. Beebe, S. L. Rodriguez-Zas and M. B. Wheeler (2004). "Embryonic development in the mouse is enhanced via microchannel culture." Lab Chip **4**(3): 186-90. Epub 2004 Mar 18.

Rijnders, P. M. and C. A. Jansen (1998). "The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection." Hum Reprod **13**(10): 2869-73.

Robertson, S. A., C. Sjoblom, M. J. Jasper, R. J. Norman and R. F. Seamark (2001). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos." Biol Reprod **64**(4): 1206-15.

Sakkas, D., Y. Shoukir, D. Chardonens, P. G. Bianchi and A. Campana (1998). "Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability." Hum Reprod **13**(1): 182-7.

Schillaci, R., R. Ciriminna and E. Cefalu (1994). "Vero cell effect on in-vitro human blastocyst development: preliminary results." Hum Reprod **9**(6): 1131-5.

Schini, S. A. and B. D. Bavister (1988). "Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose." Biol Reprod **39**(5): 1183-92.

Scholtes, M. C. and G. H. Zeilmaker (1996). "A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization." Fertil Steril **65**(6): 1245-8.

Schoolcraft, W. B. and D. K. Gardner (2000). "Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation." Fertil Steril **74**(3): 482-6.

Schwärzler, P., H. Zech, M. Auer, K. Pfau, G. Gobel, P. Vanderzwalmen and N. Zech (2004). "Pregnancy outcome after blastocyst transfer as compared to early cleavage stage embryo transfer." Hum Reprod **19**(9): 2097-102. Epub 2004 Jul 8.

Sirisathien, S., H. J. Hernandez-Fonseca and B. G. Brackett (2003). "Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro." Anim Reprod Sci **77**(1-2): 21-32.

Sjoblom, C., M. Wikland and S. A. Robertson (1999). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro." Hum Reprod **14**(12): 3069-76.

Staessen, C., M. Camus, N. Bollen, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem (1992). "The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies." Fertil Steril **57**(3): 626-30.

Staessen, C., C. Janssenswillen, E. De Clerck and A. Van Steirteghem (1998). "Controlled comparison of commercial media for human in-vitro fertilization: Menezo B2 medium versus Medi-Cult universal and BM1 medium." Hum Reprod **13**(9): 2548-54.

Steck, T.: Praxis der Fortpflanzungsmedizin. Schattauer Verlag, 2001.

Steer, C. V., C. L. Mills, S. L. Tan, S. Campbell and R. G. Edwards (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**(1): 117-9.

Steeves, T. E. and D. K. Gardner (1999). "Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture." Biol Reprod **61**(3): 731-40.

Stephens, P.C. and R.G. Edwards (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." Lancet **2**(8085):366.

Tan, S. L., C. Steer, P. Royston, P. Rizk, B. A. Mason and S. Campbell (1990). "Conception rates and in-vitro fertilisation." Lancet **335**(8684): 299.

Tay, J. I., A. J. Rutherford, S. R. Killick, S. D. Maguiness, R. J. Partridge and H. J. Leese (1997). "Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents." Hum Reprod **12**(11): 2451-6.

Telford, N. A., A. J. Watson and G. A. Schultz (1990). "Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species." Mol Reprod Dev **26**(1): 90-100.

Thompson, J. G., A. C. Simpson, P. A. Pugh and H. R. Tervit (1992). "Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos." Mol Reprod Dev **31**(4): 253-7.

Utsunomiya, T., T. Naitou and M. Nagaki (2002). "A prospective trial of blastocyst culture and transfer." Hum Reprod **17**(7): 1846-51.

Van Langendonckt, A., D. Demylle, C. Wyns, M. Nisolle and J. Donnez (2001). "Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study." Fertil Steril **76**(5): 1023-31.

Van Winkle, L. J. (1988). "Amino acid transport in developing animal oocytes and early conceptuses." Biochim Biophys Acta **947**(1): 173-208.

Vlaisavljevic, V., B. Kovacic, M. Reljic, V. G. Lovrec and M. C. Sajko (2001). "Is there any benefit from the culture of a single oocyte to a blastocyst-stage embryo in unstimulated cycles?" Hum Reprod **16**(11): 2379-83.

Westphal, L. M., M. D. Hinckley, B. Behr and A. A. Milki (2003). "Effect of ICSI on subsequent blastocyst development and pregnancy rates." J Assist Reprod Genet **20**(3): 113-6.

World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1992.

Zollner, K. P., U. Zollner, T. Steck and J. Dietl (2002a). "[First experiences with human blastocyst culture after IVF/ICSI under the conditions of the German embryo protection law]." Zentralbl Gynakol **124**(3): 164-9.

Zollner, U., K. P. Zollner, G. Hartl, J. Dietl and T. Steck (2002b). "The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience." Hum Reprod **17**(5): 1327-33.

7. Anhang

1. Embryonenschutzgesetz (ESchG) vom 13.12.1990

§ 1 Missbräuchliche Anwendung von Fortpflanzungstechniken

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

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

(2) Ebenso wird bestraft, wer

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

(3) Nicht bestraft werden

1. in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 1, 2 und 6 die Frau, von der die Eizelle oder der Embryo stammt, sowie die Frau, auf die die Eizelle übertragen wird oder der Embryo übertragen werden soll, und
2. in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 7 die Ersatzmutter sowie die Person, die das Kind auf Dauer bei sich aufnehmen will.

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

§ 2 Missbräuchliche Verwendung menschlicher Embryonen

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

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

(3) Der Versuch ist strafbar.

§ 3 Verbotene Geschlechtswahl

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

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

- (1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer
1. es unternimmt, eine Eizelle künstlich zu befruchten, ohne dass die Frau, deren Eizelle befruchtet wird, und der Mann, dessen Samenzelle für die Befruchtung verwendet wird, eingewilligt haben,
 2. es unternimmt, auf eine Frau ohne deren Einwilligung einen Embryo zu übertragen, oder
 3. wissentlich eine Eizelle mit dem Samen eines Mannes nach dessen Tode künstlich befruchtet.
- (2) Nicht bestraft wird im Fall des Absatzes 1 Nr. 3 die Frau, bei der die künstliche Befruchtung vorgenommen wird.

