

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Einfluss von Morphologiekriterien der menschlichen Eizelle auf den Erfolg der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

verlegt von:
Khadiga El-Hawari
aus Husum
Kiel, 2013

1. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. med. Liselotte Mettler
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.12.2012

gez. Herr Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Die Kinderwunschbehandlung	11
1.2 Physiologische Grundlagen der assistierten Reproduktion	12
1.2.1 Der Aufbau der menschlichen Eizelle	12
1.2.2 Die Entwicklung der Eizelle	12
1.2.3 Der Einfluss der Gonadotropine auf die Follikelreifung	13
1.3 Die <i>In-vitro</i> -Fertilisation	13
1.4 Das Embryonenschutzgesetz	14
1.5 Die Mehrlingsproblematik	15
1.6 Die Polkörperdiagnostik	15
1.7 Mögliche Verfahren zur Beurteilung der Eizelle	16
1.8 Mikroskopische Beurteilung der Eizellmorphologie	17
1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Studiendesign	19
2.2 Datenerhebung	19
2.3 Datenerfassung	19
2.4 Statistische Verfahren	20
2.5 Extrakorporale Befruchtung	20
2.5.1 Gewinnung der Eizellen	20
2.5.2 Vorbereitung der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion	21
2.5.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion	22
2.6 Polkörperdiagnostik	22
2.7 Überprüfung der Entwicklung vom Vorkernstadium zum Embryo	23
2.8 Embryotransfer	24
2.9 Lutealphasenunterstützung	24
2.10 Zyklusausgang	24

2.11	Morphologische Charakterisierung der Eizellen	24
2.11.1	Beurteilung des <i>Reifestatus</i> der Eizelle	26
2.11.2	Beurteilung der <i>Morphologiekriterien</i> bei MII-Eizellen	26
3	Ergebnisse	29
3.1	Behandlungsergebnisse	29
3.2	Einführung in die statistische Analyse	29
3.3	Einfluss allgemeiner Paramter auf den Ausgang der Kinderwunschbe- handlung	33
3.3.1	Alter der Frau	33
3.3.2	Anzahl der transferierten Embryonen	35
3.3.3	Anzahl der Metaphase-II-Eizellen	37
3.4	Einfluss der Eizellmorphologie auf den Ausgang der Kinderwunschbe- handlung	39
3.4.1	Zytoplasma	39
3.4.2	Polkörper	44
3.4.3	Granulationen im perivitellinen Raum	46
3.4.4	Zona pellucida	48
3.5	Vergleich der komplett homogenen Eizellpools mit den Eizellpools mit einer überwiegend positiven Merkmalsausprägung	52
3.6	Einfluss der Polkörperdiagnostik auf den Ausgang der Kinderwunschbe- handlung	61
4	Diskussion	63
4.1	Einfluss allgemeiner Paramter auf den Ausgang der Kinderwunschbe- handlung	63
4.1.1	Alter der Frau	63
4.1.2	Anzahl transferierter Embryonen	64
4.1.3	Anzahl der Metaphase-II-Eizellen	65
4.2	Einfluss der Eizellmorphologie auf den Ausgang der Kinderwunschbe- handlung	66
4.2.1	Zytoplasma	68
4.2.2	Polkörper	70
4.2.3	Granulationen im perivitellinen Raum	71
4.2.4	Zona pellucida	72
4.3	Vergleich der komplett homogenen Eizellpools mit den Eizellpools mit einer überwiegend positiven Merkmalsausprägung	73

4.4 Einfluss der Polkörperdiagnostik auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung	74
4.5 Schlussfolgerung	75
5 Zusammenfassung	78
Literaturverzeichnis	81
Ehrenwörtliche Erklärung	89
Danksagung	90
Lebenslauf	91

Tabellenverzeichnis

1	Allgemeine Parameter	32
2	Einfluss des <i>Alters der Frau</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	34
3	Einfluss der <i>Anzahl transferierter Embryonen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	36
4	Einfluss der Anzahl von <i>Metaphase-II-Eizellen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	38
5	Ergebnisübersicht zu dem Einfluss der morphologischen Merkmale auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung	40
6	Einfluss des <i>Zytoplasmas</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	41
7	Einfluss der <i>Vakuolen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	43
8	Einfluss der <i>Polkörper</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	45
9	Einfluss des <i>perivitellinen Raums</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	47
10	Einfluss der <i>Farbe der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	49
11	Einfluss der <i>Dicke der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	50
12	Einfluss der <i>Oberfläche der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	51
13	Einfluss des <i>Zytoplasmas</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung	54
14	Einfluss der <i>Vakuolen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung	55

15	Einfluss der <i>Polkörper</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung	56
16	Einfluss des <i>perivitellinen Raums</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung	57
17	Einfluss der <i>Farbe der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung	58
18	Einfluss der <i>Dicke der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung	59
19	Einfluss der <i>Oberfläche der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung	60
20	Einfluss der <i>Polkörperdiagnostik</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	62
21	Ergebnisübersicht aus der Literatur zu dem Einfluss morphologischer Merkmale auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate	67

Abbildungsverzeichnis

1	Schema der Eizellpools	31
2	Einfluss des <i>Alters der Frau</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	34
3	Einfluss der <i>Anzahl transferierter Embryonen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	36
4	Einfluss der Anzahl von <i>Metaphase-II-Eizellen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	38
5	Einfluss des <i>Zytoplasmas</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	41
6	Einfluss der <i>Vakuolen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	43
7	Einfluss der <i>Polkörper</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	45
8	Einfluss des <i>perivitellinen Raums</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	47
9	Einfluss der <i>Farbe der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	49
10	Einfluss der <i>Dicke der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	50
11	Einfluss der <i>Oberfläche der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	51
12	Einfluss des <i>Zytoplasmas</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen	54
13	Einfluss der <i>Vakuolen</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen	55
14	Einfluss der <i>Polkörper</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen	56

15	Einfluss des <i>perivitellinen Raums</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen	57
16	Einfluss der <i>Farbe der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen	58
17	Einfluss der <i>Dicke der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen	59
18	Einfluss der <i>Oberfläche der Zona pellucida</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen	60
19	Einfluss der <i>Polkörperdiagnostik</i> auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt	62

Abkürzungsverzeichnis

biochem. Schw.	biochemische Schwangerschaft
DIR	Deutsches IVF-Register
ESchG	Embryonenschutzgesetz
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormon
HCG	humanes Choriongonadotropin
hMG	humanes Menopausengonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	<i>in-vitro</i> -Fertilisation
klin. Schw.	klinische Schwangerschaft
LH	luteinisierendes Hormon
r-hFSH	rekombinantes humanes follikelstimulierendes-Hormon

1 Einleitung

1.1 Die Kinderwunschbehandlung

Es wird angenommen, dass derzeit in Deutschland etwa 1,5 bis 2 Millionen Paare ungewollt kinderlos sind (Diedrich, 2000). Nach WHO-Definition spricht man von einem unerfüllten Kinderwunsch, wenn nach zwei Jahren regelmäßigen, ungeschützten Geschlechtsverkehrs eine Schwangerschaft ausbleibt. Die Gründe liegen zu etwa gleichen Teilen bei der Frau oder dem Mann. In einem Drittel der Fälle liegt die Ursache bei beiden Partnern und in etwa 10 % bleibt die Unfruchtbarkeit ungeklärt (Kiechle, 2007). Die Rate der weiblichen Unfruchtbarkeit liegt aktuell bei 10-20 % mit steigender Tendenz (Ramos *et al.*, 2008). Als beeinflussende Faktoren stehen das Verschieben der Familienplanung ins höhere Alter (Boivin *et al.*, 2009) sowie zunehmende Schadstoffbelastungen aus der Umwelt (Gerhard and Runnebaum, 1992) in der Diskussion.

Die Behandlung von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch hat in den letzten 30 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Verbesserung der Therapiemöglichkeiten sowie der offene Umgang mit diesem Thema hat zu einer gesteigerten Akzeptanz einer diagnostischen Abklärung der Ursache einer Kinderlosigkeit geführt. Die Nachfrage nach reproduktionsmedizinischen Therapien hat in Europa in den Jahren 2004 bis 2005 um 13,6 % zugenommen (Andersen *et al.*, 2009). Seit der Geburt des ersten Kindes mit der Methode der *In-vitro*-Fertilisation im Jahre 1978 (Step toe und Edwards, 1978) wurde der Weg bereitet für die sich seitdem stetig in Entwicklung und Fortschritt befindliche Reproduktionsmedizin. Die künstliche, extrakorporale Befruchtung wurde zunächst nur im Rahmen der weiblichen Sterilität eingesetzt. Im Jahre 1992 konnte dann auch die männliche Sterilität mit der Methode der Intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) überwunden werden (Palermo *et al.*, 1992).

1.2 Physiologische Grundlagen der assistierten Reproduktion

1.2.1 Der Aufbau der menschlichen Eizelle

Die Eizelle ist kugelförmig, zytoplasmareich und hat nach abgeschlossenem Wachstum einen Durchmesser von etwa 120 bis 150 μm (Drews, 2006). Umgeben wird die Eizelle von der etwa 20 μm dicken Zona pellucida (Bertrand *et al.*, 1995), einer durchscheinenden, extrazellulären Glykoprotein-Hülle (Pelletier *et al.*, 2004). Sie ist eine Schutzhülle um die Eizelle und dient der Bindung der Samenzelle sowie dem Verhindern einer mehrfachen Befruchtung (Gu *et al.*, 2010). Die Eizelle wird durch den perivitellinen Raum von der Zona pellucida getrennt. In der Wachstumsphase wird die Eizelle von Kummuszellen ummantelt. Diese bestehen aus Follikelepithelzellen, den Granulosazellen, die die Eizelle unmittelbar umgeben und die sogenannte Corona radiata bilden (Lüllmann-Rauch, 2009). Über Zytoplasmafortsätze durch die Zona pellucida steht die Eizelle in Kontakt mit den Granulosazellen. Diese Verbindung dient der Ernährung der Eizelle und beeinflusst ihr Zytoplasma und die Kernreifung (Wert and Larsen, 1989; Tanghe *et al.*, 2002).

1.2.2 Die Entwicklung der Eizelle

Die Entwicklung der Eizellen beginnt in der Embryonalperiode. Die Vorläuferzellen der Eizellen (Oogonien) treten pränatal in eine mitotische Proliferationsphase ein, bis ein Pool von bis zu sieben Millionen angelegt ist. Einige dieser Oogonien treten in die erste Reifeteilung ein, die mit der Prophase beginnt. Dieser Schritt kennzeichnet die Differenzierung von der Oogonie zur primären Eizelle. Im Diktotänstadium, ein Ruhestadium zwischen der Prophase und Metaphase der ersten Reifeteilung (Meiose I), verharren die Eizellen. Die Eizellen sind zunächst von einschichtigen Follikelepithelzellen des Ovars umgeben und werden als Primordialfollikel bezeichnet (Drews, 2006). Ein Großteil der Primordialfollikel bildet sich bis zur Pubertät zurück. In der Pubertät durchlaufen die Primordialfollikel ohne hormonelle Stimulation stetig die Entwicklung zu Primärfollikeln. Nur ein geringer Teil der Follikel reift im Rahmen der Ovarialzyklen zu Sekundär- und Tertiärfollikeln heran. Dieses Wachstum erfolgt unter dem Einfluss der Gonadotropine FSH und LH (Kiechle, 2007). Es entwickeln sich dabei immer mehrere Follikel, von denen einer zum dominanten Follikel heranreift. Bei der Ovulation findet dann unter dem Einfluss von LH die Ruptur des führenden Follikels statt und es kommt zu dem

Freisetzen der Eizelle. Außerdem initiiert der Anstieg des LH vor der Ovulation oder die externe Gabe von HCG die Wiederaufnahme der ersten Reifeteilung und der erste Polkörper wird in den perivittelinen Raum abgeschnürt. Die daraus entstandene reife, befruchtungsfähige sekundäre Eizelle tritt dann während der Ovulation in die zweite Reifeteilung ein und arretiert in der Metaphase II. Erfolgt eine Befruchtung, nimmt die Eizelle nach dem Eindringen des Spermiums die Reifeteilung wieder auf und der zweite Polkörper wird abgeschnürt (Diedrich, 2000).

1.2.3 Der Einfluss der Gonadotropine auf die Follikelreifung

Die Ovarien unterliegen dem hormonellen Regelkreis des hypothalamisch-hypophysären Systems. Der Hypothalamus steuert über das GnRH die Sekretion der Gonadotropine FSH und LH aus dem Hypophysenvorderlappen. Das FSH stimuliert das Wachstum der Follikel und führt aus einer Gruppe heranreifender Follikel zur Ausbildung eines dominanten Follikels (Leyendecker and Wildt, 1996). Die Mehrzahl der Follikel wird atretisch. In der Wachstumsphase bildet eine, die Eizelle umgebene funktionelle Einheit aus Granulosa- und Thekazellen die Voraussetzung für die Bildung der Sexualsteroiden. Das LH stimuliert die Synthese von Androgenen in den Thekazellen. Diese diffundieren über eine Basalmembran in das Follikelinnere zu den Granulosazellen. Unter der Anwesenheit von FSH entsteht dort durch Aromatisierung Östrogen. Die Östrogene werden in den Blutkreislauf freigesetzt und stimulieren die Uterusschleimhaut (Erickson *et al.*, 1985).

Der steigende Östrogenspiegel hat eine hemmende Wirkung auf die Sekretion der Gonadotropine über einen negativen Feed-back-Mechanismus. Hat der Follikel eine Größe von 20–25 mm und der Serumspiegel des Östrogens einen Schwellenwert von 200–300 pg/ml erreicht, wird die Hypophyse zur Ausschüttung von LH angeregt. Dieser „LH-Peak“ löst den meiotischen Arrest auf und führt zur Ruptur des Follikels. Die nun befruchtungsfähige Eizelle wird in den Eileiter ausgestoßen. Hier findet die Befruchtung der Eizelle statt. Der Follikel bildet sich zum Corpus luteum um und bildet Östrogene und insbesondere Progesteron. Dies bewirkt eine Umwandlung der Uterusschleimhaut, die die Implantation einer befruchteten Eizelle ermöglicht (Kiechle, 2007).

1.3 Die *In-vitro*-Fertilisation

Die *In-vitro*-Fertilisation ist eine Methode der künstlichen Befruchtung. Bei der klassischen *In-vitro*-Fertilisation werden Eizellen gewonnen und mit aufbereitetem Sperma

zusammengeführt. Diese Methode findet Anwendung bei verschiedenen Ursachen der weiblichen Sterilität, wie die tubare und idiopathische Sterilität und bei erfolgloser intrauteriner Insemination und männlicher Subfertilität. Liegt hingegen eine höhergradige männliche Sterilität vor oder war eine Behandlung mit IVF erfolglos, kann eine Intrazytoplasmatische Spermieninjektion den unerfüllten Kinderwunsch überwinden. Dabei wird das Spermium, das nicht in der Lage ist eigenständig die Zona pellucida der Eizelle zu penetrieren, mit einer Glasnadel direkt in das Zytoplasma injiziert (Palermo *et al.*, 1992).

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche künstliche Befruchtung ist die Gewinnung von mehreren reifen Eizellen. Mit Hilfe verschiedener hormoneller Behandlungsschemata kann eine kontrollierte ovarielle Überstimulation das Heranreifen von Eizellen ermöglichen. Dies erfolgt mit der Gabe von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten in Kombination mit Gonadotropinen (Diedrich *et al.*, 1994). Nach der Auslösung der Ovulation mit HCG werden über eine vaginal durchgeführte Punktion die Eizellen gewonnen. Vor der Injektion eines Spermiums werden die Eizellen von den umgebenen Follikelepithelzellen befreit und morphologisch beurteilt. Wird das Spermium in die Eizelle eingebracht, wird dadurch die Befruchtungskaskade initiiert und es kommt zur Ausbildung der Vorkernstadien. Die Eizellen, die sich zu Embryonen entwickeln sollen, werden weiter kultiviert und nach Zellteilung im 4- oder 8-Zell-Stadium mit Hilfe eines Katheters in die Gebärmutter transferiert (Hummel and Kettel, 1997). Überzählige imprägnierte Eizellen im Vorkernstadium können kryokonserviert werden und zu einem späteren Zeitpunkt transferiert werden (Gook, 2010).

1.4 Das Embryonenschutzgesetz

Im deutschen Embryonenschutzgesetz (ESchG) vom 13.12.1990 (in Kraft seit dem 01.01.1991) werden die Rahmenbedingungen für die künstliche Befruchtung geregelt. Für das Verständnis des ESchG spielt die Befruchtungskaskade eine zentrale Rolle, da die einzelnen Entwicklungsstadien im Zusammenhang mit dem Gesetz von entscheidender Bedeutung sind. Mit dem Eindringen des Spermiums in die Eizelle bzw. der Injektion des Spermiums bei der Intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion wird die Befruchtungskaskade initiiert. Eine erfolgreiche Befruchtung zeigt sich im Auftreten eines männlichen sowie eines weiblichen haploiden Vorkerns. In Deutschland ist ein Einfrieren der Zellen nur bis zu diesem Vorkernstadium erlaubt. Durch die Verschmelzung der Vorkerne und somit der Vereinigung der beiden Chromosomensätze entsteht die Zygote, die laut ESchG den Abschluss der Befruchtungskaskade bildet. Die

erste Zellteilung der Zygote stellt den Beginn der Embryonalentwicklung dar. Zu diesem Zeitpunkt geht der Gesetzgeber davon aus, dass Leben entstanden ist und ein Individuum im Sinne des Gesetzes existiert. In §8 sind die Begriffsbestimmungen dargelegt. Ein Embryo ist demnach die bereits befruchtete, entwicklungsfähige Eizelle ab dem Zeitpunkt der Kernverschmelzung. Eine Auswahl der Eizellen darf nur vor Abschluss der Befruchtungskaskade erfolgen und ist auf embryonaler Ebene verboten. Es müssen laut §1 Abs. 1 Nr. 3 alle entstandenen Embryonen transferiert werden. Es ist allerdings untersagt innerhalb eines Zyklus mehr als drei Embryonen auf eine Frau zu übertragen. Ziel dabei ist es, das Risiko einer Mehrlingsgravidität zu reduzieren und dennoch eine ausreichende Erfolgchance der Kinderwunschbehandlung zu erhalten.

1.5 Die Mehrlingsproblematik

Das Vorkommen von Mehrlingsschwangerschaften stellt ein zentrales Problem in der Reproduktionsmedizin dar. Einerseits wird mit der Übertragung mehrerer Embryonen die Chance für das Eintreten einer Schwangerschaft erhöht. Andererseits ist mit steigender Anzahl an transferierten Embryonen ein erhöhtes Risiko einer Mehrlingsgravidität verbunden. In Deutschland müssen alle entstandenen Embryonen transferiert werden, mit einer erlaubten Höchstzahl von drei Embryonen (Borkenhagen *et al.*, 2007). Im Gegensatz zum Ausland ist die Möglichkeit der Auswahl der Embryonen bis hin zum „single embryo transfer“ SET (Gerris, 2007) durch das deutsche Embryonengesetz nicht erlaubt. Bereits im Vorkernstadium muss entschieden werden, welche Zellen aufbewahrt, eingefroren oder verworfen werden müssen. Somit steht die Reproduktionsmedizin in Deutschland vor der Aufgabe effiziente Methoden zu entwickeln, um eine frühe Auswahl an Zellen für den Embryotransfer zu treffen, die zu hohen Schwangerschaftsraten führen, ohne das Risiko einer Mehrlingsgravidität zu erhöhen (Germond *et al.*, 2004). Mehrlingsschwangerschaften sind bei künstlicher Befruchtung gegenüber dem Normalkollektiv erhöht (1,18 % Zwillingsgeburten, 0,013 % Drillingsgeburten) (Diedrich, 2000). Im Jahr 2007 trat laut dem DIR (deutsches IVF-Register) (2007) nach Behandlung mit IVF und ICSI in 21,94 % (21,26 % Zwillingsgeburten, 0,68 % Drillingsgeburten) der Fälle eine Mehrlingsschwangerschaft ein. Eine Mehrlingsgravidität gilt als Risikoschwangerschaft, da es dabei häufiger zu Fehl- und Frühgeburten, geringem Geburtsgewicht und zu einer höheren neonatalen Morbidität und Mortalität und bei der Mutter u.a. zu dem gesteigerten Auftreten von Kaiserschnitten und Präeklampsie kommt (MacKay *et al.*, 2006).

1.6 Die Polkörperdiagnostik

Die Polkörperdiagnostik dient der Untersuchung des genetischen Materials der Eizelle und ermöglicht es chromosomal veränderte Eizellen von der Befruchtung auszuschließen, da diese mit einer verminderten Implantationsrate einhergehen (Macklon *et al.*, 2002; van der Ven *et al.*, 1998). Bis zu 70 % der Fehlgeburten haben genetische Ursachen (Griffin, 1996). Bei der Polkörperdiagnostik können chromosomale Fehlverteilungen, Translokationen und maternal vererbte monogene Erkrankungen nachgewiesen werden. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf dem mit dem mütterlichen Alter zunehmenden Auftreten von Aneuploidien (z.B. Trisomie 21) (Pellestor *et al.*, 2005). Auch wiederholte Misserfolge bei *In-vitro*-Fertilisation und rezidivierende Aborte sind eine Indikation zur Durchführung einer Polkörperdiagnostik (Verlinsky and Kuliev, 2004; Kearns *et al.*, 2005). Eine Untersuchung aus dem Jahr 2005 zeigte, dass bei einer Auswahl an Patientinnen mit vorangegangenen Fehlversuchen ein Anstieg der Implantationsrate von 6,9 % auf 34,9 % durch Polkörperdiagnostik erreicht werden konnte (Verlinsky *et al.*, 2005). Das ESchG begrenzt den zeitlichen Rahmen für diese Untersuchung. Eine Diagnostik, die nach Abschluss der Befruchtung am Embryo erfolgt, ist in Deutschland nicht erlaubt. Die Befruchtung beginnt mit der Penetration des Spermiums in die Eizelle und endet mit dem Verschmelzen der Vorkerne. In diesem Zeitraum von ca. 18 Stunden, vor dem Verschmelzen der Vorkerne, kann die Diagnostik erfolgen. Der erste Polkörper entsteht in der ersten Reifeteilung (kurz vor der Ovulation, bzw. kurz nach der HCG-Injektion bei der assistierten Reproduktion) und enthält einen Chromosomensatz. Der zweite Chromosomensatz verbleibt in der Eizelle.

Nach dem Eindringen des Spermiums in die Eizelle erfolgt die zweite Reifeteilung mit der Aufspaltung jedes Chromosoms in 2 Chromatiden. Ein Chromatidensatz verbleibt in der Eizelle. Der zweite Chromatidensatz wird unter Bildung des 2. Polkörpers ausgeschleust. Die Polkörper werden unter mechanischer Eröffnung der Zona pellucida aus dem perivitellinen Raum entnommen. Der erste Polkörper ist komplett von der Eizelle abgeschnürt und kann problemlos gewonnen werden (Verlinsky *et al.*, 1990). Der zweite Polkörper ist häufig noch über eine Zellplasmabrücke mit der Eizelle verbunden und daher schwerer zu gewinnen. Die im Laufe der meiotischen Teilung entstandenen Polkörper werden für die weitere Entwicklung der Eizelle nicht gebraucht und können somit für die Untersuchung des weiblichen Genoms bei der Polkörperdiagnostik verwendet werden (Montag *et al.*, 2009). Bei der Auswahl der verschiedenen Methoden zur Gewinnung der Polkörper steht im Vordergrund die Eizelle unversehrt zu erhalten.

