

# **Multiparametrische Analyse der Oozyten-, Zygoten- und Embryoqualität im humanen IVF-Programm**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Claas Mehnert

aus Hannover

Gießen, 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H.-R. Tinneberg

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H.-R. Tinneberg

Gutachter: PD Dr. Dipl.-Psych. R. von Georgi

Tag der Disputation: 7. März 2007

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>Schrifttum</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Physiologische Grundlagen</b>	<b>8</b>
3.1.1	Oogenese	8
3.1.2	Endokrinologie	11
3.1.3	Zona pellucida	13
3.1.4	Die Vorgänge bei der Fertilisierung	14
3.1.5	Frühe Embryonalentwicklung und Implantation	16
<b>3.2</b>	<b>Grundlagen der assistierten Reproduktion</b>	<b>18</b>
3.2.1	Allgemeines	18
3.2.2	Ovarielle Stimulation	20
3.2.3	IVF/ICSI	21
3.2.4	Kryokonservierung	21
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Verwendete Materialien, Reagenzien und Geräte</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Oozyten</b>	<b>24</b>
4.2.1	Oozytengewinnung und –aufbereitung	25
<b>4.3</b>	<b>Spermaanlyse und –aufbereitung</b>	<b>27</b>
4.3.1	Spermiogramm	27
4.3.2	Aufbereitung des Ejakulates für die intracytoplasmatische Spermieninjektion	29
4.3.2.1	Migration-Sedimentation	29
4.3.2.2	2-Phasen-Dichtegradient	30
4.3.2.3	Waschen	31

<b>4.4</b>	<b>Polscope-Analyse</b> .....	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>In-vitro-Fertilisation</b> .....	<b>34</b>
4.5.1	Intracytoplasmatische Spermieninjektion .....	34
4.5.2	Befruchtungskontrolle .....	35
4.5.3	In-vitro-Kultur .....	36
4.5.4	Embryobeurteilung .....	37
4.5.5	Embryotransfer .....	37
<b>4.6</b>	<b>Erfasste Parameter</b> .....	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Inter- und Intrakohortenanalyse</b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>Datenerfassung und –auswertung</b> .....	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung des Patientenkollektivs</b> .....	<b>45</b>
<b>5.2</b>	<b>Homogenität der inneren Zonaschicht</b> .....	<b>49</b>
<b>5.3</b>	<b>Reliabilität der Messungen</b> .....	<b>50</b>
<b>5.4</b>	<b>Zusammenhang der Zonaretardance mit Oozytenparametern</b> .....	<b>51</b>
5.4.1	Gesamtkollektiv .....	51
5.4.2	Reifegrad der Oozyten .....	53
5.4.3	Vorhandensein einer Metaphasespindel .....	56
5.4.4	Die Retardance der inneren Zonaschicht im Kulturverlauf .....	57

<b>5.5</b>	<b>Zusammenhang der Zonaretardance mit Zygotenparametern</b>	<b>58</b>
5.5.1	Fertilisierung	58
5.5.2	Zygotenqualität	65
5.5.2.1	Pronukleus-Score	65
5.5.2.2	Weitere morphologische Parameter	67
<b>5.6</b>	<b>Zusammenhang der Zonaretardance mit Embryonalparametern</b>	<b>69</b>
5.6.1	Fragmentierungsgrad	69
5.6.2	Blastomerenanzahl	71
<b>5.7</b>	<b>Zusammenhang der Zonaretardance mit Zyklusparametern</b>	<b>73</b>
5.7.1	Alter der Patientin	73
5.7.2	BMI	76
5.7.3	Stimulationsparameter	77
5.7.3.1	hmG-Dosis	77
5.7.3.2	rekFSH-Dosis	80
5.7.4	Schwangerschaftseintritt	83
<b>5.8</b>	<b>Oozyten in der Polscope-Analyse</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
<b>6.1</b>	<b>Ergebnisse der in-vitro-Fertilisation</b>	<b>93</b>
<b>6.2</b>	<b>PolScope-Analyse</b>	<b>93</b>
6.2.1	Vorhandensein einer Metaphasespindel	93
6.2.2	Homogenität der Zonaschicht	94
6.2.3	Reliabilität der Messungen	95
<b>6.3</b>	<b>Zusammenhänge der Zonaretardance mit Oozytenparametern</b>	<b>96</b>
6.3.1	Inter- und Intrakohortenanalyse	96
6.3.2	Reifegrad und Zonaretardance	97
6.3.3	Nachreife von Prophase I-Oozyten	99

<b>6.4</b>	<b>Zusammenhang der Zonaretardance mit Zygotenparametern</b> .....	<b>100</b>
6.4.1	Fertilisierung .....	100
6.4.2	Weitere morphologische Parameter .....	100
<b>6.5</b>	<b>Zusammenhang der Zonaretardance mit Embryonalparametern</b> .....	<b>102</b>
<b>6.6</b>	<b>Zusammenhang der Zonaretardance mit Zyklusparametern</b> .....	<b>103</b>
6.6.1	Alter .....	103
6.6.2	Stimulation .....	104
6.6.3	Schwangerschaftseintritt .....	106
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>109</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>113</b>

## 1. Einleitung

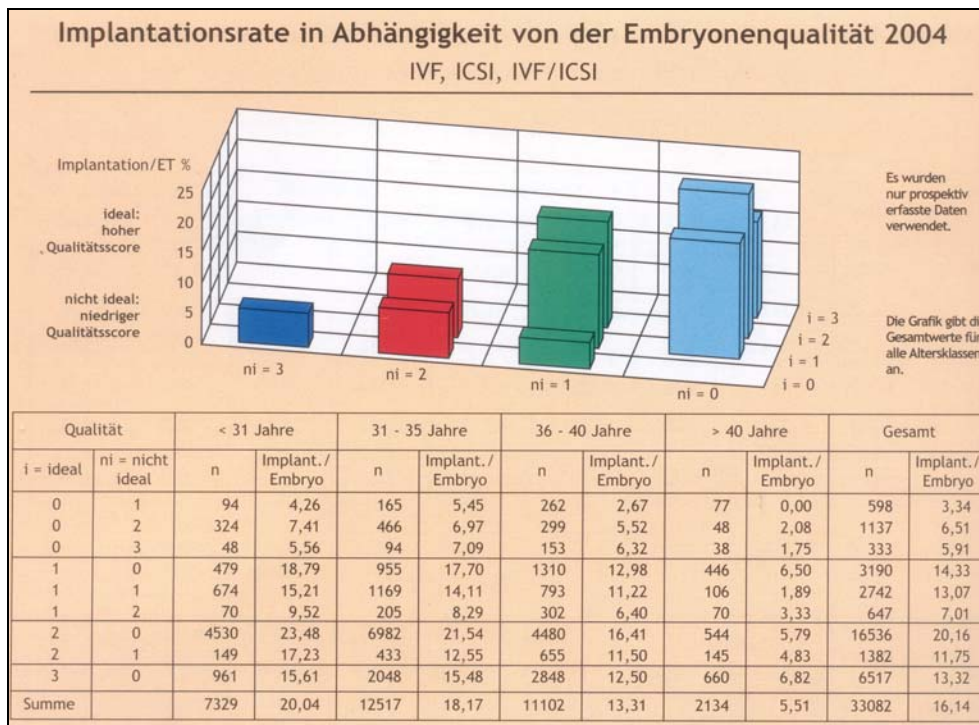
Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts formulierte der Embryologe E. B. Wilson die These, dass die embryonale Entwicklung entscheidend von der Eizelle abhängt („embryogenesis begins during oogenesis“).

Dieses biologische Prinzip behält bis in die heutige Zeit Gültigkeit. Natürlich spielt auch das Spermatozoon eine wichtige Rolle bei der Zygotenbildung und bei der Entwicklung des Säugetier- und damit auch des menschlichen Embryos. So trägt es die väterlichen komplementären Chromosomen bei, es liefert das Zentriol als wichtigsten Organisationspol der embryonalen Entwicklung und es bewirkt während des Fertilisierungsvorganges einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Oozyte. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx wiederum stößt die späteren Ereignisse des Befruchtungsvorganges wie Pronucleibildung, Pronucleiverschmelzung und Beendigung der zweiten meiotischen Metaphase der Oozyte an.

Dennoch spielt die Oozyte bei der Entwicklung eines menschlichen Embryos die wesentliche Rolle. Sie stellt sicher, dass sie nur durch ein einziges Spermatozoon fertilisiert wird, sie sorgt über die Dekondensierung des Spermatozookopfes für die Voraussetzung zur Bildung eines diploiden Genoms, ihr Zytoplasma stellt mittels der während der Oogenese gespeicherten Proteine und mRNA die Grundlage für die frühembryonale Entwicklung dar.

Es wird davon ausgegangen, dass in vivo nur ein Bruchteil der in den Ovarien einer Frau angelegten Oozyten die volle Entwicklungsfähigkeit erwirbt. Zum einen ist dies auf die Tatsache zurückzuführen, dass im natürlichen Zyklus der Frau in der Regel nur einer der etwa 1000 rekrutierten Primordialfollikel das ovulatorische Stadium erreicht, in dem die Oozyte fertilisierbar vorliegt. Zum anderen scheint in fertilen Populationen nur ein Drittel der Zyklen mit ungeschütztem Geschlechtsverkehr zu einer Schwangerschaft zu führen. Das bedeutet, in vivo entwickeln sich vermutlich nur etwa ein Drittel der fertilisierten Oozyten zu einem Embryo mit voller Entwicklungskompetenz.

In der assistierten Reproduktion ist diese Rate noch einmal drastisch reduziert. Unter Berücksichtigung der Morphologie und Anzahl der transferierten Embryonen in einem IVF-Zyklus sowie dem Alter der Frau ergeben sich Implantationsraten von durchschnittlich etwa 16% (Abb. 1).



**Abb. 1** Implantationsrate in Abhängigkeit der Embryoqualität und Anzahl transferierter Embryonen sowie dem Alter der Frau. Auswertung der Daten von 120 deutschen IVF-Zentren. Quelle: Deutsches IVF-Register, Jahrbuch 2004

Die Auswahl fertilisierter Oozyten mit dem größten Entwicklungspotenzial und damit der höchsten Wahrscheinlichkeit zu einer gesunden Schwangerschaft zu führen, ist seit den Anfängen der In-vitro-Fertilisation ein viel bearbeitetes Forschungsthema. Selektionskriterien, die zur Auswahl der zu transferierenden Zygoten bzw. Embryonen herangezogen wurden, sind die Morphologie der Pronukleusstadien (PAYNE 1997, SCOTT AND SMITH 1998, LUDWIG ET AL. 2000A,B, SCOTT 2000, TESARIK 2000, WITTEMER 2000, BALABAN 2001, ZOLLNER 2002) und das Zeitintervall bis zur ersten mitotischen Teilung (EDWARDS 1980, SHOUKIR 1997, BOS-MIKICH 2001, LUNDIN 2001, PETERSEN 2001, SAKKAS 2001, FENWICK 2002).

Für Embryonen, die bereits mindestens eine Zellteilung durchlaufen haben, existieren Qualitätsscores auf der Basis der Regelmäßigkeit der Blastomere (HARDARSON ET AL. 2001, ROUX ET AL. 1995), des Fragmentierungsgrades der



Blastomere (ANTCAK UND VAN BLERKOM 1999; ALIKANI ET AL. 2000, VAN BLERKOM ET AL. 2001) und der Mitoserate (RACOWSKY ET AL. 2000, SHAPIRO ET AL. 2000, CHECK ET AL. 2001).

Die Evaluation der Embryomorphologie am Tag 3 nach der Insemination wird ebenfalls häufig zur Selektion von Embryonen guter Implantationswahrscheinlichkeit verwendet (STEER ET AL. 1992, TAN ET AL. 1992, RIJNDERS & JANSEN 1998, VAN ROYEN ET AL. 1999, 2001, DESAI ET AL. 2000, RIENZI ET AL. 2002).

Die Implantationswahrscheinlichkeit von Embryonen im Blastozystenstadium konnte in etlichen Untersuchungen mit ihrer Morphologie in Zusammenhang gebracht werden (DOKRAS ET AL. 1993, GARDNER UND LANE 1997, SCHOLTES UND ZEILMAKER 1998, BALABAN ET AL. 2000, 2001, GIANAROLI ET AL. 2000, MILKI ET AL. 2000, PLACHOT ET AL. 2000, BLASKE ET AL. 2002).

Die nach wie vor niedrige Implantationsrate von in-vitro im Vergleich zu in-vivo gezeugten Embryonen spricht dennoch dafür, dass alle aufgeführten Scoringsysteme keine optimalen Ergebnisse liefern. Eine sequentielle Beurteilung der Zygote unter Kombination dieser Scoringsysteme in Abhängigkeit ihres Entwicklungsstadiums könnte sich als leistungsfähiger erweisen, implantationsfähige Embryonen zu erkennen (SCOTT 2003, EBNER ET AL. 2003). Da die Entwicklungsfähigkeit von Embryonen weitestgehend von der Qualität der zugrunde liegenden Gameten abhängt, sollte hierbei ein besonderes Augenmerk auf die Oozyten gelegt werden (BALABAN UND URMAN 2006).

Obwohl in einigen wenigen Untersuchungen kein Einfluss der Eizellqualität auf Fertilisierungsrate und Embryonalentwicklung festgestellt wurde (DESUTTER ET AL. 1996, BALABAN ET AL. 1998), zeigte Kahraman (KAHRAMAN ET AL. 2000), dass Embryonen, die sich aus Oozyten schlechter Qualität entwickelten, hohe Aneuploidieraten aufwiesen.

Die Mehrheit der Untersuchungen zu diesem Thema bestätigte, dass sich Oozyten mit schlechter Morphologie zu Embryonen schlechter Qualität entwickelten, die wiederum eine reduzierte Schwangerschaftswahrscheinlichkeit zur Folge hatten (SERHAL ET AL. 1997, XIA 1997, LOUTRADIS ET AL. 1999).

Die eingeschränkte Aussagekraft der Embryoqualität in Hinsicht auf die Fähigkeit des Embryos zu implantieren und zu einer gesunden Schwangerschaft zu führen, hat die Definition von Klassifikationskriterien zur Folge gehabt, die es erlauben sollten, Oozyten mit besonders hohem Entwicklungspotenzial erkennen zu können.

Zu diesem Zweck sind unterschiedliche Score-Systeme entwickelt worden, die auf der lichtmikroskopischen Evaluation der lebenden Oozyten basieren (STEER ET AL. 1992, SERHAL ET AL. 1997). Die in diesen Scores erfassten Parameter geben jedoch hauptsächlich grobe Anomalien des Zytoplasmas wieder, wie z. B. das Vorhandensein von Vakuolen, Einschlusskörperchen, Granulierungen oder aberrantes Zytoplasmavolumen oder -anordnung.

Als ein zusätzlicher Marker der Eizellqualität wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen die Morphologie der Zona pellucida herangezogen. Insbesondere die Zonadicke ist mittels konventioneller lichtmikroskopischer Untersuchungen ausführlich als ein potentiell mit Embryoqualität und –entwicklung sowie dem Outcome von IVF-Zyklen assoziierter Parameter untersucht worden (SUN 2005, COHEN 1989, PALMSTIERNA 1998, GABRIELSEN 2001, GABRIELSEN 2000, LORET DE MOLA 1997, BERTRAND 1995; BERTRAND 1997).

In weiteren Studien wurde belegt, dass fragile Zonae pellucidae mit irregulärer Morphologie mit irregulären Oozyten niedrigen Entwicklungspotenzials und daraus resultierenden Embryonen schlechter Qualität assoziiert sind (PAZ ET AL. 2004, ESFANDIARI 2005).

Die Etablierung eines neuen lichtmikroskopischen Verfahrens, bei dem die physikalischen Eigenschaften zirkular polarisierten Lichts beim Durchgang durch kristalline und parakristalline Strukturen zur Anwendung kommen, erlaubte die Einführung eines zusätzlichen morphologischen Parameters zur nichtinvasiven Beschreibung der Zona pellucida. Keefe et al. beschrieben mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie 1997 erstmals den dreischichtigen Aufbau der Zona pellucida in lebenden Oozyten des Hamsters (KEEFE ET AL. 1997).

In lebenden humanen Oozyten ist die Struktur der Zona pellucida bisher nur in zwei Studien untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die humane Zona ebenfalls einen dreischichtigen Aufbau aufweist. Ihre Struktur (evaluiert mit Hilfe der

Polarisationsmikroskopie) korreliert dabei mit ihrer Dicke. Zonadicke und –struktur variieren dabei sowohl zwischen Oozyten verschiedener Patienten als auch bei Oozyten einer Kohorte erheblich (PELLETIER ET AL. 2004). Dennoch stellten Shen et al. einen Zusammenhang zwischen der Zonastruktur und dem Outcome von IVF-Zyklen nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion fest (SHEN ET AL. 2005). Dabei zeigte die innere Schicht der Zona pellucida einen Zusammenhang mit der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit. Diese Schicht ist diejenige, die in der Polarisationsmikroskopie die größte Retardance aufweist, gefolgt von der äußeren Schicht und der mittleren, die normalerweise in der Polarisationsmikroskopie kaum erkennbar ist.

Im humanen IVF-Programm werden durch die kontrollierte ovarielle Hyperstimulation mehr Follikel zum Wachstum in das ovulatorische bzw. präovulatorische Stadium gebracht als im natürlichen Zyklus. Dabei folgt die Größe der Follikel und damit das Reifestadium der Oozyten einer gleitenden Verteilung. Oftmals wird der Reifungsprozess der Oozyten nicht im Follikel abgeschlossen, was sich im Vorliegen von genomisch unreifen Oozyten nach der Eizellgewinnung widerspiegelt.

Die Eizellreifung, -gewinnung und –fertilisation erfolgt im humanen IVF-Programm also unter höchst artifiziellen Bedingungen, wobei sich eine Vielzahl klinischer Parameter potenziell auf die Oozytenqualität auswirken.

Bisher sind keine Untersuchungen erschienen, die sich explizit mit der Bedeutung der Zona pellucida-Struktur lebender humaner Eizellen unter dem Aspekt der Oozytenqualität befasst haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, Zusammenhänge zwischen diesen klinischen Parametern und der Oozytenqualität aufzuzeigen. Dabei soll eine bisher kaum beschriebene Eigenschaft der inneren Schicht der Zona pellucida, ihr Erscheinungsbild im polarisierten Licht und damit ihre Struktur als neuer Parameter der Oozytenqualität etabliert werden.

Besonderes Augenmerk wird dabei sowohl auf die Betrachtung der Zonastruktur von Oozyten verschiedener Patienten („Interkohortenanalyse“) als auch auf die Varianz zwischen den Eizellen einer Patientin innerhalb eines IVF-Zyklus („Intrakohortenanalyse“) gelegt. Die Intrakohortenvarianz ist dabei von besonderer Bedeutung, soll die Retardanceanalyse in der In-vitro-Fertilisation Kriterien zur

Auswahl von Oozyten mit hohem Entwicklungspotenzial aus einer Eizellkohorte liefern. Nur durch ihre Betrachtung ist es möglich, Abstufungen der Qualität von Oozyten einer Kohorte zu erkennen.

## 2. Zielsetzung

Die Berücksichtigung der Oozytenqualität bei der Identifizierung von Oozyten bzw. Zygoten mit hohem Entwicklungs- und Implantationspotenzial spielt in der humanen In-vitro-Fertilisation im Gegensatz zur morphologischen Beurteilung von Zygoten bzw. Embryonen bisher eine eher untergeordnete Rolle.

Dies ist darauf zurückzuführen, dass mittels der üblicherweise in der In-vitro-Fertilisation zur Anwendung kommenden konventionellen Lichtmikroskopie lediglich grobe morphologische Anomalien hauptsächlich des Zytoplasmas oder der Polkörper reifer Oozyten erkannt werden können. Aussagen über Unterschiede im Entwicklungspotenzial von in der Lichtmikroskopie morphologisch unauffällig erscheinenden Oozyten können bislang nicht getroffen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher,

1. mittels der Untersuchung und Quantifizierung der doppelbrechenden Eigenschaften der inneren Schicht der Zona pellucida im zirkulär polarisierten Licht einen neuen morphologischen Parameter zur Beschreibung von Oozyten etablieren,
2. zu überprüfen, ob dieser neue Parameter mit
  - üblicherweise in der In-vitro-Fertilisation lichtmikroskopisch erfassten morphologischen Parametern der Oozyten-, Zygoten- und Embryoqualität,
  - mit Behandlungsparametern eines IVF-Behandlungszyklus (verwendete Gonadotropindosen, verwendete Präparate),
  - mit patientenabhängigen Parametern (Alter, BMI),
  - sowie mit der Schwangerschaftsrate in den untersuchten IVF-Zyklen

in Zusammenhang zu bringen ist.