§ 5 Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen

- (1) Wer die Erbinformation einer menschlichen Keimbahnzelle künstlich verändert, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.
- (2) Ebenso wird bestraft, wer eine menschliche Keimzelle mit künstlich veränderter Erbinformation zur Befruchtung verwendet.
- (3) Der Versuch ist strafbar.
- (4) Absatz 1 findet keine Anwendung auf
1. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer außerhalb des Körpers befindlichen Keimzelle, wenn ausgeschlossen ist, dass diese zur Befruchtung verwendet wird,
 2. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer sonstigen körpereigenen Keimbahnzelle, die einer toten Leibesfrucht, einem Menschen oder einem Verstorbenen entnommen worden ist, wenn ausgeschlossen ist, dass
 - a) diese auf einen Embryo, Fötus oder Menschen übertragen wird oder
 - b) aus ihr eine Keimzelle entsteht,

sowie

3. Impfungen, strahlen-, chemotherapeutische oder andere Behandlungen, mit denen eine Veränderung der Erbinformation von Keimbahnzellen nicht beabsichtigt ist.

§ 6 Klonen

(1) Wer künstlich bewirkt, dass ein menschlicher Embryo mit der gleichen Erbinformation wie ein anderer Embryo, ein Fötus, ein Mensch oder ein Verstorbener entsteht, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer einen in Absatz 1 bezeichneten Embryo auf eine Frau überträgt.

(3) Der Versuch ist strafbar.

§ 7 Chimären- und Hybridbildung

(1) Wer es unternimmt,

1. Embryonen mit unterschiedlichen Erbinformationen unter Verwendung mindestens eines menschlichen Embryos zu einem Zellverband zu vereinigen,
2. mit einem menschlichen Embryo eine Zelle zu verbinden, die eine andere Erbinformation als die Zellen des Embryos enthält und sich mit diesem weiter zu differenzieren vermag, oder
3. durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Tieres oder durch Befruchtung einer tierischen Eizelle mit dem Samen eines Menschen einen differenzierungsfähigen Embryo zu erzeugen, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

- (2) Ebenso wird bestraft, wer es unternimmt,
1. einen durch eine Handlung nach Absatz 1 entstandenen Embryo auf
 - a) eine Frau oder
 - b) ein Tierzu übertragen oder
 2. einen menschlichen Embryo auf ein Tier zu übertragen.

§ 8 Begriffsbestimmung

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

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

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

§ 9 Arztvorbehalt

Nur ein Arzt darf vornehmen:

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

§ 10 Freiwillige Mitwirkung

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

§ 11 Verstoß gegen den Arztvorbehalt

(1) Wer, ohne Arzt zu sein,

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

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

§ 12 Bußgeldvorschriften

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

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

Fußnote

§ 12 Abs. 2: IdF d. Art. 22 G v. 23.10.2001 I 2702 mWv 1.1.2002

§ 13 Inkrafttreten

Dieses Gesetz tritt am 1. Januar 1991 in Kraft.

2. Nomenklatur und Normalwerte im Spermogramm nach WHO-Empfehlungen [1992]

2.1 Normalwerte im Spermogramm

Ejakulatvolumen	≥ 2 ml
pH	7,2 bis 7,8
Konzentration Spermatozoen	≥ 20x10 ⁶ /ml
Morphologie	> 30 % mit normaler Form
Motilität	≥ 50 % (Kategorie a + b) oder ≥ 25 % (Kategorie a)
	Kategorie a schnelle und lineare progressive Beweglichkeit
	Kategorie b langsame, träge oder nicht-lineare progressive Beweglichkeit
	Kategorie c nicht-progressive Beweglichkeit
	Kategorie d Immotilität
Vitalität	≥ 75 %
Fruktose	≥ 13 µmol/Ejakulat
Leukozyten	< 1x10 ⁶ /ml

2.2 Pathologische Befunde im Spermogramm

Aspermie	Kein Sperma
Hypospermie	< 2 ml Sperma
Oligozoospermie	< 20x10 ⁶ Spermatozoen/ml oder < 40x10 ⁶ Spermatozoen im Ejakulat
Kryptozoospermie	< 1x10 ⁶ Spermatozoen/ml
Polyzoospermie	> 250x10 ⁶ Spermatozoen/ml
Azoospermie	Keine Spermatozoen im Samen
Nekrozoospermie	Ausschließlich abgestorbene Spermatozoen
Asthenozoospermie	Verminderte Beweglichkeit [< 25 % Kategorie a oder < 50 % Kategorie a+b)]
Teratozoospermie	< 30 % Spermatozoen mit normaler Morphologie (strenge Kriterien)
Viskositätsstörung	Störung der Spermaverflüssigung

3. Erhebungsbögen

Nr SPSS	
Nr Patientenliste	
ID (Initialen und Geburtsdatum)	
Datum Punktion	
Anamnese	
Alter Patientin	
Alter Ehemann	
Dauer Kinderlosigkeit	
Größe (cm)	
Gewicht (kg)	
BMI	
Raucherin (1=ja, 2=nein)	
Hirsutismus, Hyperandrogenämie (1=ja, 2=nein)	
Zyklus (1=Normo-, 2=Oligo, 2=Polymenorrhoe)	
Vorbehandlung Hormonstimulationen (0-x)	
Vorbehandlung Inseminationen (0-x)	
Vorbehandlung IVF-Zyklen (0-x)	
Vorbehandlung ICSI-Zyklen (0-x)	
Vorbehandlung KET's (0-x)	
Indikation Tubenfaktor (1=ja, 2=nein)	
Indikation leichte andrologische Subfertilität (1=ja, 2=nein)	
Indikation schwere andrologische Subfertilität (1=ja, 2=nein)	
Indikation Endometriose (1=ja, 2=nein)	
Indikation pathologischer Zyklus/PCOS (1=ja, 2=nein)	
Indikation Sonstiges (1=ja, 2=nein)	
Indikation idiopathische Sterilität (1=ja, 2=nein)	
Basale Hormonanalyse	
FSH (mU/ml)	
LH (mU/ml)	
Östradiol (pg/ml)	
Progesteron (ng/ml)	
Prolaktin (ng/ml)	
Testosteron (pg/ml)	
DHEAS (ng/ml)	
17-OH-Progesteron (ng/dl)	
Androstendion (ng/ml)	
TSH basal (mU/ml)	
Aktueller Zyklus Nr	
IVF/ICSI (1=IVF, 2=ICSI)	
E ₂ Tag 6 (pg/ml)	
E ₂ vor HCG (pg/ml)	
Stimulationsdauer (d)	
Stimulationsart (1=HMG, 2=FSH)	
Anzahl Ampullen	
Downregulation (1=Agonist, 2=Antagonist)	