1.7 Mögliche Verfahren zur Beurteilung der Eizelle

Um die Eizelle möglichst genau beurteilen zu können, werden Kriterien untersucht, die einen prognostischen Wert bezüglich des Eintretens einer Schwangerschaft geben können. Die mikroskopische Beurteilung der Eizelle gilt als das Verfahren der Wahl. Andere Methoden, wie die Bestimmung der Follikel anhand der Größe (Dubey *et al.*, 1995), der Blutversorgung (Blerkom *et al.*, 1997) oder von biochemischen Markern in der Follikelflüssigkeit (Pasqualotto *et al.*, 2004) werden aufgrund des hohen Aufwandes und der geringen prognostischen Aussage nicht routinemäßig durchgeführt. Über eine vaginale Punktion werden die Eizellen in Form von Kumulus-Oozyten-Komplexen gewonnen. Zur Durchführung der ICSI wird die Eizelle von den Kumulus-Zellen befreit. Dies erfolgt mechanisch mit Hilfe einer Pipette und enzymatisch mit Hyaluronsäure. Die isolierte Eizelle kann anschließend nach morphologischen Merkmalen und dem Reifestatus beurteilt werden.

1.8 Mikroskopische Beurteilung der Eizellmorphologie

Die Beurteilung der Eizelle vor Durchführung der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion erfolgt nach zytoplasmatischen und extrazytoplasmatischen Faktoren. Die Eizelle gilt als morphologisch unauffällig, wenn sie eine runde Form, ein klares, homogenes Zytoplasma, einen schmalen perivittelinischen Raum, einen intakten ersten Polkörper sowie eine pigmentfreie Zona pellucida mit einer Dicke von etwa 20 μm aufweist (Sutter *et al.*, 1996; Xia, 1997; Ebner *et al.*, 2000). Zytoplasmatische Abnormalitäten sind Granulierungen, Vakuolen, refraktile Körper und Aggregationen des endoplasmatischen Retikulums (Serhal *et al.*, 1997; Balaban *et al.*, 1998). Vergrößerungen des perivittelinischen Raumes mit Zytoplasmatrümmern, eine dunkle Farbe (Loutradis *et al.*, 1999; Hassan-Ali *et al.*, 1998) oder abnorme Dicke (Sun *et al.*, 2005) der Zona pellucida sowie fragmentierte Polkörper (Ebner *et al.*, 2002) deuten auf extrazytoplasmatische Störungen hin.

1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Wünschenswert wäre es in Zukunft die Erfolgchancen der Kinderwunschtherapie unter den Bedingungen des deutschen EschG zu erhöhen. Von besonderem Interesse ist es dabei das Auftreten von Mehrlingsgraviditäten dadurch zu reduzieren, dass man weniger Embryonen transferiert. Ein Weg dahin ist die Optimierung der Auswahl an Eizellen auf morphologischer Ebene. In dieser Arbeit wird dazu die Morphologie eines in einem Zyklus gewonnenen Eizellpools am Tag der Durchführung der ICSI beurteilt und der Zusammenhang mit dem Ausgang der Therapie untersucht. Das Ziel dabei ist möglichst frühzeitig eine Vorauswahl an Eizellen aus einem Pool treffen zu können, die sich für die Weiterkultivierung eignen und eine hohe Schwangerschaftsrate erwarten lassen.

Bei dieser Arbeit sollen im Wesentlichen folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie hoch ist das Durchschnittsalter der an dieser Studie einbezogenen Frauen? Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Frau und dem Ausgang der Kinderwunschbehandlung?
2. Wie viele Embryonen wurden im Rahmen dieser Arbeit im Durchschnitt transferiert und wie hoch war die Mehrlingsrate? Steigt mit erhöhter Anzahl an transferierten Embryonen der Behandlungserfolg?
3. Wie viele Eizellen im Stadium der Metaphase II werden in einem Behandlungszyklus im Durchschnitt gewonnen? Lässt sich anhand der Anzahl gewonnener MII-Eizellen eine Aussage über den Ausgang der Behandlung machen?
4. Kann mit Hilfe einer morphologischen Charakterisierung der Eizellen am Tag der ICSI vor der Imprägnation der Eizelle mit einem Spermium, eine Aussage über eine mögliche Chance auf einen Behandlungserfolg getroffen werden?
5. Ist es möglich anhand einer morphologischen Beurteilung des in einem Zyklus gewonnenen Eizellpools (der bezüglich eines morphologischen Merkmals die gleiche Merkmalsausprägung aufweist) eine Aussage über den Ausgang der Behandlung zu treffen?
6. Korreliert die Eizellmorphologie eines Eizellpools bezüglich des Zytoplasmas, der Vakuolen im Zytoplasma, der Polkörper, des perivitellinen Raumes und der Zona Pellucida mit dem Behandlungserfolg?
7. Beeinflusst die Durchführung einer Polkörperdiagnostik das Behandlungsergebnis?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine klinisch-retrospektive Kohortenstudie. Die Daten wurden in den Jahren 2004 und 2005 in der Abteilung für Reproduktionsmedizin der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität Kiel erhoben. Im Rahmen der Behandlungszyklen mit Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion wurden morphologische Kriterien der menschlichen Eizelle untersucht und der Einfluss auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung ermittelt.

2.2 Datenerhebung

Die Studie bezieht sich auf 267 konsekutiven Behandlungszyklen von 189 behandelten Frauen mit einem Durchschnittsalter von 34,32 (\pm 4,76) Jahren. Es wurden in den Zyklen insgesamt 1976 Eizellen durch Follikelpunktion gewonnen. Die Morphologiekriterien wurden an 1681 Eizellen im Stadium der Metaphase II untersucht. Dies erfolgte am Tag der ICSI vor der Imprägnation der Eizelle mit einem Spermium. Nicht berücksichtigt wurde, ob es sich bei dem Behandlungszyklus um den ersten oder einen Folgezyklus der Patientinnen gehandelt hat. Behandlungen mit *In-vitro*-Fertilisation sowie der Embryotransfer nach Kryokonservierung, wurden in die Datenerhebung nicht einbezogen.

2.3 Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte durch Biologen und medizinisch-technische Assistenten/-innen des reproduktionsmedizinischen Labors nach vorher festgelegten Kriterien (gemäß den *Standard Operating Procedures*). In einem Dokumentationsbogen wurden für jeden Behandlungszyklus Angaben über die Anzahl und den Reifestatus der gewonnenen Eizellen sowie deren morphologische Merkmale deskriptiv zusammengetragen. Es wurde dabei das Zytoplasma, das Vorhandensein von Vakuolen im Zytoplasma, die Polkörper, der perivitelline Raum und die Zona pellucida beurteilt. Zur Charakterisie-

zung der Parameter wurden Kodierungen festgelegt und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Version 2000) ausgewertet. Angaben über die Anamnese, den Behandlungsablauf und den Ausgang des Zyklus wurden mit Hilfe des Datenerfassungsprogrammes Rec Date (Serono, Deutschland) ergänzt und analysiert. In sehr wenigen Fällen wurden einzelne Angaben nicht erfasst, wodurch geringe Abweichungen der Fallzahlen in den ausgewerteten Tabellen zu erklären sind.

2.4 Statistische Verfahren

Mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 13.0) wurden die erhobenen Daten ausgewertet. Für alle untersuchten morphologischen Faktoren wurden die Häufigkeitsverteilungen mit Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Um die Gleichheit der Mittelwerte zu prüfen, wurde ein T-Test durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % zugrunde gelegt.

2.5 Extrakorporale Befruchtung

2.5.1 Gewinnung der Eizellen

Hypophysensuppression und Ovarialstimulation

Bei der ovariellen Stimulation wurde nach einem individuellen Therapieschema das Heranreifen von Follikeln induziert, um reife Eizellen für die ICSI zu gewinnen. Grundlage der Behandlung war, den Zyklus zu kontrollieren und den Zeitpunkt der Ovulation planen zu können. Dies erfolgte mit der Gabe von GnRH-Agonisten, die über eine Downregulation der Hypophyse den endogenen LH-Anstieg und somit die vorzeitige Ovulation verhindern. Als GnRH-Präparate wurden subkutan appliziertes Decapeptyl oder Synarela als Nasenspray verwendet. Die Stimulation wurde in unserer Studie mit humanem Menopausengonadotropin (hMG) oder rekombinantem humanem FSH (r-hFSH) eingeleitet.

Ovulationsinduktion

Die Ovulationsinduktion erfolgte, wenn sonographisch der größte Follikel einen Durchmesser von mindestens 16 mm hatte. Mit 10.000 I.E. HCG wurde die Ovulation ausgelöst.

Follikelpunktion

Die Gewinnung der Eizellen erfolgte etwa 36 Stunden nach der Ovulationsinduktion. Über eine mit Ultraschall gesteuerte Punktion wurden die Eizellen transvaginal aspiriert. Diese lagen in Form von Kumulus-Eizell-Komplexen vor. Mit einer Pasteurpipette (230 mm Länge, Assistent, Sondheim, Deutschland) wurden sie in einer Petrischale (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 37 °C warmem Kulturmedium (IVF Universal Kulturmedium, Medicult, Dänemark) gewaschen. Die Eizellen wurden bis zur Präparation im gleichen Kulturmedium im Brutschrank (37 °C, 0,5 % CO₂, Heraeus, Deutschland) inkubiert.

2.5.2 Vorbereitung der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion

Eizellenpräparation

Die Eizellen wurden freipräpariert, um die Morphologie und den Reifezustand der Eizelle zu beurteilen und die ICSI-Methode anwenden zu können. Mit Hyaluronsäure (80IU/ml, Linaris, Deutschland) wurden zunächst die Kumuluszellen enzymatisch entfernt und anschließend die restlichen Kumulus- und Corona-radiata-Zellen mechanisch durch mehrmalige vorsichtige Aspiration mittels einer Glas-Pasteurpipette (Pipettendurchmesser 160-300 µm, Assistent, Sondheim, Deutschland) abgelöst. Dann wurden die Eizellen in das Kulturmedium (IVF Universal Kulturmedium, Medicult Dänemark) übertragen.

Ejakulatpräparation

Die Aufbereitung des frisch gewonnenen Ejakulats ist erforderlich, um möglichst motile und morphologisch regelrecht geformte Spermien für die Injektion zu erhalten. Die Separation der Spermien vom Seminalplasma wurde mit dem „Swim-up“-Verfahren durchgeführt. Nach der Ejakulatverflüssigung bei Raumtemperatur wurde 1 ml Ejakulat mit 2,5-3 ml Kulturmedium gemischt. Im nächsten Schritt erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 250 g. Das entstandene Spermienpellet wurde mit 0,5 ml Medium überschichtet und anschließend für 30-60 Minuten, bis zum Aufschwimmen der vitalen Spermien, im Brutschrank (37 °C, 0,5 % CO₂, Heraeus, Deutschland) inkubiert.

2.5.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

Vorbereitung der Mikroinjektion

Auf eine Petrischale wurden einige Tropfen HAMS-F-10-Medium (Biochrom, Deutschland) und zwei Tropfen 10%ige PVP (Polyvinylpyrrolidon)-Lösung (Medicult, Jyllinge, Dänemark) gesetzt und mit Öl (Mineralöl, Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland) überschichtet. Ein kleiner Tropfen des Spermas wurde auf das PVP gegeben, das durch seine Viskosität ein schnelles Vorwärtsbewegen der Spermien verhindert, um so ein leichteres „Einfangen“ für die ICSI zu ermöglichen. Zudem wurden die Eizellen in das Medium pipettiert.

Durchführung der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion

Die Mikroinjektion erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C. Zur Durchführung wurde ein Invertmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland), das mit zwei Mikromanipulatoren (Luigs Neumann GmbH Ratingen, Deutschland), die mit Halte- und Injektionspipetten (Gynemed, Lensahn, Deutschland) verbunden sind, verwendet. Zunächst wurde mit der Spitze der Injektionspipette ein kurzer Schlag auf das Mittelstück des Spermiums ausgeführt, wodurch es zu einer Immobilisation des Spermiums kommt. Dann wurde das Spermium mit der Geißel zuerst in die Injektionspipette aufgenommen und die Eizelle an einer Haltepipette so fixiert, dass der Polkörper sich in der Position von 12 oder 6 Uhr befand. Mit der Fixierung der Eizelle in dieser Stellung wurde eine Schädigung des Spindelapparates verhindert, da sich dieser in direkter Nähe des Polkörpers befindet. Im nächsten Schritt wurde in der Position von 3 Uhr das Spermium in das Zytoplasma der Eizelle eingestochen. Die Injektionspipette wurde dann zurückgezogen und nicht erneut injiziert, um möglichst wenig Volumen an Medium und PVP in das Zytoplasma einzubringen. Nach Beendigung der Injektion wurde jede Eizelle im Kulturmedium gespült und einzeln kultiviert.

2.6 Polkörperdiagnostik

Durch die zeitlich begrenzte Vorgabe durch das deutsche Embryonenschutzgesetz (ESchG1991) muss die Diagnostik nach der Durchführung der ICSI vor Abschluss der Entstehung des Embryonalstadiums durch das Verschmelzen des männlichen und weiblichen Vorkerns erfolgen. Dieser Zeitrahmen beträgt etwa 18 Stunden. Kriterien für die Durchführung einer Polkörperdiagnostik zum Nachweis von chromosomalen Fehlver-

teilungen in der Eizelle waren insbesondere rezidivierende Aborte unklarer Genese, erfolglose Versuche einer assistierten Befruchtung bei qualitativ geeigneten Eizellen, sowie bekannte Chromosomenstörungen der Patientinnen. Allerdings bestand für jede Patientin die Möglichkeit eine Polkörperanalyse durchführen zu lassen, ungeachtet des Alters und der Anzahl der Vorversuche. Die Diagnostik erfolgte in der Regel, wenn acht Eizellen gewonnen werden konnten, da bei einer geringeren Anzahl an Eizellen die Gefahr bestand, dass zu wenig euploide Embryonen für den Transfer zur Verfügung standen. Die für die Untersuchung notwendige Entnahme der Polkörper aus dem perivitellinen Raum wurde über eine Öffnung der Zona pellucida mittels Laser durchgeführt (Montag *et al.*, 1998). Nach Beurteilung der Polkörper und der Analyse mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden die Patientinnen über die Resultate informiert. Für den Embryotransfer wurden ausschließlich euploide befruchtete Eizellen verwendet, die nach morphologischer Qualität ausgewählt wurden. Anschließend konnte je nach Wunsch der Patientin der Embryotransfer geplant werden. Um das Mehrlingsrisiko nicht zu erhöhen, wurden meistens zwei Embryonen für den geplanten Transfer weiterkultiviert. Bei vorangegangenen Fehlversuchen und hohem Alter der Patientinnen wurden auch drei Embryonen für den Transfer ausgewählt.

2.7 Überprüfung der Entwicklung vom Vorkernstadium zum Embryo

In einem Zeitraum von etwa 16 bis 18 Stunden nach der Spermieninjektion wurden die imprägnierten Eizellen auf das Vorhandensein von Vorkernen untersucht. Es wurde überprüft, ob es zu einer regelrechten Entwicklung mit der Bildung von zwei Vorkernen gekommen ist und entschieden, welche Eizellen für den Transfer, die Kryokonservierung oder zum Verwerfen vorgesehen sind. Anschließend wurden die Vorkerne nach der Lage und Größe betrachtet und deren Nukleoli nach der Anordnung, Anzahl und Größe (Tesarik and Greco, 1999) in die Gruppen Pattern 0 bis 5 eingeteilt. Zusätzlich erfolgte die morphologische Beurteilung der Polkörper und des Zytoplasmas an dem ersten Tag nach der Befruchtung. Aus den weiterkultivierten Vorkernstadien entwickelten sich Embryonen, die weiterhin klassifiziert wurden. Die Beurteilung erfolgte modifiziert (Hill *et al.*, 1989; Steer *et al.*, 1992), indem das Entwicklungspotential (reguläre Anzahl an Blastomeren) und die Morphologie (Prozentsatz an Fragmenten) dokumentiert wurden. Für eine reguläre Entwicklung an Tag 2 nach ICSI sprechen das Vorhandensein von vier möglichst gleichgeformten Blastomeren möglichst ohne Nachweis von Fragmenten.

2.8 Embryotransfer

Der Embryotransfer erfolgte am Tag 2 oder 3 nach der Punktion in Steinschnittlage. Die Embryonen wurden mit möglichst wenig Kulturmedium in den Embryotransferkatheter (Gynetics, Achel, Belgien) aufgezogen und durch den Zervikalkanal in das Cavum uteri plaziert. Nach der Einspülung der Embryonen wurde der Katheter nach kurzer Verweildauer vorsichtig entfernt und anschließend unter mikroskopischer Sicht geprüft, ob keine Embryonen im Katheter verblieben sind.

2.9 Lutealphasenunterstützung

Unter der Anwendung von GnRH-Analoga entsteht ein Lutealphasendefizit, des medikamentös ausgeglichen werden muss. Als hormonelle Unterstützung wurde ab dem Tag des Transfers Progesteron intravaginal appliziert. Zur zusätzlichen Stimulation der Progesteronsynthese aus dem Corpus luteum wurde bei niedrigen Estradiolwerten HCG verabreicht. Diese Progesteron-Therapie wurde zumindest bis zum Schwangerschaftstest, 14 Tage nach dem Embryotransfer, angewendet.

2.10 Zyklusausgang

Zwei Wochen nach dem Embryotransfer wurde der β -HCG-Spiegel bestimmt, welcher mit einem Wert von etwa $> 30\text{IE/Liter}$ als positiv zu bewerten ist. War der Test positiv, und lag somit eine biochemische Schwangerschaft vor, wurde die Progesterongabe fortgesetzt und gegebenenfalls mit Östrogen unterstützt. Der weitere Schwangerschaftsverlauf wurde mit dem Feststellen einer Herzaktion des Embryos in der 5.–6. Schwangerschaftswoche kontrolliert. Eine klinische Schwangerschaft wurde definiert mit dem Nachweis von mindestens einer Fruchthöhle bei positiven β -HCG-Wert und einer positiven Herzaktion. Die folgende Betreuung der Schwangerschaft erfolgte durch den niedergelassenen Gynäkologen.

2.11 Morphologische Charakterisierung der Eizellen

Nach der Eizellenpräparation wurden die einzelnen Eizellen lichtmikroskopisch nach dem Reifegrad und der Morphologie charakterisiert und die Daten auf dem Dokumentationsbogen erfasst. Dabei wurden folgende Kriterien ermittelt:

1. Anzahl der gewonnenen Eizellen
2. Beurteilung des Reifestatus der Eizellen:
 - Metaphase II (MII), ein Polkörper sichtbar
 - Metaphase I (MI), kein Polkörper sichtbar
 - Germinal Vesikel (GV), Zellkern sichtbar, Prophase I der Meiose I
 - Eizelle nicht intakt
 - Eizelle degeneriert
3. Beurteilung der Morphologiekriterien bei MII-Eizellen:
 - Polkörper: Vorhandensein und Beschaffenheit des ersten Polkörpers (rund vs. fragmentiert)
 - Zytoplasma: Beschaffenheit und Vorhandensein von Vakuolen
 - perivitelliner Raum: Vorhandensein und Ausprägung von Granulationen
 - Zona pellucida: Farbe, Dicke, Oberflächenstruktur

Für die Bezeichnung einer Eizelle als morphologisch unauffällig galten folgende Kriterien:

1. Ein Polkörper ist intakt und vorhanden, die Eizelle befindet sich im Reifestadium der Metaphase II.
2. Das Zytoplasma ist homogen.
3. Der Polkörper befindet sich im perivitellinen Raum.
4. Im Zytoplasma sind keine Vakuolen.
5. Im perivitellinen Raum sind keine oder wenig Granulationen.
6. Die Farbe der Zona pellucida ist hell.
7. Die Dicke der Zona pellucida beträgt ca. 20 μm .
8. Die Oberfläche der Zona pellucida ist regelmäßig.

Auf dem Dokumentationsbogen wurden Abweichungen bezüglich der als unauffällig bezeichneten Eizellen aufgezeichnet. Bei als vollständig morphologisch unauffällig eingestuftem Eizellen wurde nur die Anzahl der in Metaphase II befindlichen Eizellen notiert.

2.11.1 Beurteilung des *Reifestatus* der Eizelle

Die Anzahl der Polkörper weist auf das Stadium der Reife einer Eizelle hin. Zur Durchführung einer ICSI wurden ausschließlich Eizellen im Stadium der Metaphase II verwendet, die durch das Auftreten von einem Polkörper gekennzeichnet ist. In der Metaphase II ist die Kernreifung vollendet und es liegt ein haploider Chromosomensatz vor. Eizellen, die keinen Polkörper aufweisen, befinden sich in der Metaphase I. „Germinal Vesikel“ sind unreife Eizellen, die sich in der Prophase I der ersten Reifeteilung befinden. In diesen Reifestadien besitzen die Eizellen einen diploiden Chromosomensatz und sind ungeeignet für die Injektion. Bei der Follikelpunktion wurden zudem nicht intakte und degenerierte Eizellen gewonnen, die im Dokumentationsbogen vermerkt, aber nicht weiterverwendet wurden.

2.11.2 Beurteilung der *Morphologiekriterien* bei MII-Eizellen

Klassifikation des Zytoplasmas

Für die Kategorisierung des Zytoplasmas wurde folgende Einteilung gewählt:

1. unreif: Zytoplasma homogen, keine Einschlusskörper, Polkörper nicht vom Zytoplasma gelöst oder nicht vorhanden
2. reif: Zytoplasma homogen, Einschlusskörper möglicherweise vorhanden, ein Polkörper im perivittelinem Raum, Metaphase II
3. überreif: Zytoplasma inhomogen, unregelmäßig und/oder grob granuliert, bräunlich, ein Polkörper im perivittelinem Raum, Metaphase II

Zur Einteilung des Reifegrades der Eizelle wurden die Beschaffenheit des Zytoplasmas, das Vorhandensein von Einschlusskörpern sowie das Vorhandensein und die Lokalisation des Polkörpers beurteilt. Eine Eizelle mit guter Qualität hatte ein klares bis leicht granuliertes Zytoplasma. Im Verlauf der Reifung der Eizelle verändert sich die Struktur des Zytoplasmas. Es wird zunehmend inhomogen und granuliert. Als abnormal gelten starke Granulationen (Serhal *et al.*, 1997) und hochgradige zentrale Granulierungen (Kahraman *et al.*, 2000). Zytoplasmatische Einschlüsse, wie z. B. refraktile Körper stellen ebenfalls eine Eizelldysmorphie dar (Serhal *et al.*, 1997). Die Ausstoßung des ersten Polkörpers in den perivittelinem Raum markiert das Ende der ersten Meiose und gilt somit als Anzeichen für den Reifegrad.

Vorhandensein von Vakuolen im Zytoplasma

Eine Vakuole ist ein mit Flüssigkeit gefüllter membranumschlossener Raum. Unterschieden wurden Eizellen mit und ohne Vakuolenbildung, die Größe und Anzahl wurden nicht dokumentiert. Das Vorhandensein von Vakuolen ist ein morphologisch auffälliger Parameter des Zytoplasmas (Blerkom, 1990; Ebner *et al.*, 2005).

Anzahl der Polkörper

Die Eizellen wurden bezüglich des Vorhandenseins und der Beschaffenheit der Polkörper in drei Klassen eingeteilt:

1. kein Polkörper vorhanden
2. ein Polkörper vorhanden
3. fragmentierter Polkörper vorhanden

Wies die Eizelle keinen Polkörper auf, wurde sie in das Stadium der Metaphase I eingestuft und es erfolgte keine genauere Beurteilung der Morphologie. Bei der Charakterisierung des ersten Polkörpers der sich in MII befindlichen Eizellen wurde ein rundlich bis oval geformter Polkörper als morphologisch unauffällig bezeichnet. Zudem wurde das Vorhandensein von fragmentierten Polkörpern dokumentiert. Eine abnorme morphologische Erscheinungsform des Polkörpers kennzeichnet einen Alterungsprozess der Eizelle (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 1995) und beeinflusst die Schwangerschaftsrate negativ (Ebner *et al.*, 1999).