### **3. Schrifttum**

#### **3.1 Physiologische Grundlagen**

##### **3.1.1 Oogenese**

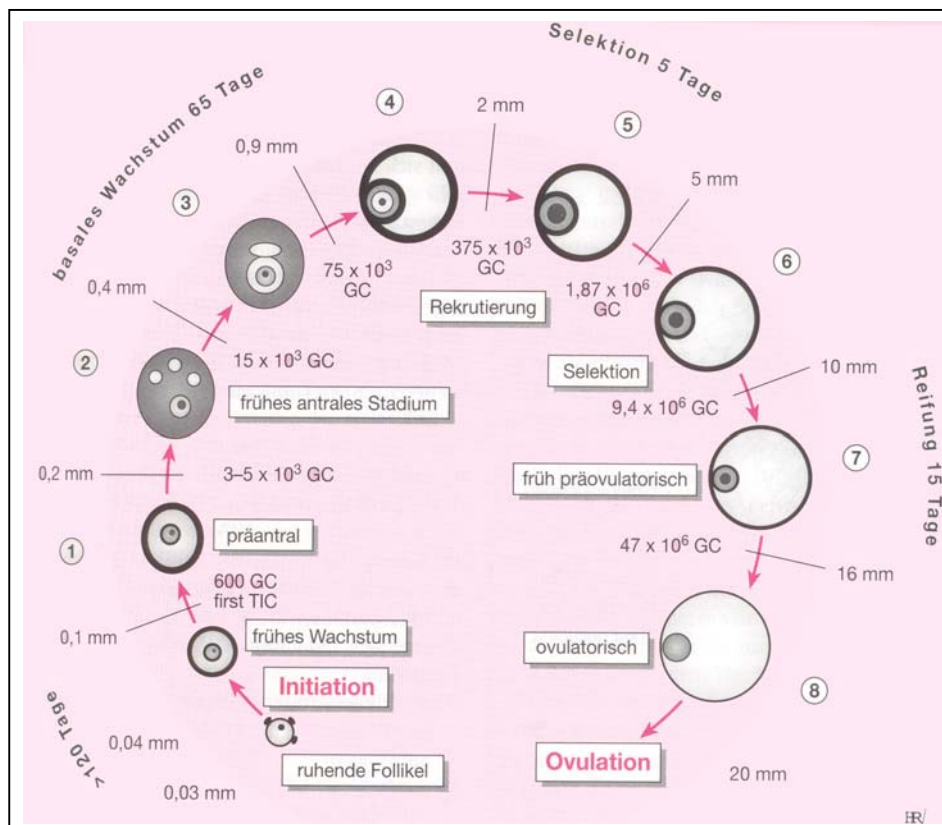
Die Entwicklung weiblicher Keimzellen beginnt bereits früh im Embryonalstadium. Zunächst wandern bereits um den 24. Tag der Embryonalentwicklung Urkeimzellen in die Gonadenanlage hinein. Diese Zellen durchlaufen mehrfache mitotische Teilungen, wobei sie sich über das Stadium der Oogonien zu Oozyten differenzieren. Die Vermehrungsphase der Oogonien ist im 5. Fetalmonat abgeschlossen. Zwischen die nunmehr vorliegenden Oozyten wandern Granulosazellen ein. Sie umhüllen die Oozyten und bilden mit ihnen zusammen die sogenannten Primordialfollikel. Die Entwicklung der Oozyte arretiert in der Prophase der Meiose 1. Dabei werden zunächst die verschiedenen Prophasestadien durchlaufen (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän), die durch DNA-Replikation und Crossing-over-Ereignisse charakterisiert sind. Im letzten Abschnitt der Prophase 1, dem Diplotän, tritt die Oozyte in eine langandauernde stationäre Phase ein, die auch Diktyotän genannt wird. Mit Eintritt in das Diktyotän bildet sich ein Nukleus heraus, in dem das Genom durch die während der Prophase erfolgte Replikation der Chromosomen tetraploid ( $4n$ ) vorliegt. Es wird in den folgenden Reifeteilungen der Meiose zum haploiden Chromosomensatz reduziert.

Die Entwicklung von Oozyten aus den Oogonien zum Diplotän der Prophase 1 erfolgt nicht synchron, so dass einige aus den Oogonien entstandene Oozyten bereits in die Prophase eintreten können, während sich andere Oogonien noch mitotisch teilen.

Am Ende der Embryonalentwicklung, kurz vor der Geburt, ist die Vermehrungs- und Differenzierungsphase der Oogonien beendet. Es liegen dann ausschließlich Oozyten im Diplotänstadium in den Primordialfollikeln vor.

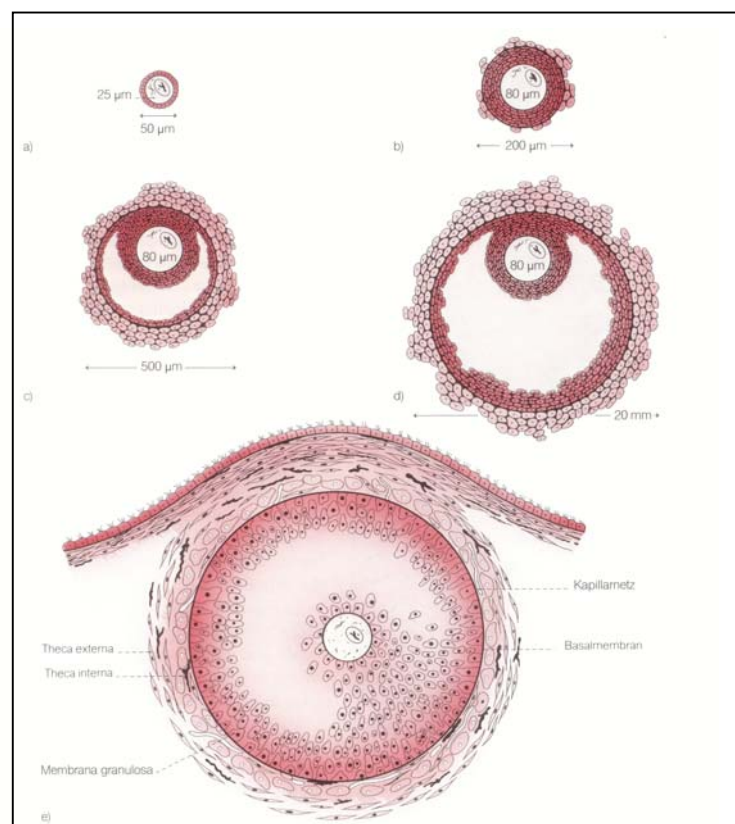
Durch die Differenzierung der Oogonien zu Oozyten steigt die Zahl der Keimzellen zunächst von 600.000 im 2. Embryonalmonat auf etwa sechs Millionen im 5. Embryonalmonat. Bis zur Geburt sinkt die Zahl der Oozyten durch Atresie wieder auf eine Million. In den Jahren nach der Geburt kommt es wiederum zu einer massiven Verringerung der Keimzellzahl, so dass zum Zeitpunkt der Menarche noch etwa 300.000 Oozyten bzw. Primordialfollikel vorhanden sind.

Primordialfollikel können zu jedem Zeitpunkt des Lebens in die Wachstumsphase übergehen. Vorpubertär degenerieren diese Follikel jedoch unter dem Einfluss niedriger Gonadotropinkonzentrationen. Nach der Pubertät treten in jedem Zyklus etwa 1000 Primordialfollikel in die Wachstumsphase ein, aus denen beim Menschen einer zum dominanten Follikel selektiert wird, der zur Ovulation gelangt (Abb. 2). Durch die Rekrutierung der Primordialfollikel im Zyklus nimmt ihre Anzahl mit zunehmendem Alter der Frau ab, bis zum Zeitpunkt der Menopause nur noch wenige 100 Primordialfollikel vorhanden sind.



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Rekrutierung eines Follikels.  
Quelle: Bender, Diedrich & Künzel 2001

Die Wachstumsphase des Follikels ist durch eine Größenzunahme der Oozyte und die Proliferation der Granulosazellen gekennzeichnet. In diesem frühen Stadium wird auch bereits die Zona pellucida gebildet. Die Oozyte ist im Primordialfollikel noch von einer einschichtigen Lage kubischer Granulosazellen umgeben. Das darauffolgende Entwicklungsstadium des Sekundärfollikels ist durch eine Proliferation der Granulosazellen und der Differenzierung der äußeren Zellschicht in die Thekaschicht gekennzeichnet. Im Tertiärfollikel bildet sich ein Hohlraum in der Thekaschicht, die Follikelhöhle (Antrum). Sie wird von Zellen der Theka interna (innen) und der Theka externa (außen) ausgekleidet. Die Theka interna ist ein endokrin aktives Gewebe und ein wichtiger Ort der Östrogensynthese. Die Granulosazellen, die die Oozyte umschließen, bilden den Cumulus oophorus. Die Zellen des Cumulus, die die Oozyte direkt umgeben, werden Corona radiata genannt. Sie stehen über zytoplasmatische Ausläufer, die die Zona pellucida durchziehen, mit der Oozyte über Gap junctions in Verbindung.

**Abb. 3**

Schematische Darstellung der verschiedenen Follikel.  
a) Primärfollikel mit Oozyte b) Sekundärfollikel c) Tertiärfollikel d) präovulatorischer Follikel, e) Vergrößerung eines präovulatorischen Follikels; Quelle: Bender, Diedrich & Künzel 2001



### 3.1.2 Endokrinologie

Primordialfollikel können zu jedem Zeitpunkt in die Wachstumsphase übergehen. Somit liegen immer Follikel aller Entwicklungsstadien im Ovar vor. Die meisten in der Wachstumsphase befindlichen Follikel degenerieren jedoch.

Die Selektion des Follikels, der im darauf folgenden Zyklus zur Ovulation gelangt, erfolgt durch den Anstieg des FSH-Spiegels am Ende der Lutealphase aus den zu diesem Zeitpunkt im Antrumstadium befindlichen Follikeln (etwa 3-20 pro Ovar). Durch eine superphysiologische Erhöhung des FSH-Spiegels können alle Follikel, die sich in diesem Reifestadium befinden, zu ovulatorischen Follikeln selektiert werden, eine Gelegenheit, die man sich in der In-vitro-Fertilisation zunutze macht.

Der Durchmesser des zur Ovulation selektierten, heranreifenden Follikels nimmt durch Flüssigkeitsvermehrung im Antrum von etwa 5mm auf 20 mm zu. Die Anzahl der Granulosazellen verzehnfacht sich auf 50-100 Millionen.

Präovulatorisch steigt der LH-Spiegel drastisch an, begleitet von einem geringeren Anstieg des FSH-Spiegels, wobei der LH-Anstieg sowohl für die Ruptur des auf etwa 22 mm angewachsenen Follikels und die Freisetzung der Oozyte mit dem sie umgebenden Cumulus oophorus als auch für die Wiederaufnahme der meiotischen Reifeteilungen verantwortlich ist. Der Anstieg des LH-Spiegels unterliegt einem positiven Rückkopplungsmechanismus mit dem von den Granulosazellen des ovulatorischen Follikels produzierten Östradiol, der Follikel stellt somit die eigene Ovulation sicher.

Erst durch den Anstieg des LH-Spiegels tritt die nach wie vor tetraploide Oozyte ( $4n$ ) aus der Prophase 1 in die weiteren Stadien der meiotischen Reifeteilungen ein. Zunächst wird die Metaphase 1 durchlaufen, in der die Chromosomen sich als Homologenpaare in der Äquatorialebene anordnen. In der Anaphase I werden die homologen Chromosomen voneinander getrennt. Dadurch erhalten die Tochterzellen jeweils einen vollständigen Satz von Chromosomen, deren Herkunft von der Mutter oder dem Vater zufällig ist. Da jedes Chromosom aus zwei Chromatiden besteht, liegt die DNA in jeder Tochterzelle doppelt vor ( $2n$ ).

Als Tochterzellen entstehen die sekundäre Oozyte und der viel kleinere 1. Polkörper. Jetzt tritt die Oozyte in die zweite Reifeteilung (Meiose II) ein. Die Kernmembran löst sich auf, die Chromosomen kondensieren (Prophase II) und ordnen sich nach Bildung einer Teilungsspindel in der Metaphaseplatte an (Metaphase II). Die in

diesem Stadium fertilisierbare sekundäre Oozyte verharret in dieser Phase, bis es zur Befruchtung durch ein Spermatozoon kommt. Nach dem Eindringen des Spermatozoons in die Eizelle erfolgt die Trennung der Chromatiden in der Anaphase II. Dadurch entsteht der 2. Polkörper und die Eizelle enthält jetzt (wie auch der 2. Polkörper) einen haploiden Chromosomensatz (1n), der nun den weiblichen Vorkern bildet.

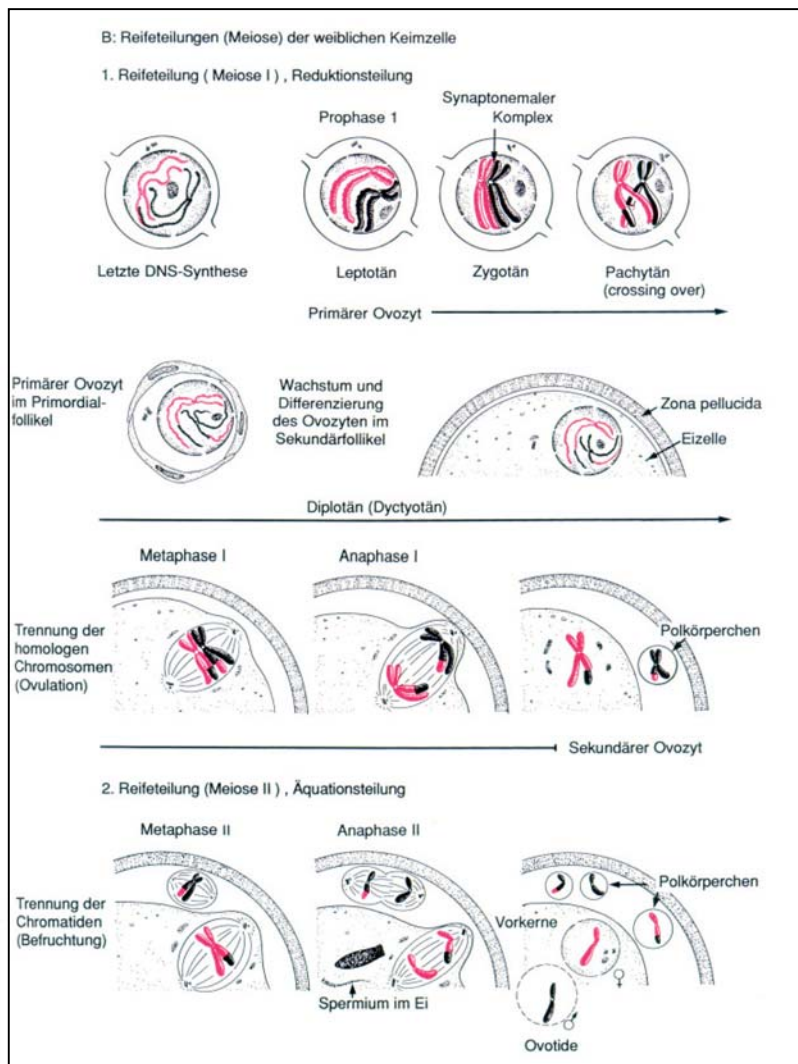


Abb. 4

Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Meiose.  
Quelle: Sinowatz und Rüsse, 1998

### 3.1.3 Zona pellucida

Eine parazelluläre Struktur, die sowohl die wachsende als auch die ausgereifte Oozyte umschließt und damit räumlich und ontogenetisch eng mit ihr assoziiert ist, ist die Zona pellucida. Die beim Menschen etwa 13-16 µm dicke Zona pellucida bindet und aktiviert die Spermatozoen, die wiederum die Zona penetrieren müssen, um mit der Plasmamembran der Oozyte verschmelzen zu können. Diese Verschmelzung löst die sogenannte Rindenreaktion aus, bei der sekretorische Vesikel exozytotisch in Perivitellinspalt entleert werden. Dies bewirkt eine Veränderung der Zonastruktur, die damit nach dem Eindringen eines Spermatozoons eine Polyspermie verhindert. Im Verlauf der frühembryonalen Entwicklung schützt die Zona den sich mitotisch teilenden Embryo auf der Passage von den Tuben in den Uterus. Voraussetzung für die Implantation des Embryos im Blastozystenstadium ist das Ausschlüpfen des Embryos aus der Zona pellucida („hatching“).

Die Zona pellucida vieler Säugeroozyten ist, die humane Zona eingeschlossen (BERCEGEAY ET AL. 1995), aus drei Glykoproteinfamilien aufgebaut (ZP1, ZP 2, ZP3), die zusammen ein kompliziertes, dreidimensionales fibrogranulares Netzwerk bilden (WASSARMAN AND MORTILLO 1991, WASSARMAN ET AL. 1999, FAMILIARI ET AL. 1992, GREEN 1997). Die Zona ist in vielen Spezies in mehrere Lagen aufgeteilt (BARANSKA ET AL. 1975), deren äußere und innere Lagen sich, wie in Zonae von Hamsteroozyten durch Verwendung von Lectinen und ZP-Protein-Antikörpern nachgewiesen werden konnte (AHUJA UND BOLWELL 1983, SHALGI UND RAZ 1997), spezifisch in ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

Die Entwicklung der Zona beginnt bereits sehr früh in der Follikulogenese (RANKIN ET AL., 2000, ZHAO ET AL., 2002) während der Bildung der Primordialfollikel. Während die Zonaproteine in der Maus ausschließlich von der Oocyte sezerniert werden (EPIFANO 1995, SOYAL 2000), haben beim Menschen wie auch bei anderen Spezies die Granulosazellen ebenfalls einen Anteil an der Synthese der Zonaproteine (SINOWATZ 2001, BOGNER 2004).

Die Zona pellucida-Proteine bilden eine extrazelluläre Matrix, die die Oozyte von den umgebenden Granulosazellen trennt. Sowohl Oozyte als auch Granulosazellen bilden jedoch Fortsätze durch die Zona hindurch. An den Enden dieser Fortsätze wird der Zellkontakt mittels Gap junctions aufrechterhalten (EPPIG 1991). Während

des Reifungsprozesses der Oozyte ereignen sich charakteristische Veränderungen der Zonastruktur (EPPIG 2001).

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung erscheint die Zona pellucida normalerweise transparent und homogen. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie lassen sich jedoch in der homogenen Zona drei konzentrische Schichten unterscheiden (KEEFE ET AL. 1997, PELLETIER ET AL., 2004, SHEN ET AL. 2005).

Die physikalische Grundlage der Polarisationsmikroskopie ist die Änderung der Ebene polarisierten Lichts beim Durchgang durch kristalline und parakristalline Strukturen. Das Ausmaß der Ebenenverschiebung kann als sogenannter Retardancewert beschrieben werden, der somit einen quantitativen Parameter der Dichte und dreidimensionalen Zusammensetzung der betrachteten Struktur darstellt.

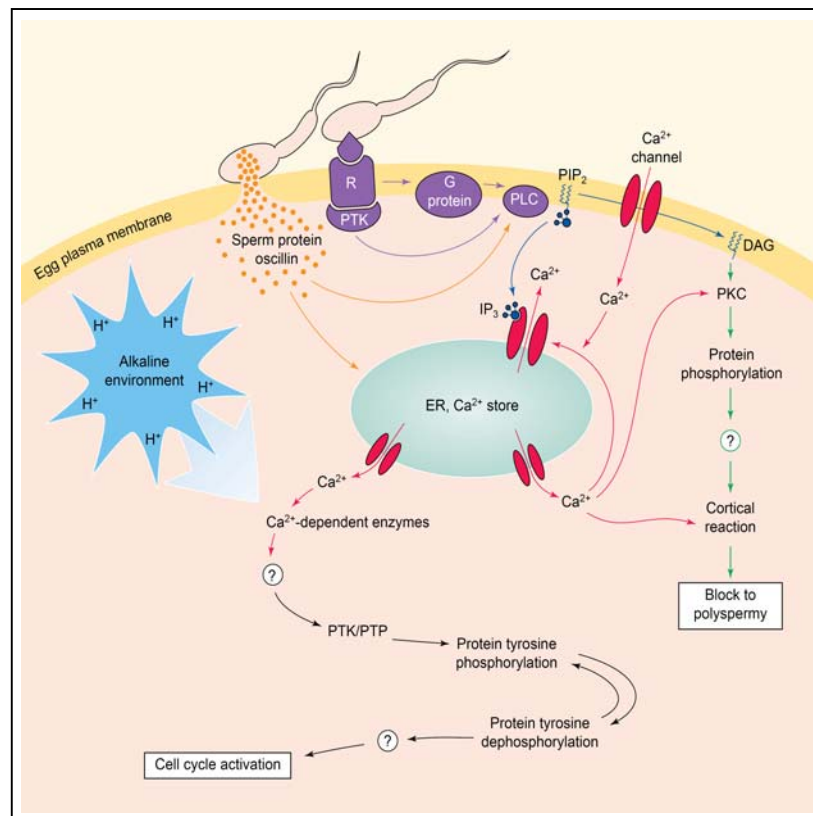
Die innere, dem Oolemma am nächsten gelegene Schicht zeigt normalerweise die höchste Retardance, gefolgt von der äußersten Schicht. Die dazwischen befindliche, mittlere Schicht hat üblicherweise eine sehr niedrige Retardance.

Die optische Retardance korreliert mit der Struktur der Zona und liefert damit einen weiteren bisher wenig bekannten Parameter der Zona pellucida-Morphologie.

### **3.1.4 Die Vorgänge bei der Fertilisierung**

Circa 30-45 Minuten nach der Ovulation erreichen die Eizellen den Übergang von der Eileiterampulle zum Isthmus, wo die Befruchtung stattfindet. Spermatozoen können direkt nach der Ejakulation Oozyten nicht fertilisieren, sie müssen sich zunächst einige Zeit im weiblichen Genitaltrakt aufhalten, um ihre Befruchtungsfähigkeit zu erlangen. Diesen Prozess, bei dem es neben der Entfernung bestimmter Bestandteile des Seminalplasmas vom Spermatozoon auch zu Veränderungen seiner Zellmembran kommt, wird Kapazitation genannt. Die Kapazitation ist ein für den nachfolgenden Ablauf der Akrosomreaktion unabdingbarer Prozess. Diese wird durch den Kontakt des Spermiums mit der Zona pellucida ausgelöst und bewirkt eine Freisetzung akrosomaler Enzyme, die ein Eindringen in die Zona ermöglichen. Nach dem Durchdringen der Zona pellucida lagert sich das Spermium mit der Längsfläche seines Kopfes parallel zur Eizellmembran an, wobei zunächst nur der postakrosomale Teil des Spermienkopfes in Kontakt mit den Mikrovilli der Eizelle tritt

(SINOWATZ 1999). Man geht davon aus, dass das Spermium dabei an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet. Dadurch aktiviert dieser Rezeptor die an ihn gebundene Phospholipase C (PLC), die wiederum Phosphatidylinositolbiphosphat aktiviert (SAUNDERS ET AL. 2002). Dadurch werden Mechanismen in Gang gesetzt, die zum Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Eizelle führen. Auch wird Calcium aus den intrazellulären Speichern des Endoplasmatischen Retikulums freigesetzt (Abb. 5, BEN-YOSEF UND SHALGI 1998). Dieser Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration im Zytoplasma läuft in Oszillationen ab, die bis zu 70 Minuten nach dem ersten Kontakt des Spermiums mit der Oozyte anhalten können (PARRINGTON ET AL. 1996). Auf diese Weise wird unter anderem durch Ausschüttung der kortikalen Granula der Polyspermieblock ausgelöst (SINOWATZ 1999). Weiterhin wird über calciumabhängige Enzyme und Protein-Tyrosin-Phosphatasen der Zellzyklus aktiviert, was dann die Fortsetzung der zweiten meiotischen Reifeteilung ermöglicht. In der Eizelle entstehen dann sowohl ein männlicher als auch ein weiblicher haploider Vorkern. Beide Vorkerne bewegen sich anschließend aufeinander zu und verschmelzen etwa 20-24 Stunden nach dem Eindringen des Spermatozoons in das Ooplasma miteinander. Da die DNA beider Vorkerne schon während der Dekondensation verdoppelt wurde, können sich die mütterlichen und väterlichen Chromosomen sogleich in der Äquatorialebene der Teilungsspindel anordnen und in die Prophase der ersten mitotischen Teilung übergehen (SINOWATZ 1999).