<u>Nativejakulat</u>	
PH	
Volumen (ml)	
Konzentration (Mio/ml)	
Menge (Mio)	
Leukozyten/Rundzellen (Mio/ml)	
Bakterien/Detritus (0-3)	
Motilität a (%)	
Motilität b (%)	
Motilität c (%)	
Motilität d (%)	
Motilität a+b (%)	
Vitalität (%)	
Morphologie (%)	
<u>Aufgearbeitetes Ejakulat</u>	
Volumen (ml)	
Konzentration (Mio/ml)	
Menge (Mio)	
Leukozyten/Rundzellen (Mio/ml)	
Bakterien/Detritus (0-3)	
Motilität a+b (%)	
Vitalität (%)	
Morphologie (%)	
<u>Eizellen</u>	
Anzahl gewonnener Cumuluskomplexe	
Anzahl MII-Oozyten	
Anzahl fertilisierter Eizellen	
Fertilisationsrate (%)	
Anzahl verworfener Eizellen	
Anzahl kryokonservierter Eizellen	
Anzahl Oozyten in Kultur	
Kulturmedium (1=Vitrolife, 2=MediCult)	
<u>Embryonen</u>	
PN-Score	
Embryo-Score	
Anzahl Blastomeren	
Embryo-Score nach Steer (Tag 3)	
Blastozystenbeurteilung	
Mittlerer PN-Score	
Mittlerer Embryo-Score nach Steer (Tag 3)	
Mittlere Blastozystenbeurteilung	
Anzahl Blastozysten	
Anzahl arrested embryos	
Anzahl transferierter Embryonen	
Transfertag	
Schwangerschaft (1=ja, 2=nein)	
Schwangerschaftsausgang (1=Einling, 2=Gemini, 3=Abort, 4=EU)	

4. Aufklärungsbögen

ICPM 9-270 bis 9-278



DOKUMENTIERTE PATIENTENAUFKLÄRUNG



Basisinformation zum Aufklärungsgespräch

Patientendaten/Aufkleber

Extrakorporale Befruchtung (IVF; ICSI)

Vorschlag des Arztes

1. Stimulationsbehandlung

- Spritzen
- sonstige: _____

2. Eizellentnahme durch

- ultraschallgesteuerte Punktion durch die Scheide
- _____

3. IVF mit

- Mikro-Insemination (ICSI)
- Kryokonservierung
- Eizellbehandlung durch _____
- chirurgischer Samenzellentnahme beim Mann
- Polkörperchendiagnostik (PID)

4. Übertragung der Embryonen

- falls möglich 3
- weniger als 3

Sehr geehrtes, liebes (Ehe-)Paar,

Bei Ihnen besteht unerfüllter Kinderwunsch. Die nähere Abklärung hat ergeben, dass zur Behandlung eine extrakorporale Befruchtung sinnvoll sein kann. Vor Beginn der Therapie wird Ihnen die Ärztin/der Arzt die bestehenden Möglichkeiten sowie die geplanten Maßnahmen erläutern. Sie müssen typische Risiken, Belastungen und Folgen der Behandlung kennen, um sich entscheiden zu können. Dieses Aufklärungsblatt soll helfen, das Gespräch vorzubereiten und die wichtigsten Punkte zu dokumentieren.

Was ist die extrakorporale Befruchtung (IVF, ICSI)?

Für die extrakorporale Befruchtung werden den Eierstöcken - in der Regel nach hormoneller Stimulationsbehandlung - Eizellen entnommen (Follikelpunktion) und außerhalb des Körpers (extrakorporal) in einem Gefäß (in vitro) mit dem vorbereiteten Samen (Sperma) vermischt (In-Vitro-Fertilisation, IVF). Im Idealfall kommt es zur Befruchtung einer oder mehrerer Eizellen (Fertilisation) sowie zu deren Weiterentwicklung zu einem oder mehreren Embryonen (s. Abb. 1). Bei der Mikroinsemination (ICSI) werden unter dem Mikroskop jeweils einzelne Samenfäden in je eine Eizelle eingebracht.

Maximal drei Embryonen werden anschließend in die Gebärmutter zurückübertragen und können sich dort einnisten.

Wann ist die IVF sinnvoll?

Mögliche medizinische Gründe für eine IVF-Behandlung sind:

- Verschluss, Schädigung oder Fehlen beider Eileiter, beispielsweise nach Entzündungen, Eileiterschwangerschaften und Operationen (tubare Sterilität);

- Schäden an anderen Organen im kleinen Becken der Frau durch Entzündungen, Verwachsungen oder Endometriose;
- erhebliche Einschränkung der Zeugungsfähigkeit des Mannes durch zu geringe Zahl oder Qualität der Samenzellen (männliche Subfertilität);
- Nachweis von Antikörpern gegen Ei- oder Samenzellen (immunologische Sterilität);
- nicht aufklärbare Ursache eines unerfüllten Kinderwunsches (ungeklärte Sterilität).

Die extrakorporale Befruchtung bringt körperliche und seelische Belastungen mit sich, die unterschiedlich stark empfunden werden. Die Chance auf eine Schwangerschaft besteht nur in den Monatszyklen die behandelt werden. Andere Behandlungsmaßnahmen (z.B. Operationen) könnten die Sterilität womöglich dauerhaft beseitigen. Die IVF sollte deshalb erst dann angewandt werden, wenn diese anderen Behandlungsmethoden bereits ausgeschöpft oder von vornherein ausgeschlossen sind.

Gibt es alternative Befruchtungsmethoden?