Granulationen im perivittelinem Raum

Der Spalt zwischen der Zona pellucida und der Eizellmembran (Oolemma) wird als perivittelinem Raum oder extrazelluläre Matrix bezeichnet (Dandekar *et al.*, 1992; Hassan-Ali *et al.*, 1998). Der Grad der Granulationen wurde unterschieden in keine, wenig, mäßig oder starke Granulationen. Bei den Granula handelt es sich um Ablagerungen oder Zytoplasmatrümmer. Eine Eizelle ohne oder mit wenig Granulation galt als normal.

Zona pellucida

Die Zona pellucida ist eine glykoproteinreiche Schicht zwischen der Zellmembran der Eizelle und den Follikelepithelzellen. Sie wurde nach der Dicke, der Oberfläche sowie

der Farbe beurteilt. Als normwertig galt eine Dicke von etwa 20 μm , eine regelmäßige Oberfläche und eine helle Farbe. War die Zona pellucida im Lichtmikroskop auffällig größer oder kleiner als 20 μm oder war die Oberfläche unregelmäßig oder die Farbe dunkel, wurde dies als auffällig notiert.

3 Ergebnisse

3.1 Behandlungsergebnisse

Die Analyse der Daten bezieht sich auf 267 Behandlungszyklen mit Intrazytoplasmatischer Spermatozoeninjektion, die an 189 Frauen durchgeführt wurden. Insgesamt wurden 1976 Eizellen gewonnen und am Tag der ICSI morphologisch charakterisiert. Davon wurden 512 Embryonen transferiert. In 70 Fällen kam es zum Eintritt einer klinischen Schwangerschaft. Es wurden bei 49 Geburten 64 Kinder geboren. Einen Überblick der Behandlungsergebnisse zeigt die Tabelle 1.

3.2 Einführung in die statistische Analyse

Die Intention der vorliegenden Analyse besteht darin mit Hilfe einer Charakterisierung des in einem Behandlungszyklus gewonnenen Eizellpools eine Aussage über die Erfolgchancen der Kinderwunschtherapie treffen zu können. Die Charakterisierung der morphologischen Merkmale soll eine optimale Auswahl an Eizellen ermöglichen und somit die Schwangerschaftschancen erhöhen. In der statistischen Auswertung wurden zunächst das Alter, die Zahl transferierter Embryonen und die Zahl der gewonnenen MII-Eizellen als mögliche prädiktive Einflussfaktoren untersucht. Zur Beurteilung der morphologischen Charakteristika wurden das Zytoplasma, die Vakuolen im Zytoplasma, die Polkörper, der perivitelline Raum und die Zona pellucida analysiert und der Zusammenhang mit den Erfolgchancen der Therapie ermittelt. Eine gesonderte Betrachtung galt den Behandlungszyklen mit durchgeführter Polkörperdiagnostik. Der Einfluss der Polkörperdiagnostik auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung wurde dabei geprüft. Als Kennzeichen für den Ausgang der Behandlung galt die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt. Bei der Auswertung der Geburt zählte nur das Eintreten des Ereignisses ohne Berücksichtigung der Anzahl der geborenen Kinder pro Geburt (Mehrlinge).

Der in einem Behandlungszyklus gewonnene Eizellpool wurde bezüglich der möglichen Einflussfaktoren (Alter, Anzahl transferierter Embryonen, Anzahl der MII-Eizellen) und der morphologischen Merkmale (Zytoplasma, Vakuolen, Polkörper, perivitelliner Raum, Zona pellucida) nach der Homogenität ausgewertet. Eine Homogenität lag dann vor,

wenn die Eizellen eines Zyklus die gleiche Merkmalsausprägung aufwiesen. Für jedes morphologische Merkmal galt nur eine Merkmalsausprägung als positiv. Die anderen als negativ definierten Merkmalsausprägungen wurden nicht unterschieden, da dies zu große Kombinationsmöglichkeiten beinhaltet hätte. Die Eizellen wurden beispielsweise bezüglich des morphologischen Merkmals „Polkörper“ in drei Klassen eingeteilt. Als morphologisch unauffällig galt eine Eizelle im Stadium der MII mit einem intakten ersten Polkörper. Als abnorm galten Eizellen im Stadium der MI ohne Polkörper und Eizellen mit einem fragmentierten Polkörper. Hatte in einem Eizellpool jede Eizelle einen intakten ersten Polkörper wurde dieser Pool als homogen positiv bezeichnet. Lagen in einem Eizellpool ausschließlich Eizellen mit einer abnormen Erscheinungsform vor (kein Polkörper/ fragmentierter Polkörper) war dies ein homogen negativer Pool. Um den Einfluss der einzelnen morphologischen Merkmale auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung zu prüfen, wurden zunächst die rein homogen positiv bewerteten Eizellpools mit den rein homogen negativ bezeichneten Pools verglichen. Zur weiteren Analyse wurden dann zu den homogen positiven Pools die Pools mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung hinzugefügt. Es wurden dann beispielsweise zu den rein homogen positiven Eizellpools bezüglich der Polkörper die Eizellpools ergänzt, in denen mindestens 70 % der Eizellen einen intakten Polkörper aufwiesen. Diese vergrößerten Pools wurden dann mit den rein homogen negativen Pools verglichen und nach den morphologischen Merkmalen ausgewertet, um den Einfluss der Extremwertanalyse unter Betrachtung der rein homogenen Pools einzuschätzen. Ein Schema zur Erläuterung ist in Abbildung 1 dargestellt.

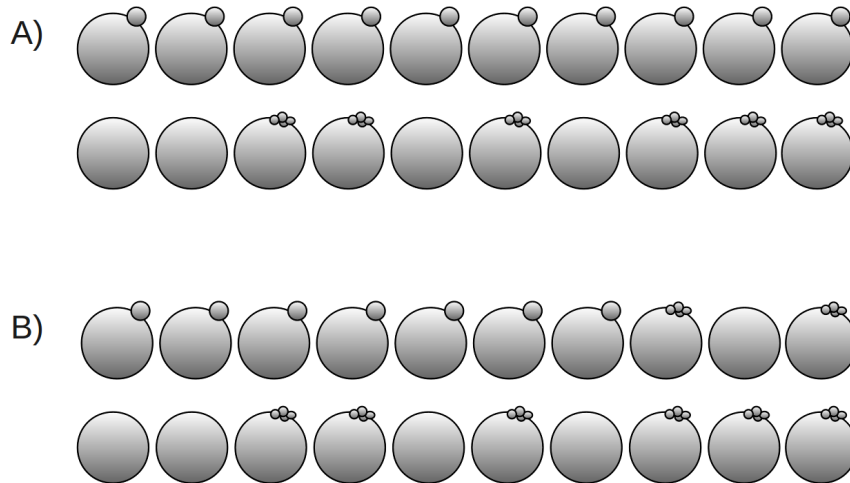


Abbildung 1 – Schema der Eizellpools.

A) Darstellung eines homogenen Eizellpools bezüglich des morphologischen Merkmals „Polkörper“. In der ersten Reihe ist ein positiv homogener Pool zu sehen, in dem alle in einem Zyklus gewonnenen Eizellen einen intakten Polkörper aufweisen. In der zweiten Reihe ist ein negativ homogener Pool mit Eizellen mit einer abnormen Erscheinungsform bezüglich der Polkörper abgebildet (kein Polkörper/fragmentierter Polkörper).

B) Darstellung eines Eizellpools, in dem 70 % der Eizellen einen intakten Polkörper aufweisen im Vergleich zu einem negativ homogenen Eizellpool.

Tabelle 1 – Allgemeine Parameter

Patientinnen			
Anzahl gesamt	189	Durchschnittsalter	34,32 ± 4,76 a
gestartete Behandlungszyklen			
Anzahl gesamt	267	Anzahl gewonnener Oozyten	1976
		Anzahl MII	1681 (85 %)
Transfer			
Anzahl gesamt	266	Anzahl transferierter Embryonen	512
		Embryonen pro Transfer Durchschnitt	1,92
		Anzahl sonographisch sichtbarer intrauteriner Fruchthöhlen	88
		Implantationsrate*	17,19 %
Schwangerschaften			
Anzahl gesamt	70	Schwangerschaften/Embryotransfers	26,32 %
		Schwangerschaften/gestarteter Zyklus	26,22 %
		Schwangerschaften/Anzahl transf. Embr.	13,67 %
Aborte			
Anzahl gesamt	21	Aborte/Embryotransfers	7,89 %
Geburten			
Anzahl gesamt	49	Geburtenrate**	24,06 %
Geborene Kinder			
Anzahl gesamt	64	Einlingsgeburten	35
		Zwillingsgeburten	13
		Drillingsgeburten	1
		Mehrlingsrate***	28,57 %

Die vorliegende Tabelle zeigt einen Überblick der Behandlungsergebnisse der Jahre 2004 und 2005 aus der Abteilung für Reproduktionsmedizin der Kieler Universitätsfrauenklinik.

* Implantationsrate: Anzahl sonographisch sichtbarer intrauteriner Fruchthöhlen/Anzahl transferierter Embryonen

** Geburtenrate: Anzahl der geborenen Kinder/Anzahl durchgeführter Embryotransfers

*** Mehrlingsrate: Anzahl der Mehrlinge/Anzahl der Geburten gesamt

3.3 Einfluss allgemeiner Parameter auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung

3.3.1 Alter der Frau

In 266 betrachteten Zyklen kam es in 70 Fällen zu einer biochemischen Schwangerschaft. Das Durchschnittsalter dieser Patientinnen betrug 32,63 Jahre und lag somit fast 3 Jahre unter dem Durchschnittsalter von 35,47 Jahren der Frauen, bei denen es nicht zu dem Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft gekommen ist. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Auswertung der Daten bezüglich der klinischen Schwangerschaft. Zu einer klinischen Schwangerschaft ist es in 70 von 267 Zyklen gekommen. Auch hierbei zeigte sich, dass Patientinnen mit erzielter klinischer Schwangerschaft fast 3 Jahre jünger waren (Durchschnittsalter: 32,63 Jahre), verglichen mit einem Durchschnittsalter von 35,47 Jahren bei den Patientinnen, die nicht schwanger wurden. Im Rahmen der Studie wurden 49 Geburten in 267 Behandlungszyklen erfasst. Zur Geburt kam es bei Frauen im Altersdurchschnitt von 31,98 Jahren. In 218 Fällen kam es nicht zu einer Geburt. Hierbei waren die Patientinnen durchschnittlich 3 Jahre älter (Durchschnittsalter: 35,34 Jahre). Wie aus Tabelle 2 und Abbildung 2 hervorgeht, zeigte sich, dass das Alter der Frau einen deutlich signifikanten Effekt auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft ($p < 0,001$), klinischen Schwangerschaft ($p < 0,001$) und Geburt ($p < 0,001$) hat.

Tabelle 2 – Einfluss des *Alters der Frau* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Anzahl Zyklen	70	196	70	197	49	218
Durchschnittsalter [Jahre]	32,63	35,47	32,63	35,47	31,98	35,34
Signifikanz	< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt war abhängig von dem Alter der Frau, mit einem statistisch signifikanten Effekt in allen drei Zielvariablen.

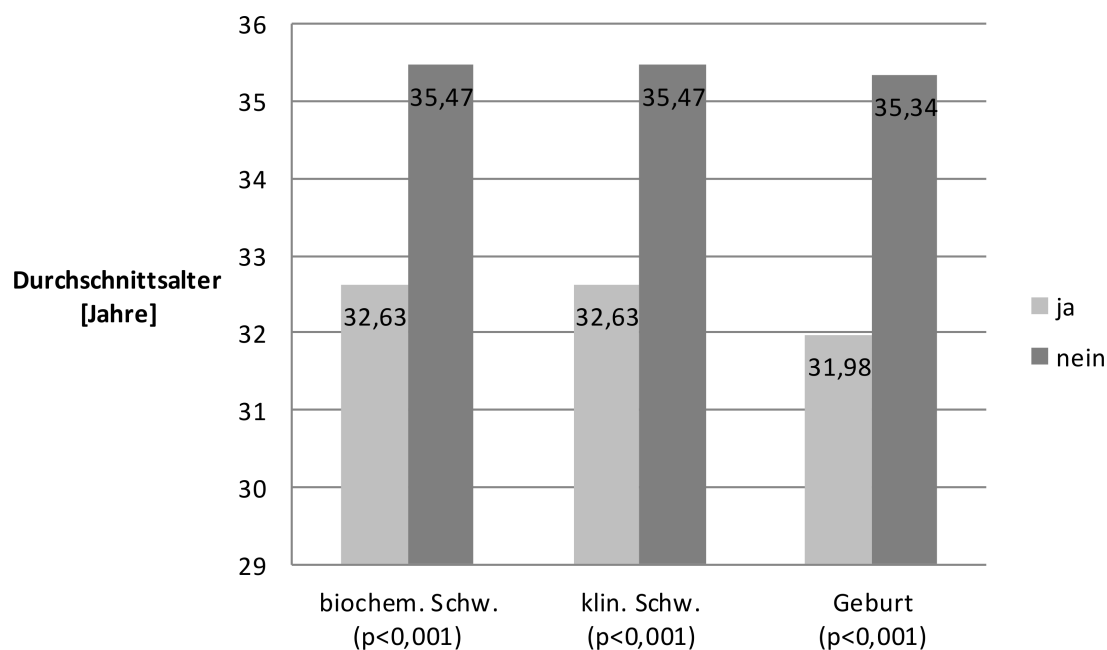


Abbildung 2 – Einfluss des *Alters der Frau* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

3.3.2 Anzahl der transferierten Embryonen

Die Anzahl der transferierten Embryonen wurde unter den Bedingungen des ESchG so gewählt, dass die Chance für das Eintreten einer Schwangerschaft möglichst hoch war und das Risiko einer Mehrlingsschwangerschaft gering. In den meisten Fällen wurden nur zwei Embryonen transferiert. Stand nicht mehr als ein Vorkernstadium zur Verfügung wurde nur ein Embryo transferiert. Wenn vermutet wurde, dass die Schwangerschaftschancen für die Frau gering sind (hohes Alter der Frau, mehrere erfolglose Vorversuche, schlechte Eizellenqualität), wurden drei Embryonen transferiert. Die Anzahl an transferierten Embryonen in einem Zyklus hatte, wie in Tabelle 3 und Abbildung 3 angegeben, einen statistisch signifikanten Effekt auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung (biochemische Schwangerschaft: $p < 0,001$; klinische Schwangerschaft: $p < 0,001$; Geburt: $p = 0,003$). Unter Betrachtung der aufgetretenen biochemischen Schwangerschaften in 70 von 265 Zyklen zeigt sich ein Unterschied von 2,16 zu 1,85 transferierten Embryonen, verglichen mit Zyklen ohne Erfolg. Das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft ging ebenfalls mit einer erhöhten Anzahl an transferierten Embryonen einher. In 70 eingetretenen klinischen Schwangerschaften wurden im Durchschnitt 2,16 Embryonen transferiert. Bei den 196 Fällen, in denen es nicht zu einer klinischen Schwangerschaft kam, wurden 1,84 Embryonen transferiert. Ähnlich verhielt es sich bei der Analyse der Geburten. Auch in den Zyklen in denen eine Geburt stattfand, wurden mehr Embryonen transferiert. Für die 49 Geburten wurden im Durchschnitt 2,18 Embryonen transferiert, verglichen mit 1,87 Embryonen in 217 Fällen, in denen keine Geburt erfolgt ist.

Tabelle 3 – Einfluss der Anzahl transferierter Embryonen auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Anzahl Zyklen	70	195	70	196	49	217
Anzahl transf. Embryonen	2,16	1,85	2,16	1,84	2,18	1,87
Signifikanz	< 0,001		< 0,001		0,003	

Aus der Tabelle geht hervor, dass mit höherer Anzahl an transferierten Embryonen die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt statistisch signifikant zunahm.

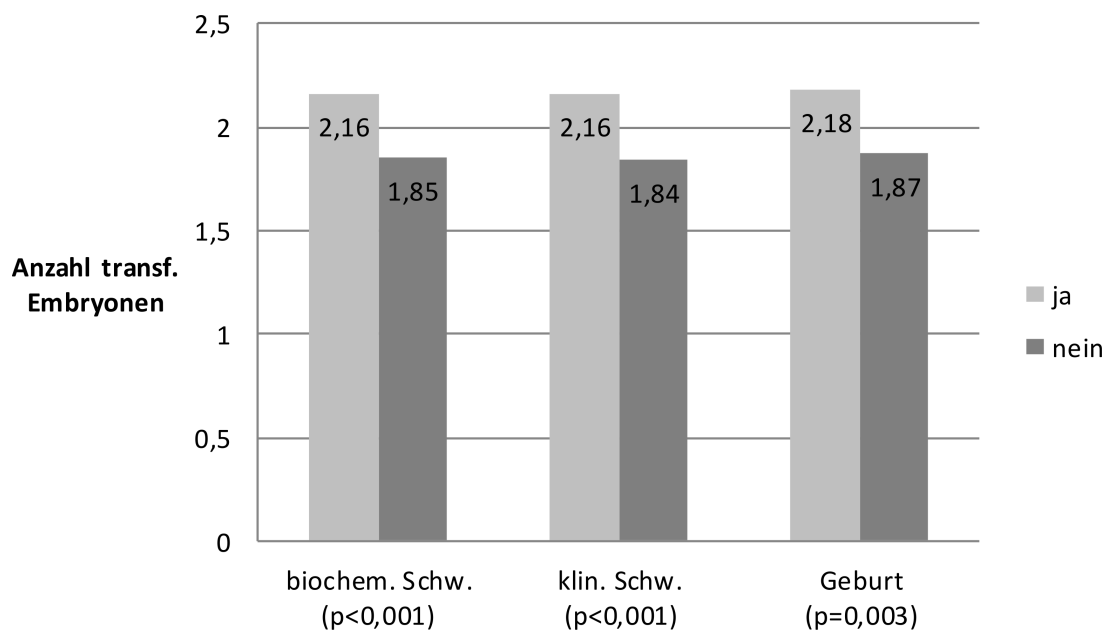


Abbildung 3 – Einfluss der Anzahl transferierter Embryonen auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

3.3.3 Anzahl der Metaphase-II-Eizellen

In 266 betrachteten Zyklen kam es in 70 Zyklen zu einer biochemischen Schwangerschaft und in 196 Zyklen ist keine biochemische Schwangerschaft eingetreten. Die Anzahl der durchschnittlich gewonnenen MII-Eizellen lag sowohl bei positivem als auch bei negativem Ausgang der Behandlung bei 8,7 MII-Eizellen. Ebenso verhielt es sich bei der klinischen Schwangerschaft. In 70 Zyklen wurde eine klinische Schwangerschaft festgestellt und in 197 Zyklen ist es nicht zu dem Eintreten einer klinischen Schwangerschaft gekommen mit einer gewonnenen Anzahl von 8,7 MII-Eizellen. Auch bei der Geburt unterschied sich die Anzahl der gewonnenen MII-Eizellen kaum. In 267 Zyklen kam es in 49 Fällen zu einer Geburt. Hier wurden im Durchschnitt 8,6 MII-Eizellen gewonnen. In den 218 Fällen ohne Geburten wurden 8,7 MII-Eizellen gewonnen. Die Anzahl der gewonnenen MII-Eizellen hatte, wie aus Tabelle 4 und Abbildung 4 ersichtlich wird, keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft ($p = 0,977$), klinischen Schwangerschaft ($p = 0,956$) oder Geburt ($p = 0,549$). Die durchschnittliche Anzahl der gewonnenen Eizellen unterschied sich nur geringfügig bei allen ausgewerteten Zielvariablen und betrug 8,6-8,7 Eizellen pro Zyklus.

Tabelle 4 – Einfluss der Anzahl von *Metaphase-II-Eizellen* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Anzahl Zyklen	70	196	70	197	49	218
MII-Eizellen	8,694	8,700	8,694	8,682	8,560	8,713
Signifikanz	0,977		0,956		0,549	

Die Anzahl der gewonnenen MII-Eizellen in den einzelnen Behandlungszyklen unterschied sich nur geringfügig und hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

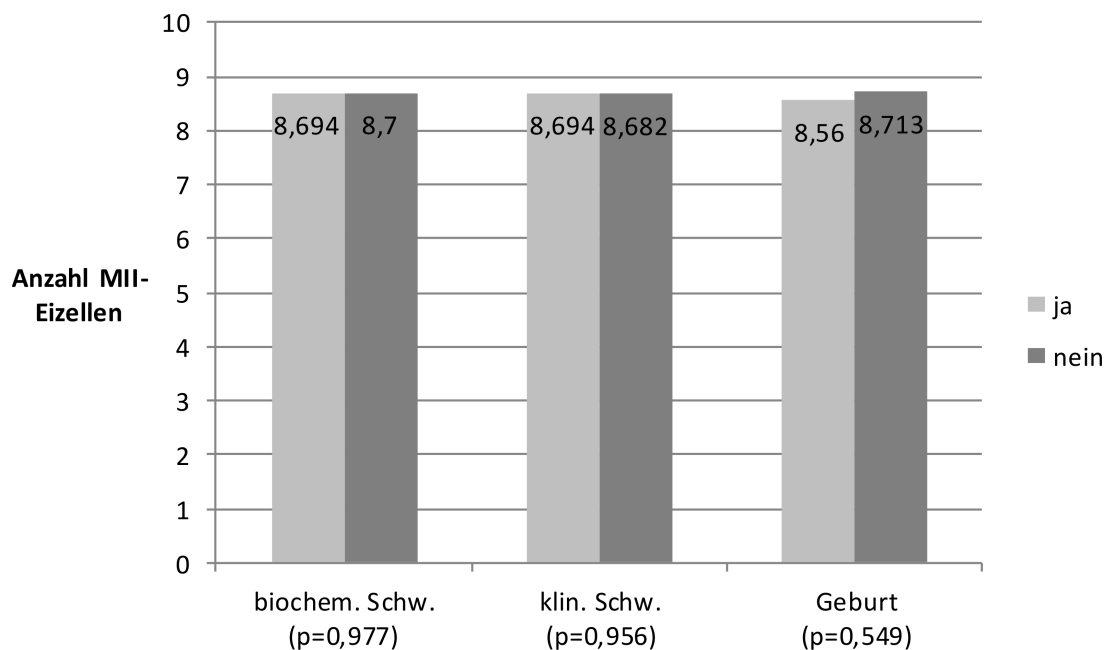


Abbildung 4 – Einfluss der Anzahl von *Metaphase-II-Eizellen* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

3.4 Einfluss der Eizellmorphologie auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung

In dem Zeitraum dieser Studie wurden in 267 Behandlungszyklen insgesamt 1976 Eizellen gewonnen. Nach der Punktion der Eizellen wurden diese von den Kumuluszellen befreit und der Reifestatus beurteilt. 1681 Eizellen befanden sich in der zweiten Reifeteilung der Meiose (MII). Diese Eizellen im Stadium der MII wurden nach morphologischen Kriterien charakterisiert und dokumentiert. Dies erfolgte nach dem aktuellen Stand der Literatur, anhand definierter Qualitätskriterien. Die Dokumentationsbögen dienten als Grundlage für die statistische Auswertung. Der Einfluss der morphologischen Merkmale (Zytoplasma, Vakuolen, Polkörper, perivittelinärer Raum, Zona pellucida) auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung wurde dabei analysiert. Die morphologischen Merkmale haben einzeln betrachtet jeweils unterschiedlich starke Zusammenhänge mit der Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt, eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 5. Daher wurde eine weitere statistische Analyse durchgeführt, um zu prüfen, ob eine bestimmte Kombination der einzelnen morphologischen Merkmale als Summe betrachtet eine stärkere Signifikanz aufweist. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten jedoch, dass ein Gesamtvergleich der Parameter keine stärkeren Signifikanzen verspricht.