**Abb. 5** Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Fertilisierung.  
Quelle: Ben Yosef und Shalgi 1998

### 3.1.5 Frühe Embryonalentwicklung und Implantation

Fertilisierung und die ersten mitotischen Teilungen des frühen Embryos erfolgen in der Tube, wobei sich die Anzahl der Blastomeren im Zeitraum von 5-6 Tagen über 30-60 (Morulastadium) auf etwa 130 (Blastozystenstadium) erhöht. Eine Differenzierung der Blastomeren in einen Embryo- und einen Trophoblasten beginnt bereits zwischen dem 8- und dem 16-Zellstadium. Am Tag 4 nach der Fertilisierung gelangt der Embryo durch den Schlag der tubaren Zilien und durch Kontraktionen der Tubenmuskulatur in das Cavum Uteri, wo er etwa 2 Tage frei verbleibt und eine Weiterentwicklung zum Blastozystenstadium erfolgt. Dieses Stadium ist durch die deutlich erkennbare Differenzierung in die äußeren Trophoblastenzellen und die im Inneren der flüssigkeitsgefüllten Blastozystenhöhle liegenden Zellen des Embryoblasten gekennzeichnet. Im weiteren Entwicklungsverlauf nimmt das Volumen des Embryos durch weitere Zellteilungen und Erhöhung des Flüssigkeitsvolumens in der Blastozystenhöhle deutlich zu (expandierte Blastozyste). Zu diesem Zeitpunkt muss die Blastozyste aus der sie noch immer umgebenden,

durch die Größenzunahme des Embryos gedehnte Zona pellucida ausschlüpfen, um in die uterine Schleimhaut implantieren zu können.

Die Implantation des Embryos in die Uterusschleimhaut ist ein komplexer Prozess, der sowohl durch die Blastozyste als auch von der Endometriumoberfläche gesteuert wird (GALAN ET AL. 2000, GONZALEZ ET AL. 2000). Sie beginnt mit dem Einwachsen des Trophoblasten in Zwischenräume des Endometriumepithels, die durch proteolytische und apoptoseinduzierende Aktivitäten der Blastozyste erzeugt werden. Der Trophoblast differenziert sich in den Synzytiotrophoblasten, der vielkernig und ohne erkennbare Zellgrenzen in das Uterusstroma vordringt und den die Blastozyste umgebenden Zytotrophoblasten. Am neunten Tag entstehen im Synzytiotrophoblasten Lakunen, die mit mütterlichem Blut aus eröffneten Kapillare gefüllt sind und die Versorgung des Embryos sicherstellen.

### 3.2 Grundlagen der assistierten Reproduktion

#### 3.2.1 Allgemeines

Als Beginn der In-vitro-Fertilisation beim Menschen wird allgemein die Geburt von Louise Brown als erstes außerhalb des mütterlichen Körpers gezeugten Kindes 1978 in Großbritannien erachtet (STEPTOE AND EDWARDS 1978).

Vorangegangen waren seit dem Beginn der 1960er Jahre umfangreiche zytogenetische Untersuchungen zur Eizellreife durch Edwards. Ursprünglich entwickelt, um eine Therapie der tubaren Infertilität der Frau zu ermöglichen, haben sich die Indikationen bis heute stark erweitert. (Abb. 6):

Indikation		Normal	%	eingeschr. Spermioigr.	%	Path. Funktionstest	%	Sonstige	%	Summe	%		
IVF	Frau												
	Mann												
	Indikation												
	Normal	1140	10,03	1261	11,10	56	0,49	77	0,68	2534	22,30		
	Tubenpath.	2905	25,56	1460	12,85	110	0,97	173	1,52	4648	40,90		
	Endometr.	656	5,77	382	3,36	25	0,22	55	0,48	1118	9,84		
	Hyperandrog./PCO	253	2,23	220	1,94	3	0,03	29	0,26	505	4,44		
	path. Zyklus	389	3,42	372	3,27	48	0,42	30	0,26	839	7,38		
	Path. Zervixfaktor	20	0,18	36	0,32	0	0,00	8	0,07	64	0,56		
	psychog. Faktoren	9	0,08	8	0,07	0	0,00	0	0,00	17	0,15		
Sonstige*	506	4,45	545	4,80	36	0,32	347	3,05	1434	12,62			
Keine Angaben	68	0,60	93	0,82	1	0,01	43	0,38	205	1,80			
Summe	5946	52,32	4377	38,52	279	2,46	762	6,71	11364	100,00			
ICSI	Frau												
	Mann												
	Indikation												
	Normal	665	2,78	9928	41,47	753	3,15	276	1,15	633	2,64	12255	51,19
	Tubenpath.	673	2,81	2021	8,44	41	0,17	71	0,30	117	0,49	2923	12,21
	Endometr.	210	0,88	1036	4,33	37	0,15	41	0,17	78	0,33	1402	5,86
	Hyperandrog./PCO	103	0,43	995	4,16	47	0,20	7	0,03	55	0,23	1207	5,04
	path. Zyklus	143	0,60	1524	6,37	56	0,23	59	0,25	51	0,21	1833	7,66
	Path. Zervixfaktor	14	0,06	70	0,29	3	0,01	1	0,00	10	0,04	98	0,41
	psychog. Faktoren	6	0,03	15	0,06	1	0,00	0	0,00	1	0,00	23	0,10
Sonstige*	203	0,85	2611	10,91	99	0,41	69	0,29	546	2,28	3528	14,74	
Keine Angaben	35	0,15	441	1,84	18	0,08	12	0,05	167	0,70	673	2,81	
Summe	2052	8,57	18641	77,86	1055	4,41	536	2,24	1658	6,93	23942	100,00	

\*) Hier ist auch die Indikation "Sperma-Antikörper" eingeschlossen

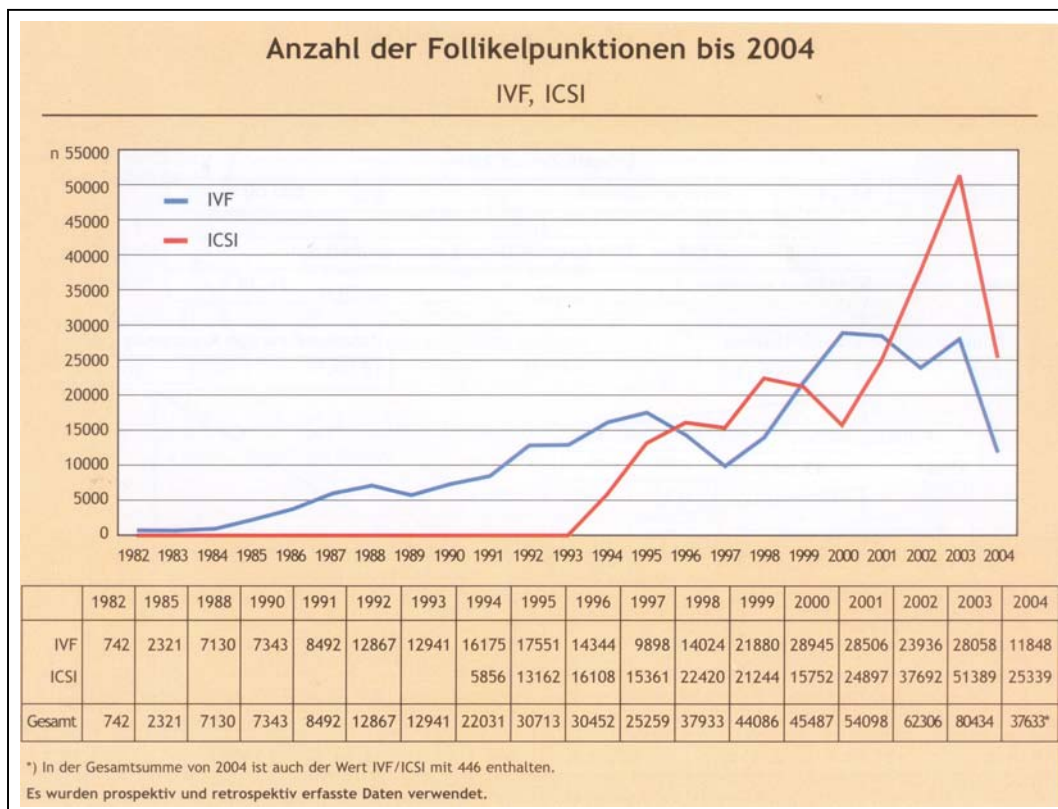
Es wurden nur prospektiv erfasste Daten verwendet.

**Abb. 6:** Indikationsverteilung für IVF/ICSI-Behandlungen im Jahr 2004 in Deutschland  
Quelle: DIR-Jahrbuch 2004

Bis zum Jahr 2003 sind weltweit mehr als eine Million Kinder nach In-vitro-Fertilisation zur Welt gekommen (POWELL 2003). In Deutschland stieg die Zahl der Follikelpunktionen für IVF/ICSI von 742 im Jahr 1982 auf 80434 im Jahr 2003. 2004



kam es durch Änderungen der Kostenübernahme durch die Krankenkassen zu einem Abfall der Behandlungszahlen auf 37633 Behandlungszyklen (Abb. 7):



**Abb. 7** Anzahl der Follikelpunktionen für IVF/ICSI-Behandlungen in Deutschland 1982-2004  
Quelle: DIR-Jahrbuch 2004

### 3.2.2 Ovarielle Stimulation

Obwohl das erste sogenannte Retortenbaby, Louise Brown, einem unstimulierten Spontanzklus entstammt, ist die ovarielle Hyperstimulation durch applizierte Gonadotropingaben aus der routinemäßigen In-vitro-Fertilisation heute kaum noch wegzudenken. Um in der assistierten Reproduktion akzeptable Behandlungsergebnisse zu erreichen, ist das Vorliegen mehrerer fertilisierbarer Oozyten unabdingbar. Als Gründe dafür sind zu nennen, dass nicht aus jedem Follikel auch eine Oocyte gewonnen werden kann, dass die Fertilisationsrate von Oozyten in vitro nur bei etwa 50-60% liegt und dass die Implantationsrate der in-vitro gezeugten Embryonen vermutlich nur etwa ein Drittel der in-vivo entstandenen Embryonen beträgt, was eine Qualitätsauswahl auf Basis mehrerer fertilisierter Oozyten und den Transfer meist mehrerer Embryonen erforderlich macht.

Die Entdeckung einer Substanz im Urin schwangerer Frauen, die die gleiche Wirkung aufwies wie die gonadotropen Faktoren des Hypophysenvorderlappens durch Aschheim und Zondek 1927 stand am Beginn des Verständnisses der hypophysären-ovariellen Achse. 1930 fand Zondek Gonadotrophine ebenfalls im Urin postmenopausaler Frauen. Erst 1947 gelang es Piero Donini im pharmazeutischen Institut der Firma Serono, humanes menopausales Gonadotrophin aus Urin aufzureinigen, welches ab dem Jahr 1950 als Pergonal<sup>®</sup> vermarktet wurde. 1961 kam das erste Baby nach Behandlung einer sekundären Amenorrhoe mit Pergonal<sup>®</sup> zur Welt.

Humanes menopausales Gonadotrophin (hmG) enthält sowohl FSH als auch LH-Aktivität. Mit dem Einsatz verbesserter Aufreinigungsmethoden durch spezifische Antikörper gelang es, FSH und LH-Aktivitäten voneinander zu trennen. Heute existieren sowohl hochaufgereinigte urinaire Präparate als auch gentechnisch erzeugte reine FSH bzw. LH-Präparate nebeneinander.

### **3.2.3 IVF/ICSI**

Nachdem zunächst gezeigt werden konnte, dass die IVF eine effiziente Behandlungsmethode bei weiblicher Infertilität, und hier vor allem bei tubarer Infertilität (EDWARDS ET AL. 1980) ist, wurde sie seit den frühen 1980er Jahren ebenfalls zur Therapie männlicher Subfertilität eingesetzt (MAHADEVAN ET AL. 1983). Allerdings waren die Therapieresultate deutlich schlechter, wenn die männlichen Partner starke Einschränkungen der Spermienparameter Konzentration, Morphologie und Motilität aufwiesen (TOURNAYE 1992). Deshalb wurden Ende der 1980er Jahre neue Techniken entwickelt, denen das gemeinsame Prinzip zu Grunde lag, die Spermatozoen in die unmittelbare Nähe des Oolemmas zu bringen. Das partielle Eröffnen der Zona pellucida (partielle Zonadissektion, PZD) erwies sich als ungeeignet, die Fertilisierungsrate konsistent und reproduzierbar zu erhöhen. Bei der subzonalen Insemination (SUZI) wurden mittels Mikromanipulation einige motile Spermatozoen durch die Zona pellucida in den Perivitellinspalt injiziert. SUZI führte recht zuverlässig zu einer Befruchtungsrate von etwa 20%. Damit lag diese Technik immer noch weit hinter der konventionellen IVF zurück, bei der Fertilisierungsraten von ca. 80% der fertilisierbaren, reifen Oozyten erreicht werden.

Als Meilenstein in der assistierten Reproduktion beim Menschen kann die Einführung der Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) durch Palermo 1992 gelten (PALERMO ET AL. 1992), die selbst bei erheblich eingeschränkten Spermioogrammen durch Injektion eines einzelnen Spermatozoons in die Oozyte eine Fertilisierung ermöglicht. Kurz nach Einführung der ICSI mit ejakulierten Spermatozoen gelangen ebenfalls Fertilisierungen nach der Injektion testikulärer (CRAFT ET AL. 1993, SCHOYSMAN ET AL. 1993) und epididymaler (DEVROEYE 1995) Spermatozoen.

### **3.2.4 Kryokonservierung**

Die Möglichkeit, Gameten außerhalb des Körpers zu lagern und dabei vital und funktionell zu erhalten, ist in der modernen IVF von wesentlicher Bedeutung. Sowohl Spermatozoen und Hodengewebe als auch Ovargewebe, Oozyten, Pronucleusstadien und Embryonen werden routinemäßig der Lagerung bei Tieftemperaturen zugeführt.

Ermöglicht wurde dies durch bereits in den 1950er Jahren begonnene Forschungen im Tiermodell. Polge et al. gelang es erstmals, Spermatozoen des Huhns nach Exposition sehr niedriger Temperaturen in einem vitalen Zustand zu erhalten (POLGE ET AL. 1949). Nur wenige Jahre später konnte erstmals ovarielles Gewebe von Mäusen bei Erhalt der Vitalität kryokonserviert werden (DEANESLY 1954, PARROT 1960).

Auch Versuche zur Kryokonservierung unfertilisierter Oozyten wurden bereits 1952 durchgeführt (SMITH 1952). Trotzdem Schwangerschaften mit kryokonservierten, nach dem Auftauen fertilisierten Oozyten beim Menschen erzielt werden konnten (CHEN 1986, VAN UEM ET AL. 1987), wurde die Kryokonservierung unfertilisierter Oozyten aufgrund niedriger Überlebens-, Fertilisierungs- und Implantationsraten lange Zeit nicht routinemäßig durchgeführt. Erst in jüngerer Zeit ist dieses Thema wieder Gegenstand erhöhter Aufmerksamkeit, kann allerdings immer noch nicht als Routinemethode bezeichnet werden.

Zu Beginn der 1970er Jahre wurden zuverlässige Kryoprotektiva entwickelt, die die Kryokonservierung von Mäuse- und Schafembryonen zuließen (WHITTINGHAM ET AL. 1972, WILMUT 1972, WILLADSEN 1977). 1983 gelang die erste Schwangerschaft beim Menschen durch den Transfer eines achtzelligen Embryos nach Kryokonservierung (TROUNSON 1983), zwei Jahre später wurde die erste Schwangerschaft nach Transfer eines kryokonservierten Embryos im Blastozystenstadium erzielt (COHEN ET AL. 1985).

## 4. Material und Methoden

### 4.1 *Verwendete Materialien, Reagenzien und Geräte*

Access (Microsoft, USA)

Aspirationsset für die Follikelpunktion (Gynetics, Belgien)

Brutschrank C200 (Labotect, Deutschland)

Embryotransferkatheter (Cook, USA)

Excel (Microsoft, USA)

Glaspasteurpipetten, 230 mm, (WU Mainz, Deutschland)

Haltekapillare für ICSI (Microtech, Tschechische Republik)

HTF-Medium, HEPES-gepuffert, mit Gentamycin (Cambrex, Belgien)

HTF-Medium, NaHCO<sub>3</sub>-gepuffert, mit Gentamycin (Cambrex, Belgien)

Humanes Serumalbumin (HSA, 20%, Behring, Deutschland)

Hyaluronidase (Sigma, Deutschland)

Injektionskapillare für ICSI (Microtech, Tschechische Republik)

Labormikroskop CH2 (Olympus, Japan)

Laborzentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus, Deutschland)

Maklerkammer (SEFI Medical Instruments, Israel)

Migration-Sedimentation-Kammern (Research Instruments, UK)

Mikromanipulator (Narishige, Japan)

Mikropipetten mit Spitzen, 1-10µl, 10-100µl (Eppendorf, Deutschland)

Petrischale (Ø 60 mm, Falcon 351016, Becton Dickinson, UK)

Petrischale mit Glasboden (Willco, USA)

Polscope™-Einheit (CRI, USA)

Polyvinylpyrrolidon, 10% (Medicult, Dänemark)

Pumpe für die Follikelpunktion (Labotect, Deutschland)

Rundbodenröhrchen, 14 ml (Falcon 352057, Becton Dickinson, UK)

Umkehrmikroskop TE2000-S (Nikon, Japan)

Universal IVF-Medium (Medicult, Dänemark)

Stereomikroskop SZ 40 (Olympus, Japan)

Ultraschallgerät RTX 400 für die Follikelpunktion (GE Medical Systems, Frankreich)

4-Well-Dish (Nunc, Dänemark)  
Vortex-Mischer (IKA, Deutschland)  
Wärmeplatte (Medax, Deutschland)  
Wasserbad (Julabo, Deutschland)  
2-Phasen-Dichtegradient (Sil Select)

## **4.2 Oozyten**

### **4.2.1 Oozytengewinnung und –aufbereitung**

Die Eizellentnahme erfolgte 36-38 Stunden nach subkutaner Injektion von 10000 IU hCG unter Analgosedierung mit Propofol.

Der Follikelinhalt wurde durch transvaginale, sonografisch kontrollierte (GE Medical Systems, Frankreich) Punktion der Follikel mittels einer Vakuumpumpe (Labotect, Deutschland) in ein Rundbodenröhrchen (Becton Dickinson, UK) abgesaugt (Abb. 8). Ein Spülen des Follikels erfolgte gegebenenfalls mit etwa 5 ml auf 37 Grad Celsius vorgewärmten HTF-HEPES-Medium (Cambrex, Belgien).

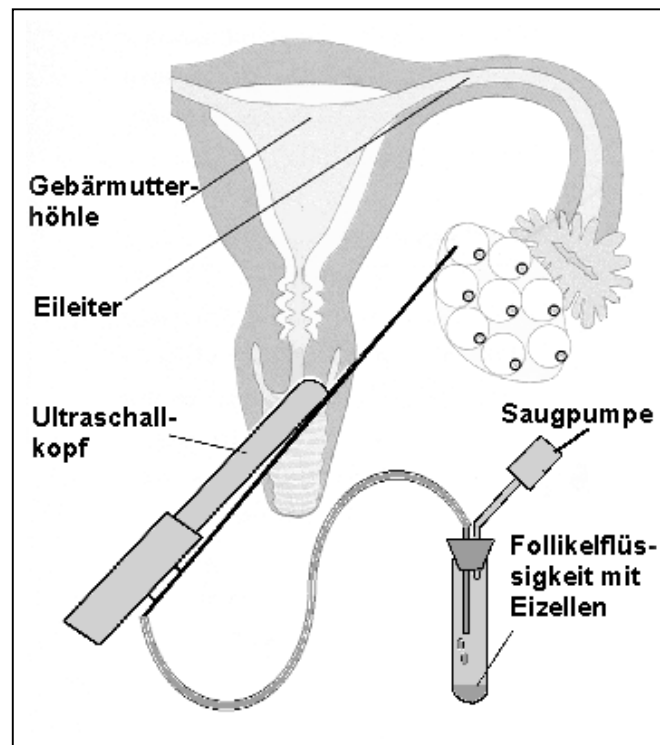
In der Regel erfolgte die mikroskopischen Untersuchung auf das Vorhandensein von Oozyten sofort, bei Verzögerungen von ein bis zwei Minuten wurde das Rundbodenröhrchen mit dem Aspirat in einem Aluminiumblock bei 37 Grad Celsius aufbewahrt. Anschließend wurden das Punktat in einem Plastikpetrischälchen (Becton Dickinson, UK) bei 10-15facher Vergrößerung mit einem Stereomikroskop ausgewertet. Die Oozyten wurden makroskopisch an den Zellen des Cumulus oophorus (Granulosazellen), der mehrere Millimeter groß sein kann, identifiziert. Der Kumulus erscheint, anders als andere sich im Punktat befindende Zellverbände, durchscheinend hell. Eine mikroskopische Kontrolle des Kumuluszellverbandes auf das Vorhandensein einer Oozyte erfolgte bei einer sechzig- bis hundertfachen Vergrößerung. Die aufgefundenen Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden in einer Petrischale in 37 Grad Celsius warmen HTF-HEPES-Medium in einem Aluminiumblock auf einer Wärmeplatte (Medax, Deutschland) bis zum Ende der Follikelpunktion gesammelt.

Nach dem Ende der Punktion erfolgte eine Wäsche der gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe in 37 Grad warmen mit Natriumhydrogencarbonat gepuffertem HTF ohne HEPES (Cambrex, Belgien).