In manchen Fällen kann die Befruchtung nach unterstützenden medizinischen Maßnahmen auch im

100
100
100

Dokumentierte Patientenaufklärung • Herausgeber: proCompliance Verlag GmbH • Autoren: Dr. med. W. Frobenius, Prof. Dr. med. E. Stelzmann • Mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. jur. M. Frommel • Juristisch geprüft durch Rée Dr. jur. B. Joch, Dr. jur. A. Schwerdtfeger, Kanzlei Schwarz Nehring Wicke Westphal, München • © 2004 by proCompliance Verlag GmbH, 91058 Erlangen • Nachdruck - auch auszugsweise - und fotokopieren verboten. Bestell-Nr. 607-266 • Bestell-Adresse: proCompliance Verlag GmbH, Weinstr. 70, 91058 Erlangen, Tel. 09131/93 406-40, Fax 09131/93 406-70

Aufklärungsbogen „Extrakorporale Befruchtung (IVF; ICSI)“, Abdruck mit freundlicher Genehmigung der proCompliance GmbH, Erlangen. Nachdruck und Kopieren - auch auszugsweise - verboten.

Mutterleib (intrakorporal) stattfinden. Beim sogenannten **Intratubaren Gametentransfer** beispielsweise werden die zuvor gewonnenen Eizellen und die aufbereiteten Spermazellen außerhalb des Körpers in einer Kulturflüssigkeit vermischt und dann noch vor der Verschmelzung mit Hilfe eines dünnen Katheters direkt in einen Eileiter eingespült. Bei der **Insemination** überträgt die Ärztin/der Arzt zum Zeitpunkt des Eisprungs speziell aufbereitete Spermazellen mit Hilfe einer Spritze und eines dünnen Katheters direkt in die Gebärmutterhöhle oder in die Eileiter. Falls eine dieser Methoden in Ihrem Falle in Betracht kommt, wird Ihre Ärztin/Ihr Arzt dies gesondert mit Ihnen besprechen.

Wie erfolgt die IVF?

Vor der eigentlichen IVF-Behandlung ist es meist sinnvoll, die Eizell-Reifung hormonell anzuregen (**hormonelle Stimulation**). Dadurch lassen sich die Zahl der reifen Eizellen pro Behandlungszyklus erhöhen und so die Behandlungsaussichten verbessern. Für die Stimulation gibt es folgende Möglichkeiten:

- Behandlung mit **Hormonspritzen** (Gonadotropinen); je nach Dosierung können eine, mehrere oder sehr viele Eizellen heranreifen. Die Spritzen werden vom Stimulationsbeginn an (oft dem 2. Zyklustag) täglich verabreicht. Um Störungen der Stimulation durch unerwünschte körpereigene Hormone zu verhindern, werden meist zusätzliche Injektionen gegeben oder Nasensprays verabreicht. Da sich die Behandlungsprotokolle der einzelnen IVF-Zentren im Detail unterscheiden können, wird die Ärztin/der Arzt Ihnen den Ablauf der in Ihrem Fall geplanten Behandlung im Aufklärungsgespräch genau darlegen;
- in besonderen Fällen lässt sich die Behandlung mit **Hormontabletten** (Antiöstrogenen) oder einer Kombination aus Tabletten und Spritzen durchführen; auch bei der alleinigen Tablettenbehandlung ist die gleichzeitige Reifung mehrerer Eizellen möglich. Diese Methode wird meist angewandt, wenn eine übermäßig starke Reaktion der Eierstöcke vermieden werden soll;
- da Frauen sehr unterschiedlich auf die Stimulationsbehandlung reagieren, kann Ihre Ärztin/Ihr Arzt in Ihrem Fall auch ein Behandlungsverfahren für erforderlich halten, das im Aufklärungsbogen nicht besprochen ist. Darüber werden Sie jedoch gesondert informiert.

Während der Stimulation wird das Wachsen der Eibläschen, in denen sich die Eizellen befinden, meist durch mehrere Ultraschalluntersuchungen kontrolliert. Oft werden zusätzlich die Hormone im Blut bestimmt, damit Rückschlüsse auf den Fortschritt im Reifeprozess der Eizellen gezogen werden können.

Zeigen diese Untersuchungen nach etwa 11 Tagen, dass die Entwicklung der Eizellen ausreichend ist, so beendet man ihre Reifung durch die Injektion eines weiteren Hormons (HCG). Die entsprechende Spritze wird der Patientin in der Regel abends oder nachts verabreicht, damit die Eizellentnahme am Vormittag des übernächsten Tages durchgeführt werden kann. Die Eizellgewinnung erfolgt heute in der Regel am-

bulant durch **ultraschallgesteuerte Punktion** in Kurznarkose oder Regionalanästhesie. Dazu führt die Ärztin/der Arzt eine Ultraschallsonde in die Scheide ein, mit deren Hilfe sich die Eibläschen genau lokalisieren lassen. Dann werden die Eibläschen mit einer Nadel durch Scheidenwand und Bauchfell punktiert und die Eizellen abgesaugt. Die Ultraschallpunktion ist auf Wunsch auch ohne Narkose nur mit einer Beruhigungs- und/oder Schmerz-spritze möglich.

In seltenen Fällen kann es sinnvoll erscheinen, die Eizellen im Rahmen einer **Bauchspiegelung** zu entnehmen (laparoskopische Punktion). Sollte dieses Verfahren bei Ihnen angezeigt sein, klärt Sie die behandelnde Ärztin/der Arzt gesondert darüber auf.