3.4.1 Zytoplasma

Zur Analyse des Zytoplasmas wurde eine Einteilung vorgenommen, die den Reifegrad des Zytoplasmas widerspiegelt. Dazu wurden neben der Beschaffenheit des Zytoplasmas auch das Vorhandensein von Einschlusskörpern sowie die Lage und das Vorhandensein des Polkörpers mit berücksichtigt. Eine Eizelle galt als unreif, wenn das Zytoplasma homogen war, keine Einschlusskörper zu sehen waren und der Polkörper nicht vom Zytoplasma gelöst oder nicht vorhanden war. Die Kriterien, die eine reife Eizelle definierten, waren ein homogenes Zytoplasma mit oder ohne Einschlusskörper und das Vorhandensein eines Polkörpers im perivittelinären Raum. Eine überreife Eizelle wies ein inhomogenes, granuliertes, bräunliches Zytoplasma auf. Die Merkmale einer reifen Eizelle galten als positiv.

In der Berechnung des Einflusses des Zytoplasmas auf den Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft lagen in 195 Zyklen Eizellpools mit reifen Eizellen vor. Diese als morphologisch unauffällig charakterisierten Eizellen führten in 25 % der Fälle zu einer biochemischen Schwangerschaft. In 43 Zyklen waren Pools mit unreifen und/oder überrei-

Tabelle 5 – Ergebnisübersicht zu dem Einfluss der morphologischen Merkmale auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung

	biochemische Schwangerschaft	klinische Schwangerschaft	Geburt
Zytoplasma	–	–	–
Vakuolen	∅	∅	∅
Polkörper	+	+	(+)
perivitelliner Raum	(+)	(+)	–
Zona pellucida Farbe	(+)	(+)	–
Zona pellucida Dicke	–	–	(–)
Zona pellucida Oberfläche	∅	∅	∅

+ : Erfolgchance höher bei homogen positiven als bei negativen Pools, signifikant;
 (+) : Erfolgchance höher bei homogen positiven als bei negativen Pools, nicht signifikant;
 (–) : Erfolgchance niedriger bei homogen positiven als bei negativen Pools, signifikant;
 – : Erfolgchance niedriger bei homogen positiven als bei negativen Pools, nicht signifikant;
 ∅ : Fallzahl ≤ 2 bezüglich der homogen negativen Pools, Ergebnis nicht aussagekräftig

fen Eizellen vorhanden, bei denen es in 28 % zu einer biochemischen Schwangerschaft kam. Bei den Pools mit ausschließlich reifen Eizellen trat in 25 % von 196 Zyklen eine klinische Schwangerschaft auf. In den 43 Zyklen mit negativ homogenen Eizellpools kam es bei 28 % zu einer klinischen Schwangerschaft. Eine Geburt trat in 16 % der 196 Zyklen mit einer positiven Charakterisierung des Eizellpools ein. In 43 Zyklen wiesen die Eizellen negativ bewertete Merkmale auf. In diesen homogen negativen Pools kam es in 21 % zu einer Geburt. Die Zielvariablen der biochemischen Schwangerschaft und klinischen Schwangerschaft wiesen keine deutlichen Abweichungen in dem Vergleich der homogen positiven und negativen Pools auf. Es zeigte sich statistisch kein signifikanter Effekt (biochemische Schwangerschaft: $p = 0,716$; klinische Schwangerschaft: $p = 0,703$). Bei der Geburt zeigte sich gleichermaßen kein signifikanter Effekt ($p = 0,502$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abbildung 5 dargestellt.

Tabelle 6 – Einfluss des *Zytoplasmas* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Pool homogen						
Anzahl Zyklen	195	43	196	43	196	43
Erfolgsquote [%]	25	28	25	28	16	21
Signifikanz	0,716		0,703		0,502	

Die Morphologie des Zytoplasmas hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

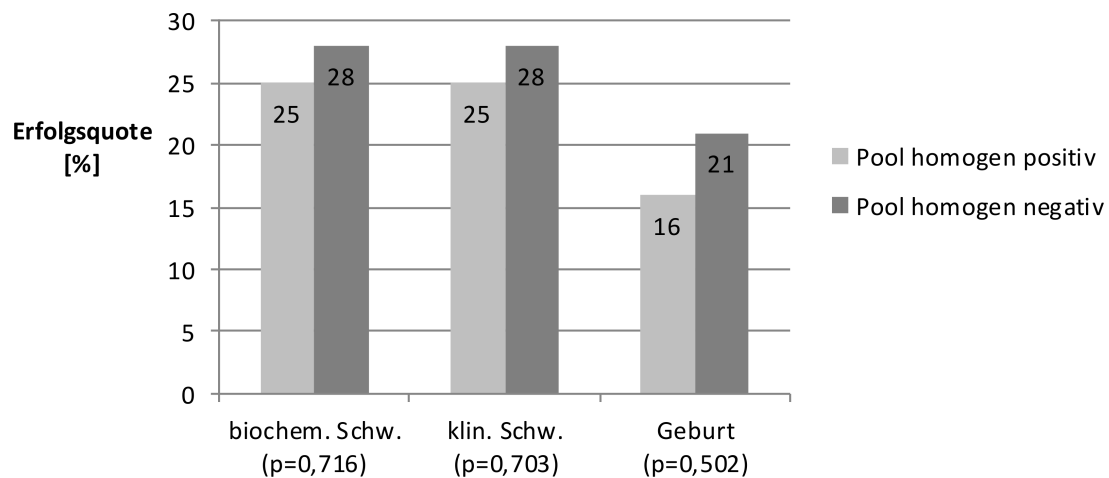


Abbildung 5 – Einfluss des *Zytoplasmas* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

Pool homogen positiv: Eizellen mit reifem Zytoplasma (homogene Struktur, Polkörper im perivitellinen Raum, MII);

Pool homogen negativ: Eizellen mit unreifem Zytoplasma (homogene Struktur, Polkörper nicht vom Zytoplasma gelöst oder nicht vorhanden) und/oder Eizellen mit überreifem Zytoplasma (inhomogene Struktur, Polkörper im perivitellinen Raum, MII).

Vakuolen im Zytoplasma

Das Vorhandensein von Vakuolen im Zytoplasma wurde dokumentiert. Eine Eizelle ohne Vakuolen galt als unauffällig.

Wie aus der Tabelle 7 und Abbildung 6 hervorgeht, zeigten sich in 258 Zyklen bei der biochemischen Schwangerschaft und in 259 Zyklen bei der klinischen Schwangerschaft und Geburt homogen positive Merkmalsausprägungen, also das Fehlen von Vakuolen. In nur 2 Zyklen wiesen die Eizellpools Vakuolen auf. Bei den homogen positiven Pools ist es in 27% zu einer biochemischen Schwangerschaft und einer klinischen Schwangerschaft gekommen. Zu einer Geburt kam es bei den homogen positiven Pools in 19% der Fälle. Bei den beiden Zyklen mit Vakuolen ist es nicht zu einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft oder Geburt gekommen. Eine statistische Auswertung dieser Fallzahlen ist aufgrund der geringen Stichprobe an negativen Eizellpools nicht verwertbar.

Tabelle 7 – Einfluss der *Vakuolen* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Pool homogen						
Anzahl Zyklen	258	2	259	2	259	2
Erfolgsquote [%]	27	0,00	27	0,00	19	0,00
Signifikanz	< 0,001		< 0,001		< 0,001	

In zwei Behandlungszyklen sind in jeder gewonnenen Eizelle Vakuolen vorgekommen. Nach der Auswahl von Eizellen aus diesen beiden Pools ist es nicht zu dem Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft gekommen.

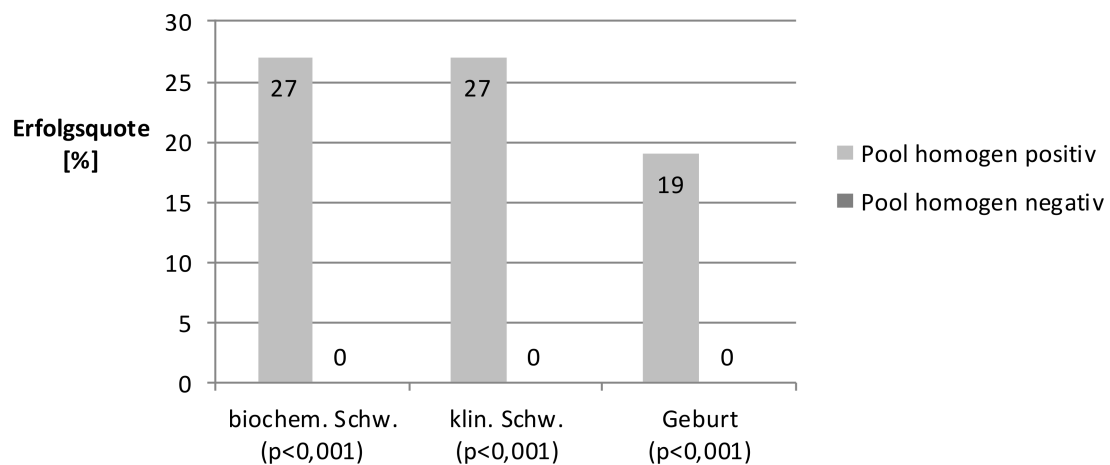


Abbildung 6 – Einfluss der *Vakuolen* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

Pool homogen positiv: Eizellen ohne Vakuolen im Zytoplasma;

Pool homogen negativ: Eizellen mit Vakuolen im Zytoplasma

3.4.2 Polkörper

Bei der Charakterisierung der Polkörper wurde unterschieden zwischen Eizellen mit einem oder einem fragmentierten Polkörper sowie solchen ohne Polkörper. Das Vorhandensein eines Polkörpers, der intakt ist, als Zeichen des Reifestatus der Eizelle, galt als positives Merkmal.

Die Auswertung des Merkmals „Polkörper“ ergab im Bezug auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft in 209 Zyklen einen homogenen Pool an Eizellen mit einem Polkörper. Dieses morphologische Merkmal wurde als unauffällig bezeichnet. In diesen Zyklen kam es in 27 % der Fälle zu einer biochemischen Schwangerschaft. In 14 Zyklen zeigten die gewonnenen Eizellen auffällige Merkmale. Diese waren ein fragmentierter Polkörper oder das Nichtvorhandensein eines Polkörpers. Hierbei kam es lediglich bei 7 % zu einer biochemischen Schwangerschaft. Eine klinische Schwangerschaft wurde in 27 % von 210 gewerteten Zyklen mit einem homogenen Pool an positiv bewertetem Merkmal verzeichnet. In 14 Zyklen mit homogen negativen Pools wurden 7 % der Frauen klinisch schwanger. Bei der Berechnung der Ergebnisse bezüglich der Geburt ist das Vorhandensein eines Polkörpers in jeder Eizelle eines Eizellpools in 210 Zyklen vorgekommen. Bei diesen homogen positiven Fällen kam es in 19 % zu einer Geburt. Bei den Zyklen mit homogen negativen Merkmalen der Polkörper kam es in 7 % der Fälle zu einer Geburt. Die Erfolgsquoten bezüglich der biochemischen Schwangerschaft und der klinischen Schwangerschaft waren fast 4fach höher bei Zyklen mit homogen positiven Pools. Bei der Analyse des Ereignisses der Geburt war ein fast dreifacher Anstieg der Erfolgsquote zu sehen bei Pools mit unauffälligem Polkörper. Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft ($p = 0,021$) und klinischen Schwangerschaft ($p = 0,022$) war signifikant erhöht bei der Auswahl an Eizellen mit einem intakten ersten Polkörper. Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Geburt ($p = 0,152$) korrelierte hingegen nicht mit der Polkörpermorphologie. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und Abbildung 7 zu sehen.

Tabelle 8 – Einfluss der *Polkörper* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Pool homogen						
Anzahl Zyklen	209	14	210	14	210	14
Erfolgsquote [%]	27	7	27	7	19	7
Signifikanz	0,021		0,022		0,153	

Die Erfolgsquoten bezüglich der biochemischen Schwangerschaft und klinischen Schwangerschaft waren fast vierfach höher bei Zyklen mit homogen positiven Eizellpools mit statistisch signifikantem Effekt. Bei der Analyse der Geburt war ein knapp dreifacher Anstieg der Erfolgsquote zu sehen bei den Zyklen mit unauffälligen Eizellpools ohne signifikanten Effekt.

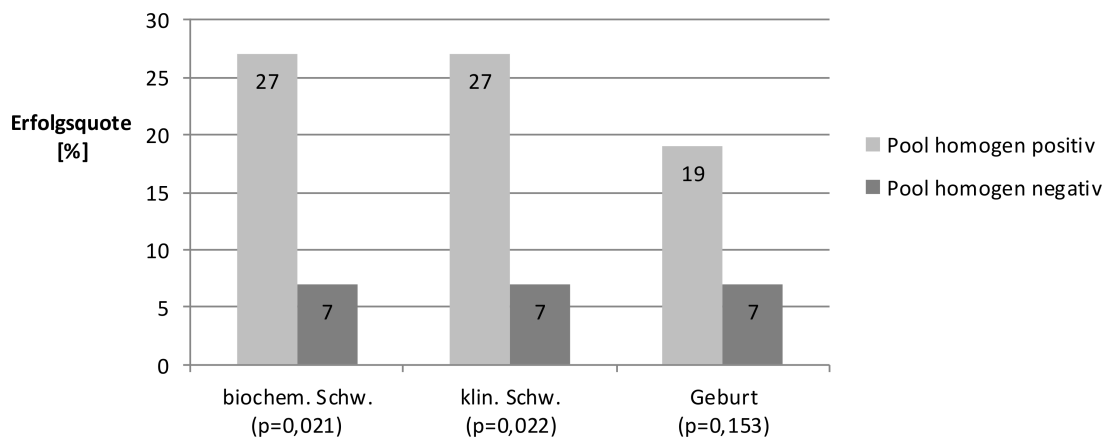


Abbildung 7 – Einfluss der *Polkörper* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

Pool homogen positiv: Eizellen mit einem intakten Polkörper;

Pool homogen negativ: Eizellen ohne Polkörper, Eizellen mit fragmentiertem Polkörper

3.4.3 Granulationen im perivitellinen Raum

Zur Analyse des perivitellinen Raumes wurde das Ausmaß an Granulationen beurteilt. Keine oder nur wenig Granulationen kennzeichneten eine unauffällige Eizelle. Eizellpools mit mäßigen oder stark vorhandenen Granulationen galten als negativ.

In die Beurteilung der Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft sind 242 Zyklen und in die Beurteilung der Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer klinischen Schwangerschaft 243 Zyklen mit homogen positiver Bewertung eingegangen, wie aus Tabelle 9 und Abbildung 8 hervorgeht. In beiden Ereignissen wurden 19 Zyklen als homogen negativ bewertet. Sowohl bei der biochemischen Schwangerschaft als auch der klinischen Schwangerschaft errechnete sich eine Wahrscheinlichkeit des Eintretens von 21 % in den homogen negativen Zyklen. In den homogen positiven Zyklen kam es bei 27 % zu einer biochemischen Schwangerschaft und einer klinischen Schwangerschaft. Aus Tabelle 9 geht hervor, dass kein Zusammenhang zwischen der Granulation und dem Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft und klinischen Schwangerschaft besteht (biochemische Schwangerschaft: $p = 0,568$; klinische Schwangerschaft: $p = 0,576$). Die Ausprägung der Granulationen im perivitellinen Raum zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Geburt ($p = 0,770$). In 243 Zyklen sind keine oder nur wenig Granulationen in den Pools aufgetreten und in 19 Zyklen waren mäßig viele oder stärkere Granulation zu sehen. In den homogen positiven Pools ist es in 18 % und in den homogen negativen Pools in 21 % zu einer Geburt gekommen. Bezüglich des Ausgangs der Behandlung waren keine deutlichen Abweichungen in dem Vergleich der homogen positiven und negativen Pools zu sehen.

Tabelle 9 – Einfluss des *perivitellinen Raums* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

Pool homogen	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	242	19	243	19	243	19
Erfolgsquote [%]	27	21	27	21	18	21
Signifikanz	0,568		0,576		0,770	

Bei der Betrachtung der biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt zeigten sich keine deutlichen Abweichungen der Erfolgsquoten in dem Vergleich der homogen positiven und negativen Eizellpools.

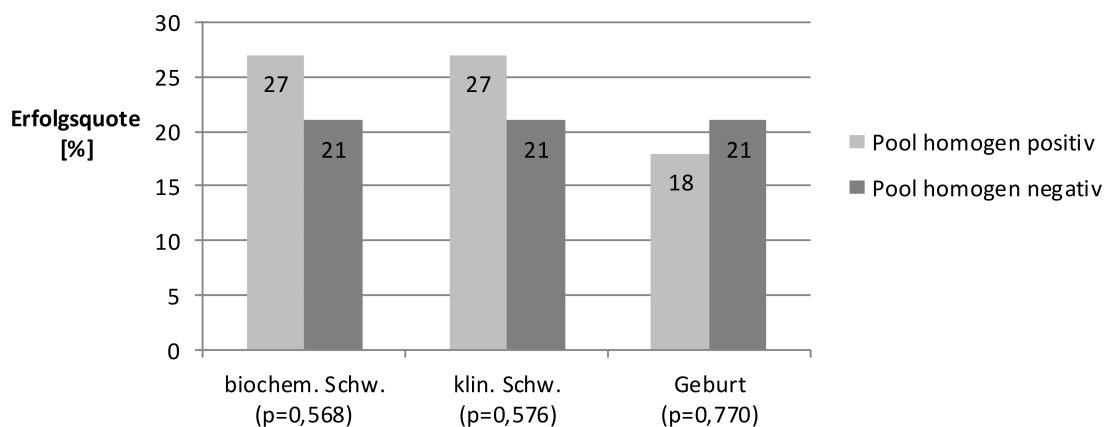


Abbildung 8 – Einfluss des *perivitellinen Raums* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

Pool homogen positiv: Eizellen ohne oder mit wenig Granulationen im PVR;

Pool homogen negativ: Eizellen mit mäßig vielen oder starken Granulationen im PVR

3.4.4 Zona pellucida

Als Merkmale der Zona pellucida wurden die Farbe, Dicke und Oberfläche dokumentiert. Eine Eizelle mit positivem Merkmal bezüglich des Aussehens der Zona pellucida hatte eine Dicke von etwa 20 μm , eine regelmäßige Oberfläche und eine helle Farbe. Abweichungen von diesen Merkmalen galten als negativ.

Angaben über die Farbe der Zona pellucida sind in Tabelle 10 und Abbildung 9 zu sehen. Die Farbe der Zona pellucida war in 12 Zyklen auffällig. Bei der Errechnung der biochemischen Schwangerschaft wurden insgesamt 260 und bei der klinischen Schwangerschaft und Geburt 261 Zyklen gewertet. Das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft und klinischen Schwangerschaft erfolgte in 27 % der Fälle bei homogen positiven Zyklen und in 25 % bei homogen negativen Zyklen. Hier zeigte sich kein Einfluss der Farbe der Zona pellucida auf die biochemische Schwangerschaft und klinische Schwangerschaft (biochemische Schwangerschaft $p = 0,906$; klinische Schwangerschaft $p = 0,912$). In Pools mit unauffälliger Farbe der Zona pellucida ist es in 18 % zu einer Geburt gekommen. Waren in den Zyklen Pools mit auffälliger Farbe der Zona pellucida, so kam es in 25 % zu einer Geburt. Die Farbe der Zona pellucida, zeigte einen Einfluss auf das Eintreten einer Geburt ($p = 0,632$).

Wie in Tabelle 11 und Abbildung 10 zu der Dicke der Zona pellucida zu sehen ist, sind bei der biochemischen Schwangerschaft 249 Zyklen und bei der klinischen Schwangerschaft 250 Zyklen mit homogen positiven Pools vorgekommen. Eine auffällige Zona pellucida Dicke trat in 8 Zyklen auf. Die Erfolgsquote lag sowohl bei der biochemischen Schwangerschaft als auch bei der klinischen Schwangerschaft bei 24 % bei den homogen positiven und bei 63 % bei den homogen negativen Pools. Bei der Geburt lag die Erfolgsquote bei 17 % bei der Auswahl an Eizellen mit einer unauffälligen Zona pellucida Dicke und bei 63 % bei der Auswahl an Eizellen aus einem homogen negativen Pool. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Dicke der Zona pellucida und der biochemischen Schwangerschaft und klinischen Schwangerschaft (biochemische Schwangerschaft $p = 0,077$; klinische Schwangerschaft $p = 0,077$). Bei der Geburt zeigt sich hingegen ein signifikanter Effekt ($p = 0,041$).

Homogen negative Pools mit einer auffälligen Oberfläche der Zona pellucida traten in einem Zyklus auf (Tabelle 12 und Abbildung 11). Hier sind die Fallzahlen jedoch zu gering, so dass eine statistische Auswertung zur Analyse der Signifikanz nicht aussagekräftig ist.

Tabelle 10 – Einfluss der *Farbe der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Pool homogen						
Anzahl Zyklen	248	12	249	12	249	12
Erfolgsquote [%]	27	25	27	25	18	25
Signifikanz	0,906		0,912		0,632	

Die Farbe der Zona pellucida zeigte keinen Einfluss auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

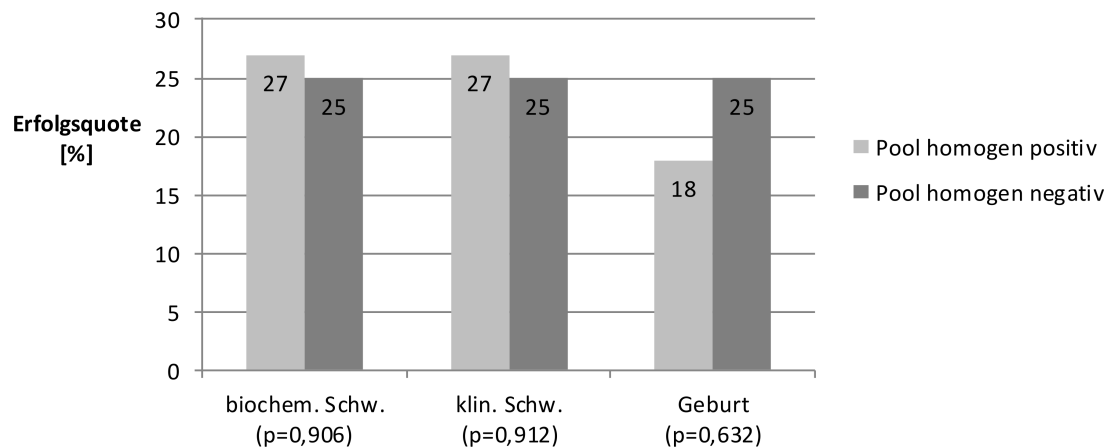


Abbildung 9 – Einfluss der *Farbe der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

Pool homogen positiv: Eizellen mit einer hellen Farbe der Zona pellucida;

Pool homogen negativ: Eizellen mit einer dunklen Farbe der Zona pellucida

Tabelle 11 – Einfluss der *Dicke der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

Pool homogen	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	249	8	250	8	250	8
Erfolgsquote [%]	24	63	24	63	17	63
Signifikanz	0,077		0,077		0,041	

Die Dicke der Zona pellucida korrelierte nicht mit der biochemischen und klinischen Schwangerschaft. Bei der Geburt zeigte sich ein signifikanter Effekt.