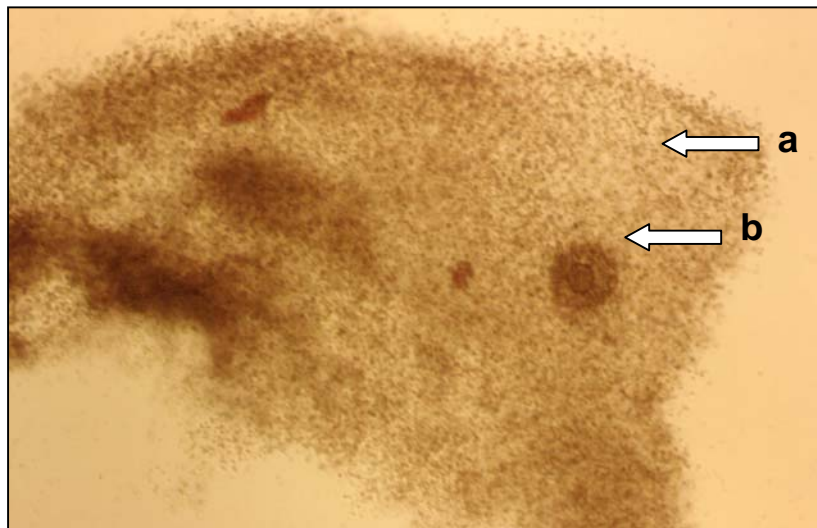
Direkt anschließend wurden die Oozyten aus dem Kumulus-Oozytenkomplex isoliert (Denudierung). Dazu erfolgte die mechanische Dispersion der Kumuluszellen in 80 IU / ml Hyaluronidase/HTF-HEPES (Sigma, Deutschland) durch mehrfaches Pipettieren mit einer zu einem engem Lumen (300-400 µm) ausgezogenen Glaspasteurpipette (WU Mainz, Deutschland). Die Zellschicht der direkt der Oocyte aufliegenden Corona radiata ist enzymatisch nur schwer auflösbar, sie wurde deshalb durch Pipettieren mit einer Glaspipette mit einem Innendurchmesser von ca. 120 µm mechanisch entfernt.

Die verwendeten Glaspipetten wurden jeweils frisch über einer offenen Flamme zum benötigten Innendurchmesser ausgezogen.

Die denudierten Oozyten wurden anschließend in HTF-HEPES gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in einem 4-well-Schälchen (NUNC) in Standard-IVF-Medium (Medicult, Dänemark) inkubiert. Die PolScope-Untersuchung wurde innerhalb der nächsten zwei Stunden durchgeführt. Die anschließende Insemination mittels ICSI erfolgte im Zeitraum von drei bis fünf Stunden nach der Eizellgewinnung.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der transvaginalen Follikelpunktion



**Abb. 9:** Kumulus-Oozytenkomplex direkt nach Follikelpunktion (x60)  
a) Granulosazellen b) Oocyte mit umliegender Zellschicht der Corona radiata



### **4.3 Spermaanlyse und –aufbereitung**

#### **4.3.1 Spermogramm**

Die Analyse des Ejakulates beinhaltete das Volumen, die Gesamtkonzentration der Spermatozoen, den Anteil der motilen, und immotilen Spermatozoen sowie ihre Morphologie gemäß den WHO-Kriterien 1999 (Tab. 1; Quelle: WHO-Laborbuch 1999, Springer-Verlag). Die Ejakulatanalyse wurde mit Hilfe einer Makler-Kammer (SEFI Medical Instruments, Israel) und einem Standard-Labormikroskop (Olympus, Japan) bei 200facher Vergrößerung durchgeführt. Das Ejakulat wurde nach der Gewinnung zunächst für ca. 15 Minuten bei 37 Celsius im Wasserbad (Julabo, Deutschland) inkubiert und anschließend kräftig gevortext, um es vollständig zu verflüssigen und zu durchmischen. Anschließend wurden 10 µl Ejakulat auf die Maklerkammer gebracht.

Die Spermienzählung erfolgte durch Auszählung von zehn Feldern der Kammer. Waren weniger als 20 Spermatozoen in den zehn Feldern vorhanden, wurden in einem zweiten Durchgang alle 100 Felder der Maklerkammer ausgewertet.

Die Methode zur weiteren Aufbereitung des Ejakulates richtete sich nach dem Ausgangsbefund und hatte eine maximale Ausbeute motiler Spermatozoen zum Ziel (Tab. 2).

**Tab. 1:** WHO-Parameter zur Analyse des Ejakulates (Quelle: WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion, Springer-Verlag, 4. Aufl. 1999)

<u>Volumen</u>	2 - 8 ml	Normozoospermie
	< 2 ml	Hyposemie
	> 8 ml	Hypersemie
<u>Konzentration</u>	> 20 Mio/ml	Normozoospermie
	< 20 Mio/ml	Oligozoospermie
	> 200 Mio/ml	Polyzoospermie
	< 2 Mio/ml	Kryptozoospermie
<u>Morphologie</u>	> 30 % normalgeformt	Normozoospermie
	< 30 % normalgeformt	Teratozoospermie
	(<15% normalgeformt)	Teratozoospermie
<u>Gesamtmotilität</u>	> 50 % beweglich <b>oder</b> mind. 25 % WHO A + B	Normozoospermie
	< 50 % beweglich	Asthenozoospermie
	WHO A	linear progressiv motil (20 – 25 µm/s, entspricht etwa einer halben Flagellenlänge )
	WHO B	mäßig progressiv motil / nicht linear motil
	WHO C	lokal motil (<5 µm/s)
	WHO D	immotil
<b>OAT - Syndrom</b>	< 20 Mio/ml	Oligozoospermie
	< 50 % beweglich	Asthenozoospermie
	< 30 % (15%) normalgeformt	Teratozoospermie
<b>Azoospermie</b>	keine Spermien	

### 4.3.2 Aufbereitung des Ejakulates für die intracytoplasmatische Spermieninjektion

Die Aufbereitung des Ejakulates für ICSI erfolgte abhängig vom Ausgangsbefund des Spermigrammes. Dabei kamen 3 unterschiedliche Aufbereitungsmethoden zur Anwendung (Tab. 2):

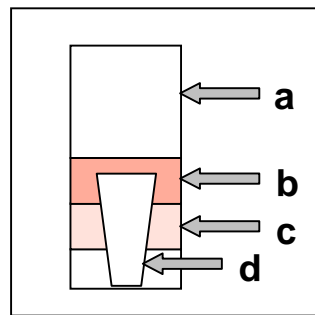
**Tab. 2** Methoden der Spermaaufbereitung für die intracytoplasmatische Spermieninjektion

Aufbereitungsmethode	Indikation
Migration-Sedimentation	mind. 2-3 progressiv motile Spermien / Blickfeld
Dichtegradientenzentrifugation	weniger als 2 progressiv motile Spermien / Blickfeld, oder bei starkem Auftreten von Leukozyten bzw. bekannter Infektion.
Waschen	in allen Blickfeldern nur vereinzelt Spermien, oder bei extrem stark eingeschränkter Motilität wie z.B. Nebenhodenaspirat nach Kryokonservierung

#### 4.3.2.1 Migration-Sedimentation

Bei geringer Spermiedichte wurde das Nativejakulat gegebenenfalls durch Zentrifugation (10 min bei 1500 U/min = 300 g) auf ca. 0,5 ml eingengt. Anschließend wurde HTF-Medium (15% HSA) in das Migration-Sedimentation-Röhrchen (Research Instruments, UK) bis kurz über den Rand des und etwa 0,5 ml Ejakulat um den Trichter dazu pipettiert (siehe Abb. 10). Motile Spermatozoen schwimmen aus dem Ejakulatsediment auf und gelangen dadurch in den unteren Teil des in das Migration-Sedimentation-Röhrchen integrierten Trichters.

Nach einer 2-3 stündigen Inkubation im Brutschrank (37 Grad Celsius, 5% CO<sub>2</sub>) wurde der Trichterinhalt abgenommen und in ein Spitzbodenröhrchen überführt. Wies das Spermogramm der Aufbereitung eine sehr geringe Konzentration von Spermatozoen auf (<1 / Blickfeld), wurde die Dichte der Spermatozoen nochmals durch Zentrifugation (10 Minute, 300g) und Verwurf des Überstandes erhöht.

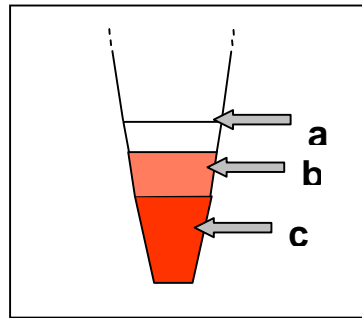


**Abb. 10** Schematische Darstellung eines Migration-Sedimentation-Ansatzes zur Spermaaufbereitung für die intracytoplasmatische Spermieninjektion  
a) Migration-Sedimentation-Kammer, b)HTF-Medium,  
c) Ejakulat d)Trichter

#### 4.3.2.2 2-Phasen-Dichtegradient

Die Herstellung des Dichtegradienten (Sil Select) erfolgte aus den beiden Einzellösungen durch vorsichtiges Unterschichten der Lösung höherer Dichte unter die Lösung niedrigerer Dichte mittels einer 1ml-Spritze mit Kanüle (Abb. 11).

Anschließend wurde das gesamte Ejakulat vorsichtig auf die obere Lage geschichtet. Eine Überführung von Stärkekörnern oder sonstigen möglicherweise im Ejakulat befindlichen Festkörpern wurde vermieden. Nach einer Zentrifugation (30 Minuten, 500g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in ca. 5 ml HTF (HEPES-gepuffert, 15% HSA) resuspendiert und wiederum pelletiert (10 Minute, 300 g). Abschließend wurde das Pellet in einem Gesamtvolumen von 50 µl in HTF (HEPES-gepuffert, 15% HSA) aufgenommen.



**Abb. 11**

Schematische Darstellung eines 2-Phasen-Dichtegradienten-Ansatzes zur Spermaaufbereitung für die intracytoplasmatische Spermieninjektion  
a) Ejakulat, b) Dichtegradient leichtere Schicht,  
c) Dichtegradient schwerere Schicht

#### **4.3.2.3 Waschen**

Bei nur vereinzelt vorhandenen Spermatozoen wurde das Ejakulat mit ca. acht Millilitern HTF (HEPES-gepuffert, 15% HSA) gewaschen. Nach einer Zentrifugation (30 Minuten, 500g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l in HTF (HEPES-gepuffert, 15% HSA) aufgenommen.

#### **4.4 PolScope-Analyse**

Um die Entwicklung der individuellen Oozyten und einen eventuellen Zusammenhang mit den durch die PolScope-Analyse gewonnenen Daten untersuchen zu können, war es notwendig, sie für die gesamte Kulturdauer bis hin zum zu transferierenden Embryo individuell in jeweils einem Mediumtropfen zu kultivieren. Dazu wurden in Abhängigkeit der Eizellzahl 5 $\mu$ l-Tropfen HTF (HEPES-gepuffert, 15% HSA) auf eine Petrischale pipettiert und mit Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen des Medienvolumens sowie ein Auskühlen zu vermeiden. Bei allen Arbeiten außerhalb des Inkubators wurde HEPES-gepuffertes HTF-Medium verwendet, um den pH-Wert bei 7,4 stabil zu halten.

Bei der Mikroskopie mit polarisiertem Licht können keine Plastikmaterialien wie sonst in der IVF-Kultur verwendet werden, da sie polarisiertes Licht ungeordnet streuen und eine Analyse unmöglich machen. Die Polscope-Analyse wurde aus diesem Grund in Einwegpetrischalen mit einem Glasboden durchgeführt (Willco, USA). Zu

diesem Zweck wurden die Oozyten individuell in je einen 5 $\mu$ l-Tropfen HTF (HEPES-gepuffert, 15% HSA) auf einem Glasboden-Schälchen überführt. Wässrige Medien bilden auf Glasunterlagen aufgrund der Hydrophilie des Glases im Gegensatz zu den normalerweise für die ICSI verwendeten Plastikschaalen sehr flach auseinanderlaufende Tropfen, was durch den großen Durchmesser der Oozyten (etwa 150 $\mu$ m) zu Schwierigkeiten bei der Mikromanipulation führen kann. Durch eine statische Aufladung der Glasboden-Petrischaalen mittels Reiben mit einem Stofftuch konnte die Tropfenform derjenigen auf Plastikpetrischaalen angeglichen werden.

Vor Beginn der Polscope-Analyse wurde das Mikroskop geköhlet. Dazu wurden nach der Fokussierung eines Objektträgerpräparates die Leuchtfeld- und Kondensorblende geschlossen und durch Heben bzw. Senken des Kondensors das Blendenbild fokussiert. Anschließend wurde das Blendenbild durch seitliches Verschieben des Kondensors zentriert und die Leuchtfeld- und Kondensorblende wieder geöffnet.

Zu Beginn jeder Analyse erfolgte eine Grundkalibrierung der Polscopeeinheit. Für jeden Mediumtropfen mit der darin enthaltenen einzelnen Oozyte wurde eine Hintergrundkalibration durchgeführt.

Für die Analyse wurden Metaphase-II-Oozyten und Telophase-II-Oozyten mit Hilfe der Injektionspipette des Mikromanipulators so gedreht, dass sich der erste Polkörper in der Äquatorialebene der Oozyte befand. Die Fokussierung der Schärfenebene erfolgte ebenfalls auf die Äquatorialebene. Bei Prophase-I-Oozyten (Germinalvesikel) wurde ebenfalls auf die Äquatorialebene fokussiert, die Oozyte wurde so gedreht, dass der Nukleus in der Schärfenebene zu liegen kam.

Metaphase-I-Oozyten die eine Teilungsspindel aufwiesen, wurden so gedreht, dass die Spindel in der Schärfenebene zu liegen kam.

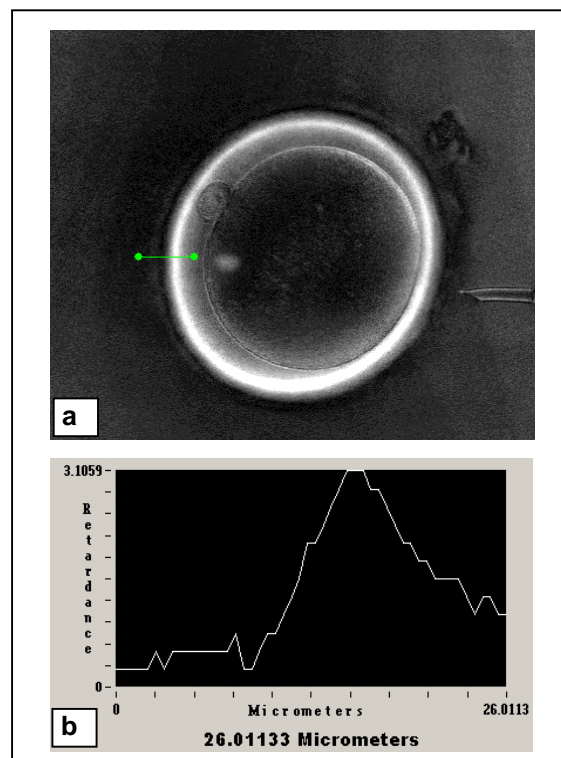
Metaphase-I-Oozyten ohne Spindel sind symmetrisch, so dass die Analyse nach Fokussierung auf den Äquator ohne weitere Drehung der Eizelle erfolgte.

Die Messungen wurden nach der Methode von Pelletier durchgeführt (PELLETIER ET AL. 2004). Die elektronische fotografische Aufnahme erfolgte mit automatischer Belichtungseinstellung durch die Software. Die Retardancewerte der untersuchten Strukturen wurden mit Hilfe einer Softwareoption, der sogenannten Line-Scans ermittelt. Um einen Linescan zu erstellen, wird mit Hilfe der Maus softwaremäßig eine Linie quer über die zu messende Struktur erzeugt. Die Retardancewerte längs dieser Linie werden von der Software in einem Histogramm dargestellt und können von

diesem abgelesen werden (Abb. 12). Die Retardancewerte der inneren Schicht der Zona pellucida folgen entlang des Line-Scans einer glockenförmigen Verteilung mit einem Maximum etwa in der Mitte der inneren Schicht. Dieser Maximalwert wurde für die weitere Datenauswertung herangezogen. Die Messwerte wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

An jeder Oozyte wurden acht Messungen auf diese Weise durchgeführt. Die Messpunkte waren dabei beginnend bei 12 Uhr alle 45 Grad gleichmäßig um den Umfang der Eizelle verteilt. Dabei lag der angenommene Schnittpunkt aller Linescans im Zentrum der Oozyte.

Aus den Werten der acht Messpunkte wurde der Mittelwert gebildet und als durchschnittliche Retardance der Zona der jeweiligen Oozyte bezeichnet. Zusätzlich wurde ein sogenannter Hauptwert, als der am häufigsten gemessene Wert, definiert. Waren ein niedriger und ein höherer Wert gleich häufig als der am häufigsten gemessene Wert vorhanden, wurde der höhere Wert als Hauptwert angenommen. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit des Bildaufnahme- und Analysesystems wurden vierzehn Oozyten dreimal fotografiert und ausgewertet (vgl. 5.3).



**Abb. 12:**

Messung der Zona pellucida-Retardance mit Hilfe eines Linescans, a) Oozyte mit Messlinie b) Histogramm der Messung

## **4.5 In-vitro-Fertilisation**

### **4.5.1 Intracytoplasmatische Spermieninjektion**

Nach der Polscope-Analyse wurde die intracytoplasmatische Spermieninjektion durchgeführt. Jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Spermienaufbereitung wurde in 5  $\mu\text{l}$  Polyvinylpyrrolidon-Lösung (10% Polyvinylpyrrolidon in sperm preparation medium, MediCult, Dänemark) gegeben. Dies war notwendig, um einerseits ein Freischwimmen der motilen Spermien aus der Gesamtzellmasse der Aufbereitung zu ermöglichen, andererseits wird die Bewegungsgeschwindigkeit der Spermatozoen durch die Viskosität der PVP-Lösung reduziert, was die Aspiration in die Injektionspipette erleichtert.

Für die Injektion wurden, soweit vorhanden, ausschließlich unter 200facher Vergrößerung morphologisch normal erscheinende Spermatozoen verwendet. Dabei erfolgte zunächst die Immobilisierung durch Druck der Injektionskapillare auf das Flagellum und kurzes Reiben auf dem Boden der Petrischale. Der dadurch verursachte Bruch der Spermienmembran ist unbedingt für die Erzielung einer normalen Fertilisierungsrate erforderlich.

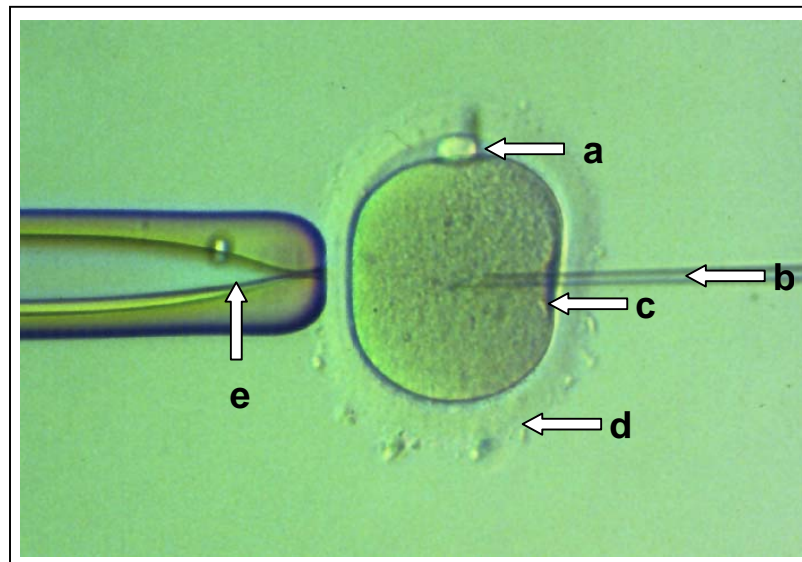
Die immobilisierten Spermatozoen wurden mit dem Flagellum voran mit möglichst kleinem Volumen PVP-Lösung in die Injektionskapillare eingesaugt.

Ausschließlich Oozyten, die als Reifemerkmale den 1. Polkörper aufwiesen, wurden inseminiert. Dabei musste der 1. Polkörper auf 12 bzw. 6 Uhr positioniert werden, um eine Verletzung der sich möglicherweise in unmittelbarer Nähe befindenden mitotischen Spindel beim Injektionsvorgang möglichst auszuschließen.

Die Oozyte wurde durch Aspiration an eine Haltepipette aus Glas (Microtech, Tschechische Republik) fixiert, wobei beachtet wurde, dass keine Torsion des Zytoplasmas erfolgte. Der Einstich der Injektionspipette erfolgte äquatorial bei 15 Uhr durch die Zona pellucida bis etwa zur Mitte des Zytoplasmas. Das Oolemma stülpt sich dabei in der Regel „handschuhartig“ über die Injektionspipette, welche die Plasmamembran zunächst nicht durchdringt, so dass durch sanfte Aspiration mit der Injektionspipette die Membran zur Ruptur gebracht werden muss (Abb. 13). Die Injektion des Spermatozoons erfolgte unmittelbar nach der Membranruptur mit minimalem Volumen in das Zentrum der Oozyte.



Nach der Injektion wurden die Oozyten in eine weitere Petrischale individuell in jeweils einen eigenen 5µl-Tropfen Embryokulturmedium (IVF Universal-Medium, MediCult) umgesetzt. Alle weiteren Schritte der in-vitro-Kultur erfolgten in diesen 5µl-Tropfen.



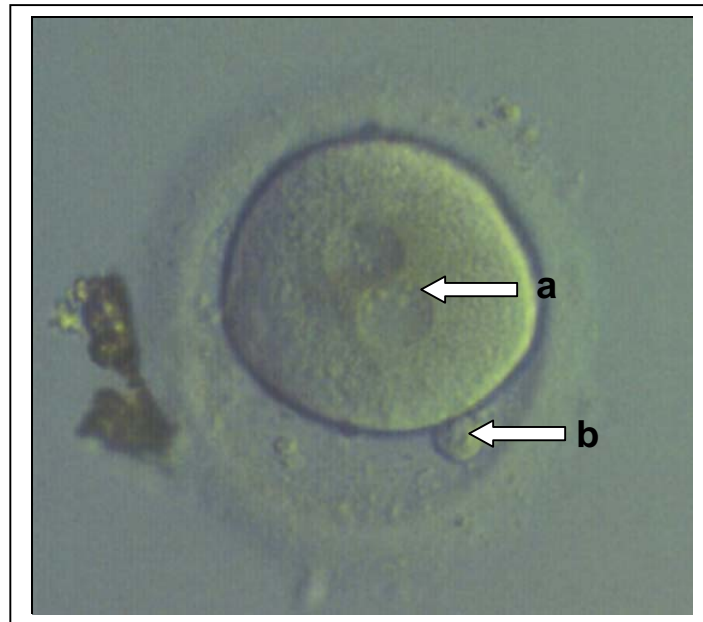
**Abb. 13:** Intracytoplasmatische Spermieninjektion  
a) 1. Polkörper b) Injektionspipette c) „handschuhartige Einstülpung der Plasmamembran d) Zona pellucida e) Haltepipette

#### 4.5.2 Befruchtungskontrolle

Die Befruchtungskontrolle wurde 16-18 Stunden nach Insemination der Oozyten durchgeführt. Hierzu wurden die Oozyten mit dem Umkehrmikroskop bei 200facher Vergrößerung auf Vorhandensein, Anzahl und Morphologie der Pronuclei (siehe Abb. 14), sowie eine weitere Anzahl morphologischer Parameter (siehe Abschnitt 4.6) untersucht. Dabei war es erforderlich, sie mittels des Mikromanipulators zu drehen. Bei Oozyten, die einer weiteren PolScope-Analyse 18 Stunden nach Insemination unterzogen wurden, wurde die Oozyte bzw. das Pronukleusstadium mit Hilfe des Mikromanipulators so positioniert, dass ein bzw. beide Polkörper in der Äquatorialebene zu liegen kamen.