Vereinfachte schematische Darstellung

Prinzip der in-vitro-Fertilisation

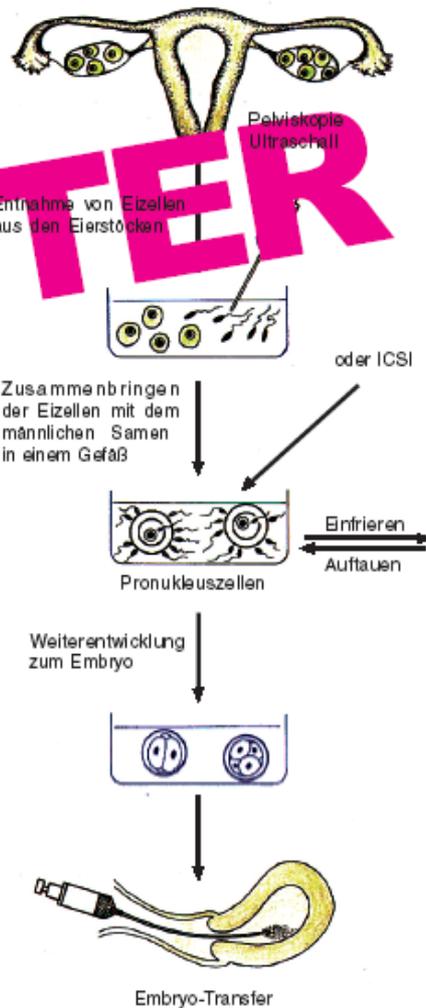


Abb. 1

Am Tag der Eizellentnahme wird eine Samenprobe des (Ehe-)Mannes benötigt. Die Gewinnung kann im IVF-Zentrum oder zu Hause erfolgen. Über den genauen Ablauf und die notwendigen Formalitäten (z.B. ob Sie einen Personalausweis mitbringen müssen) informieren Sie Ihre Ärztin/Ihr Arzt oder das zuständige Laborpersonal. Die Samenprobe wird dann im Labor für die IVF vorbereitet (z.B. durch Abtrennung der befruchtungsfähigen Spermien von den übrigen Bestandteilen des Ejakulates).

Die reifen Eizellen werden in einem speziellen Gefäß mit den Spermien gemischt und in einer Nährlösung in einen Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag überprüft das Laborpersonal, ob sich in den Eizellen je ein weiblicher und männlicher Vorkern (Pronukleus) gebildet haben und damit die eigentliche Befruchtung (Vereinigung des Erbgutes) unmittelbar bevorsteht. In diesem Stadium können ggf. überzählige Pronukleuszellen eingefroren (kryokonserviert) und für einen neuen Behandlungsversuch aufbewahrt werden. Ausgewählte Pronukleuszellen verbleiben in der Nährlösung, entwickeln sich im Idealfall zu Embryonen und werden in die Gebärmutter übertragen.

Dieser Embryonentransfer erfolgt meist zwei Tage nach der Eizellentnahme mit Hilfe eines dünnen, biegsamen Plastikschlauches, der durch den Muttermund eingeführt wird (Abb. 1). Dieser Vorgang ist normalerweise ungefährlich und schmerzlos. Mit geringen Beschwerden (z.B. leichten Schmerzen) muss nur in den seltenen Fällen gerechnet werden, in denen eine Aufdehnung des Gebärmutterhalskanals nötig wird.

Welche zusätzlichen Maßnahmen sind möglich?

Wenn die Sperma-Qualität sehr gering ist, oder es den Samenfäden aus anderen Gründen nicht gelingt, eine Befruchtung herbeizuführen, können zusätzliche Maßnahmen nötig werden. Auch wiederholte Fehlversuche oder bestimmte genetische Konstellationen können eine Erweiterung der Therapie erfordern. Folgende Maßnahmen sind möglich:

- eine **Mikro-Insemination**, wobei die Spermien unter mikroskopischer Sicht direkt in die Eizelle eingebracht werden (s. Abb. 2). Das Erbgut von Ei- und Samenzellen bleibt dabei unberührt. Diese Methode wird als **intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)** bezeichnet.
- eine **Eizellbehandlung** (Assisted hatching), wobei die Eihaut verdünnt wird.
- eine **erweiterte Embryokultur**, wobei die Embryonen länger als zwei Tage im Brutschrank wachsen, bevor sie in einem möglichst reifen Stadium übertragen werden.
- eine **Präimplantationsdiagnostik (PID)** durch Analyse der Polkörperchen der Eizellen, die eine Reihe genetischer Defekte der Eizellen nachweisen kann. Wenn in Ihrem Fall eine PID sinnvoll erscheint, wird Sie Ihre Ärztin/Ihr Arzt näher darüber informieren.

Liegen extrem wenige, gar keine oder zu wenige lebe-nde Spermien in der Samenspende vor, so kann eine operative Samenzellentnahme sinnvoll werden. Sollte diese Maßnahme in Ihrem Fall in Betracht gezogen werden, so werden Sie darüber gesondert aufgeklärt.

Mit welchen Risiken/Problemen ist bei der IVF zu rechnen?

Hormonelle Stimulation

- Bei der Behandlung mit **Hormonspritzen** tritt - je nach Dosierung und Veranlagung - eine erhebliche **Vergrößerung der Eierstöcke** auf, die zu starken Bauchschmerzen führen kann. Zusätzlich sind **Wasseransammlungen** im Bauch (Aszites) und in der Lunge (Pleuraergüsse) möglich. Die Wasseransammlungen haben häufig Atemnot und Übelkeit zur Folge. Eine ebenfalls mögliche „Blutverdickung“ erhöht das Thrombose- bzw. Embolierisiko (u.U. **lebensgefährlicher** Verschluss von Blutgefäßen). Diese Nebenwirkungen werden als **Überstimulationssyndrom** bezeichnet. Sie lassen sich in der Regel medizinisch gut beherrschen. Meist ist jedoch eine stationäre Behandlung erforderlich. **Lebensbedrohliche Zustände und Todesfälle** treten extrem selten auf;
- bei **unzureichender Reaktion der Eierstöcke** kann der Arzt es für ratsam halten, die hormonelle Stimulation zu beenden. In manchen Fällen muss die Stimulation auch zur Vermeidung eines drohenden Überstimulationssyndroms abgebrochen werden;
- die Behandlung mit **Hormontabletten** (Anti-östrogenen) und **GnRH-Analoga** bzw. -Antagonisten führt gelegentlich zu weitgehend harmlosen Nebenwirkungen wie z.B. **Hitzewallungen, Kopfschmerzen, Völlegefühl, schmerzhaftem Ziehen im Unterbauch oder Eierstockzysten**. Diese Symptome bedürfen keiner besonderen Behandlung. Überstimulation ist sehr selten;
- möglicherweise kann es zu **Langzeitfolgen** der hormonellen Stimulationsbehandlung (z.B. **Tumorleiden**) kommen. Es existieren zur Zeit jedoch keine gesicherten Erkenntnisse darüber, ob Erkrankungen in späteren Jahren auf die Stimulationsbehandlung zurück zu führen sind;

Mikroinsemination (ICSI-Methode)