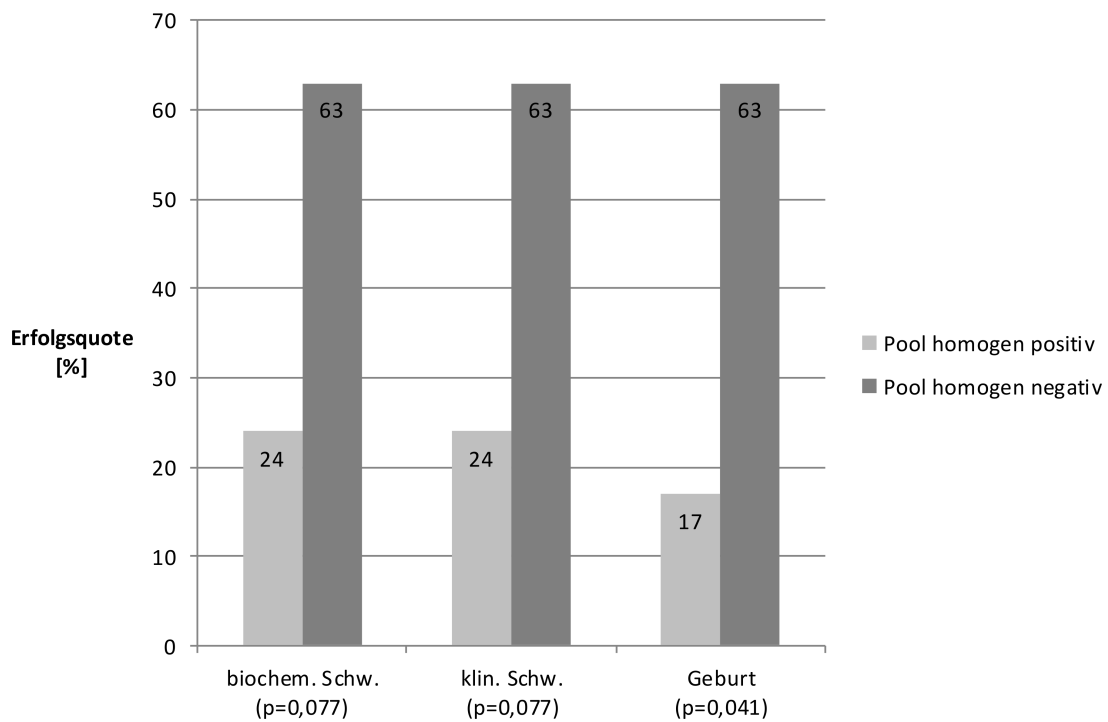


Abbildung 10 – Einfluss der *Dicke der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

Pool homogen positiv: Eizellen mit einer Zona pellucida Dicke von etwa 20 μm ;
Pool homogen negativ: Eizellen mit einer Zona pellucida Dicke deutlich größer oder kleiner 20 μm

Tabelle 12 – Einfluss der *Oberfläche der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

Pool homogen	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	263	1	264	1	264	1
Erfolgsquote [%]	26	00	26	00	18	00
Signifikanz	0,553		0,554		0,639	

Es wird ersichtlich, dass eine auffällige Oberfläche in nur einem Eizellpool vorkam. Eine statistische Auswertung ist nicht aussagekräftig.

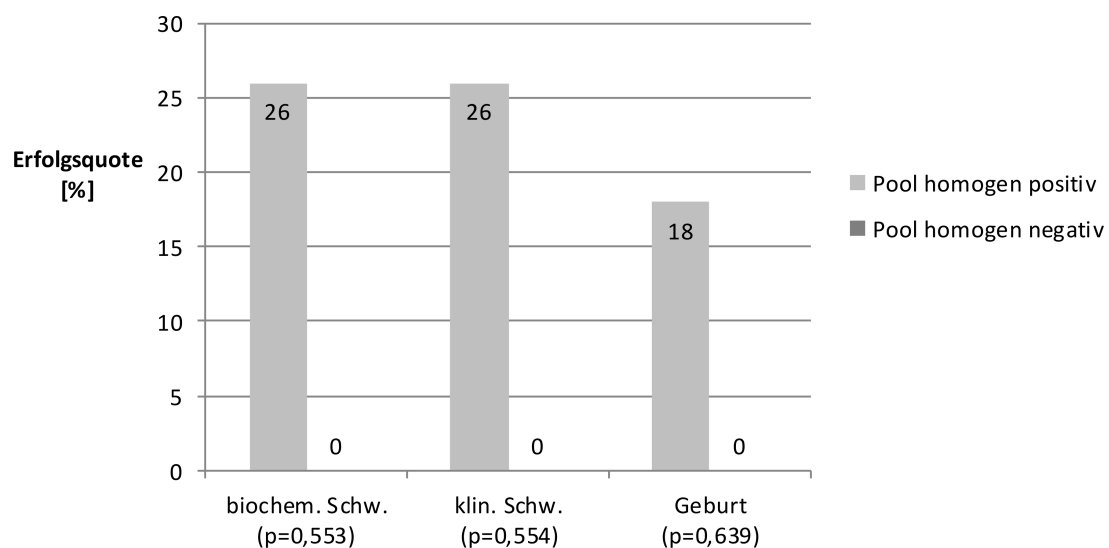


Abbildung 11 – Einfluss der *Oberfläche der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

Pool homogen positiv: Eizellen mit einer regelmäßigen Oberfläche der Zona pellucida;

Pool homogen negativ: Eizellen mit einer unregelmäßigen Oberfläche der Zona pellucida

3.5 Vergleich der komplett homogenen Eizellpools mit den Eizellpools mit einer überwiegend positiven Merkmalsausprägung

Bei der Auswertung der Ergebnisse mit den ergänzten homogen positiven Pools (homogen positive Pools zusammen mit den Pools, in denen mindestens 70 % der Eizellen eine positive Merkmalsausprägung aufweisen) wurden bei der Analyse des Zytoplasmas zusätzlich 12 Pools gewertet. Der Vergleich der Tabellen 6 und 13 und der Abbildungen 5 und 12 zeigt, dass es sowohl bei der Errechnung der Erfolgsquote als auch der Signifikanzen kaum Unterschiede gab. Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft und Geburt stieg um 1 % an. Bei der Betrachtung der klinischen Schwangerschaft waren die Erfolgsquoten identisch. Die errechneten Signifikanzen wichen ebenfalls kaum voneinander ab (biochemische Schwangerschaft: 25 % vs. 26 %; $p = 0,716$ vs. $0,762$; klinische Schwangerschaft: 25 % vs. 25 %; $p = 0,703$ vs. $0,749$; Geburt: 16 % vs. 17 %; $p = 0,502$ vs. $0,597$).

In der ergänzten Auswertung bezüglich der Vakuolen wurden bei der biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt zusätzlich 5 Pools in die Analyse einbezogen. Da jedoch insgesamt nur 2 homogen negative Pools vorgekommen sind, ist kein Vergleich der homogen negativen und positiven Pools möglich. Eine statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Stichprobe nicht aussagekräftig (Tabellen 14 und 7, Abbildungen 13 und 6).

Bei der Analyse der Polkörper wurden zusätzlich 16 Pools gewertet (Tabellen 8 und 15, Abbildungen 7 und 14). Hier waren die Ergebnisse der Erfolgchancen und der Signifikanzen ebenfalls vergleichbar. Die Erfolgchance ist bei der biochemischen Schwangerschaft und Geburt um 1 % gestiegen und bei der klinischen Schwangerschaft identisch geblieben. Die Signifikanzen unterschieden sich kaum (biochemische Schwangerschaft: 27 % vs. 28 %; $p = 0,021$ vs. $0,017$; klinische Schwangerschaft: 27 % vs. 27 %; $p = 0,022$ vs. $0,017$; Geburt: 19 % vs. 20 %; $p = 0,153$ vs. $0,112$).

Bei der Auswertung des perivitellinen Raumes wurden die homogen positiven Pools um 3 Pools ergänzt (Tabellen 9 und 16, Abbildungen 8 und 15). Bei der biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt zeigte sich kein Unterschied der Ergebnisse. Die Signifikanzen waren ebenfalls ähnlich (biochemische Schwangerschaft: 27 % vs. 27 %; $p = 0,568$ vs. $0,563$; klinische Schwangerschaft: 27 % vs. 27 %; $p = 0,576$ vs. $0,570$; Geburt: 18 % vs. 18 %; $p = 0,770$ vs. $0,784$).

Bei der Auswertung der Farbe der Zona pellucida gab es keinen Pool, in dem 70 % der Eizellen eine positive Merkmalsausprägung aufwiesen. Die homogen positiven Pools wurden somit nicht durch weitere Pools ergänzt (Tabellen 17 und 10, Abbildungen 16 und 9).

Bei den Analysen zu der Dicke der Zona pellucida wurden 6 Pools ergänzt (Tabellen 11 und 18, Abbildungen 10 und 17). Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft und klinischen Schwangerschaft stieg um 1 % an. Bei der Betrachtung der Geburt waren die Erfolgsquoten identisch. Die Signifikanzen wichen ebenfalls kaum voneinander ab (biochemische Schwangerschaft: 24 % vs. 25 %; $p = 0,077$ vs. $0,081$; klinische Schwangerschaft: 24 % vs. 25 %; $p = 0,077$ vs. $0,081$; Geburt: 17 % vs. 17 %: $p = 0,041$ vs. $0,043$).

In der ergänzten Auswertung bezüglich der Oberfläche der Zona pellucida wurden zusätzlich 2 Pools in die Analyse einbezogen (Tabellen 19 und 12, Abbildungen 18 und 11). Da jedoch insgesamt nur 1 homogen negativer Pool vorkam, ist kein Vergleich der homogen negativen und positiven Pools möglich. Eine statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Stichprobe nicht verwertbar.

In der Gegenüberstellung der rein homogenen Pools und der ergänzten Pools weichen die Auswertungen zu den einzelnen morphologischen Merkmalen kaum voneinander ab. Es zeigen sich ähnliche Erfolge bei Ergänzung der rein homogenen Pools mit den Pools, in denen mindestens 70 % der Eizellen eine positive Merkmalsausprägung aufwiesen.

Tabelle 13 – Einfluss des *Zytoplasmas* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung

Pool ergänzt	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	207	43	208	43	208	43
Erfolgsquote [%]	26	28	25	28	17	21
Signifikanz	0,762		0,749		0,597	

Die Morphologie des Zytoplasmas hatte keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

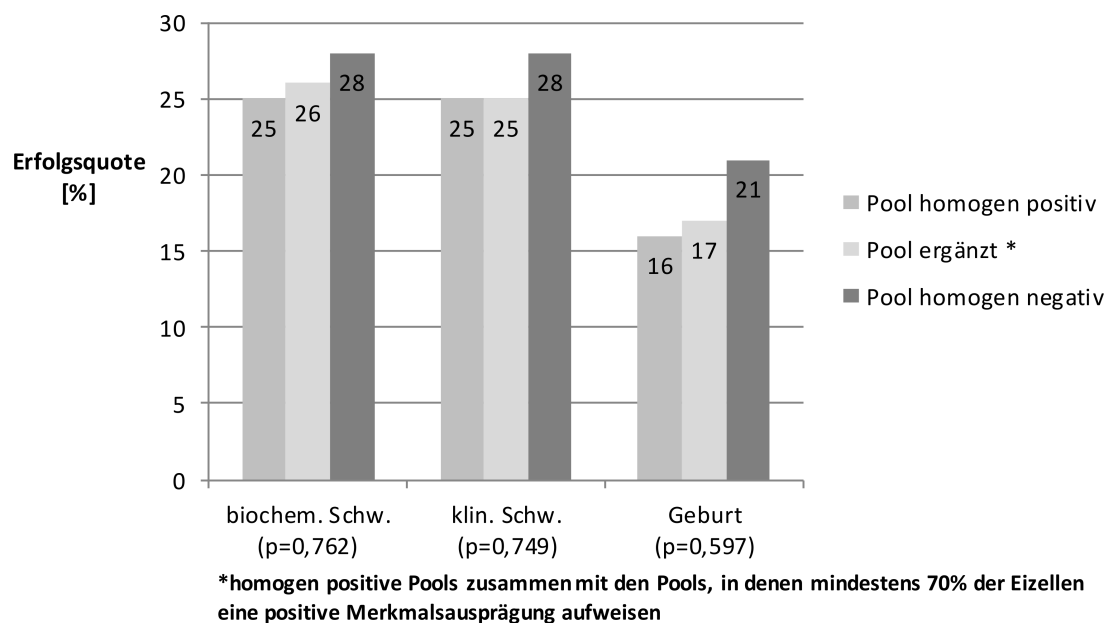


Abbildung 12 – Einfluss des *Zytoplasmas* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen

Tabelle 14 – Einfluss der *Vakuolen* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung

Pool homogen	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	263	2	264	2	264	2
Erfolgsquote [%]	27	0,00	27	0,00	19	0,00
Signifikanz	< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Aus der Tabelle geht hervor, dass nur in zwei Zyklen Vakuolen auftraten und somit kein Vergleich mit den homogen positiven Pools ohne Vakuolen möglich war. Die statistische Auswertung ist nicht aussagekräftig.

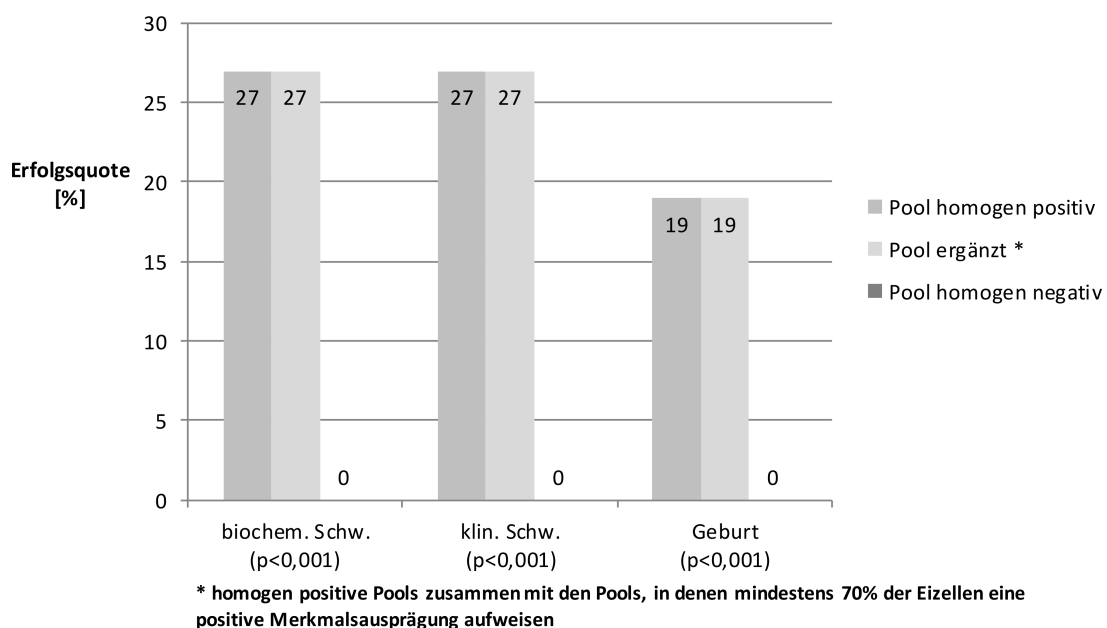


Abbildung 13 – Einfluss der *Vakuolen* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen

Tabelle 15 – Einfluss der *Polkörper* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung

Pool ergänzt	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	225	14	226	14	226	14
Erfolgsquote [%]	28	7	27	7	20	7
Signifikanz	0,017		0,017		0,112	

Ein intakter Polkörper erhöhte die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen und klinischen Schwangerschaft. Bei der Geburt zeigte sich dieser Effekt nicht.

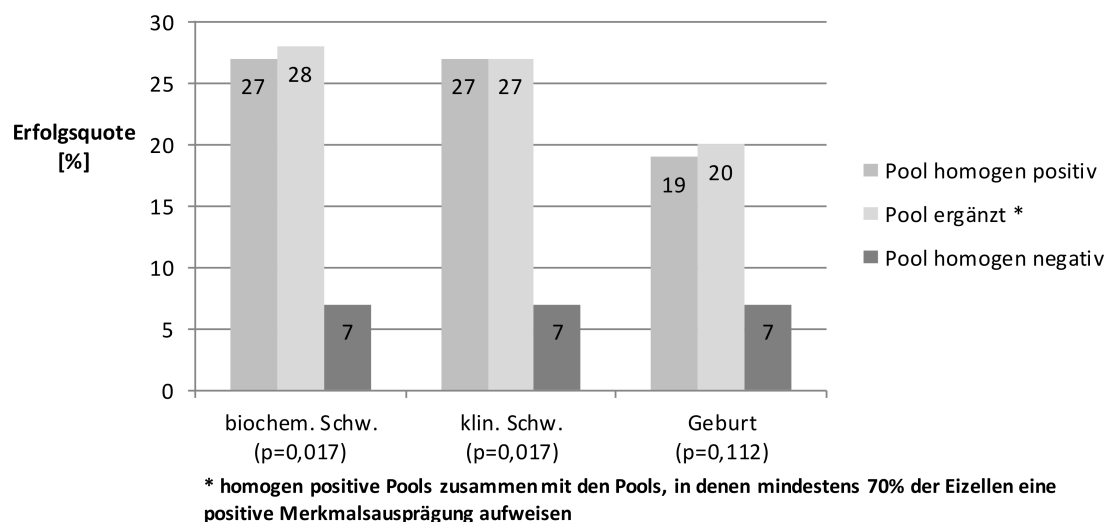


Abbildung 14 – Einfluss der *Polkörper* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen

Tabelle 16 – Einfluss des *perivitellinen Raums* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung

Pool ergänzt	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	245	19	246	19	246	19
Erfolgsquote [%]	27	21	27	21	18	21
Signifikanz	0,563		0,570		0,784	

Die Morphologie des *perivitellinen Raums* zeigte keinen Einfluss auf die biochemische Schwangerschaft, klinische Schwangerschaft und Geburt.

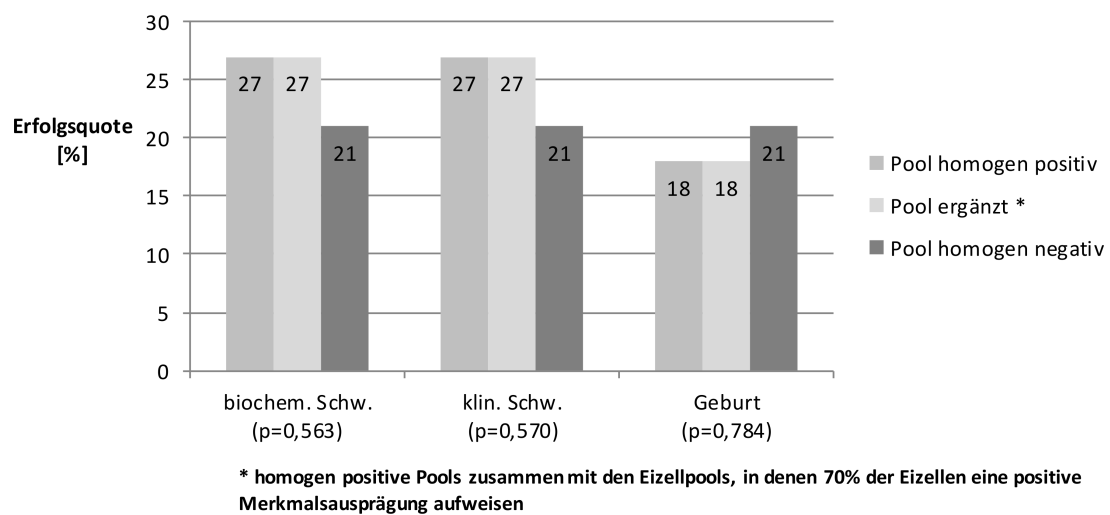


Abbildung 15 – Einfluss des *perivitellinen Raums* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen

Tabelle 17 – Einfluss der *Farbe der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Pool homogen						
Anzahl Zyklen	248	12	249	12	249	12
Erfolgsquote [%]	27	25	27	25	18	25
Signifikanz	0,906		0,912		0,632	

Die Ergebnisse zeigten keinen Einfluss der *Zona pellucida* Farbe auf die biochemische Schwangerschaft, klinische Schwangerschaft und Geburt.

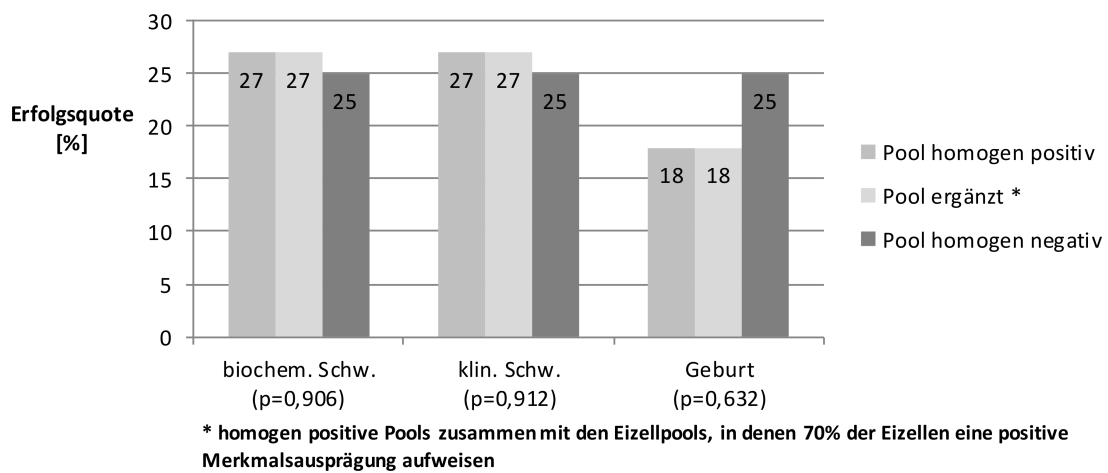


Abbildung 16 – Einfluss der *Farbe der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen

Tabelle 18 – Einfluss der *Dicke der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Pool homogen						
Anzahl Zyklen	255	8	256	8	256	8
Erfolgsquote [%]	25	63	25	63	17	63
Signifikanz	0,081		0,081		0,043	

Die Dicke der Zona pellucida stand nicht mit der biochemischen und klinischen Schwangerschaft im Zusammenhang. Sie hatte einen signifikanten Effekt auf die Geburt.