Die bei der Befruchtungskontrolle erfassten Zygotenparameter sind in Tab. 3 (Abschnitt 4.6) aufgeführt. Diese Parameter dienen zur Auswahl derjenigen befruchteten Oozyten, die zur weiteren in-vitro-Kultur und zum Transfer vorgesehen

waren. Die Auswahl erfolgte dabei primär nach dem Pronukleus-Score, wobei die Oozyten in der Reihenfolge des PN-Scores  $4 > 3.5 > 2 > 3 > 1$  präferiert wurden. War der PN-Score bei den auszuwählenden Zygoten gleich, wurden die weiteren Parameter bei der Auswahl berücksichtigt. Dabei sollten möglichst keine morphologischen Aberrationen wie z. B. Vakuolen oder Granulierungen vorliegen.



**Abb. 14:** Fertilisierte Oozyte (2PN-Stadium, Vorkernstadium)  
a) Pronuclei b) Polkörper

#### 4.5.3 In-vitro-Kultur

Alle Oozyten wurden nach der PoIScope-Analyse und der intracytoplasmatischen Spermieninjektion in Kunststoffpetrischalen (NUNC, Deutschland) individuell in je einem 5  $\mu$ l-Tropfen IVF-Universal-Medium (Medicult, Dänemark) bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub> in einem Begasungsbrutschrank (Labotect, Deutschland) kultiviert. Überzählige befruchtete Oozyten, die nicht für den Embryotransfer vorgesehen waren, wurden entweder kryokonserviert oder verworfen.

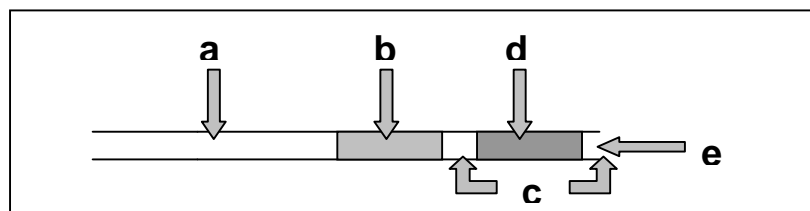
#### 4.5.4 Embryobeurteilung

Die Beurteilung der Embryoqualität erfolgte bei allen Embryonen 40 Stunden nach Insemination nach Steer (STEER ET AL. 1992). Dabei wurde sowohl Anzahl der Blastomere als auch der Fragmentierungsgrad (siehe Tab. 5) berücksichtigt.

#### 4.5.5 Embryotransfer

Der Embryotransfer wurde am Tag 2 oder am Tag 3 nach Eizellgewinnung/Insemination durchgeführt. Hierzu wurden die Embryonen mittels einer Glaskapillare aus den Mikrotropfen der Individualkultur in ein 4-well-Schälchen (NUNC, Germany) mit IVF-Universal-Medium (Medicult, Dänemark) umgesetzt.

Der verwendete Embryotransferkatheter (Cook, USA) ist aus zwei Teilen, einem äußeren Führungskatheter und einem inneren Katheter aufgebaut. Die zu transferierenden Embryonen wurden nach Positionierung des Führungskatheters im Cavum uteri mit etwa 20 µl IVF-Medium aus dem 4-well-Schälchen in den inneren Katheter aspiriert (siehe Abb. 15). Nach dem Einführen des inneren Katheter in den Führungskatheter wurden die Embryonen etwa 1,5 cm vor der hinteren Wand des Cavum uteri appliziert.



**Abb. 15**

Ladeschema des Embryo-Transferkatheters  
a) Katheter b) Universal-IVF-Medium c) Luft d) Universal-IVF-Medium mit Embryonen e) Katheterspitze

#### **4.6 Erfasste Parameter**

Folgende Parameter wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erfasst:

##### **Zyklusparameter**

- Alter
- Gewicht
- Größe
- BMI (errechneter Wert)
- Art des Gonadotropins
- Applizierte Gesamtdosis Gonadotropin im Zyklus

##### **Oozytenparameter**

- Anzahl
- Reifegrad (Prophase I, Metaphase I, Telophase I, Metaphase II)

##### *Begriffsbestimmung der erfassten Reifegrade:*

In der vorliegenden Arbeit wurde der Reifegrad der untersuchten Oozyten in die folgenden Reifegrade eingeteilt:

1. Prophase I
2. Metaphase I
3. Telophase I
4. Metaphase II

Dabei handelt es sich bei Prophase I-Oozyten um Oozyten ohne Polkörper mit germinalem Vesikulum (GV).

Als Metaphase I-Oozyten wurden alle Oozyten ohne Polkörper und ohne germinales Vesikulum bezeichnet (nach Germinal vesicle breakdown, GVBD).

Telophase I-Oozyten wurden anhand des Vorhandenseins eines Polkörpers sowie der Anwesenheit einer zwischen Ooplasma und Zytoplasma des Polkörpers lokalisierten Teilungsspindel identifiziert.

Als Metaphase II-Oozyten wurden alle Oozyten mit vorhandenem ersten Polkörper bezeichnet.

### ***PoIScope-Analyse***

- 8 Retardancewerte der inneren Zona Pellucida-Schicht
- Ret: Mittelwert der Retardance (errechneter Wert)
- HW: Hauptwert der Retardance einer Oozyte (höchster, häufigst vorkommender Wert der 8 Retardancewerte)
- $\Delta$ Ret: nach Formel 1 errechneter Wert (vgl. Abschnitt 4.7)

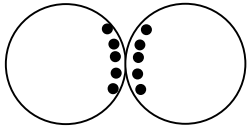
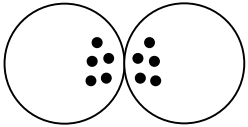
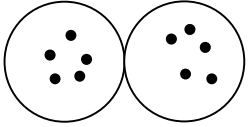
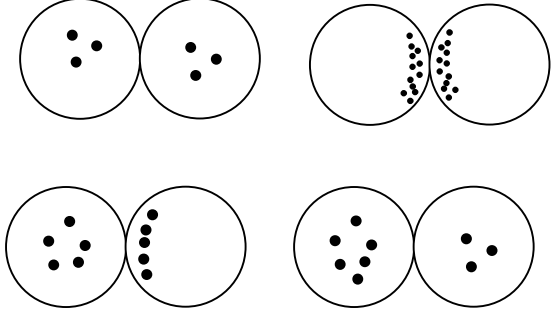
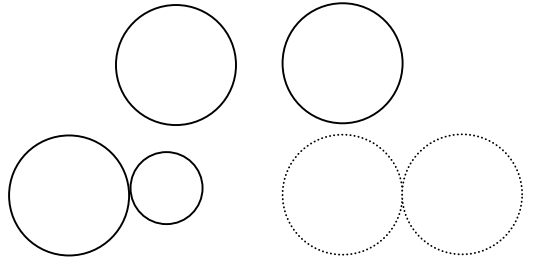
### ***Zygotenparameter***

- Morphologische Parameter der Zygote (vgl. Tab. 3)
- Morphologische Parameter der Pronuklei (vgl. Tab. 4)

**Tab. 3:** Im Rahmen der Befruchtungskontrolle erfasste morphologische Parameter der Zygoten

<b>Parameter</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Mögliche Zustände</b>
PN	Anzahl der PN	0, 1, 2, >2
halo	halo-Effekt	ja; nein
halo rund	halo-Effekt rund	ja; nein
PN-Score	PN-Score nach Vorlage (Tab. 4)	1; 2; 3; 3.5; 4
Gran	Granulierung des Zytoplasmas	nein, lokal, ganz
Ref Körp	Refraktile Körper im Zytoplasma	nein, wenige; viele
Vac	Vakuolen im Zytoplasma	nein, wenige; viele
Def	Zytoplasma deformiert	ja; nein

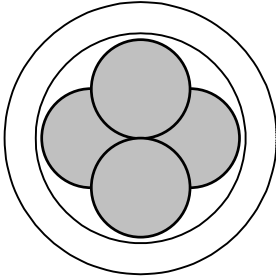
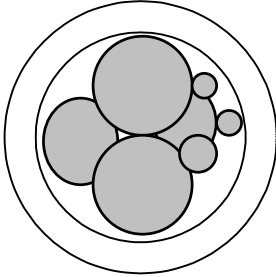
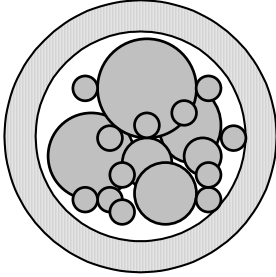
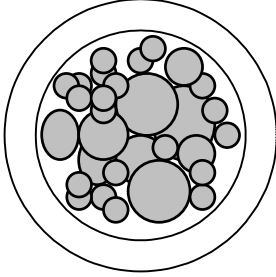
**Tab. 4:** Morphologische Beurteilung der Pronuklei

Score	Muster	Bemerkung
4		Nucleoli in Reihe polarisiert
3,5		Nucleoli beginnend polarisiert
3		Nucleoli gleichmäßig verteilt
2		Wenige große Nucleoli (<5) ohne Polarisierung oder viele kleine (>10) Nucleoli mit Polarisierung Asymmetrische Verteilung der Nucleoli oder ungleiche Anzahl
1		PN getrennt PN unterschiedlich groß oder PN schwer zu erkennen

**Embryonalparameter**

- Blastomerenanzahl
- Fragmentierungsgrad (vgl. Tab. 5)

**Tab. 5:** Fragmentierungsgrad humaner Embryonen (nach Steer et al. 1992)

Score	Fragmentierungsgrad	Morphologie
<b>4</b>	<b>0 – 10%</b>	
<b>3</b>	<b>10 - 20%</b>	
<b>2</b>	<b>20 – 50 %</b>	
<b>1</b>	<b>&gt;50 %</b>	



#### **4.7 Inter- und Intrakohortenanalyse**

Wie in Abschnitt 5.3.1 gezeigt wird, wies die Retardance der inneren Zonaschicht sowohl im Vergleich verschiedener Eizellkohorten (d. h. Oozyten, die verschiedenen Behandlungszyklen entstammen) als auch im Vergleich der Oozyten einer Kohorte erhebliche Varianz auf.

Bei der Betrachtung individueller Oozyten (bzw. Zygoten oder Embryonen) kann es, vor allem im Hinblick auf die Erkennung von Oozyten mit hohem Implantationspotenzial, von Bedeutung sein, die Oozyte in den Zusammenhang ihrer Eizellkohorte einzuordnen.

Die Analyse der Retardance der inneren Zonaschicht in Hinblick auf mögliche Zusammenhänge mit Eizell-, Zygoten-, Embryonal- und Zyklusparametern erfolgte deshalb, soweit sinnvoll, unter zwei Aspekten:

1. Durchschnittliche Retardancewerte aller Oozyten, die auf ein Merkmal hin analysiert wurden („Interkohortenanalyse“).
2. Relative Abweichung der analysierten Oozyte vom Mittelwert der Retardances der Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus („Intrakohortenanalyse“). Die relative Abweichung wurde als  $\Delta\text{Ret}$  definiert (vgl. Formel 1).  
Der Mittelwert der Retardances der Metaphase II-Oozyten wurde als relativer Bezugspunkt für die Intrakohortenanalyse festgelegt, da die Metaphase II-Oozyten einer Kohorte für die In-vitro-Fertilisation die größte praktische Relevanz besitzen.

#### **Formel 1:**

$$\Delta\text{Ret} = [\text{Retardance}_{\text{Oozyte}}] - [\text{Mittelwert (Retardances}_{\text{Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus}})]$$

Diese Betrachtungsweisen ermöglichten sowohl Aussagen über das Gesamtkollektiv der Oozyten eines Zyklus wie auch über individuelle Oozyten.

#### ***4.8 Datenerfassung und -auswertung***

Alle erfassten Parameter wurden in eine Microsoft Access-Datenbank eingegeben. Mit Hilfe der Datenbankfunktionen konnten beliebige Kombinationen von Eizell- und Patienten-Parametern abgefragt werden. Die weitere Auswertung der umfangreichen Daten erfolgte in Microsoft Excel, die statistischen Tests (2-Wege ANOVA, zweiseitiger t-Test nach Student) mit der Computersoftware SPSS.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Einen Überblick über die untersuchten Parameter des gesamten Patientenkollektivs gibt Tabelle 5:

**Tab. 5** Übersicht über die erfassten Parameter zu Merkmalen der Patienten, Oozyten, Zygoten und Embryonen

<b>Allgemein</b>	
Anzahl Zyklen	103
Anzahl gewonnene Oozyten	1058
Anzahl Patienten	92
Anzahl Zyklen mit ET	99 (96%)
Patientenalter	33,7 ± 4,6
BMI	24,8 ± 4,7
<b>Verwendetes Hormonpräparat</b>	
<b>Rek. FSH</b>	
Zyklen (Oozyten)	40 (528)
Oozyten/Zyklus	13,2
Durchschnitt Ampullen	26,6 ± 7,5
Alter	31,0 ± 4,1
<b>Urinäres hmG</b>	
Zyklen (Oozyten)	60 (523)
Oozyten/Zyklus	8,7
Durchschnitt Ampullen	30,6 ± 10,4
Alter	35,2 ± 4,1

**Fortsetzung** Übersicht über die erfassten Parameter zu Merkmalen der Patienten,  
**Tab. 5** Oozyten, Zygoten und Embryonen

<b>Rek. FSH + Urinäres hmG</b>	
Zyklen (Oozyten)	3 (7)
Oozyten/Zyklus	2,3
Durchschnitt Ampullen hmG	36,0 ± 13,0
Durchschnitt Ampullen FSH	32 ± 10,6
Alter	39,7 ± 2,5
<b><i>Eizellreife</i></b>	
Reifegrad erfasst (inkl. Telophasespindel)	937
Anteil reifer Oozyten (Metaphase II)	706 (75%)
Anteil unreifer Oozyten	231 (25%)
<i>Davon</i>	
Telophase I	55 (24%)
Metaphase I	83 (36%)
Prophase I	93 (40%)
<b><i>Metaphasespindel vorhanden</i></b>	
Metaphase II	432 von 706 (61%)
Metaphase I	47 von 83 (57%)
<b><i>Insemination und Fertilisation</i></b>	
Inseminierte Oozyten	889
Befruchtete Oozyten	648 (73%)
3 PN	33 (5%)
2 PN	577 (89%)

**Fortsetzung** Übersicht über die erfassten Parameter zu Merkmalen der Patienten,  
**Tab. 5** Oozyten, Zygoten und Embryonen

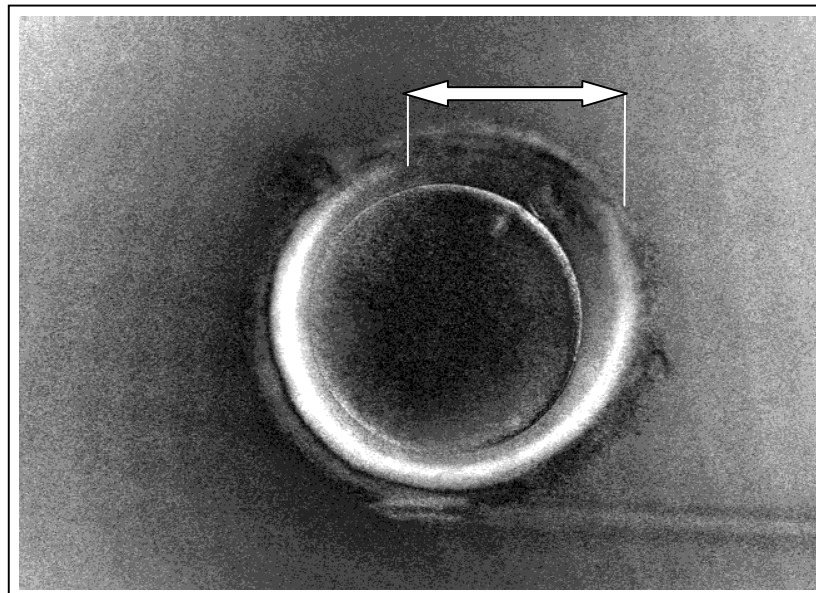
1 PN	38 (6%)
Nicht befruchtet nach Insemination	241 (27%)
Degeneriert nach Insemination	42 (5%)
<b><i>Pronukleus-Score</i></b>	
PN-Score vorhanden	576
Zygoten mit Score 4	48 (8%)
Zygoten mit Score 3,5	128 (22%)
Zygoten mit Score 3	61 (11%)
Zygoten mit Score 2	299 (52%)
Zygoten mit Score 1	40 (7%)
<b><i>Embryonale Entwicklungsrate</i></b>	
Embryonen vorhanden	241
6-Zeller nach 40 Stunden	2 (1%)
5-Zeller nach 40 Stunden	3 (1%)
4-Zeller nach 40 Stunden	111 (46%)
3-Zeller nach 40 Stunden	19 (8%)
2-Zeller nach 40 Stunden	100 (41%)
Keine Zellteilung	6 (2%)
<b><i>Embryonaler Fragmentierungsgrad nach 40 Stunden</i></b>	
Embryonen mit Zellteilung	235
Score A	43 (18%)
Score B	137 (58%)
Score C	37 (16%)
Score D	18 (8%)

**Fortsetzung** Übersicht über die erfassten Parameter zu Merkmalen der Patienten,  
**Tab. 5** Oozyten, Zygoten und Embryonen

<b>Outcome</b>	
Transferierte Embryonen / Zyklus	2,4
Schwangerschaftstest vorhanden	97 Zyklen
Schwangerschaften Anzahl	32
Schwangerschaft / ET	33%

## 5.2 Homogenität der inneren Zonenschicht

Viele der untersuchten Oozyten wiesen keine über den gesamten Zonaquerschnitt gleichmäßige Verteilung der Retardance der inneren Zonenschicht auf. Vielmehr konnte häufig ein Sektor niedrigerer Retardance festgestellt werden (Abb. 16). Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch diese Retardance“lücken“ zu minimieren, wurde die Retardance der inneren Zonenschicht an acht gleichmäßig über den Zonaquerschnitt verteilten Punkten gemessen. Der Mittelwert dieser acht Messungen bildet den durchschnittlichen Retardancewert (Ret) der betreffenden Oozyte.

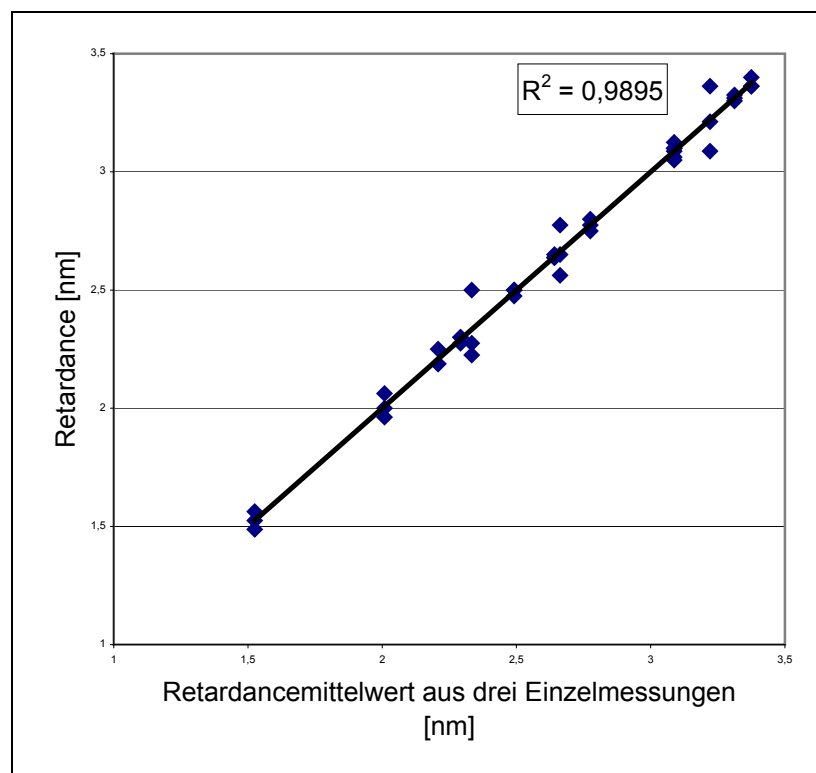


**Abb. 16** Metaphase II-Oozyte im Polscope-Bild  
Bereich mit niedriger Retardance in der inneren Zonenschicht

Weiterhin wurde der Retardancewert, der innerhalb der acht Messwerte am häufigsten vorkam, in einem zweiten Wert, dem sogenannten Hauptwert (HW) erfasst. Bei gleicher Anzahl zweier verschiedener Messwerte wurde der höhere Wert als Retardance-Hauptwert definiert. Neben dem durchschnittlichen Retardancewert der Oozyten wurde auch der Retardance-Hauptwert (HW) in allen Tabellen dargestellt. Wie sich zeigte, folgte der Hauptwert in allen Fällen den Tendenzen des durchschnittlichen Retardancewertes und kann damit als Kontrollwert der Retardancewerte dienen. Auf eine gesonderte statistische Auswertung der Hauptwerte wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet.

### 5.3 Reliabilität der Messungen

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der unternommenen Messungen wurden 14 Oozyten jeweils in Dreifachbestimmung mit dem elektronischen Bilderfassungssystem erfasst und ausgewertet. Die Auswertung der Dreifachbestimmungen zeigte in der Regressionsanalyse einen linearen Zusammenhang zwischen den Messungen mit einem  $R^2$ -Wert von 0,99 (Abb. 17).