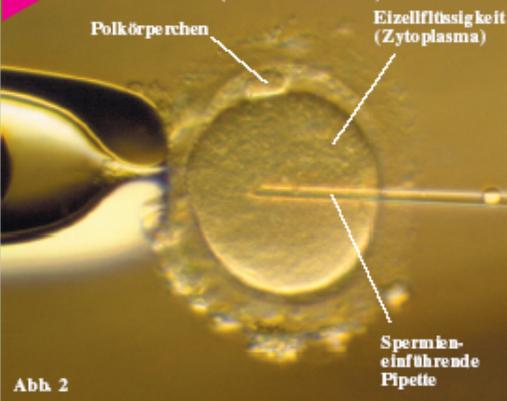


Abb 2

Eizellgewinnung

- Verletzungen innerer Organe (z.B. Darm, Blutgefäße, Harnwege) durch die Punktionsnadel bei der Eizellentnahme; das Verletzungsrisiko ist erhöht bei ungünstigen anatomischen Bedingungen, vor allem nach Voroperationen mit Verwachsungen;
- stärkere Blutungen durch Verletzungen während der Punktion; sie werden meist sofort erkannt und behandelt. Unter Umständen kann eine Übertragung von Blutbestandteilen erforderlich werden. Eine Übertragung von Fremdblut kann sehr selten zu Infektionen, z.B. mit Hepatitis-Viren (Folge: Leberentzündung) oder extrem selten mit HIV (Spätfolge AIDS) führen. Eine Eigenblutspende ist in aller Regel jedoch nicht notwendig;
- leichte Nachblutungen und Blutergrüsse auf Grund von Verletzungen müssen meist nicht zusätzlich behandelt werden;
- Durchblutungsstörungen durch Verschluss oder Schädigung von Blutgefäßen sind sehr selten. Sie können extrem selten - auch noch längere Zeit nach dem Eingriff - zum Absterben von Gewebe (z.B. Haut) oder Organen (z.B. Darm) führen;
- sehr selten Infektionen durch die Eizellentnahme oder die Embryonen-Übertragung; z.B. eine Keimverschleppung in die Blutbahn (Bakteriämie) bis hin zur Blutvergiftung (Sepsis), die eine intensivmedizinische Behandlung erfordert und lebensbedrohlich verlaufen kann. Lokale Infektionen haben unter Umständen z.B. eine Abszessbildung im Eierstock zur Folge. Im Extremfall können dadurch große Bauchoperationen u.a. mit Entfernung der Gebärmutter und der Eierstöcke nötig werden. Dies führt zur endgültigen Sterilität und kann auch psychosexuelle Störungen zur Folge haben;

Embryonentransfer und Schwangerschaft

- auch beim Embryonentransfer in die Gebärmutter kann es in sehr seltenen Fällen zu einer Infektion mit den oben genannten Folgen kommen;
- nach einem Embryonentransfer kommt es gelegentlich zu einer Eileiterschwangerschaft, die operativ entfernt werden muss; insgesamt ist dieses Risiko etwas größer als bei einer normalen Schwangerschaft;
- sehr selten treten nach der Übertragung der Embryonen krampfartige Bauchschmerzen auf, die jedoch medikamentös behandelt werden und/oder nach einiger Zeit von selbst verschwinden können;
- je nach dem, wie viele Embryonen übertragen werden, sich einnisten und weiter entwickeln, kann es nach IVF-Behandlung vermehrt zu einer Mehrlingsschwangerschaft kommen! Damit verbunden können Schwangerschaftskomplikationen auftreten, die ggf. eine stationäre Überwachung und/oder Behandlung über lange Zeit erforderlich machen. Bei höhergradigen Mehrlingsschwangerschaften (Drillinge und mehr) kann auch eine Frühgeburt stattfinden. Möglicherweise ist auch die Krankheitsanfälligkeit und Sterblichkeit der Kinder erhöht.

Schwangerschaften nach IVF mit nur einem Kind unterscheiden sich in ihren Risiken unwesentlich von „normalen“ Schwangerschaften. So liegt die Rate an Fehlgeburten etwas höher. Bei den Kindern wurde bisher kein vermehrtes Auftreten von Fehlbildungen beobachtet.

Bei Schwangerschaften nach ICSI sind die Untersuchungen darüber, ob es vermehrt zu Störungen im Erbgut der Kinder kommt, noch nicht endgültig abgeschlossen. Nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen ist es jedoch nicht auszuschließen, dass Eltern, deren Sterilität genetisch bedingt ist, diese auf ihre Kinder vererben.

Allgemeine Behandlungsrisiken

Neben den speziellen Risiken und Problemen der in-vitro-Fertilisation existieren noch allgemeine Risiken, die jeder medizinischen Behandlung anhaften. Zu nennen sind:

- selten beeinträchtigte Atemfunktion bis hin zum Atemstillstand, sehr selten Herz- Kreislaufstörungen, insbesondere bei der Gabe von Beruhigungs-/Schmerzmitteln oder als schwere allergische Reaktion auf eingespritzte Medikamente. Störungen dieser Art erfordern eine intensivmedizinische Behandlung und können u.U. lebensbedrohlich sein. Die dabei mögliche mangelnde Organdurchblutung hat u.U. bleibende Schäden zur Folge (z.B. Nierenversagen, Hirnschädigung, Krampfanfälle). Die Überwachung während und auch nach der Untersuchung durch den Arzt und seine Assistenten reduziert diese Gefahr jedoch erheblich; ggf. notwendig werdende Behandlungsmaßnahmen können sofort eingeleitet werden;
- sehr selten Komplikationen wie z.B. Haut- und Weichteilschäden (Spritzenabszess, Absterben von Gewebe, Nerven- und Venenreizungen) infolge von Einspritzungen und/oder Verletzungen durch Lagerung vor, während oder nach der Eizellentnahme/dem Embryonentransfer. Solche Komplikationen verschwinden meist nach einiger Zeit von selbst bzw. sind gut behandelbar. In ungünstigen Fällen können sie jedoch auch langandauernde oder dauerhafte Beschwerden (Narben, schmerzhaftes Missempfindungen, Taubheitsgefühl) zur Folge haben;
- Bildung von Blutgerinnseln in Venen (Thrombosen), die u.U. in lebenswichtige Organe verschleppt werden und einen Verschluss von Blutgefäßen (Embolie) verursachen (z.B. Lungenembolie, Schlaganfall). Dies kann zu lebensbedrohlichen Zuständen und Organschäden durch mangelnde Durchblutung führen. Das Thromboembolie-Risiko erhöht sich bei langer Bettlägerigkeit. Sofern Medikamente zur Beeinflussung der Blutgerinnung verabreicht werden (Thromboseprophylaxe), können diese zu vermehrten Nachblutungen führen.