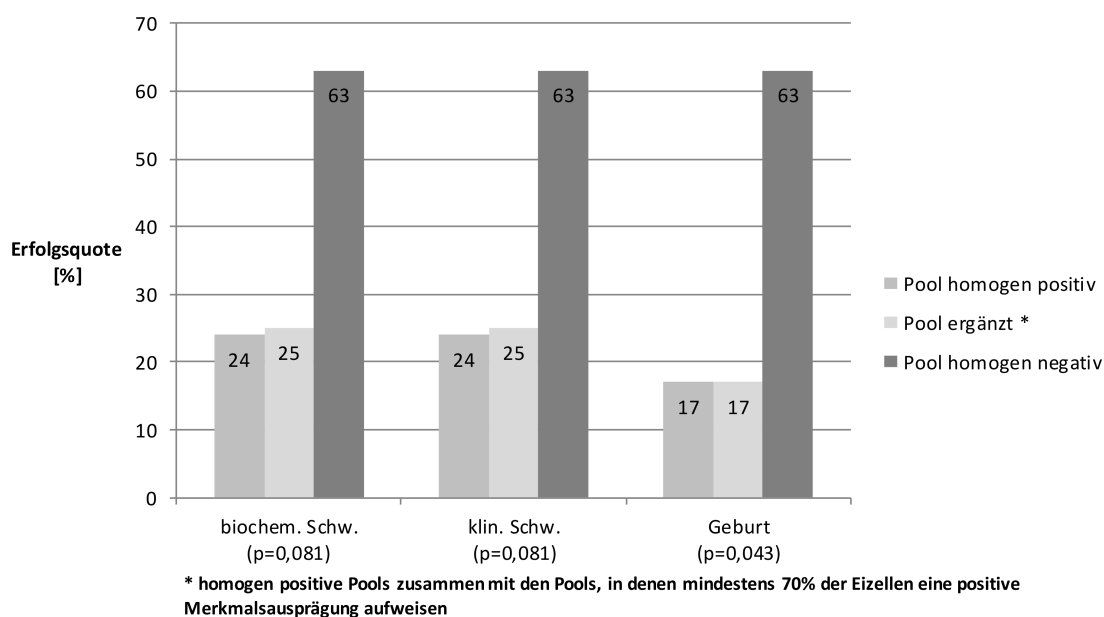


Abbildung 17 – Einfluss der *Dicke der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen

Tabelle 19 – Einfluss der *Oberfläche der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen mit einer zu mindestens 70 % vorhandenen positiven Merkmalsausprägung

	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Anzahl Zyklen	265	1	266	1	266	1
Erfolgsquote [%]	26	00	26	00	18	00
Signifikanz	0,551		0,552		0,636	

Es wird ersichtlich, dass eine auffällige Oberfläche in nur einem Eizellpool vorkam. Eine statistische Auswertung ist nicht verwertbar.

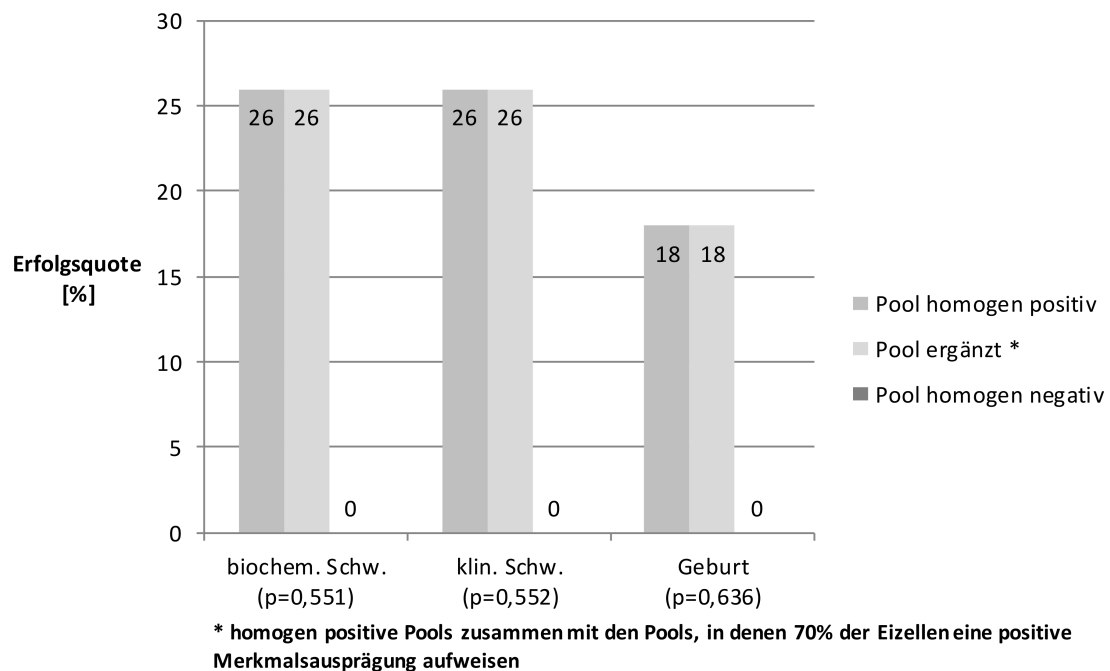


Abbildung 18 – Einfluss der *Oberfläche der Zona pellucida* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt unter Betrachtung der ergänzten Zyklen

3.6 Einfluss der Polkörperdiagnostik auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung

In 59 Zyklen wurde eine Polkörperdiagnostik durchgeführt. Bei der Auswertung bezüglich der biochemischen Schwangerschaft ist es in den 59 gewerteten Zyklen mit erfolgter Polkörperdiagnostik in 22 % und in den Zyklen ohne Polkörperdiagnostik in 28 % zu einer biochemischen Schwangerschaft gekommen. Zu einer klinischen Schwangerschaft ist es in 22 % gekommen, verglichen mit 27 % nach Zyklen ohne Polkörperdiagnostik. Auch bezüglich der Geburt zeigten sich keine deutlichen Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit des Eintretens von 14 % mit und 20 % ohne durchgeführter Polkörperdiagnostik. Wie aus der Tabelle 20 und Abbildung 19 hervorgeht, zeigten die Ergebnisse keinen signifikanten Einfluss der Polkörperdiagnostik auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung (biochemische Schwangerschaft $p = 0,382$; klinische Schwangerschaft $p = 0,393$; Geburt $p = 0,246$).

Tabelle 20 – Einfluss der *Polkörperdiagnostik* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

Polkörperdiagnostik	biochemische Schwangerschaft		klinische Schwangerschaft		Geburt	
	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne
Anzahl Zyklen	59	207	59	208	59	208
Erfolgsquote [%]	22	28	22	27	14	20
Signifikanz	0,382		0,393		0,246	

Die Durchführung einer Polkörperdiagnostik erfolgte in 59 Zyklen. Diese hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt.

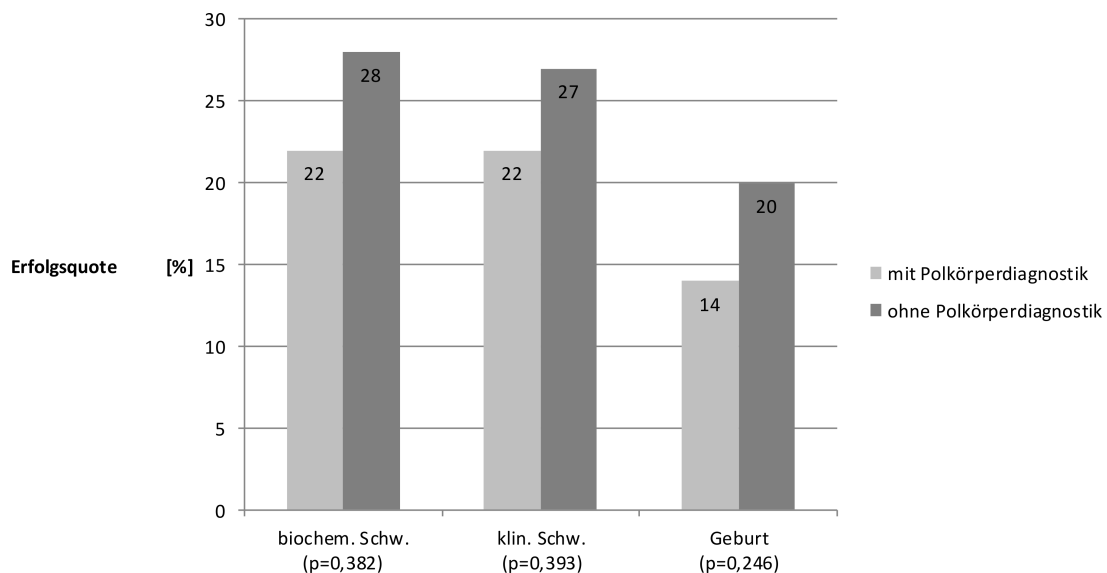


Abbildung 19 – Einfluss der *Polkörperdiagnostik* auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt

4 Diskussion

4.1 Einfluss allgemeiner Parameter auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung

4.1.1 Alter der Frau

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass das Durchschnittsalter der in dieser Studie einbezogenen Frauen bei 34,32 Jahren lag. Es zeigte sich deutlich, dass Frauen, die schwanger wurden, fast 3 Jahre jünger waren und Frauen, die ein Kind geboren haben, über 3 Jahre jünger waren als die Frauen ohne Erfolg bei der künstlichen Befruchtung. Das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft ($p < 0,001$), klinischen Schwangerschaft ($p < 0,001$) und Geburt ($p < 0,001$) war in dieser Arbeit statistisch signifikant abhängig von dem Alter der Frau.

Das mittlere Alter der Frauen, die eine Therapie der ungewollten Kinderlosigkeit durchführen lassen, steigt stetig an und erreicht laut DIR aus dem Jahr 2008 einen Höchstwert von 34,7 Jahren. Das Verlegen der reproduktiven Phase in das höhere Lebensalter ist ein entscheidender Faktor für die Abnahme der Fruchtbarkeit der Frau. Als Grund dafür werden eine Verminderung der Qualität und Quantität des Eizell- und Follikelpools und die Zunahme des Auftretens von Aneuploidien diskutiert (te Velde und Pearson, 2002; Baird *et al.*, 2005). Lim und Tsakok (1997) untersuchten in einer retrospektiven Studie die Abnahme der Infertilität bei Frauen im Alter. Es zeigten sich bei nicht signifikantem Unterschied der Fertilisationsraten in den verschiedenen Altersgruppen ein deutlicher und signifikanter Unterschied in den Schwangerschaftsraten (≤ 34 Jahre: 43,2 % vs. 40 Jahre: 14,3 %). Die Ursache liegt nach Lim und Tsakok (1997) in einer Abnahme der Eizellqualität im zunehmenden Alter, basierend auf einer Degeneration von Chromosomen (≤ 34 Jahre: 23,7 % vs. ≥ 40 Jahre: 95,8 %). Ein altersabhängiger Abfall der Schwangerschaftsraten wurde ebenfalls signifikant deutlich in der Arbeit von Abdelmassih *et al.* (1996) (< 30 Jahre: 41,4 % vs. 36-40 Jahre: 16,6 %). Szamatowicz und Grochowski (1998) gaben in einer retrospektiven Kohortenstudie mit 2511 durchgeführten Zyklen auch einen deutlichen und signifikanten Abfall der Implantations- und Schwangerschaftsraten (< 30 Jahre: 18,9 % und 29,4 % vs. ≥ 40 Jahre: 7,4 % und 12,8 %) an. An einer Studie bei Frauen über 39 Jahre mit 736 ICSI-Behandlungszyklen zeigten

Grimbizis *et al.* (1998) einen stetigen Abfall der Schwangerschaftsraten und dass es im Alter über 45 Jahren nicht mehr zu einer austragungsfähigen Schwangerschaft kam. Aus den Ergebnissen dieser Studie geht hervor, dass das Alter der Frau und die Anzahl an transferierten Embryonen einen prädiktiven Einflussfaktor auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung darstellen. In dieser Arbeit liegt das Durchschnittsalter bei 34,32 Jahren und entspricht etwa den Daten aus dem DIR für den vergleichbaren Zeitraum aus den Jahren 2004 (34,1 Jahre) und 2005 (34,3 Jahre). Es wurde zur Auswertung des Einflusses des Alters auf den Ausgang der Behandlung keine Unterteilung in Altersgruppen unternommen. Es zeigte sich allerdings deutlich, dass Frauen mit Erfolg bei der künstlichen Befruchtung deutlich jünger waren als Frauen ohne Erfolg. Mit einer erzielten Schwangerschaftsrate von 26,32 % liegt das Ergebnis dieser Studie im vergleichbaren Bereich mit dem des DIR. Die dort veröffentlichten Ergebnisse zeigten eine Schwangerschaftsrate von 28,12 % (2004) und 28,02 % (2005). Eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse ist allerdings nicht möglich, da das DIR die Schwangerschaftsrate nur im Bezug auf den Transfer von 2 Embryonen bezieht.

4.1.2 Anzahl transferierter Embryonen

Ein erfolgreicher Ausgang der Kinderwunschbehandlung war ebenfalls bei erhöhter Anzahl an transferierten Embryonen zu sehen. In den meisten Fällen wurden zwei Embryonen transferiert, soweit ausreichend Vorkernstadien zur Verfügung standen. Nur bei der Vermutung einer geringen Schwangerschaftschance bei beispielsweise hohem Alter der Frau oder erfolglosen Vorversuchen wurden drei Embryonen transferiert. Die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Ausgang der Behandlung bei höherer Anzahl an transferierten Embryonen nahm sowohl bei der biochemischen Schwangerschaft ($p < 0,001$), als auch bei der klinischen Schwangerschaft ($p < 0,001$) und Geburt ($p = 0,003$) statistisch signifikant zu.

Verschiedene statistische Angaben in der Literatur beschreiben einen Anstieg der Schwangerschaftsrate mit zunehmender Anzahl an transferierten Embryonen (Speirs *et al.*, 1983; Walters, 1996). Ludwig *et al.* (2000) zeigten in ihrer Studie den Einfluss des Alters der Frau in der Analyse der Daten bezüglich der optimalen Anzahl zu transferierender Embryonen. Sie untersuchten retrospektiv in 2573 IVF- und ICSI-Behandlungszyklen, welche Schwangerschaftsraten bei dem Transfer von zwei Embryonen zu erwarten sind unter Berücksichtigung des Alters der Frauen. Sie kamen zu dem Resultat, dass der Transfer von zwei anstatt drei Embryonen zu einer Reduktion der Schwangerschaftsraten führt, die altersabhängig ist, und empfehlen Frauen über 35

Jahren, drei Embryonen transferieren zu lassen. Aus den Ergebnissen des DIR von 2008 geht hervor, dass bei Frauen in einem Alter von 35-39 Jahren nach dem Zurücksetzen von einem Embryo die Schwangerschaftsrate pro durchgeführtem Embryotransfer bei 12,45 %, bei zwei zurückgesetzten Embryonen bei 28,77 % und bei drei zurückgesetzten Embryonen bei 27,08 % lag (DIR 2008). Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse zeigt sich keine deutliche Abweichung in den Schwangerschaftsraten bei dem Transfer von zwei verglichen mit einem Transfer von drei Embryonen in einer vergleichbaren Altersgruppe. Ein Grund dafür ist möglicherweise, dass der Transfer von drei Embryonen in den meisten Fällen bei Frauen durchgeführt wird, bei denen von einer geringen Chance des Behandlungserfolges ausgegangen wird (Alter > 35 Jahren, erfolglose Vorversuche, schlechte Qualität der Eizellen). Westergaard *et al.* (2000) und Staessen *et al.* (1993) zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Geburtenraten bei dem Transfer von zwei oder drei Embryonen ausgehend von einem Patientenkollektiv, bei dem eine gute Prognose der Behandlung vorlag.

Bei dieser Arbeit wurden im Durchschnitt 1,92 Embryonen transferiert. Frauen, bei denen eine geringe Chance des Behandlungserfolges vermutet wurde, haben einen Transfer von drei Embryonen erhalten. In der vorliegenden Arbeit ist deutlich zu erkennen, dass ein erfolgreicher Ausgang der Kinderwunschbehandlung mit erhöhter Anzahl an transferierten Embryonen im Zusammenhang stand. Der einschränkende Faktor bei der Frage nach der optimalen Anzahl der zu transferierenden Embryonen ist das naturgemäße Ansteigen der risikoreichen Mehrlingsschwangerschaften mit der Anzahl an transferierten Embryonen. Die Mehrlingsrate in dieser Studie betrug 28,57 % und deutschlandweit im Jahr 2007 21,11 % (DIR 2008). Imaizumi (2003) hat in seiner Studie einen 30fachen Anstieg der Drillingsraten und einen 1,5fachen Anstieg der Zwillingsraten (dizygote) in den Jahren 1972 bis 1999 beobachtet. Diese hohen Raten machen die Dringlichkeit der Reduktion der Anzahl zu transferierender Embryonen deutlich. Nur so ist es möglich eine Reduktion des bei einer Mehrlingsschwangerschaft erhöhten Auftretens von Fehl- und Frühgeburten sowie prä- und perinataler Morbidität und Mortalität im Vergleich zu Einlingsgeburten zu erzielen.

4.1.3 Anzahl der Metaphase-II-Eizellen

Als weiterer möglicher Einflussfaktor wurde die Anzahl der gewonnenen MII-Eizellen in einem Zyklus untersucht. Es zeigte sich, dass die Anzahl der MII-Eizellen bei 8,4 bis 8,7 lag und sich die Anzahl kaum unterschied in den Zyklen mit und ohne erfolgreichen Ausgang der Behandlung. Die Anzahl der gewonnenen MII-Eizellen hatte somit

keinen signifikanten Einfluss auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft ($p = 0,977$), klinischen Schwangerschaft ($p = 0,956$) und Geburt ($p = 0,549$).

Für die ICSI-Behandlung wird mit Hilfe einer ovariellen Überstimulation das Heranreifen mehrerer Follikel induziert. Die Anzahl der MII-Eizellen, die nach der kontrollierten ovariellen Stimulation gewonnen werden, ist abhängig von mehreren Faktoren. Zum einen ist auch hier das Alter von entscheidendem Einfluss. Der Grund dafür ist die mit dem Alter abnehmende Anzahl an Follikeln im Ovar, die für die Ovulation bereitstehen, und damit verbunden eine geringere Reaktionsbereitschaft des Ovars auf die Gonadotropine (Leidenberger 2002). Diese Abnahme der Anzahl an gewonnenen Kumulus-Eizellen-Komplexen (COC) zeigte sich in den retrospektiven Studien von Ravhon *et al.* (2001) mit über 1388 Patientinnen (< 34 Jahre: 12 COC vs. 39-41 Jahre: 8,7 COC) und Lim und Tsakok (1997) (35-39 Jahre: 16,6 vs ≥ 40 : 8,2 COC). Zum anderen zeigt jede Frau eine unterschiedlich starke ovarielle Antwort, die auch abhängig ist von der Art der verwendeten Stimulationsprotokolle. In der Literatur sind geringe Schwangerschaftsraten beschrieben, wenn nach einer ovariellen Stimulation nur wenige Follikel gewonnen werden konnten (Kailasam *et al.*, 2004).

Als weiterer möglicher Einflussfaktor wurde die Anzahl der in einem Behandlungszyklus gewonnen MII-Eizellen untersucht. Sowohl in Zyklen mit, als auch in Zyklen ohne erfolgreichen Ausgang unterschied sich die Anzahl nur geringfügig und lag bei fast 9 MII-Eizellen. Dies gibt somit keinen Aufschluss über den zu erwartenden Behandlungserfolg. Es zeigt sich jedoch, dass es im Allgemeinen möglich ist nach einer ovariellen Stimulation genügend Eizellen im befruchtungsfähigen Reifestatus mit einem haploiden Chromosomensatz für die ICSI zu gewinnen.

4.2 Einfluss der Eizellmorphologie auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung

Mit Hilfe einer Charakterisierung der Eizellen können zytoplasmatische und extrazytoplasmatische Schäden abgeschätzt werden. In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Auswirkung der einzelnen morphologischen Charakteristika auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung. Die Tabelle 21 zeigt die im Folgenden aufgeführten in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zu dem Einfluss von verschiedenen morphologischen Merkmalen auf die Implantations- und Schwangerschaftsraten.

Tabelle 21 – Ergebnisübersicht aus der Literatur zu dem Einfluss morphologischer Merkmale auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate

	Implantationsrate		Schwangerschaftsrate		Signifikant
	normal	abnormal	normal	abnormal	
<i>Zytoplasma</i>					
Loutradis <i>et al.</i> 1999	–	–	29,4 %	5,5 %	ja
Serhal <i>et al.</i> 1998	10 %	1 %	24 %	3 %	ja
<i>Polkörper</i>					
Ebner <i>et al.</i> 1999	20,3 %	10,5 %	35,7 %	23,3 %	ja
Ebner <i>et al.</i> 2002	48,6 %	22 %	68,4 %	34,8 %	ja
Ciotti <i>et al.</i> 2004	10,7 %	17,9 %	22,7 %	16,7 %	nein
<i>Perivitelliner Raum</i>					
Hassan-Ali <i>et al.</i> 1998	10,1 %	10,6 %	14,8 %	17,1 %	nein
Farhi <i>et al.</i> 2002	11,5 %	5,7 %	32,5 %	10,7 %	ja
<i>Zona pellucida*</i>					
Gabrielsen <i>et al.</i> 2000	40,7 %	15,7 %	54 %	16 %	ja
Sun <i>et al.</i> 2005	–	–	50 %	17,1 %	ja
<i>Morphologie gesamt**</i>					
Balaban <i>et al.</i> 1998	13,2 %	10,3 %	42,1 %	44,4 %	nein

* Varianz der Zona pellucida-Dicke > 20 % vs. < 20 %

** Zytoplasma, perivitelliner Raum und Zona pellucida

4.2.1 Zytoplasma

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Zytoplasmamorphologie und der Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft ($p = 0,716$), klinischen Schwangerschaft ($p = 0,703$) und Geburt ($p = 0,502$) festgestellt werden. Als weiteres zytoplasmatisches Merkmal wurde der Einfluss der Vakuolen auf den Ausgang der Behandlung untersucht. Da in nur zwei Behandlungszyklen ein Pool mit Vakuolen in allen Eizellen gewonnenen wurde, ist aufgrund der geringen Stichprobe an homogen negativen Eizellpools eine statistische Auswertung nicht aussagekräftig. In den beiden Behandlungszyklen mit Vakuolen in den Eizellen ist es nicht zu einer biochemischen Schwangerschaft gekommen.

Sundström und Nilsson (1988) führen abnorme Erscheinungsformen der Eizelle auf einen asynchron verlaufenden Prozess in der Reifung zurück, der mit einer geringeren Befruchtungsrate einhergeht. Sie beschreiben ein Zusammenspiel der Zytoplasma- und Kernreifung in natürlichen Zyklen, der in stimulierten Zyklen nicht gegeben ist. Im Rahmen der ovariellen Stimulation reifen Follikel heran, die im normalen Zyklus arretisch geworden wären. Dadurch ist der Prozess der Eizellreifung nicht für alle Eizellen gleichermaßen gegeben (Blerkom, 1990). Auf zytoplasmatischer Ebene zeigt sich dies u.a. in Aggregationen des Endoplasmatischen Retikulums, Vakuolenbildung und Veränderung der Beschaffenheit des Zytoplasmas (Ebner *et al.*, 2006). Als Einflussfaktor für das Ausbleiben einer Befruchtung werden zudem die Einschlusskörper vermutet (Veeck, 1988). Die zytoplasmatischen Prozesse, die neben der Kernreifung an der Entwicklung der Eizelle mit verantwortlich sind, sind in ihren einzelnen Aspekten noch nicht geklärt (Swain und Pool, 2008). Serhal *et al.* (1997) und Sutter *et al.* (1996) zeigen in ihrer Arbeit, dass ein abnormales Zytoplasma verglichen mit einem unauffälligen Zytoplasma keine Unterschiede in der Befruchtungsrate und der Entwicklung der Embryonen aufweist. Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Xia (1997), der zeigt, dass ein auffälliges Zytoplasma mit schlechten Befruchtungs- und Entwicklungsraten im Zusammenhang steht. Loutradis *et al.* (1999) beschrieben das Einhergehen von auffälligem Zytoplasma mit niedrigen Schwangerschaftsraten (5,5 % vs. 29,4 %). Die Merkmale des Zytoplasmas, wie eine dunkle Färbung, Fragmente und Vakuolen werden in seiner Studie zusammengefasst. Serhal *et al.* (1997) zeigen, dass es bei dem Vorhandensein von Granulationen und zytoplasmatischen Einschlüssen zu einer geringeren Implantationsrate kommt (1 % vs. 10 %). Auch die Schwangerschaftsrate war bei normalem Zytoplasma verglichen mit abnormalem Zytoplasma statistisch signifikant erhöht (24 % vs. 3 %). Hierbei wurden die zytoplasmatischen Auffälligkeiten zunächst differenziert betrachtet, in der Auswertung der Daten jedoch ebenfalls zusammengefasst. Im Gegensatz dazu

steht die Arbeit von Balaban *et al.* (1998), der keine Korrelation zwischen der Morphologie der Eizellen und dem Ausgang der Kinderwunschbehandlung feststellen konnte. Die Implantationsrate lag bei 10,3 % bei abnormalen Eizellen, verglichen mit 13,2 % bei normalen Eizellen. Auch bei der Schwangerschaftsrate war kein signifikanter Effekt ersichtlich mit einer Rate von 44,4 % bei abnormalen Eizellen und 42,1 % bei normalen Eizellen. Bei der Auswertung der Implantations- und Schwangerschaftsraten wurden allerdings extrazytoplasmatische und zytoplasmatische Auffälligkeiten zusammengefasst. Dadurch ist kein Vergleich zu den Daten mit ausschließlicher Bewertung des Zytoplasmas möglich.