**Abb. 17**

Regressionsanalyse der Dreifachbestimmungen der Retardance der inneren Zonaschicht von 14 Oozyten



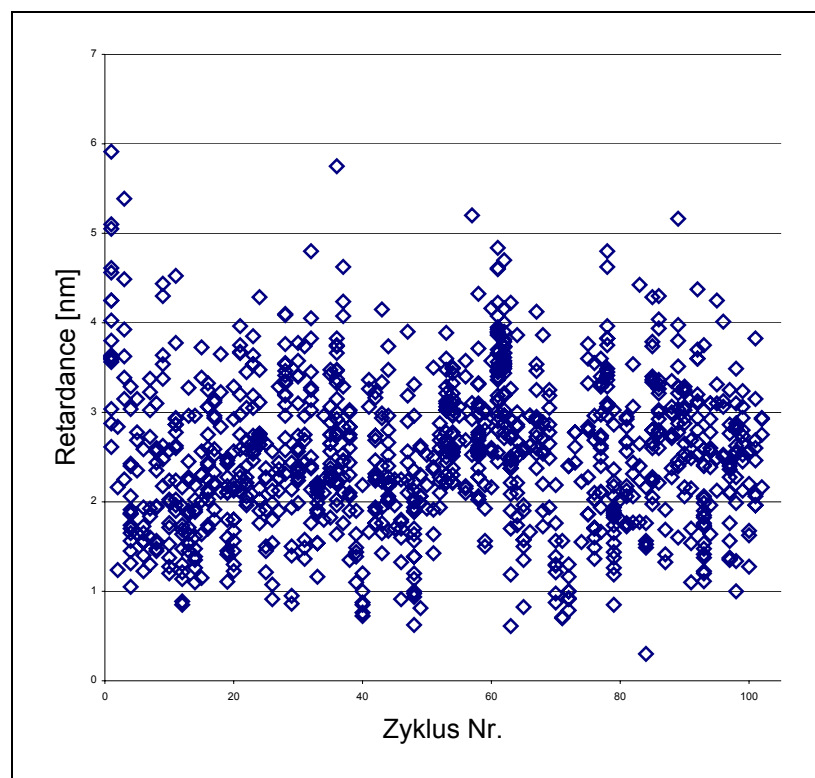
## 5.4 Zusammenhang der Zonaretardance mit Oozytenparametern

### 5.4.1 Gesamtkollektiv

Die Retardances der inneren Zonenschicht der untersuchten Eizellen wiesen beträchtliche Schwankungen sowohl innerhalb eines Zyklus als auch zwischen den verschiedenen Zyklen auf (Abb. 18).

Der Mittelwert und die Standardabweichung der durchschnittlichen Retardance (Ret) aller gemessenen Oozyten betrug  $2,54 \pm 0,83$  nm.

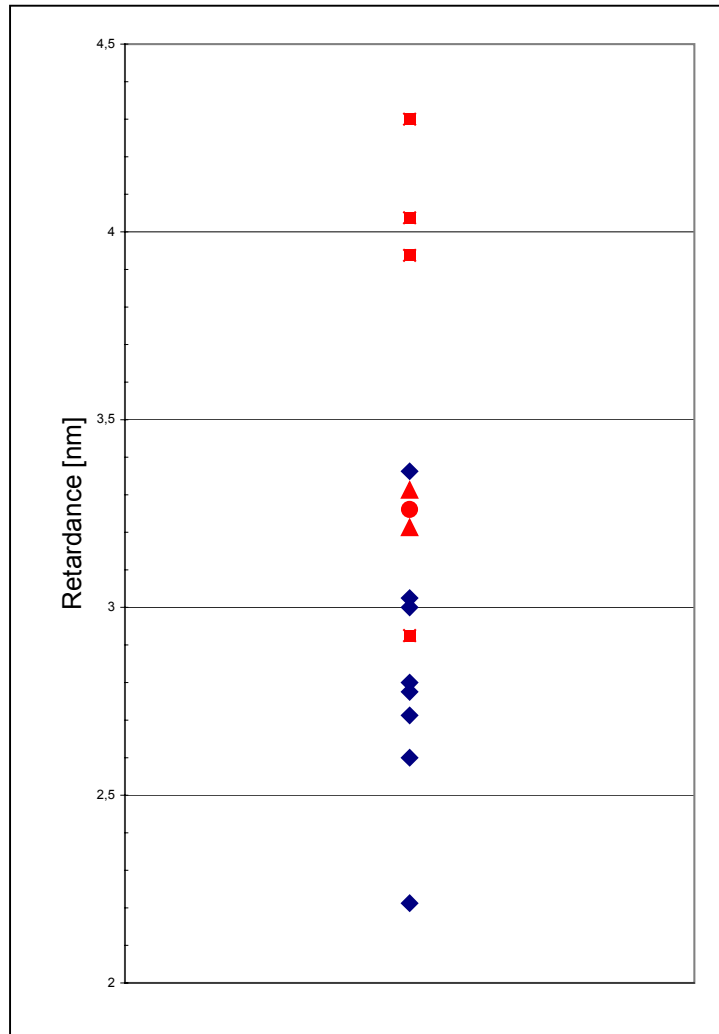
Der Mittelwert und die Standardabweichung des Retardance-Hauptwertes (HW) aller gemessenen Oozyten betrug  $2,74 \pm 0,89$  nm.



**Abb. 18:** Retardance des inner Layer der Zona pellucida (Ret) aller untersuchten Oozyten (103 Zyklen, 1058 Eizellen). Die Retardancewerte der Oozyten eines Zyklus sind jeweils in einer Spalte aufgetragen.

Abb. 19 zeigt die Retardances der inneren Zonenschicht der Oozyten eines individuellen Zyklus. Die Retardancewerte (Ret) der Oozyten liegen hier im Bereich

von 2,21 nm bis 4,3 nm. Betrachtet man den Reifegrad der Oozyten, so wird deutlich, dass die Metaphase II-Oozyten im unteren und die unreifen Oozyten im oberen Wertebereich der Retardance liegen. Dabei weisen in diesem Zyklus drei von vier Prophase I-Oozyten besonders hohe Retardances auf. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch nach statistischer Analyse aller untersuchten Oozyten (vgl. 5.4.2).



**Abb. 19**

Retardances aller Oozyten eines Zyklus  
Rauten: Metaphase II-Oozyten, Quadrate: Prophase I-Oozyten,  
Dreiecke: Metaphase I-Oozyten, Kreis: Telophase I-Oozyte

Bei der statistischen Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen der Retardance der inneren Zonenschicht und den im Folgenden aufgeführten Oozytenparametern wurde davon ausgegangen, dass die Oozyten im statistischen Sinne als Individuen aufgefasst werden können. Als Fallzahl wurde deshalb die Anzahl der untersuchten Oozyten eingesetzt.

### 5.4.2 Reifegrad der Oozyten

Der Reifegrad der Oozyten zum Untersuchungszeitpunkt wurde in vier Stufen eingeteilt:

1. Metaphase II (reife Oozyte)
2. Telophase I (unreife Oozyte)
3. Metaphase I (unreife Oozyte)
4. Prophase I (unreife Oozyte)

### Interkohortenanalyse

Die Verteilung der Reifegrade war unabhängig vom Alter und vom Body-Mass-Index der Patientinnen (Tab. 6).

Alle unreifen Oozyten wiesen eine im Verhältnis zu den reifen Oozyten hoch signifikant erhöhte Retardance ( $p < 0,001$ , ANOVA) der inneren Zonenschicht auf (Tab. 7).

**Tab. 6** Reifegrad der untersuchten Oozyte und Korrelation mit Alter und BMI der Frau, 937 Oozyten, an 1058 fehlende: Reifegrad nicht bekannt

		n Oozyten	n Oozyten [%]	n Zyklen	Alter Frau	BMI
1	Metaphase II	706	75	89	32,32 ± 4,31	24,82 ± 4,91
2	Telophase I	55	6	29	31,00 ± 3,93	26,46 ± 6,47
3	Metaphase I	83	9	48	33,11 ± 4,20	24,98 ± 4,75
4	Prophase I	93	10	42	32,66 ± 4,31	25,17 ± 4,31

**Tab. 7** Reifegrad der untersuchten Oozyten und Korrelation mit Retardance der inneren Zonenschicht, 937 Oozyten, an 1058 fehlende: Reifegrad nicht bekannt  
Alle Retardancewerte in nm.

		n Oozyten	n Oozyten [%]	n Zyklen	MW ± SD (Ret)	MW ± SD (HW)
1	Metaphase II	706	75	89	2,40 ± 0,73	2,60 ± 0,77
2	Telophase I	55	6	29	2,92 ± 0,76	3,15 ± 0,85
3	Metaphase I	83	9	48	2,80 ± 0,84	2,99 ± 0,90
4	Prophase I	93	10	42	3,20 ± 0,95	3,45 ± 1,02

(p<0,001, ANOVA)

### Intrakohortenanalyse

Der Befund der Interkohortenanalyse bestätigt sich wenn man den Retardancewert der jeweiligen Oozyte mit dem Mittelwert der Retardances aller Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus vergleicht. Hierzu wurde die Retardancedifferenz mittels folgender Formel errechnet:

**Formel 1:**

$$\Delta\text{Ret} = [\text{Retardance}_{\text{Oozyte}}] - [\text{Mittelwert (Retardances}_{\text{Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus}})]$$

Die auf diese Weise errechneten Werte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tab. 8** Vergleich der Retardancewerte von Oozyten mit dem Mittelwert der Retardance aller Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus, an 937 fehlende Oozyten: Zyklen ohne MII-Oozyten. Alle Retardancewerte in nm.

		n Oozyten	Mittelwert $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)
1	Metaphase II	706	0,00 $\pm$ 0,49
2	Telophase I	55	0,29 $\pm$ 0,59
3	Metaphase I	76	0,42 $\pm$ 0,59
4	Prophase I	91	0,76 $\pm$ 0,77

( $p < 0,0001$ , ANOVA)

Aus diesen Werten ist zu entnehmen, dass unreife Oozyten einen relativ zu den Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus erhöhten Retardancewert der inneren Zona-Schicht aufweisen. Weiterhin nimmt diese Differenz mit fortschreitender Reifung ab ( $p < 0,0001$ , ANOVA).

Metaphase II-Oozyten weisen erwartungsgemäß einen  $\Delta$ Ret von Null auf.

### 5.4.3 Vorhandensein einer Metaphasespindel

#### Interkohortenanalyse

60% der Metaphase II- und 55% der Metaphase I-Oozyten wiesen zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse eine Metaphasespindel auf. Das Vorhandensein einer Metaphasespindel ist weder bei Metaphase I- noch bei Metaphase II-Oozyten mit dem durchschnittlichen Retardancewert der inneren Zonaschicht korreliert (Tab. 9). Oozyten mit aberranter Spindel (d. h. Position vom 1. Polkörper  $>30$  Grad) wiesen einen erniedrigten Retardancewert auf, der jedoch aufgrund der niedrigen Eizellzahlen keine Signifikanz erreicht (Tab. 9).

#### Intrakohortenanalyse

Die Analyse des  $\Delta$ Ret zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer Spindel (Tab. 9).

**Tab. 9:** Retardance des inner layer vs. Spindel vorhanden, 789 Metaphase-Oozyten, Alle Retardancewerte in nm.

	<b>Spindel +</b>	<b>Spindel -</b>	<b>Spindel aberrant</b>
<b>MII</b>			
MW $\pm$ SD (Ret)	2,37 $\pm$ 0,68	2,45 $\pm$ 0,78	2,27 $\pm$ 0,71
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	-0,025 $\pm$ 0,47	0,04 $\pm$ 0,52	-0,03 $\pm$ 0,46
MW $\pm$ SD (HW)	2,56 $\pm$ 0,70	2,64 $\pm$ 0,88	2,23 $\pm$ 0,76
n Oozyten	423	274	9
<b>MI</b>			
MW $\pm$ SD (Ret)	2,96 $\pm$ 0,89	2,64 $\pm$ 0,76	1,91
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,47 $\pm$ 0,55	0,36 $\pm$ 0,66	-0,13
MW $\pm$ SD (HW)	3,14 $\pm$ 0,92	2,81 $\pm$ 0,86	2,3 $\pm$ 0,00
n Oozyten	46	36	1

#### 5.4.4 Die Retardance der inneren Zonenschicht im Kulturverlauf

Als ein weiterer Parameter wurde eine eventuelle Änderung der Zonaretardance während der in-vitro-Kultur untersucht. Dafür wurden die Oozyten 18 Stunden nach der ersten Retardanceanalyse einer weiteren Retardanceanalyse unterzogen. In Tabelle 10 sind die durchschnittlichen Retardancewerte aufgeschlüsselt nach Reifegraden am Tag 1 und Tag 2 aufgeführt. Es konnten keine signifikanten Änderungen der durchschnittlichen Retardance der inneren Zonenschicht der untersuchten Oozyten im untersuchten Zeitintervall festgestellt werden.

**Tab. 10:** Differenz der Retardance der inneren Zonenschicht Tag 1 bis Tag 2, 425 Oozyten. Alle Retardancewerte in nm.

	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 2</b>	<b>Diff Tag 1- Tag 2</b>
<b>Metaphase II</b>			
MW ± SD (Ret)	2,35 ± 0,68	2,36 ± 0,70	-0,02 ± 0,37
MW ± SD (HW)	2,54 ± 0,72	2,57 ± 0,76	-0,03 ± 0,46
n Oozyten	324	324	
<b>Telophase I</b>			
MW ± SD (Ret)	3,02 ± 0,78	3,02 ± 0,82	0,0005 ± 0,25
MW ± SD (HW)	3,29 ± 0,86	3,25 ± 0,94	0,04 ± 0,37
n Oozyten	18	18	
<b>Metaphase I</b>			
MW ± SD (Ret)	2,69 ± 0,91	2,68 ± 0,88	0,012 ± 0,25
MW ± SD (HW)	2,87 ± 1,04	2,92 ± 1,00	-0,05 ± 0,46
n Oozyten	35	35	
<b>Prophase I</b>			
MW ± SD (Ret)	3,15 ± 0,90	3,04 ± 0,85	0,11 ± 0,65
MW ± SD (HW)	3,37 ± 1,05	3,29 ± 0,85	0,07 ± 0,65
n Oozyten	48	48	

## **5.5 Zusammenhang der Zonaretardance mit Zygotenparametern**

Bei der statistischen Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen der Retardance der inneren Zonenschicht und den im Folgenden aufgeführten Zygotenparametern wurde davon ausgegangen, dass Oozyten und die sich daraus entwickelnden Zygoten im statistischen Sinne als Individuen aufgefasst werden können. Als Fallzahl wurde deshalb die Anzahl der untersuchten Oozyten bzw. Zygoten eingesetzt.

### **5.5.1 Fertilisierung**

73% aller inseminierten Oozyten konnten mittels der intracytoplasmatischen Spermieninjektion fertilisiert werden. Als fertilisiert wurden dabei alle Pronukleus-Stadien definiert, die mindestens einen Pronukleus enthielten.

### **Interkohortenanalyse**

Oozyten, die trotz Spermieninjektion nicht fertilisiert werden konnten, wiesen bei der Messung vor Insemination eine signifikant höhere Zonaretardance auf als befruchtete Oozyten (Tab. 11).

Zwischen Oozyten, die nach der Befruchtung einen oder zwei Pronuklei aufwiesen, konnte kein Unterschied der Retardance zum Zeitpunkt der Messung vor Insemination nachgewiesen werden. Lediglich Oozyten, die nach intracytoplasmatischer Spermieninjektion eine Polyploidie (mehr als zwei Pronuklei) aufwiesen, zeigten bei der Messung vor der Insemination einen signifikant niedrigeren Retardancewert als Zygoten mit einem oder zwei Vorkernen (Tab. 11).



**Tab. 11:** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller inseminierten Eizellen mit dem Befruchtungsergebnis, 92 Zyklen, 889 inseminierte Eizellen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3	4	5
PN-Zahl	0	>0	1	2	>2
MW $\pm$ SD (Ret)	2,71 $\pm$ 0,97 <sup>1</sup>	2,45 $\pm$ 0,75	2,45 $\pm$ 0,75	2,47 $\pm$ 0,75 <sup>2</sup>	2,15 $\pm$ 0,67
MW $\pm$ SD (HW)	2,94 $\pm$ 1,06	2,64 $\pm$ 0,79	2,68 $\pm$ 0,83	2,66 $\pm$ 0,79	2,32 $\pm$ 0,68
n Oozyten	241	648	38	577	33

<sup>1</sup>1 vs. 2, p<0,0001

<sup>2</sup>4 vs. 5, p<0,017

Differenziert man die obige Analyse weiter, so gelangt man zu einem weiteren Ergebnis:

Demnach muss die Erhöhung der durchschnittlichen Zonaretardance bei nicht fertilisierten Oozyten auf die Verwendung von im Zeitraum zwischen Retardanceanalyse und ICSI-Insemination nachgereiften Oozyten zurückgeführt werden.

Oozyten wurden bei der ICSI grundsätzlich nur inseminiert, wenn sie in der Metaphase II vorlagen. Ein Teil der Oozyten, die bei der Polscope-Analyse noch unreif waren, reiften jedoch bis zur ICSI bis zur Metaphase II nach und wurden inseminiert.

Berücksichtigt man diese ursprünglich unreifen Oozyten bei der Korrelation mit dem Fertilisierungsergebnis, wird deutlich, dass die erhöhte Retardance in der Gruppe der nicht fertilisierten Oozyten auf die Insemination nachgereifter Eizellen des Reifestadiums Prophase I zurückzuführen ist (Tab. 15). Metaphase I- und Telophase I-Oozyten zeigten keinen Zusammenhang der Fertilisierungsrate mit der Retardance der inneren Zonaschicht (Tab. 13, 14).

Nachgereifte Prophase I- und Metaphase I-Oozyten wiesen im Durchschnitt eine höhere Zonaretardance sowie eine deutlich schlechtere Fertilisierungsrate (Prophase I: 10%, Metaphase I: 26%) auf als die inseminierten Eizellen, die zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse bereits in der Metaphase-II vorlagen (81%, Tab. 12 - 15).

Telophase I-Oozyten zeigten mit 81% die gleiche Fertilisierungsrate wie Metaphase II-Oozyten.

**Tab. 12:** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller inseminierten Metaphase II-Oozyten mit dem Befruchtungsergebnis, 650 inseminierte Eizellen die zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse bereits in MII waren. An 706 fehlende: k. A. zur Befruchtung. Alle Retardancewerte in nm.

PN-Zahl	0	>0	1	2	>2
MW $\pm$ SD (Ret)	2,35 $\pm$ 0,83	2,41 $\pm$ 0,70	2,45 $\pm$ 0,77	2,43 $\pm$ 0,70	2,14 $\pm$ 0,63
MW $\pm$ SD (HW)	2,58 $\pm$ 0,91	2,60 $\pm$ 0,73	2,66 $\pm$ 0,82	2,61 $\pm$ 0,73	2,32 $\pm$ 0,64
n Oozyten	125	525	28	473	24

**Tab. 13:** Zusammenhang der Retardance des inner layer mit dem Befruchtungsergebnis, Telophase I-Oozyten bis ICSI nachgereift und inseminiert, 54 inseminierte Eizellen. Alle Retardancewerte in nm.

PN-Zahl	0	>0	1	2	>2
MW $\pm$ SD (Ret)	2,72 $\pm$ 0,61	2,99 $\pm$ 0,78	3,54	3,05 $\pm$ 0,73	2,27 $\pm$ 1,10
MW $\pm$ SD (HW)	2,94 $\pm$ 0,68	3,22 $\pm$ 0,88	4,1	3,28 $\pm$ 0,83	2,48 $\pm$ 1,11
n Oozyten	10	44	1	39	4

**Tab. 14:** Zusammenhang der Retardance des inner layer mit dem Befruchtungsergebnis, Metaphase I-Oozyten bis ICSI nachgereift und inseminiert, 50 inseminierte Eizellen. Alle Retardancewerte in nm.

PN-Zahl	0	>0	1	2
MW $\pm$ SD (Ret)	2,86 $\pm$ 0,86	2,85 $\pm$ 1,03	1,56	2,96 $\pm$ 1,00
MW $\pm$ SD (HW)	3,09 $\pm$ 0,93	3,02 $\pm$ 1,06	1,6	3,14 $\pm$ 1,01
n Oozyten	37	13	1	12

**Tab. 15:** Zusammenhang der Retardance des inner layer mit dem Befruchtungsergebnis, Prophase I-Oozyten bis ICSI nachgereift und inseminiert, 31 inseminierte Eizellen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2
PN-Zahl	0	>0
MW $\pm$ SD (Ret)	3,61 $\pm$ 0,88	2,22 $\pm$ 1,30
MW $\pm$ SD (HW)	3,92 $\pm$ 0,99	2,40 $\pm$ 1,45
n Oozyten	28	3

### **Intrakohortenanalyse**

Um den Einfluß der Varianz zwischen den Eizellkohorten zu minimieren, wurde für jede Kohorte der Mittelwert der reifen Oozyten gebildet. Die Abweichung der Retardance der betrachteten Oozyten von dem Mittelwert wurde mittels Formel 1 errechnet:

#### **Formel 1:**

$$\Delta\text{Ret} = [\text{Retardance}_{\text{Oozyte}}] - [\text{Mittelwert (Retardances}_{\text{Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus}})]$$

Die Anzahl der Oozyten ist bei der Analyse des  $\Delta\text{Ret}$ -Wertes geringer als bei der Auswertung des Ret-Wertes, da einige Oozyten aus Zyklen entstammen, die zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse lediglich unreife Eizellen aufwiesen. Damit konnte der Mittelwert der Metaphase II-Oozyten nach Formel 1 nicht gebildet werden.

Errechnet man nach Formel 1 den  $\Delta\text{Ret}$  inseminierter aber unfertilisierter Oozyten, so ergibt sich, dass diese im Schnitt eine höchst signifikant um  $0,21 \pm 0,66$  nm erhöhte Retardance der inneren Zonenschicht aufwiesen, als der Durchschnitt aller MII-Oozyten der gleichen Kohorte. Die Retardance von Oozyten mit mindestens einem Pronukleus wichen lediglich um  $0,02 \pm 0,51$  nm vom Mittelwert der MII-Oozyten des gleichen Zyklus ab. Dabei unterschied sie sich nicht signifikant zwischen Zygoten mit einem oder mehreren Pronuklei.