Wie sind die Erfolgsaussichten?

Ein Erfolg der IVF kann trotz sachgemäßer Durchführung der Behandlung nicht garantiert werden. Er ist auch sehr stark vom Alter der Frau, den Ursachen der Kinderlosigkeit und der gewählten Behandlungsform abhängig.

Unter natürlichen Bedingungen liegt die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft für jeden Menstruationszyklus bei etwa 25%. Auch mit dem Embryonentransfer kann diese Rate erreicht werden, wenn mehrere Embryonen übertragen werden. Diese Schwangerschaften tragen - vor allem in den ersten drei Monaten - ein etwas erhöhtes Risiko für einen Abgang.

Nach den Daten des Deutschen IVF Registers enden etwa 10 % aller Embryotransfers mit der Geburt eines Kindes. Allerdings sinkt die Erfolgsrate sehr stark mit dem Alter der Frau.

Gesetzliche Bestimmungen

Nach dem Embryonenschutzgesetz darf nur eine begrenzte Anzahl von Embryonen erzeugt werden, um zu vermeiden, dass überzählige entwicklungsfähige Embryonen entstehen. Im Rahmen der Behandlung dürfen höchstens drei, zur Vermeidung von Mehrlingsschwangerschaften sollten aber in der Regel maximal zwei entwicklungsfähige Embryonen transferiert werden.

Pronukleuszellen fallen allerdings nicht unter diese Bestimmungen. Sie dürfen eingefroren (**Kryokonservierung**) und zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut und übertragen werden. Dieses Vorgehen kann Vorteile für die Patientin haben, da ein erneuter Behandlungsversuch ohne aufwendige Stimulation sowie Ei- und Samenzellgewinnung möglich ist. Allerdings überleben nicht alle Pronukleuszellen das Einfrieren und Wiederauftauen.

In Deutschland soll die IVF/ICSI-Behandlung nur bei verheirateten Paaren oder bei Paaren, die in einer dauerhaften Lebensgemeinschaft leben, durchgeführt werden. Ausnahmen sind nach Genehmigung durch die zuständige Landesärztekammer aber möglich.

Die Kosten für eine normale IVF-Behandlung und auch eine ICSI-Therapie werden unter bestimmten Voraussetzungen von den Krankenkassen erstattet. In manchen Fällen (z.B. wenn der Katalog Ihrer Krankenkasse die ICSI-Behandlung nicht vorsieht oder wenn beide Partner in verschiedenen Kassen versichert sind) ist es jedoch ratsam, vorab mit der Krankenkasse zu sprechen und sich eine Kostenübernahme schriftlich zusichern zu lassen. Zusätzliche Behandlungsmaßnahmen (z.B. Kryokonservierung, Eizellbehandlung) tragen die Krankenkassen nicht. Falls Sie diese Maßnahmen dennoch wünschen, kommen Kosten auf Sie zu, über deren Höhe Sie Ihre Ärztin/Ihr Arzt informiert.

Da sich die Bestimmungen häufig ändern, sollten Sie sich in jedem Fall vor Behandlungsbeginn bei Ihrer Krankenkasse/Behilfestelle genau informieren.

Was ist besonders zu beachten?

Sprechen Sie vor der Behandlung mit Ihrer Ärztin/Ihrem Arzt darüber, ob es sinnvoll ist, bei beiden (Ehe-) Partnern eine Untersuchung zum Ausschluss einer evt. vorhandenen Chromosomenstörung durchzuführen. Eine Verpflichtung zu dieser Untersuchung besteht jedoch nicht.

Die IVF-Behandlung erfordert häufige und zeitlich aufeinander abgestimmte Arztbesuche. Beachten Sie die Anweisungen Ihrer Ärztin/Ihres Arztes diesbezüglich genau, um die Erfolgchancen Ihrer Behandlung nicht zu reduzieren. So sollten Sie z.B. für die Hormonspritzen pünktlich zur vereinbarten Zeit erscheinen.

Auch die von Ihrer Ärztin/Ihrem Arzt empfohlenen Verhaltensregeln für die Zeit nach bestimmten Eingriffen (z.B. körperliche Schonung während der hormonellen Stimulation oder nach der Eizellentnahme bzw. Embryoübertragung) müssen exakt eingehalten werden.

Nach einer Narkose, einer Beruhigungs- oder Schmerzspritze oder nach Regionalanästhesie dürfen Sie 24 Stunden lang nicht aktiv am Straßenverkehr teilnehmen, keine wichtigen Entscheidungen treffen und nicht an gefährlichen Maschinen arbeiten.

Fragen zum Aufklärungsgespräch

Im Aufklärungsgespräch sollten Sie nach allem fragen, was Ihnen wichtig oder noch unklar erscheint. Hier haben Sie die Möglichkeit, Ihre Fragen zu notieren, damit Sie diese beim Gespräch nicht vergessen.

Wichtige Fragen,

die Sie sorgfältig beantworten sollten, um Gefahrenquellen rechtzeitig erkennen und spezielle Risiken in Ihrem Fall besser abschätzen zu können:

1. Sind **Störungen des Stoffwechsels** (z.B. Diabetes) oder **wichtiger Organe** (Gefäße, Herz, Nieren, Leber, Lungen, Schilddrüse, Nervensystem) bekannt? nein ja
2. Besteht eine **akute/chronische Infektionskrankheit** (z.B. Hepatitis, HIV/AIDS) oder ein **anderes schwerwiegendes chronisches Leiden** (z.B. grüner Star, Epilepsie, Lähmungen)? nein ja
3. Besteht eine **Allergie/Überempfindlichkeit** (z.B. Asthma, Heuschnupfen oder gegen Medikamente, Pflaster, Latex, Nahrungsmittel, örtliche Betäubungsmittel)? nein ja
4. Besteht eine **Bluterkrankung/erhöhte Blutungsneigung** (z.B. häufiges Nasenbluten, Neigung zu Blutergüssen oder blauen Flecken)? nein ja
5. Kam es zur **Bildung/Verschleppung von Blutgerinnseln (Thrombose, Embolien)**? nein ja
6. Nehmen Sie **regelmäßig Medikamente** ein (z.B. Herz-, Schmerz-, blutdrucksenkende oder blutgerin-

MERKBLATT ZUR BEHANDLUNG MIT HORMONEN WEGEN KINDERWUNSCHES

Dieses Merkblatt soll Sie für die geplante Behandlung mit Hormonen zur Ovulationsauslösung informieren. Selbstverständlich haben Sie darüber hinaus die Gelegenheit, alle Sie interessierenden Fragen zu stellen.