In der Literatur wird auch das Vorkommen abnormer Erscheinungsformen des Zytoplasmas durch den unnatürlichen Reifungsprozess der Eizellen bei der Stimulation beschrieben (Sundström und Nilsson, 1998; Blerkom 1990). Im Rahmen dieser Studie konnte jedoch kein negativer Einfluss bei auffälliger Zytoplasmamorphologie auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft oder Geburt festgestellt werden. Die ebenfalls im Zytoplasma auftretenden Vakuolen wurden getrennt betrachtet und nicht mit in die Klassifikation des Zytoplasmas einbezogen. Der Einfluss dieses morphologischen Merkmals war aber durch ein zu geringes Vorkommen statistisch nicht weiter auswertbar. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist allerdings nicht möglich. Die morphologischen Merkmale werden in den Studien teilweise zusammengefasst oder vernachlässigt. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls keine differenzierte Analyse der einzelnen zytoplasmatischen Auffälligkeiten vorgenommen, um eine übersichtliche statistische Auswertung zu erhalten. Ein weiterer Aspekt, der einen direkten Vergleich der Arbeiten nicht möglich macht ist, dass der Einfluss der Eizellmorphologie auf den Erfolg der Behandlung nicht in jeder Studie anhand der Schwangerschaftschance eingeschätzt wird. In verschiedenen Studien wird die Qualität der Eizellen ausschließlich anhand des Entwicklungspotentials und der Befruchtungsrates (Serhal *et al.*, 1997; Xia 1997; Santis *et al.*, 2005) beurteilt. Angaben über den Ausgang der Behandlung liegen somit nicht immer vor. Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss kritisch berücksichtigt werden, dass es sich um eine retrospektive Studie handelt. Die zugrunde liegenden Daten wurden aus Dokumentationsbögen erhoben. Fehlende, unvollständige oder auch unverständliche Angaben konnten nicht nacherhoben und ergänzt werden. Zudem bestand eine Diskrepanz zwischen einer optimalen Bewertung der morphologischen Merkmale und der Umsetzbarkeit in den reproduktionsmedizinischen Labors. Die Charakterisierung der Eizellen unterlag der subjektiven Betrachtungsweise der Mitarbeiter. Die Ausprägung und das Aussehen der einzelnen Defekte wurden nach Augenmaß beurteilt, geschätzt und somit unterschiedlich bewertet.

4.2.2 Polkörper

Im Rahmen dieser Studie war die Chance auf eine biochemische Schwangerschaft ($p = 0,021$) und auf eine klinische Schwangerschaft ($p = 0,022$) bei dem Transfer von Eizellen aus homogen positiven Pools mit intaktem ersten Polkörper deutlich erhöht. Wurden Eizellen aus homogen positiven Pools transferiert, war die Erfolgchance bei der biochemischen und klinischen Schwangerschaft fast vierfach höher (27 % vs. 7 %) verglichen mit dem Transfer aus homogen negativen Pools. Bei der Geburt war ein fast dreifacher Anstieg der Erfolgchance (19 % vs. 7 %) zu sehen bei dem Transfer von unauffälligen Eizellen mit einem intakten Polkörper. Dennoch war hier kein signifikanter Zusammenhang festzustellen.

Der erste Polkörper zeigt den Reifestatus der Eizelle an. Eichenlaub-Ritter *et al.* (1995) nehmen an, dass das Vorliegen eines fragmentierten Polkörpers in einer zu schnellen Reifung der Eizelle vor der Follikelpunktion und einer zu langen Verweildauer der Eizelle im Stadium der MII vor der Imprägnation mit einem Spermatozoon begründet sein kann. Verlinsky *et al.* (2003) bringen die Form des Polkörpers nicht mit der genetischen Konstitution in Zusammenhang und sehen diese nicht als relevanten morphologischen Faktor für die Entwicklung der Embryonen. Santis *et al.* (2005) konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Erscheinungsform des ersten Polkörpers und der Befruchtungsrates (95 % vs. 57 %, $p > 0,05$) feststellen. Ciotti *et al.* (2004) zeigten in ihrer Arbeit, dass die Auswahl an Eizellen mit normalen Polkörpern verglichen mit Eizellen mit fragmentierten Polkörpern keine Unterschiede in den Implantations- (10,7 vs. 17,9; $p > 0,05$) und Schwangerschaftsrates (22,7 vs. 16,7; $p > 0,05$) aufweist. Ebner *et al.* (1999, 2002) zeigten in ihren Untersuchungen, dass eine normale Form des ersten Polkörpers einen positiven prognostischen Wert für die Implantations- und Schwangerschaftsrates darstellt. In dem Jahr 1999 beschreibt die Arbeit von Ebner *et al.*, dass es mit der Auswahl an Eizellen mit intaktem Polkörper zu statistisch signifikant höheren Implantationsrates (20,3 % vs. 10,5 %, $p < 0,05$) und Schwangerschaftsrates (35,7 % vs. 23,3 %, $p < 0,05$) kommt, verglichen mit der Auswahl an Eizellen mit fragmentiertem Polkörper. Aus einer Studie im Jahr 2002 konnten Ebner *et al.* diese Korrelation bestätigen (Implantationsrate: 48,6 % vs. 22 %, $p < 0,05$; Schwangerschaftsrates: 68,4 % vs. 43,8 %, $p < 0,005$).

Bezüglich der morphologischen Charakterisierung machen die Ergebnisse deutlich, dass es über eine Auswahl an Eizellen mit einem intakten ersten Polkörper möglich ist, den Behandlungserfolg signifikant zu erhöhen. In dieser Arbeit zeigte sich eine fast vierfach höhere Chance einer klinischen Schwangerschaft bei der Auswahl an Eizellen aus einem Pool mit ausschließlich als morphologisch unauffällig beurteilten Polkörpern. Das

Vorkommen von fragmentierten Polkörpern wird durch Eichenlaub-Ritter *et al.* (1995) mit dem negativen Einfluss der hormonellen Stimulation und die damit verbundene zu schnelle Reifung mancher Eizellen in einem Zyklus in Zusammenhang gebracht. Dies könnte ein Grund für den positiven Effekt bei dem Ausschluss an Eizellen mit einem fragmentierten Polkörper sein.

4.2.3 Granulationen im perivitellinen Raum

Als extrazytoplasmatisches Merkmal wurde das Vorkommen von Granulationen im perivitellinen Raum untersucht. Die Erfolgswahrscheinlichkeit wies im Vergleich der homogen positiven mit den homogen negativen Eizellpools nur geringfügig ab. Die Morphologie des perivitellinen Raumes stand nicht im Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft ($p = 0,568$), klinischen Schwangerschaft ($p = 0,576$) und Geburt ($p = 0,770$).

Der Ursprung der Granula im perivitellinen Raum könnten Rückstände von Coronazellausläufern (Sathanathan, 1997) oder Produkte der extrazellulären Matrix (Dandekar *et al.*, 1992) sein. Hassan-Ali *et al.* (1998) stellen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Granulationen und der Gabe von hohen Gonadotropindosen fest. Ihre Studie zeigt ein signifikant häufigeres Vorkommen von Zytoplasmatrümmern im perivitellinen Raum bei Frauen, die mit hohen Gonadotropindosen behandelt wurden. Das Vorkommen von Granula hatte in ihrer Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Implantations- (10,1 % vs. 10,6 %; $p > 0,05$) und Schwangerschaftsraten (14,8 % vs. 17,1 %; $p > 0,05$). Auch Ebner *et al.* (2006) beschreiben eine Beeinflussung des perivitellinen Raumes durch die Hormonapplikation bei der ovariellen Stimulation. Die Ergebnisse der Arbeiten von Balaban *et al.* (1998) und Sutter *et al.* (1996) sind vergleichbar. Die Embryonalentwicklung bei abnormen Eizellen verlief in ihren Untersuchungen ähnlich wie bei morphologisch unauffälligen Eizellen. Farhi *et al.* (2002) zeigte hingegen, dass das Auftreten von Granulationen im perivitellinen Raum mit einer schlechteren Implantations- (11,5 % vs. 5,7 %; $p < 0,05$) und Schwangerschaftsrate (32,5 % vs. 10,7 %; $p < 0,05$) in Zusammenhang steht.

Das Vorkommen von Granulationen im perivitellinen Raum wird wie auch das Vorkommen abnormer Erscheinungsformen des Zytoplasmas mit den Hormongaben bei der Stimulation in Zusammenhang gebracht. Es finden sich in der Literatur gegensätzliche Angaben über den Einfluss der Granulationen auf den Behandlungserfolg. In dieser Arbeit korreliert das Vorkommen von Granulationen im perivitellinen Raum im Unterschied zu der Arbeit von Farhi *et al.* (2002) nicht mit dem Ausgang der Behandlung.

4.2.4 Zona pellucida

Desweiteren wurde die Farbe, Dicke und Oberfläche der Zona pellucida auf den Ausgang der Behandlung untersucht. Die Farbe der Zona pellucida korrelierte in dieser Arbeit nicht mit einem positiven Ausgang der Behandlung ($p > 0,05$). Auch die Dicke der Zona pellucida zeigte keinen Einfluss auf die biochemische Schwangerschaft ($p = 0,077$) und klinische Schwangerschaft ($p = 0,077$). Es war jedoch ein signifikanter Einfluss auf die Geburt zu sehen ($p = 0,041$). Eine auffällige Oberfläche der Zona Pellucida in allen Eizellen war insgesamt in nur einem Pool zu finden, so dass eine statistische Auswertung nicht aussagekräftig war. Bei dem Eizelltransfer aus diesem Pool ist es nicht zu einer biochemischen Schwangerschaft gekommen.

Die Dicke der Zona pellucida kann variieren und wird möglicherweise durch einen unterschiedlichen präovulatorischen Hormonstatus (Mola *et al.*, 1997) beeinflusst. Zudem nimmt die Dicke wie auch die Varianz in der Dicke der Zona pellucida mit dem Alter ab (Gabrielsen *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2005). Sun *et al.* (2005) weisen einen positiven Effekt auf das Eintreten einer Schwangerschaft bei einer steigenden Varianz in der Zonadicke (21,73 % vs. 18,61 %; $p < 0,05$) nach. Schwangere und Nicht-Schwangere unterscheiden sich nach ihrer Arbeit jedoch nicht in der Dicke der Zona pellucida (16,71 μm vs. 17,06 μm ; $p > 0,05$). Gabrielsen *et al.* (2000) zeigten ebenfalls einen signifikanten Effekt auf die Schwangerschaftsrate bei einer steigenden Varianz in der Zonadicke (54 % vs. 16 %; $p < 0,05$). Shen *et al.* (2005) fanden heraus, dass nicht die Glykoproteinschicht in ihrer Gesamtheit, sondern die Dicke und die Brechungseigenschaften der inneren der drei Zonaschichten ausschlaggebend sind für den Erfolg bei der Kinderwunschbehandlung. Dies bestätigt die Analyse von Montag *et al.* (2008), die eine Korrelation zwischen der Brechungseigenschaft der inneren Schicht der Zona pellucida und dem Entwicklungspotential der Eizelle beschreiben. Diese Untersuchung der Zona pellucida kann jedoch nur mit speziellen Geräten durchgeführt werden und lässt sich deshalb nicht routinemäßig in den reproduktionsmedizinischen Labors einsetzen.

Die Farbe und Dicke der Zona Pellucida hatten in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen oder klinischen Schwangerschaft. In der Literatur finden sich Studien in denen die Zona Pellucida mit Hilfe spezieller Geräte anhand der Varianz der Dicke sowie der Brechungseigenschaften beurteilt wird (Gabrielsen *et al.* 2000; Sun *et al.* 2005; Shen *et al.* 2005). In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich eine mikroskopische Charakterisierung der Morphologie durchgeführt, wodurch kein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich ist. Da bei der Methode der ICSI das Spermium direkt in die Eizelle injiziert und die äußere Barriere der Zona pellucida überwunden wird, ist zu erwarten, dass der Ausgang der Kinderwunschbe-

handlung unabhängig von der Dicke der Zona pellucida ist. Allerdings muss bei der Durchführung der ICSI bei zunehmender Dicke ein stärkerer mechanischer Druck auf die Eizelle ausgeübt werden, was zu höheren Schäden an der Eizelle führen könnte. Zur Beurteilung der Oberfläche der Zona Pellucida lagen für eine statistische Auswertung zu niedrige Fallzahlen bezüglich der auffälligen Charakteristika vor. Dies könnte wie auch bei den Vakuolen in einem geringen Auftreten dieser Merkmale begründet sein.

4.3 Vergleich der komplett homogenen Eizellpools mit den Eizellpools mit einer überwiegend positiven Merkmalsausprägung

Im Unterschied zu anderen Arbeiten zu dem Einfluss morphologischer Kriterien auf den Behandlungserfolg lag das Augenmerk hier in dem Einschätzen der Qualität der Eizellen am Tag der ICSI vor der Imprägnation der Eizelle mit einem Spermium, um zu einem möglichst frühen Zeitpunkt die Auswahl der optimalen Eizellen für die weitere Behandlung treffen zu können. Dabei war es das Ziel die Eizellen nicht einzeln zu untersuchen, sondern die im Rahmen eines Behandlungszyklus gewonnenen Eizellpools als Ganzes zu betrachten und mit dem Ausgang der Behandlung zu korrelieren.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss bedacht werden, dass in der Regel zwei Embryonen transferiert werden, die möglicherweise aus Eizellen mit unterschiedlicher Morphologie entstanden sind. Es kann somit nicht mehr nachvollzogen werden, aus welcher der beiden Eizellen eine Schwangerschaft entstanden ist. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die rein homogenen Eizellpools bewertet und dabei jeweils der Fokus auf ein als positiv bewertetes morphologisches Merkmal gesetzt. Aufgrund zu großer Kombinationsmöglichkeiten wurden die als negativ definierten Merkmalsausprägungen nicht unterschieden. Um den Einfluss der Extremwertanalyse unter Betrachtung der rein homogenen positiven Pools einzuschätzen, folgte eine Analyse mit Eizellpools, in denen mindestens 70 % der Eizellen eine positive Merkmalsausprägung aufwiesen. In der Gegenüberstellung zu den rein homogen positiven Pools zeigten sich jedoch kaum Abweichungen der Erfolgchancen und auch die Signifikanzen unterschieden sich nur geringfügig. Somit wird deutlich, dass die errechneten Erfolgchancen und Signifikanzen nicht nur auf eine ausschließliche Betrachtung der rein homogenen Pools beruhen.

4.4 Einfluss der Polkörperdiagnostik auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung

In 59 Fällen wurde eine Polkörperdiagnostik durchgeführt, um eine indirekte Beurteilung des chromosomalen Status der Eizelle durch die Entnahme und Darstellung der Polkörper durchführen zu können. Die Untersuchung geht mit einer mechanischen Eröffnung der Zona pellucida einher und es besteht dabei die Gefahr eines Traumas für die Eizellen. Zudem galten andere Rahmenbedingungen, wie das Auswahlkriterium, dass bei den Patientinnen mindestens acht Eizellen gewonnen werden mussten, sowie die Auswahl der Eizellen für den Transfer nur bei Vorliegen einer Euploidie. Aus diesen Gründen wurde ein Vergleich zu den Zyklen ohne Polkörperdiagnostik aufgestellt, um den Einfluss dieser Untersuchung beurteilen zu können. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf das Eintreten einer biochemischen Schwangerschaft ($p = 0,382$), klinischen Schwangerschaft ($p = 0,393$) und Geburt ($p = 0,246$) in dem Vergleich der Zyklen mit und ohne durchgeführter Polkörperdiagnostik.

Die Polkörperdiagnostik wurde in der Regel nur dann vorgenommen, wenn mindestens acht Eizellen nach der Punktion vorlagen, da sonst die Möglichkeit bestand, dass weniger als drei Embryonen für den Transfer zur Verfügung standen. In ihrer Arbeit beschreiben van der Ven *et al.* (2002) eine gewonnene Eizellenzahl von $7,8 \pm 2,9$ sogar als Voraussetzung, um ein bis zwei Embryonen übertragen zu können, die keine Aneuploidien in den Chromosomen aufweisen. Die Polkörperdiagnostik dient dem Ausschluss von chromosomal veränderten Eizellen von der Befruchtung, die mit einer verminderten Implantationsrate einhergehen (Macklon *et al.*, 2002; van der Ven *et al.*, 1998). Untersuchungen aus dem Jahr 2005 zeigten, dass bei einer Auswahl an Patientinnen mit vorangegangenen Fehlversuchen ein Anstieg der Implantationsrate von 6,9% auf 34,9% durch die Polkörperdiagnostik erreicht werden konnte (Verlinsky *et al.*, 2005). Ein anderer Einflussfaktor könnte die durch die Öffnung der Zona pellucida bei der Polkörperbiopsie erfolgte assistierte Schlüpfhilfe (assisted hatching) darstellen, die dem Embryo das Verlassen der Zona pellucida erleichtern soll. In der Literatur wird der Vorteil der Implantation nach der assistierten Schlüpfhilfe kontrovers diskutiert. Montag (1999) beschreibt nach *laser assisted hatching* signifikant höhere Implantationsraten bei Patientinnen im Alter über 35 Jahren (22% vs. 53%, $p < 0,01$). In der Arbeit von Ebner *et al.* (2002b) werden signifikant höhere Schwangerschaftsraten erreicht (36,6% vs. 13,6%, $p < 0,05$), wenn bei schwerer Penetration bei der ICSI die Methode der assistierten Schlüpfhilfe angewandt wird. Im Gegensatz zu diesen Studien zeigt die Arbeit von Frydman *et al.* (2006) keinen signifikanten Unterschied in dem Vergleich der Fälle

mit und ohne assistierter Schlüpfhilfe bei Frauen über 37 Jahren (Implantationsrate: 16,1 % vs. 16,7 %).

Die gesonderte Betrachtung der Fälle nach durchgeführter Polkörperdiagnostik hat ergeben, dass ein Ausschluss der Eizellen mit Aneuploidien, die im zunehmendem Alter häufiger auftreten (Munné *et al.*, 1995a,b; Pellestor *et al.*, 2005) in dieser Studie keinen Effekt auf den Ausgang der Kinderwunschbehandlung hatte. Als mögliche Ursache dafür könnte die ausschließliche Betrachtung des mütterlichen Erbgutes und des ersten Polkörpers sein. Allerdings zeigen Studien, dass die Fehlverteilungen der Chromosomen meistens auf das weibliche Erbgut zurückzuführen sind und überwiegend in der ersten Reifeteilung (Meiose I) auftreten (Sherman *et al.*, 1991; Hassold *et al.*, 1991). Die Unterscheidung der Fälle mit und ohne Polkörperdiagnostik ist zudem wichtig, da die Eizellen durch die Biopsie des Polkörpers einer mechanischen Manipulation ausgesetzt sind. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Polkörperdiagnostik anscheinend keinen Stressfaktor für die Eizelle darstellt und keinen Einfluss auf die weitere Entwicklung nimmt.

4.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen die Zunahme der Bedeutung der Behandlung von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch deutlich. Immer mehr Paare verlegen ihren Kinderwunsch in ein höheres Lebensalter, das mit einer naturgemäßen Abnahme der Fruchtbarkeit einhergeht. Diese Arbeit zeigt, dass bei höherem Alter der Frauen der Erfolg der Kinderwunschbehandlung deutlich geringer ist. Ist mit einer reduzierten Chance auf einen positiven Ausgang der Therapie zu rechnen, besteht mit einer erhöhten Anzahl der zu transferierenden Embryonen die Möglichkeit diese Chance zu erhöhen, was ebenso in diesen statistischen Auswertungen zu sehen ist. Dabei muss allerdings die Zunahme des Eintretens einer risikoreichen Mehrlingsschwangerschaft in Kauf genommen werden. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Kinderwunschbehandlung ist der Gewinn von mehreren befruchtungsfähigen MII-Eizellen nach der hormonellen Stimulation. Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass im Durchschnitt ausreichend reife Eizellen für die künstliche Befruchtung zur Verfügung stehen und sich die Anzahl nur geringfügig unterscheidet bei Frauen mit und ohne positivem Ausgang der Therapie. Versucht man den Frauen eine bestmögliche Therapie zukommen zu lassen, könnte in Zukunft ein Ansatzpunkt sein, nicht die Anzahl der zu transferierenden Embryonen für eine bessere Erfolgchance zu erhöhen, sondern die optimalen Eizellen für die künstliche Befruchtung auszuwählen.

Mit Hilfe einer mikroskopischen Charakterisierung der Morphologie der Eizellen kann so eine Auswahl erfolgen. Diese Methode lässt sich nicht nur einfach und kostengünstig in den reproduktionsmedizinischen Labors umsetzen, sondern ermöglicht es nach den Ergebnissen dieser Arbeit auch, eine Aussage über den Behandlungserfolg zu treffen. Die mit der hormonellen Stimulation verbundene unnatürlich schnelle Reifung der Eizelle kann sich in Form einer Strukturveränderung der Eizelle äußern. Die verschiedenen Merkmalsausprägungen zeigen hier einen unterschiedlichen Einfluss auf den Behandlungserfolg. Liegen abnorme Erscheinungsformen bezüglich des Polkörpers als Zeichen des Reifestatus der Eizelle vor, kann man von einem deutlich geringeren Behandlungserfolg ausgehen, als bei der Auswahl einer Eizelle mit intaktem Polkörper. Kommt es hingegen im Zytoplasma oder perivitellinen Raum durch den abnormen Reifungsprozess zu morphologischen Auffälligkeiten, hat dies in dieser Arbeit keinen negativen Einfluss auf den Ausgang der Behandlung und scheint den weiteren Entwicklungsprozess nach der Imprägnation der Eizelle mit einem Spermium nicht zu stören. Auch Normabweichungen bezüglich der Dicke und Farbe der Zona Pellucida beeinflussen den Behandlungserfolg nicht. Möglicherweise ist ein Grund dafür, dass die Zona Pellucida, die die äußere Barriere der Eizelle darstellt, bei der ICSI durchstoßen wird und das Spermium direkt in das Zytoplasma der Eizelle injiziert wird. Die Auswertungen der Daten zu den Vakuolen im Zytoplasma und der Oberfläche der Zona pellucida waren aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht aussagekräftig. Zum einen zeigt dies ein naturgemäßes geringes Vorkommen dieser abnormen Erscheinungsformen. Zum anderen wären diesbezüglich weitere ergänzende Analysen mit höheren Fallzahlen nötig, um auch hier die Korrelation mit dem Ausgang der Behandlung zu untersuchen. Nach diesen Ergebnissen zu den morphologischen Charakteristika der Eizellen kann folglich mit der Auswahl von Eizellen mit intaktem ersten Polkörper die Chance auf den Behandlungserfolg erhöht werden.