Wie bereits bei der Interkohortenanalyse ist auch hier die beobachtete höhere  $\Delta\text{Ret}$  bei nicht fertilisierten Oozyten auf die Insemination von ursprünglich unreifen, zwischen Retardanceanalyse und Spermieninjektion nachgereiften Oozyten zurückzuführen (Tab. 16-20).

Bei Prophase I und Metaphase I ist hierbei ein Trend derart festzustellen, dass Oozyten, die einen niedrigeren  $\Delta\text{Ret}$ -Wert aufwiesen, d. h. näher am Mittelwert der reifen Oozyten der gleichen Kohorte lagen, tendenziell eher fertilisiert werden.

**Tab. 16:** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller inseminierten Eizellen mit dem Befruchtungsergebnis, 788 Eizellen  
An 889 Eizellen fehlende: zum Zeitpunkt des Polscope keine MII-EZ vorhanden, folglich auch kein MW MII, inseminierte EZ nachgereift. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3	4	5
PN-Zahl	0	>0	1	2	>2
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,21 $\pm$ 0,66 <sup>1</sup>	0,03 $\pm$ 0,51	-0,08 $\pm$ 0,49	0,03 $\pm$ 0,51	-0,05 $\pm$ 0,44
n Oozyten	202	586	30	528	28

<sup>1</sup>1 vs. 2, p=0,0001

**Tab. 17:** Zusammenhang der Retardance des inner layer der inseminierten Metaphase II-Oozyten mit dem Befruchtungsergebnis, 650 Eizellen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3	4	5
PN-Zahl	0	>0	1	2	>2
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	-0,016 $\pm$ 0,48	-0,002 $\pm$ 0,49	-0,11 $\pm$ 0,49	0,006 $\pm$ 0,49	-0,049 $\pm$ 0,39
n Oozyten	125	525	28	473	24

**Tab. 18:** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller inseminierten Telophase I-Oozyten mit dem Befruchtungsergebnis, 54 Eizellen inseminiert nach Nachreife. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2
PN-Zahl	0	>0
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,25 $\pm$ 0,68	0,30 $\pm$ 0,59
n Oozyten	10	44

**Tab. 19:** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller inseminierten Metaphase I-Oozyten mit dem Befruchtungsergebnis, 50 Eizellen inseminiert nach Nachreife. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2
PN-Zahl	0	>0
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,46 $\pm$ 0,64	0,40 $\pm$ 0,60
n Oozyten	37	13

**Tab. 20:** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller inseminierten Prophase I-Oozyten mit dem Befruchtungsergebnis, 30 Eizellen inseminiert nach Nachreife. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2
PN-Zahl	0	>0
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,94 $\pm$ 0,76	-0,007 $\pm$ 0,28
n Oozyten	27	3

## 5.5.2 Zygotenqualität

### 5.5.2.1 Pronukleus-Score

#### Interkohortenanalyse

Alle regulär befruchteten Oozyten (Zygoten mit zwei Pronuklei) wurden einer Qualitätsbeurteilung der Pronuklei (PN-Score) unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass Oozyten, die sich nach regulärer Befruchtung zu Zygoten mit sehr schlechtem Pronukleus-Score entwickelten, einen signifikant erniedrigten Retardancewert der inneren Zonaschicht aufwiesen (Tab. 21).

**Tab. 21:** Retardance des inner layer aller befruchteten Eizellen vs. Pronucleus-Score, 576 2PN-Stadien. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3	4	5	6
PN-Score	1	2	3	3,5	4	3,5+4
MW ± SD (Ret)	2,20±0,78 <sup>1,2</sup>	2,50±0,76	2,46±0,61	2,51±0,78	2,33±0,77	2,46±0,78
MW ± SD (HW)	2,38±0,78	2,68±0,81	2,62±0,61	2,72±0,81	2,57±0,82	2,68±0,82
n Oozyten	40	299	61	128	48	176

<sup>1</sup>1 vs. 2, p=0,02, <sup>2</sup>1 vs. 4, p=0,03

#### Intrakohortenanalyse

Bei der Auswertung der relativen Retardanceabweichungen der analysierten Oozyte vom Retardancemittelwert der MII-Oozyten des gleichen Zyklus ( $\Delta$ Ret) zeigt sich, dass keine Unterschiede zwischen den PN-Score-Gruppen bestehen (Tab. 22). Die Korrelation des PN-Score 1 mit einem erniedrigten Retardancewert bezieht sich folglich auf das Gesamtkollektiv der analysierten Oozyten und nicht auf die relative Abweichung der Oozyte innerhalb eines Zyklus. Die Schwankungen der Retardance reifer Oozyten innerhalb des Eizellpools eines Zyklus können somit für den Pronukleus-Score vernachlässigt werden. Entscheidender ist hier die absolute Retardance der analysierten Oozyte. Metaphase II-Oozyten, die einer Kohorte mit niedriger durchschnittlicher Retardance der Metaphase II-Oozyten entstammen,

werden somit mit geringerer Wahrscheinlichkeit fertilisiert als Oozyten, die Kohorten höherer durchschnittlicher Retardance entstammen.

**Tab. 22:** Retardance des inner layer aller befruchteten Eizellen vs. Pronucleus-Score, 527 2PN-Stadien, an 577 fehlende: zum Zeitpunkt des Polscope keine MII-EZ vorhanden, folglich auch kein MW MII, inseminierte EZ nachgereift. Alle Retardancewerte in nm.

PN-Score	1	2	3	3,5	4	3,5+4
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	-0,097 $\pm$ 0,49	0,058 $\pm$ 0,53	-0,103 $\pm$ 0,47	0,120 $\pm$ 0,50	-0,036 $\pm$ 0,49	0,076 $\pm$ 0,50
n Oozyten	34	275	54	118	46	164



### 5.5.2.2 Weitere morphologische Parameter

Bei der Betrachtung der weiteren während der Zygotenbeurteilung erhobenen morphologischen Parameter zeigten das Vorhandensein von refraktilen Körperchen und das Vorliegen einer Deformierung des Zytoplasmas jeweils einen positiven Zusammenhang mit der Retardance der untersuchten Oozyten. Im Falle der deformierten Oozyten zeigte sich weiterhin ein signifikanter positiver Zusammenhang mit dem  $\Delta$ Ret.

**Tab. 23:** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller Oozyten, die sich zu 2PN-Stadien entwickelten mit weiteren morphologischen Zygotenparametern, 577 2PN-Stadien. Alle Retardancewerte in nm.

	n Oozyten	MW $\pm$ SD (Ret)	MW $\pm$ SD (HW)	n Oozyten	MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)
<b>Halo-Effekt</b>					
Halo +	246	2,52 $\pm$ 0,76	2,69 $\pm$ 0,81	225	0,036 $\pm$ 0,510
Halo -	247	2,43 $\pm$ 0,77	2,65 $\pm$ 0,80	212	0,063 $\pm$ 0,499
Halo rund	84	2,43 $\pm$ 0,68	2,61 $\pm$ 0,71	83	-0,024 $\pm$ 0,556
<b>Vakuolen</b>					
Nein	462	2,46 $\pm$ 0,76	2,66 $\pm$ 0,81	422	0,038 $\pm$ 0,513
Wenige	81	2,52 $\pm$ 0,76	2,73 $\pm$ 0,76	74	0,034 $\pm$ 0,524
viele	34	2,42 $\pm$ 0,66	2,60 $\pm$ 0,63	32	0,053 $\pm$ 0,475
<b>Refraktile Körper</b>					
Nein	396	2,40 $\pm$ 0,76 <sup>1,2</sup>	2,59 $\pm$ 0,78	362	0,025 $\pm$ 0,507
Wenig	97	2,57 $\pm$ 0,67	2,81 $\pm$ 0,76	92	0,080 $\pm$ 0,504
Viele	84	2,66 $\pm$ 0,78	2,83 $\pm$ 0,82	74	0,052 $\pm$ 0,541
<sup>1</sup> Nein vs. Wenig, p=0,044, <sup>2</sup> Nein vs. Viele, p=0,005					

**Tab. 23** Zusammenhang der Retardance des inner layer aller Oozyten, die sich zu 2PN Stadien entwickelten mit weiteren morphologischen Zygotenparametern, 577 2PN-Stadien. Alle Retardancewerte in nm.  
**Fortsetzung:**

	n Oozyten	MW ± SD (Ret)	MW ± SD (HW)	n Oozyten	MW ± SD (ΔRet)
<b>Granulierung</b>					
Nein	537	2,48 ± 0,75	2,67 ± 0,79	495	0,039 ± 0,516
lokal	20	2,56 ± 0,89	2,81 ± 0,94	19	-0,003 ± 0,491
ganz	20	2,14 ± 0,60	2,32 ± 0,70	14	0,050 ± 0,368
<b>Deformierung</b>					
Nein	545	2,45 ± 0,75 <sup>1</sup>	2,64 ± 0,79	497	0,019 ± 0,503 <sup>2</sup>
ja	32	2,78 ± 0,83	2,94 ± 0,82	31	0,350 ± 0,545
<sup>1</sup> Nein vs. Ja, p=0,017, <sup>2</sup> Nein vs. Ja, p=0,0004					

## 5.6 Zusammenhang der Zonaretardance mit Embryonalparametern

Es wurden folgende morphologische Embryonalparameter auf einen eventuellen Zusammenhang mit der Retardance der inneren Zonenschicht der Oozyte vor der Insemination untersucht:

- Fragmentierungsgrad des Embryos 40 Stunden nach Insemination
- Blastomerenzahl 40 Stunden nach Insemination

### 5.6.1 Fragmentierungsgrad

#### Interkohortenanalyse

Die Analyse der Retardance der inneren Zonenschicht einer Oozyte und dem Fragmentierungsgrad eines sich aus dieser entwickelnden Embryos 40 Stunden nach Insemination zeigte einen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,031$ , ANOVA). Dabei entwickelten sich Oozyten mit höherer Retardance zu stärker fragmentierten Embryonen (Tab. 24, Abnahme der Fragmentierung mit höher Zahl, vgl. Abschnitt 4.6, Tab. 5).

**Tab. 24:** Retardance des inner layer der Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Fragmentierungsgrad des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 235 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Fragmentierungsgrad	1	2	3	4
MW $\pm$ SD (Ret)	2,73 $\pm$ 0,87	2,57 $\pm$ 0,81	2,35 $\pm$ 0,72	2,21 $\pm$ 0,69
MW $\pm$ SD (HW)	2,94 $\pm$ 0,90	2,78 $\pm$ 0,91	2,54 $\pm$ 0,74	2,41 $\pm$ 0,67
n Embryonen	18	37	137	43

( $p=0,031$ , ANOVA)

Diese Tendenz bleibt erhalten, bezieht man nur Oozyten ein, die sich zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse in Metaphase II befanden (Tab. 25):

**Tab. 25:** Retardance des inner layer der MII-Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Fragmentierungsgrad des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 191 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Fragmentierungsgrad	1	2	3	4
MW $\pm$ SD (Ret)	2,47 $\pm$ 0,47	2,51 $\pm$ 0,79	2,34 $\pm$ 0,72	2,22 $\pm$ 0,65
MW $\pm$ SD (HW)	2,70 $\pm$ 0,50	2,70 $\pm$ 0,87	2,53 $\pm$ 0,73	2,43 $\pm$ 0,64
n Embryonen	12	30	115	34

### Intrakohortenanalyse

Die Intrakohortenanalyse zeigt, dass Oozyten, die sich zu wenig fragmentierten Embryonen weiterentwickelten, tendenziell eher niedrigere Retardances aufwiesen, als die anderen Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte (Tab. 26). Deutlicher wird diese Tendenz, betrachtet man nur Oozyten, die sich zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse bereits in Metaphase II befanden (Tab. 27)

**Tab. 26:** Retardance des inner layer aller Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Fragmentierungsgrad des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 208 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Fraggrad	1	2	3	4
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,036 $\pm$ 0,218	0,164 $\pm$ 0,448 <sup>1</sup>	0,057 $\pm$ 0,519	-0,080 $\pm$ 0,561
n Embryonen	14	34	123	37

<sup>1</sup>Fraggrad 2 vs Fraggrad 4: p=0,048

**Tab. 27:** Retardance des inner layer der MII-Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Fragmentierungsgrad des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 191 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Fraggrad	1	2	3	4
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,068 $\pm$ 0,216	0,089 $\pm$ 0,301 <sup>1</sup>	0,038 $\pm$ 0,512	-0,135 $\pm$ 0,502
n Embryonen	12	30	115	34

<sup>1</sup>Fraggrad 2 vs Fraggrad 4: p=0,037

## 5.6.2 Blastomerenanzahl

### Interkohortenanalyse

Die Retardance der inneren Zonaschicht von Oozyten zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit der Anzahl der Blastomere von sich daraus entwickelnden Embryonen 40 Stunden nach Insemination (vgl. Tab. 28)

**Tab. 28** Retardance des inner layer aller Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Blastomerenzahl des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 241 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Anzahl Blastomere	1	2	3	4	>4
MW $\pm$ SD (Ret)	2,53 $\pm$ 1,15	2,39 $\pm$ 0,81	2,27 $\pm$ 0,45	2,41 $\pm$ 0,74	2,31 $\pm$ 0,64
MW $\pm$ SD (HW)	2,68 $\pm$ 1,10	2,59 $\pm$ 0,84	2,47 $\pm$ 0,50	2,60 $\pm$ 0,77	2,58 $\pm$ 0,69
n Embryonen	6	100	19	111	5

Das gleiche Ergebnis erhält man, werden nur Embryonen berücksichtigt, deren zugrunde liegenden Oozyten zum Zeitpunkt der Polscope-Analyse bereits in Metaphase II vorlagen (Tab. 29).

Dennoch wiesen Embryonen, die 40 Stunden nach Insemination noch keine Zellteilung durchlaufen hatten, vergleichsweise niedrige Retardances auf. Allerdings handelte es sich dabei lediglich um drei Oozyten.

**Tab. 29** Retardance des inner layer der MII-Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Blastomerenzahl des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 194 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Anzahl Blastomere	1	2	3	4	>4
MW $\pm$ SD (Ret)	1,54 $\pm$ 0,47	2,33 $\pm$ 0,77	2,23 $\pm$ 0,45	2,41 $\pm$ 0,69	2,31 $\pm$ 0,64
MW $\pm$ SD (HW)	1,73 $\pm$ 0,51	2,53 $\pm$ 0,78	2,40 $\pm$ 0,47	2,60 $\pm$ 0,72	2,58 $\pm$ 0,69
n Embryonen	3	79	17	90	5

**Intrakohortenanalyse**

Die Analyse des  $\Delta\text{Ret}$ -Wertes zeigte ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang mit der Blastomerenanzahl 40 Stunden nach Insemination, berücksichtigt man alle inseminierten Oozyten (Tab. 30), bzw. nur die Oozyten, die zum Zeitpunkt der Polscope-Analyse bereits in Metaphase II vorlagen (Tab. 31).

Allerdings wiesen Embryonen mit mehr als zwei Blastomeren tendenziell eher Retardances ( $\Delta\text{Ret}$ ) auf, die unter oder nahe bei dem Mittelwert aller Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte lagen. Embryonen mit nur einem oder zwei Blastomeren hatten sich aus Oozyten entwickelt, deren Retardances höher lagen als der Mittelwert aller Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte.

**Tab. 30:** Retardance des inner layer aller Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Blastomerenanzahl des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 213 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Anzahl Blastomere	1	2	3	4	>4
MW $\pm$ SD ( $\Delta\text{Ret}$ )	0,318 $\pm$ 0,443	0,093 $\pm$ 0,521	-0,126 $\pm$ 0,416	0,042 $\pm$ 0,503	-0,012 $\pm$ 0,460
n Embryonen	5	88	17	98	5

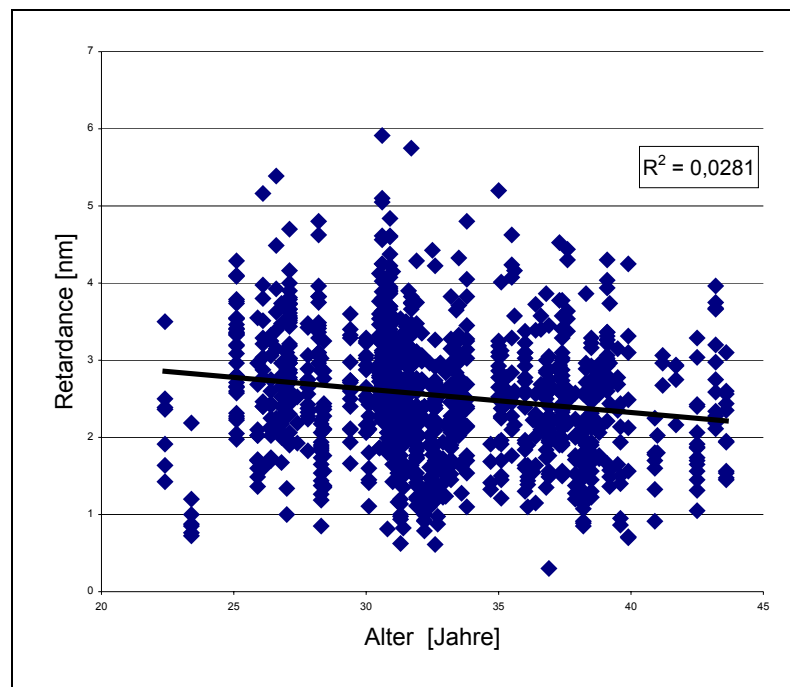
**Tab. 31:** Retardance des inner layer der MII-Eizellen, die zum Embryo weiterkultiviert wurden vs. Blastomerenanzahl des Embryos 40 Stunden nach Insemination, 194 Embryonen. Alle Retardancewerte in nm.

Anzahl Blastomere	1	2	3	4	>4
MW $\pm$ SD ( $\Delta\text{Ret}$ )	0,120 $\pm$ 0,463	0,064 $\pm$ 0,495	-0,126 $\pm$ 0,416	0,005 $\pm$ 0,489	-0,012 $\pm$ 0,460
n Embryonen	3	79	17	90	5

## 5.7 Zusammenhang der Zonaretardance mit Zyklusparametern

### 5.7.1 Alter der Patientin

Im Vergleich der Retardance der inneren Zonenschicht mit dem Alter der Frau zeigte sich ein linear negativer Zusammenhang (Abb. 20).



**Abb. 20:** Retardance des inner Layer aller Oozyten (Ret) in Abhängigkeit vom Alter. 103 Zyklen, 1058 Eizellen

Die Einteilung des Patientinnenalters in drei Gruppen verdeutlicht diesen Trend (Tab. 32). Aufgrund der Einordnung des Zusammenhanges Retardance vs. Alter in die Kategorie der zyklusabhängigen Parameter erreicht dieser jedoch keine statistische Signifikanz.

**Tab. 32:** Retardance des inner layer aller Eizellen eines Zyklus vs. Alter der Frau, 103 Zyklen, 1058 Oozyten. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Alter [Jahre]	<30	30-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	2,71 $\pm$ 0,83	2,57 $\pm$ 0,86	2,40 $\pm$ 0,77
MW $\pm$ SD (HW)	2,92 $\pm$ 0,89	2,78 $\pm$ 0,92	2,57 $\pm$ 0,81
n Oozyten	244	461	353
n Zyklen	18	39	46

Der Zusammenhang zwischen Zonaretardance und Alter zeigt sich nach einer Differenzierung der Oozyten in die vier Reifegrade ebenfalls für Oozyten der Metaphase II, Metaphase I- und Telophase I (Tab. 33-35).

Lediglich bei Prophase 1-Oozyten war kein Zusammenhang zwischen Alter und Retardance zu beobachten. Hier traten in jeder Altersgruppe sehr hohe Retardancewerte auf (Tab. 36).

**Tab. 33:** Retardance des inner layer aller Metaphase II-Oozyten eines Zyklus vs. Alter der Frau, 706 Oozyten aus 89 Zyklen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Alter [Jahre]	<30	30-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	2,58 $\pm$ 0,77	2,37 $\pm$ 0,73	2,28 $\pm$ 0,67
MW $\pm$ SD (HW)	2,81 $\pm$ 0,83	2,56 $\pm$ 0,77	2,45 $\pm$ 0,70
n Zyklen	15	41	33
n Oozyten	169	341	196



**Tab. 34:** Retardance des inner layer aller Telophase I-Oozyten eines Zyklus vs. Alter der Frau, 55 Oozyten aus 29 Zyklen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Alter [Jahre]	<30	30-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	3,12 $\pm$ 0,80	2,85 $\pm$ 0,73	2,55 $\pm$ 0,82
MW $\pm$ SD (HW)	3,30 $\pm$ 0,81	3,13 $\pm$ 0,87	2,86 $\pm$ 0,88
n Zyklen	8	14	7
n Oozyten	18	30	7

**Tab. 35:** Retardance des inner layer aller Metaphase I-Oozyten eines Zyklus vs. Alter der Frau, 83 Oozyten aus 48 Zyklen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Alter [Jahre]	<30	30-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	2,93 $\pm$ 0,88	3,09 $\pm$ 0,73	2,44 $\pm$ 0,82
MW $\pm$ SD (HW)	3,14 $\pm$ 0,87	3,30 $\pm$ 0,75	2,59 $\pm$ 0,93
n Zyklen	10	18	20
n Oozyten	15	35	33

**Tab. 36:** Retardance des inner layer aller Prophase I-Oozyten eines Zyklus vs. Alter der Frau, 93 Oozyten aus 42 Zyklen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Alter [Jahre]	<30	30-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	3,17 $\pm$ 1,22	3,23 $\pm$ 0,85	3,18 $\pm$ 0,92
MW $\pm$ SD (HW)	3,44 $\pm$ 1,42	3,51 $\pm$ 0,86	3,38 $\pm$ 0,95
n Zyklen	11	17	14
n Oozyten	19	42	32

### 5.7.2 BMI

Ein Zusammenhang zwischen dem Body-Mass-Index der Patientinnen im jeweiligen Zyklus und der Retardance der inneren Zonenschicht aller gewonnenen bzw. Metaphase II-Oozyten konnte nicht beobachtet werden (Tab. 37 und 38).