Medikament. Vorgesehen ist eine Gabe von täglichen Injektionen des Präparates.....subkutan/intramuskulär. Die subkutanen Injektionen können von Ihnen selbst, die intramuskulären Gaben sollen nur von ausgebildetem medizinischem Personal vorgenommen werden.

Erfolgsaussicht. Die Chance auf den Eintritt einer Schwangerschaft beträgt im Durchschnitt etwa 15 - 25 % pro Zyklus. Ihre individuelle Erfolgsaussicht hängt aber von zahlreichen weiteren Faktoren ab, wie Art der zugrundeliegenden Störung, Durchgängigkeit der Eileiter, Zeugungsfähigkeit Ihres Ehemannes usw. Das Risiko einer Fehlgeburt dürfte etwa 20 - 25 % betragen.

Risiken. Durch die Stimulation kann es zu einer Vergrößerung der Eierstöcke mit Zystenbildung kommen (sog. Überstimulation) sowie zu Beschwerden wie Umfangszunahme des Bauches oder Schmerzen. In schweren Fällen ist eine stationäre Behandlung mit Infusionen und Gabe von schmerzlindernden und gerinnungshemmenden Medikamenten erforderlich. In der Regel ist eine abwartende Therapie der Überstimulation ausreichend; das Krankheitsbild verschwindet von selbst in einigen Wochen. Selten kann eine Punktion eines Ergusses notwendig sein.

Durch die Auslösung mehrfacher Eisprünge besteht darüber hinaus ein etwas erhöhtes Risiko für den Eintritt einer Mehrlingsschwangerschaft. Dieses Risiko hängt von einer Reihe individueller Faktoren ab, wie der Zahl und Größe der Eibläschen und dem Verlauf des Stimulationszyklus, aber auch von Ihrer Vorgeschichte und Vorbefunden.

Zyklusüberwachung. Wir sind bestrebt, durch mehrmalige Kontrollen des Zyklus nicht nur den Tag des Eisprunges möglichst genau vorherzusagen, sondern auch das Risiko einer Überstimulation oder einer Mehrlingsschwangerschaft möglichst gering zu halten. Diese Kontrollen umfassen in der Regel eine vaginale Sonographie der Eierstöcke sowie die Bestimmung von Hormonen im Blut. Für den Fall der Ausbildung zu vieler Eibläschen besteht die Alternative in einem Abbruch des Zyklus unter Verzicht auf einen Verkehr während dieser Tage, so daß sowohl eine Überstimulation als auch der Eintritt einer Mehrlingsschwangerschaft verhindert werden.

Es ist von großer Wichtigkeit, daß Sie sich an den vereinbarten Tagen zu diesen Zykluskontrollen in unserer Sprechstunde vorstellen.

Einverständniserklärung. Nach Lektüre dieses Merkblattes, nach ausreichender Bedenkzeit und nach Beantwortung aller Sie interessierenden Fragen erklären Sie hiermit Ihr Einverständnis zur der geplanten Hormonbehandlung.

Würzburg, den

.....
(Patientin)

.....
(Arzt)

8. Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COC	Cumulus Oozyten Komplex
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
E ₂	Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESchG	Embryonenschutzgesetz
FR	Fertilisationsrate
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HMG	Humanes menopausales Gonadotropin
HSA	Humanes Serum Albumin
ICM	Innere Zellmasse
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IE	Internationale Einheiten
IVF	In-vitro-Fertilisation
KET	Kryo-Embryotransfer
LH	Luteinisierendes Hormon
MII	Metaphase II
ns	nicht signifikant
PN	Pronukleus
PCOS	Syndrom der polyzystischen Ovarien
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SSR	Schwangerschaftsrate
Tab.	Tabelle
TE	Trophektoderm
TSH	Thyreoideastimulierendes Hormon
vs.	versus

WHO

World Health Organization

Danksagung

Ich möchte allen meine Dankbarkeit ausdrücken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt

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

Frau Privat-Dozentin Dr. med. U. Zollner, Oberärztin der Frauenklinik und Poliklinik der Universität Würzburg, für die außerordentlich engagierte und zuverlässige wissenschaftliche und menschliche Betreuung während der Arbeit.

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

Herrn Professor Dr. med. H. Höhn, Leiter des Instituts für Humangenetik, für die freundliche Übernahme des Korreferates.

meinen Eltern für die jahrelange unermüdliche Unterstützung bei all meinen Vorhaben.

Lebenslauf

Minka Mareille Schneider

Kleinweidenmühle 12
90419 Nürnberg

Geburtsdatum/Ort: 14.10.1978 in Neuss

Eltern: Andreas Schneider
Dr. med. Dorothee Schneider, geb. Mies

Geschwister: Dr. jur. Moritz Schneider, * 05.03.1975
Marie-Christin Schneider, * 17.12.1981

AUSBILDUNG

1985 - 1989 Carl-Sonnenschein-Schule Düsseldorf
1989 - 1998 Städtisches Gymnasium Gerresheim Düsseldorf
05/1998 Abitur
09/1998 - 03/1999 Auslandsaufenthalt Guatemala
04/1999 - 04/2005 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2001 Ärztliche Vorprüfung
03/2002 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2002 - 03/2003 Studium der Humanmedizin an der Universidad Complutense de Madrid, Spanien
04/2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004 - 02/2005 Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgischen Klinik des Kantonalen Spitals Grabs, Schweiz
02/2005 - 05/2005 Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der Medizinischen Klinik des Kantonsspitals Winterthur, Schweiz
04/2005 - 09/2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
05/2005 - 09/2005 Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Dermatologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/2005 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
11/2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 3/2006 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik 2 der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Nürnberg, den 19.02.2007

(Minka Schneider)