In dieser Arbeit wurde für die Anwendbarkeit in der Praxis und die Umsetzbarkeit der statistischen Analysen die nach der Follikelpunktion gewonnenen Eizellpools als Ganzes betrachtet und mit dem Ausgang der Behandlung korreliert. Zunächst wurden hierfür die Eizellpools untersucht, in denen alle Eizellen bezüglich eines morphologischen Merkmals die gleiche Merkmalsausprägung aufwiesen. Um den Einfluss dieser Extremwertanalyse einzuschätzen, wurden im Anschluss zusätzlich die Eizellpools in die Analyse mit einbezogen, in denen mindestens 70 % der Eizellen bezüglich eines Merkmals die gleiche Merkmalsausprägung aufweisen. In dieser ergänzten Auswertung war zu sehen, dass es bei dem Vergleich der homogenen Pools mit den ergänzten Pools kaum ein Unterschied in den errechneten Ergebnissen gab.

Desweiteren wurde der Einfluss der Durchführung der Polkörperdiagnostik untersucht. Wider erwarten wurden in dieser Arbeit trotz des Ausschlusses von Aneuploidien nach der Polkörperdiagnostik die Behandlungsergebnisse nicht positiv beeinflusst. Es zeigt sich allerdings, dass bei dieser Methode zur Beurteilung des genetischen Materials die Eizelle unversehrt bleibt und keinen negativen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Eizelle nach der Imprägnation mit einem Spermium nimmt.

5 Zusammenfassung

Einleitung

Die Reproduktionsmedizin gewinnt durch das Verlegen des Kinderwunsches in eine immer spätere Lebensphase und die damit verbundene Zunahme an ungewollter Kinderlosigkeit stetig an Bedeutung. Es ist somit erforderlich die Behandlungsmethoden unter den Bedingungen des deutschen EschG zu optimieren, um unter einer Reduktion der risikoreichen Mehrlingsgraviditäten den Behandlungserfolg weiter erhöhen zu können. Für eine erfolgreiche Therapie ist die Qualität der Eizelle ein entscheidender Faktor. Über eine lichtmikroskopische Charakterisierung verschiedener morphologischer Merkmale kann diese eingeschätzt werden. In der vorliegenden Studie wurde die Eizellmorphologie vor erfolgter Befruchtung bewertet, um möglichst frühzeitig eine optimale Vorauswahl der Eizellen für die weitere Behandlung treffen zu können. Der in einem Behandlungszyklus gewonnene Eizellpool wurde in seiner Gesamtheit betrachtet und auf eine mögliche Korrelation mit dem Ausgang der Kinderwunschbehandlung untersucht. Ziel der Untersuchung war es zu ergründen, welche morphologischen Kriterien eines Eizellpools einen prognostischen Hinweis auf die Erfolgchancen in der Kinderwunschbehandlung geben können.

Methoden

Es handelt sich um eine klinisch-retrospektive Kohortenstudie. Grundlage der Studie waren 1976 Eizellen, deren Morphologie und Reifestatus lichtmikroskopisch erfasst wurde. Sie wurden in den Jahren 2004 und 2005 in 267 konsekutiven Behandlungszyklen mit intrazytoplasmatischer Spermieninjektion im Kinderwunschzentrum der Universität Kiel gewonnen. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Behandlung in einem Durchschnittsalter von 34,32 Jahren. Die nach ovarieller Stimulation punktierten Eizellen im Stadium der Metaphase II wurden als Eizellpool am Tag der ICSI vor der Imprägnation mit einem Spermium morphologisch beurteilt und der Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer biochemischen Schwangerschaft, klinischen Schwangerschaft und Geburt ermittelt. Das Alter, die Zahl transferierter Embryonen und die Zahl gewonnener Eizellen in der Metaphase II wurden als mögliche prädiktive Einflussfaktoren einbezogen. Zudem wurde der Einfluss der in 59 Fällen durchgeführten Polkörperdiagnostik auf den Ausgang der Behandlung untersucht.

Ergebnisse

Die Behandlungsergebnisse zeigten eine Schwangerschaftsrate von 26,32 % pro durchgeführtem Embryotransfer. Schwangere und Nicht-Schwangere unterschieden sich signifikant im Alter (32,63 vs. 35,47 Jahre; $p < 0,05$) und in der Anzahl der transferierten Embryonen (2,16 vs. 1,84 transferierte Embryonen; $p < 0,05$). Die Chance auf eine klinische Schwangerschaft war deutlich erhöht bei dem Transfer von Eizellen aus einem homogenen Pool mit intakten ersten Polkörpern (27 % vs. 7 %; $p < 0,05$). Die Anzahl gewonnener Metaphase-II-Eizellen (8,69 vs. 8,68 Oozyten; $p > 0,05$), Charakteristika des Zytoplasmas (25 % vs. 28 %; $p > 0,05$), der perivitelline Raum (27 % vs. 21 %; $p > 0,05$), die Farbe der Zona pellucida (27 % vs. 25 %; $p > 0,05$) und die Dicke der Zona pellucida (24 % vs. 63 %; $p > 0,05$) nahmen keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer klinischen Schwangerschaft. Auch die ergänzend durchgeführte Auswertung der Zyklen mit erfolgter Polkörperdiagnostik stand nicht mit dem Ausgang der Behandlung in Zusammenhang (klinische Schwangerschaft: 22 % vs. 27 %; $p > 0,05$). Bei der Beurteilung der Vakuolen im Zytoplasma, sowie der Oberfläche der Zona Pellucida lagen zu geringe Fallzahlen bezüglich der auffälligen Charakteristika vor, um eine repräsentative Analyse fertigen zu können.

Diskussion und Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass die morphologische Charakterisierung der Eizelle einen wesentlichen Baustein in der Reproduktionsmedizin darstellt. Werden aus einem Pool mit intakten ersten Polkörpern Eizellen für die ICSI verwendet, sind die Schwangerschaftschancen statistisch signifikant höher als bei Eizellen aus einem morphologisch auffälligen Pool. Ebenso ist bei jüngeren Frauen und bei erhöhter Zahl der transferierten Embryonen der Behandlungserfolg deutlich gesteigert. Die Anzahl gewonnener MII-Eizellen stand hingegen nicht mit dem Ausgang der Behandlung in Zusammenhang. Auch die weiteren untersuchten morphologischen Merkmale wie das Zytoplasma, der perivitelline Raum, sowie die Farbe und Dicke der Zona pellucida korrelierten nicht mit dem Behandlungserfolg. Der Ausschluss von aneuploiden Eizellen nach durchgeführter Polkörperdiagnostik nahm ebenfalls keinen Einfluss auf die Erfolgchancen.

Die Reproduktionsmedizin in Deutschland steht vor der Aufgabe unter den Bedingungen des deutschen ESchG weitere Wege zu finden, um den Patientinnen eine bestmögliche Behandlung zukommen zu lassen. Durch weiterführende Arbeiten könnten mit Hilfe einer einheitlichen und detaillierten Dokumentation in den reproduktionsmedizinischen Labors Ergebnisse besser miteinander verglichen werden und höhere Fallzah-

len für eine statistische Auswertung vorliegen. Somit könnte die Auswahl der Eizellen auf morphologischer Ebene weiter optimiert werden. Mit dieser optimierten Auswahl könnte das Ziel näher rücken, durch eine verminderte Anzahl der zu transferierenden Embryonen die Gefahr einer Mehrlingsschwangerschaft zu reduzieren und die Schwangerschaftschancen weiter zu erhöhen.

Literaturverzeichnis

- Abdelmassih, R., Solliá, S., Moretto, M. and Acosta, A. A. (1996). Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 65, 573–577.
- Andersen, A. N., Goossens, V., Bhattacharya, S., Ferraretti, A. P., Kupka, M. S., de Mouzon, J., Nygren, K. G., European IVF-monitoring (EIM) Consortium, f. t. E. S. o. H. R. and (ESHRE), E. (2009). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 24, 1267–1287.
- Baird, D. T., Collins, J., Egozcue, J., Evers, L. H., Gianaroli, L., Leridon, H., Sunde, A., Templeton, A., Steirteghem, A. V., Cohen, J., Crosignani, P. G., Devroey, P., Diedrich, K., Fauser, B. C. J. M., Fraser, L., Glasier, A., Liebaers, I., Mautone, G., Penney, G., Tarlatzis, B. and Group, E. S. H. R. E. C. W. (2005). Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 11, 261–276.
- Balaban, B., Urman, B., Sertac, A., Alatas, C., Aksoy, S. and Mercan, R. (1998). Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13, 3431–3433.
- Bertrand, E., den Bergh, M. V. and Englert, Y. (1995). Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Hum Reprod* 10, 1189–1193.
- Blerkom, J. V. (1990). Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech* 16, 324–346.
- Blerkom, J. V., Antczak, M. and Schrader, R. (1997). The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 12, 1047–1055.
- Boivin, J., Rice, F., Hay, D., Harold, G., Lewis, A., van den Bree, M. M. B. and Thapar, A. (2009). Associations between maternal older age, family environment and parent

- and child wellbeing in families using assisted reproductive techniques to conceive. *Soc Sci Med* 68, 1948–1955.
- Borkenhagen, A., Brähler, E. and Kentenich, H. (2007). Attitudes of German infertile couples towards multiple births and elective embryo transfer. *Hum Reprod* 22, 2883–2887.
- Dandekar, P., Aggeler, J. and Talbot, P. (1992). Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Hum Reprod* 7, 391–398.
- Diedrich, K. (2000). *Gynäkologie und Geburtshilfe, 1. Auflage*. Springer Verlag, Berlin.
- Diedrich, K., Diedrich, C., Santos, E., Zoll, C., al Hasani, S., Reissmann, T., Krebs, D. and Klingmüller, D. (1994). Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 9, 788–791.
- Drews, U. (2006). *Taschenatlas der Embryologie, 2. Auflage*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Dubey, A. K., Wang, H. A., Duffy, P. and Penzias, A. S. (1995). The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 64, 787–790.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Shebl, O., Jesacher, K. and Tews, G. (2005). Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 83, 1635–1640.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Yaman, C., Pfleger, U. and Tews, G. (2002). First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 17, 2415–2418.
- Ebner, T., Moser, M. and Tews, G. (2006). Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online* 12, 507–512.
- Ebner, T., Moser, M., Yaman, C., Feichtinger, O., Hartl, J. and Tews, G. (1999). Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril* 72, 599–603.
- Ebner, T., Moser, M., Yaman, C., Sommergruber, M., Hartl, J., Jesacher, K. and Tews, G. (2002b). Prospective hatching of embryos developed from oocytes exhibiting difficult oolemma penetration during ICSI. *Hum Reprod* 17, 1317–1320.

- Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Feichtinger, O. and Tews, G. (2000). Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15, 427–430.
- Eichenlaub-Ritter, U., Schmiady, H., Kentenich, H. and Soewarto, D. (1995). Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 10, 2343–2349.
- Erickson, G. F., Magoffin, D. A., Dyer, C. A. and Hofeditz, C. (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6, 371–399.
- Farhi, J., Nahum, H., Weissman, A., Zahalka, N., Glezerman, M. and Levran, D. (2002). Coarse granulation in the perivitelline space and IVF-ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 19, 545–549.
- Frydman, N., Madoux, S., Hesters, L., Duvernoy, C., Feyereisen, E., Du, A. L., Tachdjian, G., Frydman, R. and Fanchin, R. (2006). A randomized double-blind controlled study on the efficacy of laser zona pellucida thinning on live birth rates in cases of advanced female age. *Hum Reprod* 21, 2131–2135.
- Gabrielsen, A., Bhatnager, P. R., Petersen, K. and Lindenberg, S. (2000). Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 17, 323–328.
- Gerhard, I. and Runnebaum, B. (1992). [Harmful substances and infertility. Substances of abuse]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 52, 509–515.
- Germond, M., Primi, M.-P., Urner, F., Chanson, A., Wirthner, D. and Senn, A. (2004). Number of transferred embryos: how to reduce multiple pregnancies. *Ann N Y Acad Sci* 1034, 93–100.
- Gerris, J. (2007). The near elimination of triplets in IVF. *Reprod Biomed Online* 15 Suppl 3, 40–44.
- Gook, D. A. (2010). History of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online* Epub, ahead of print.
- Griffin, D. K. (1996). The incidence, origin, and etiology of aneuploidy. *Int Rev Cytol* 167, 263–296.

- Grimbizis, G., Vandervorst, M., Camus, M., Tournaye, H., Steirteghem, A. V. and Devroey, P. (1998). Intracytoplasmic sperm injection, results in women older than 39, according to age and the number of embryos replaced in selective or non-selective transfers. *Hum Reprod* 13, 884–889.
- Gu, Y.-F., Lu, C.-F., Lin, G. and Lu, G.-X. (2010). A comparative analysis of the zona pellucida birefringence of fresh and frozen-thawed human embryos. *Reproduction* 139, 121–127.
- Hassan-Ali, H., Hisham-Saleh, A., El-Gezeiry, D., Baghdady, I., Ismaeil, I. and Mandelbaum, J. (1998). Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13, 3425–3430.
- Hassold, T. J., Pettay, D., Freeman, S. B., Grantham, M. and Takaesu, N. (1991). Molecular studies of non-disjunction in trisomy 16. *J Med Genet* 28, 159–162.
- Hill, G. A., Freeman, M., Bastias, M. C., Rogers, B. J., Herbert, C. M., Osteen, K. G. and Wentz, A. C. (1989). The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 52, 801–806.
- Hummel, W. P. and Kettel, L. M. (1997). Assisted reproductive technology: the state of the ART. *Ann Med* 29, 207–214.
- Imaizumi, Y. (2003). A comparative study of zygotic twinning and triplet rates in eight countries, 1972-1999. *J Biosoc Sci* 35, 287–302.
- Kahraman, S., Yakin, K., Dönmez, E., Samli, H., Bahçe, M., Cengiz, G., Sertyel, S., Samli, M. and Imirzalioglu, N. (2000). Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15, 2390–2393.
- Kailasam, C., Keay, S. D., Wilson, P., Ford, W. C. L. and Jenkins, J. M. (2004). Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome. *Hum Reprod* 19, 1544–1547.
- Kearns, W. G., Pen, R., Graham, J., Han, T., Carter, J., Moyer, M., Richter, K. S., Tucker, M., Hoegerman, S. F. and Widra, E. (2005). Preimplantation genetic diagnosis and screening. *Semin Reprod Med* 23, 336–347.
- Kiechle, M. (2007). *Gynäkologie und Geburtshilfe, 1. Auflage*. Urban und Fischer Verlag, München.

- Leidenberger, F. (2002). *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Springer Verlag, Berlin.
- Leyendecker, G. and Wildt, L. (1996). From physiology to clinics—20 years of experience with pulsatile GnRH. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 65 Suppl, S3–12.
- Lim, A. S. and Tsakok, M. F. (1997). Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertil Steril* 68, 265–271.
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinis, S. and Michalas, S. (1999). Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 72, 240–244.
- Ludwig, M., Schöpfer, B., Katalinic, A., Sturm, R., Al-Hasani, S. and Diedrich, K. (2000). Experience with the elective transfer of two embryos under the conditions of the german embryo protection law: results of a retrospective data analysis of 2573 transfer cycles. *Hum Reprod* 15, 319–324.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- MacKay, A. P., Berg, C. J., King, J. C., Duran, C. and Chang, J. (2006). Pregnancy-related mortality among women with multifetal pregnancies. *Obstet Gynecol* 107, 563–568.
- Macklon, N. S., Geraedts, J. P. M. and Fauser, B. C. J. M. (2002). Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 8, 333–343.
- Mola, J. R. L. D., Garside, W. T., Bucci, J., Tureck, R. W. and Heyner, S. (1997). Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet* 14, 332–336.
- Montag, M., Schimming, T., Köster, M., Zhou, C., Dorn, C., Rösing, B., van der Ven, H. and der Ven, K. V. (2008). Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reprod Biomed Online* 16, 239–244.
- Montag, M. and van der Ven, H. (1999). Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croat Med J* 40, 398–403.
- Montag, M., van der Ven, K., Delacrétaç, G., Rink, K. and van der Ven, H. (1998). Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril* 69, 539–542.
- Montag, M., van der Ven, K. and van der Ven, H. (2009). [Polar body diagnosis]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 49, 62–68.

- Munné, S., Alikani, M., Tomkin, G., Grifo, J. and Cohen, J. (1995). Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64, 382–391.
- Munné, S., Dailey, T., Sultan, K. M., Grifo, J. and Cohen, J. (1995a). The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10, 1014–1020.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Steirteghem, A. C. V. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17–18.
- Pasqualotto, E. B., Agarwal, A., Sharma, R. K., Izzo, V. M., Pinotti, J. A., Joshi, N. J. and Rose, B. I. (2004). Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 81, 973–976.
- Pellestor, F., Anahory, T. and Hamamah, S. (2005). Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 111, 206–212.
- Pelletier, C., Keefe, D. L. and Trimarchi, J. R. (2004). Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril* 81 Suppl 1, 850–856.
- Ramos, R. R., Gutiérrez, G. R., Monroy, I. A. and Sánchez, H. G. M. (2008). [Risk factors associated to female infertility]. *Ginecol Obstet Mex* 76, 717–721.
- Ravhon, A., Lavery, S., Aurell, R., Trew, G., Margara, R. and Winston, R. (2001). Clinical experience with recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) and urinary FSH: a retrospective case- controlled analysis. *Fertil Steril* 75, 920–925.
- Santis, L. D., Cino, I., Rabellotti, E., Calzi, F., Persico, P., Borini, A. and Coticchio, G. (2005). Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online* 11, 36–42.
- Sathananthan, A. H. (1997). Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 10, 21–38.
- Serhal, P. F., Ranieri, D. M., Kinis, A., Marchant, S., Davies, M. and Khadum, I. M. (1997). Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12, 1267–1270.
- Shen, Y., Stalf, T., Mehnert, C., Eichenlaub-Ritter, U. and Tinneberg, H.-R. (2005). High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod* 20, 1596–1606.

- Sherman, S. L., Takaesu, N., Freeman, S. B., Grantham, M., Phillips, C., Blackston, R. D., Jacobs, P. A., Cockwell, A. E., Freeman, V. and Uchida, I. (1991). Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *Am J Hum Genet* 49, 608–620.
- Speirs, A. L., Lopata, A., Gronow, M. J., Kellow, G. N. and Johnston, W. I. (1983). Analysis of the benefits and risks of multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 39, 468–471.
- Steer, C. V., Mills, C. L., Tan, S. L., Campbell, S. and Edwards, R. G. (1992). The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 7, 117–119.
- Stephens, P. C. and Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2, 366.
- Sun, Y. P., Xu, Y., Cao, T., Su, Y. C. and Guo, Y. H. (2005). Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet* 89, 258–262.
- Sundström, P. and Nilsson, B. O. (1988). Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycles is asynchronous. *Hum Reprod* 3, 613–619.
- Sutter, P. D., Dozortsev, D., Qian, C. and Dhont, M. (1996). Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11, 595–597.
- Swain, J. E. and Pool, T. B. (2008). ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 14, 431–446.
- Szamatowicz, M. and Grochowski, D. (1998). Fertility and infertility in aging women. *Gynecol Endocrinol* 12, 407–413.
- Tanghe, S., Soom, A. V., Nauwynck, H., Coryn, M. and de Kruif, A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61, 414–424.
- te Velde, E. R. and Pearson, P. L. (2002). The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 8, 141–154.
- Tesarik, J. and Greco, E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 14, 1318–1323.

- van der Ven, H., Montag, M. and van der Ven, K. (2002). [Performance of in vitro fertilization in Germany]. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 96, 369–374.
- van der Ven, K., Peschka, B., Montag, M., Lange, R., Schwanitz, G. and van der Ven, H. H. (1998). Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13, 48–54.
- Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J. and Strom, C. M. (1990). Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 5, 826–829.
- Verlinsky, Y. and Kuliev, A. (2004). Preimplantation diagnosis for aneuploidies in assisted reproduction. *Minerva Ginecol* 56, 197–203.
- Verlinsky, Y., Tur-Kaspa, I., Cieslak, J., Bernal, A., Morris, R., Taranissi, M., Kaplan, B. and Kuliev, A. (2005). Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients. *Reprod Biomed Online* 11, 219–225.
- Walters, D. E. (1996). The statistical implication of the 'number of replacements' in embryo transfer. *Hum Reprod* 11, 10–12.
- Wert, S. E. and Larsen, W. J. (1989). Meiotic resumption and gap junction modulation in the cultured rat cumulus-oocyte complex. *Gamete Res* 22, 143–162.
- Westergaard, H. B., Johansen, A. M., Erb, K. and Andersen, A. N. (2000). Danish National IVF Registry 1994 and 1995. Treatment, pregnancy outcome and complications during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79, 384–389.
- Xia, P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 12, 1750–1755.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass meine Dissertation mit dem Titel „Einfluss von Morphologiekriterien der menschlichen Eizelle auf den Erfolg der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion“, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Kiel, 2013

Khadiga El-Hawari

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei dem Chefarzt der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UK-SH Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Größten Dank schulde ich Frau Prof. Dr. med. Liselotte Mettler für die wissenschaftliche Leitung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas Schmutzler für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die jederzeit kompetente und äußerst hilfsbereite Betreuung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des reproduktionsmedizinischen Labors unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ali Salmassi, die stets hilfsbereit waren und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten. Im Gedenken und ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Sibylle Buck für die wertvollen Ratschläge bei der Einarbeitung bedanken. Frau Dr. rer. nat. Dipl.-Embr. Bengi Acar-Perk danke ich dafür, dass sie mir stets tatkräftig zur Seite stand.

Herrn Dr. Knud Sievers möchte ich für die ausführliche Beratung und geduldige Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung danken.

Meinem Bruder Yasser möchte ich danken, der mir bei der formalen Gestaltung dieser Arbeit eine außerordentlich große Hilfe war.

Auch meinem Partner Fabian gilt mein Dank, der jederzeit für mich da ist.

Abschließend möchte ich meinen lieben Eltern ganz herzlich für die jahrelange großzügige Unterstützung und für den uneingeschränkten Rückhalt danken.

Lebenslauf

Khadiga El-Hawari

Knooper Weg 143

24118 Kiel

E-Mail: khadiga.el-hawari@web.de

Geburtsdatum: 26.05.1982

Geburtsort: Husum

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1988 – 1991 Deutsche Evangelische Oberschule Kairo

1991 – 1992 Grundschule Jübek

1992 – 2002 Domschule Schleswig, Gymnasium,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/2002 – 05/2009 Studium der Humanmedizin an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

03/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/2006 Aufnahme der Arbeit zur Promotion an der Frauenklinik der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Publikation

11/2010 El-Hawari, K., Sievers, K., Salmassi, A., Mettler, L., Schmutzler, A.
Einfluss der Eizellmorphologie auf den Erfolg der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion. XXIV. Jahreskongress der deutschen IVF-Zentren, 11. – 13. November 2010, München.
J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2010; 7 (6), 509

Praktisches Jahr

- 02/2008 – 06/2008 Abteilung für Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Rendsburg
06/2008 – 10/2008 Akademische Lehrpraxis der Medizinischen Fakultät,
Gemeinschaftspraxis für Innere Medizin und Allgemeinmedizin,
Dr. Duncker und Dr. Harms, Kiel-Russee
10/2008 – 01/2009 Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie,
UK-SH Campus Kiel

Berufstätigkeit

- 10/2009 – 05/2010 Assistenzärztin, Abteilung für Innere Medizin,
Schleiklinikum Schleswig
ab 06/2010 Assistenzärztin, Abteilung für Frauenheilkunde,
Schleiklinikum Schleswig

Kiel, 05. März 2013