**Tab. 37:** Retardance des inner layer aller Oozyten vs. BMI der Frau, 103 Zyklen, 1058 Oozyten. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3	4
BMI	15-19,9	20-24,9	25-29,9	$\geq 30$
MW $\pm$ SD (Ret)	2,38 $\pm$ 0,83	2,58 $\pm$ 0,85	2,42 $\pm$ 0,83	2,75 $\pm$ 0,71
MW $\pm$ SD (HW)	2,56 $\pm$ 0,95	2,78 $\pm$ 0,91	2,63 $\pm$ 0,84	2,94 $\pm$ 0,74
n Oozyten	117	575	228	138
n Zyklen	13	52	25	13

**Tab. 38:** Retardance des inner layer aller Metaphase II-Oozyten vs. BMI der Frau, 706 Oozyten aus 89 Zyklen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3	4
BMI	15-19,9	20-24,9	25-29,9	$\geq 30$
MW $\pm$ SD (Ret)	2,31 $\pm$ 0,73	2,45 $\pm$ 0,71	2,20 $\pm$ 0,73	2,57 $\pm$ 0,68
MW $\pm$ SD (HW)	2,46 $\pm$ 0,84	2,65 $\pm$ 0,78	2,40 $\pm$ 0,73	2,77 $\pm$ 0,71
n Oozyten	79	368	157	102
n Zyklen	10	43	23	13

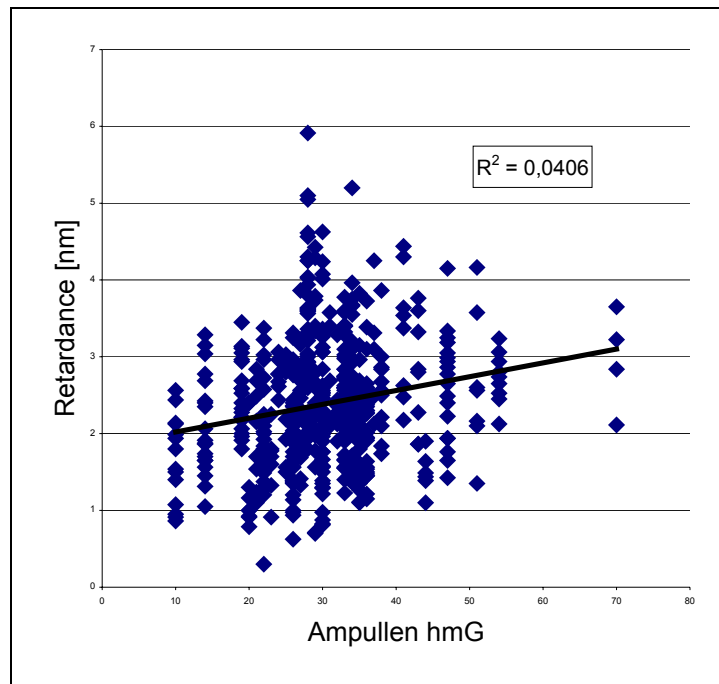
### **5.7.3 Stimulationsparameter**

Die Eizellreifung verläuft in der In-vitro-Fertilisation unter dem Einfluss superphysiologischer Dosen des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) bzw. des humanen menopausalen Gonadotropins (hmG), eines Gemisches aus FSH und luteinisierendem Hormon (LH). Aus diesem Grund wurde die Analyse möglicher Einflüsse der Dosis und Art der zur ovariellen Stimulation applizierten Präparate in die vorliegende Arbeit einbezogen.

Mögliche Zusammenhänge zwischen Art und Dosis der Medikation und der Zonaretardance wurden als zyklusabhängiger Parameter aufgefasst. Für die statistische Analyse wurde daher, wie bei allen zyklusabhängigen Parametern, die Anzahl der Zyklen herangezogen.

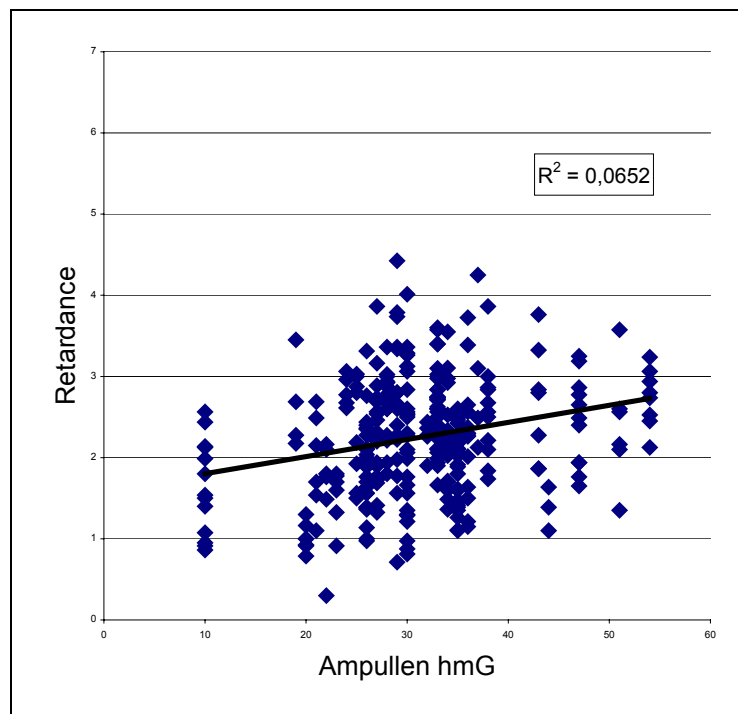
#### **5.7.3.1 hmG-Dosis**

Bei der Analyse der eingesetzten Dosen humanen menopausalen Gonadotropins (hmG) konnte ein positiver Zusammenhang mit der Retardance der inneren Zona pellucida-Schicht festgestellt werden (Abb. 21):



**Abb. 21:** Die Retardance des inner layer korreliert positiv mit der verabreichten Hormonmenge (hMG); 60 Zyklen, 523 Eizellen

Dieser Zusammenhang wird noch deutlicher, bezieht man nur Metaphase II-Oozyten in die Auswertung ein (Abb. 22):



**Abb. 22:** Die Retardance des inner layer von Metaphase II- Eizellen korreliert positiv mit der verabreichten Hormonmenge (hMG). 327 Eizellen

Die Einteilung der applizierten hmG-Dosis in drei Gruppen verdeutlicht diesen Trend (Tab. 39 und 40). Aufgrund der Einordnung des Zusammenhanges Retardance vs. Dosis hmG in die Kategorie der zyklusabhängigen Parameter erreicht dieser jedoch keine statistische Signifikanz.

**Tab. 39:** Retardance des inner layer aller Eizellen vs. verabreichte Dosis hmG 60 Zyklen, 523 Eizellen. Alle Retardancewerte in nm.

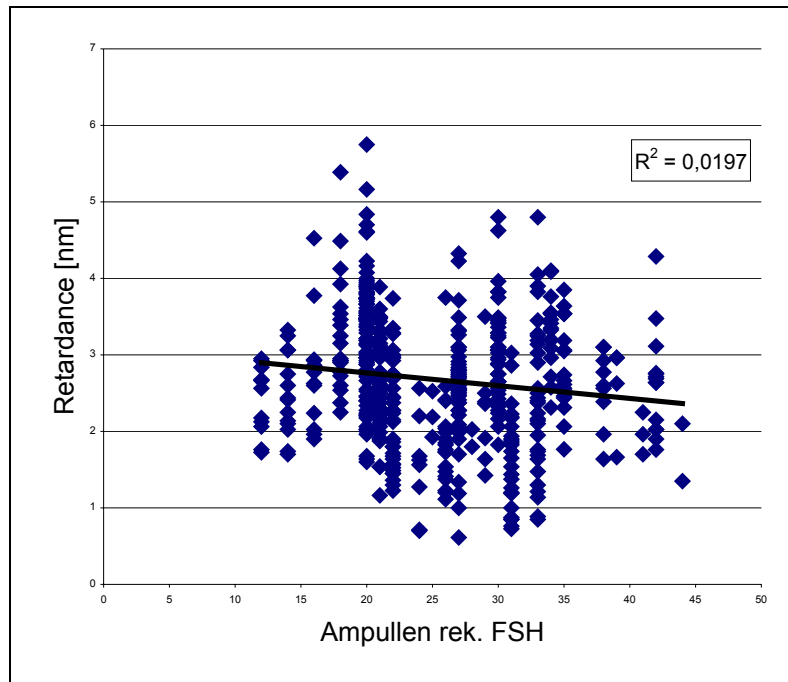
	1	2	3
Ampullen	<25	25-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	2,02 $\pm$ 0,68	2,49 $\pm$ 0,86	2,54 $\pm$ 0,77
MW $\pm$ SD (HW)	2,18 $\pm$ 0,72	2,69 $\pm$ 0,90	2,73 $\pm$ 0,78
n Oozyten	116	304	103
n Zyklen	16	30	14

**Tab. 40:** Retardance des inner layer aller Metaphase II-Eizellen vs. verabreichte Dosis hmG, 327 Eizellen aus 49 Zyklen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Ampullen	<25	25-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	1,78 $\pm$ 0,72	2,26 $\pm$ 0,67	2,49 $\pm$ 0,69
MW $\pm$ SD (HW)	1,91 $\pm$ 0,73	2,45 $\pm$ 0,69	2,67 $\pm$ 0,69
n Oozyten	47	213	67
n Zyklen	10	27	12

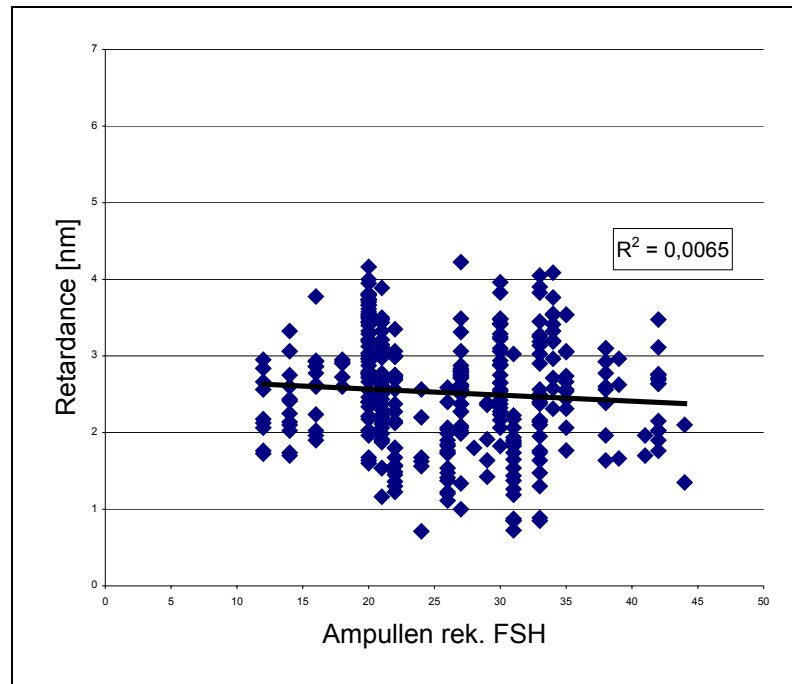
### 5.7.3.2 rekFSH-Dosis

Die Auswertung der applizierten Dosis rekombinanten FSH ergibt ein anderes Bild. Hier zeigt sich lediglich bei der Analyse aller Oozyten allenfalls ein negativer Zusammenhang der Retardance mit der Dosis (Abb. 23). Betrachtet man nur die Metaphase II-Oozyten, ist keinerlei Trend mehr festzustellen (Abb. 24).



**Abb. 23:**

Die Retardance des inner layer korreliert negativ mit der verabreichten Hormonmenge (FSH).  
Retardance des inner layer aller Eizellen vs. verabreichte Dosis rek. FSH, 40 Zyklen, 528 Eizellen

**Abb. 24:**

Die Retardance des inner layer von Metaphase II- Eizellen korreliert nicht mit der verabreichten Hormonmenge (FSH). Retardance des inner layer aller Metaphase II- Eizellen vs. verabreichte Dosis rek. FSH, 37 Zyklen, 374 Eizellen

Die Einteilung der applizierten rekFSH-Dosis in drei Gruppen verdeutlicht dies (Tab. 41 und 42).

**Tab. 41:**

Retardance des inner layer aller Eizellen vs. verabreichte Dosis FSH 40 Zyklen, 528 Eizellen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Ampullen	<25	25-35	>35
MW ± SD (Ret)	2,84 ± 0,78	2,56 ± 0,84	2,54 ± 0,60
MW ± SD (HW)	3,07 ± 0,87	2,76 ± 0,87	2,68 ± 0,65
MW ± SD (Alter)	31,0 ± 0,8	30,1 ± 3,5	33,6 ± 1,8
n Oozyten	267	231	30
n Zyklen	18	18	4

**Tab. 42:** Retardance des inner layer aller Metaphase II-Eizellen vs. verabreichte Dosis FSH, 374 Eizellen, 37 Zyklen. Alle Retardancewerte in nm.

	1	2	3
Ampullen	<25	25-35	>35
MW $\pm$ SD (Ret)	2,68 $\pm$ 0,67	2,41 $\pm$ 0,77	2,47 $\pm$ 0,52
MW $\pm$ SD (HW)	2,90 $\pm$ 0,75	2,61 $\pm$ 0,80	2,60 $\pm$ 0,54
MW $\pm$ SD (Alter)	31,1 $\pm$ 4,0	30,2 $\pm$ 3,5	33,7 $\pm$ 1,9
n Oozyten	182	165	27
n Zyklen	16	17	4



### 5.7.4 Schwangerschaftseintritt

Es wurde lediglich eine leichte Tendenz derart beobachtet, dass Oozyten, die in Zyklen gewonnen wurden, die zu einer Schwangerschaft führten, zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse eine höhere Retardance aufwiesen, als Oozyten, die in Zyklen gewonnen wurden, die nicht zum Eintritt einer Schwangerschaft führten. Diese Tendenz erreichte keine statistische Signifikanz (Tab. 43):

**Tab. 43:** Retardance des inner layer aller Oozyten vs. Schwangerschaft, 1025 Oozyten, 97 Zyklen, an 1058 Oozyten fehlende: kein Schwangerschaftstest bekannt. Alle Retardancewerte in nm.

	Schwanger	Nicht schwanger
MW $\pm$ SD (Ret)	2,60 $\pm$ 0,83	2,53 $\pm$ 0,84
MW $\pm$ SD (HW)	2,82 $\pm$ 0,89	2,72 $\pm$ 0,89
n Oozyten	352	673
n Zyklen	32	65

Analysiert man nur die Retardances der Metaphase II-Oozyten der Schwangerschafts- bzw. Nicht-Schwangerschaftszyklen, erhält man ein ähnliches Resultat (Tab. 44):

**Tab. 44:** Retardance des inner layer aller Metaphase II-Oozyten vs. Schwangerschaft, 691 Oozyten aus 85 Zyklen, an 706 Oozyten fehlende: kein Schwangerschaftstest bekannt. Alle Retardancewerte in nm.

	Schwanger	Nicht schwanger
MW $\pm$ SD (Ret)	2,44 $\pm$ 0,75	2,38 $\pm$ 0,72
MW $\pm$ SD (HW)	2,65 $\pm$ 0,75	2,56 $\pm$ 0,76
n Oozyten	240	451
n Zyklen	28	57

Betrachtet man nur die Retardances der Oozyten, die letztlich auch transferiert wurden, ist keinerlei Trend mehr zu beobachten (Tab. 45):

**Tab. 45:** Retardance des inner layer aller transferierten Oozyten vs. Schwangerschaft, 237 Oozyten, 89 Zyklen, (an 241 Embryonen fehlende: kein Schwangerschaftstest bekannt). Alle Retardancewerte in nm.

	Schwanger	Nicht Schwanger
MW $\pm$ SD (Ret)	2,37 $\pm$ 0,71	2,39 $\pm$ 0,78
MW $\pm$ SD (HW)	2,60 $\pm$ 0,76	2,57 $\pm$ 0,80
n Oozyten	85	152
n Zyklen	30	59

### Intrakohortenanalyse:

Auch in der Intrakohortenanalyse zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem  $\Delta$ Ret-Wert und dem Schwangerschaftseintritt (Tab. 46)

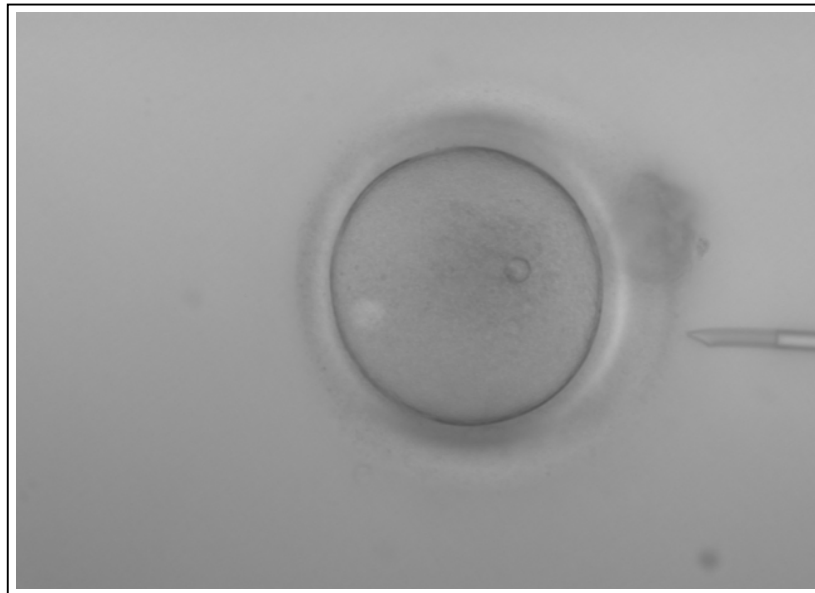
**Tab. 46:** Retardance des inner layer aller transferierten Oozyten vs. Schwangerschaft, 209 Oozyten, 78 Zyklen an 89 fehlende: zum Zeitpunkt des Polscope keine MII-EZ vorhanden, folglich auch kein MW MII, inseminierte EZ nachgereift. Alle Retardancewerte in nm.

	Schwanger	Nicht Schwanger
MW $\pm$ SD ( $\Delta$ Ret)	0,090 $\pm$ 0,462	0,028 $\pm$ 0,514
n Oozyten	75	134
n Zyklen	26	52

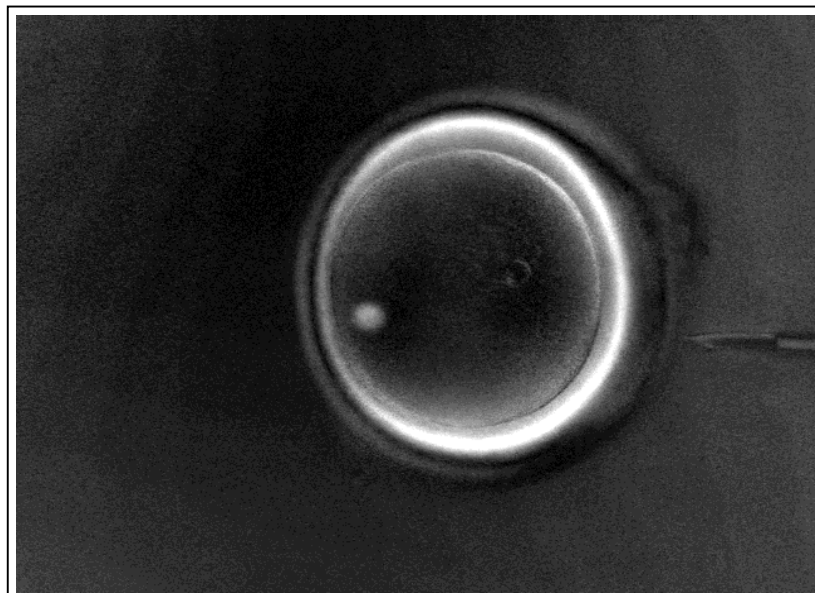
### **5.8 Oozyten in der Polscope-Analyse**

Die Abbildungen 21-34 zeigen beispielhaft Oozyten, wie sie im Verlauf der Untersuchungen vorgefunden wurden. Abgebildet sind jeweils eine Oozyte im Hellfeld sowie die gleiche Oozyte in der unmittelbar darauf folgenden Retardanceanalyse.

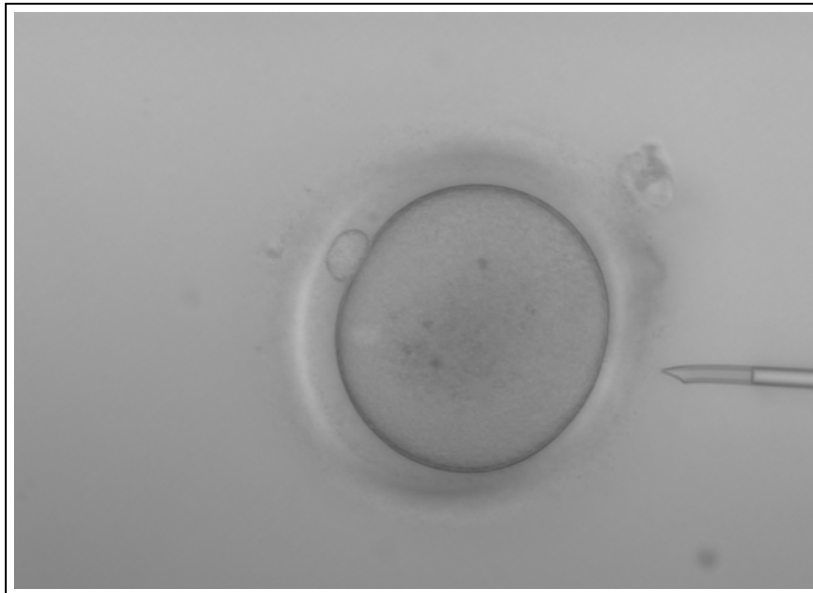
Die abgebildeten Oozyten entstammen zwei Zyklen (Zyklus 1: Abb. 25-34, Zyklus 2: Abb. 35-38). Es liegen sämtliche Reifestadien vor (Metaphase II, Telophase I, Metaphase I, Prophase I). Die individuellen durchschnittlichen Retardances sind zusammen mit dem Mittelwert der durchschnittlichen Retardances der Metaphase II-Oozyten dieses Zyklus in den Bildunterschriften angegeben. Die zum Teil unterschiedliche Helligkeit der verschiedenen Aufnahmen spiegelt lediglich einen fotografischen Belichtungseffekt wieder. Die Retardancewerte werden hiervon nicht beeinflusst. Vielmehr wird an einem sehr dunklen Hintergrund bereits erkennbar, dass es sich um Oozyten mit besonders hoher Retardance handeln muss, da die fotografische Belichtung vom System automatisch an die Retardance angeglichen wurde, was bei hoher Retardance zu einer Unterbelichtung und somit zu einer Verdunkelung des Hintergrundes führte.



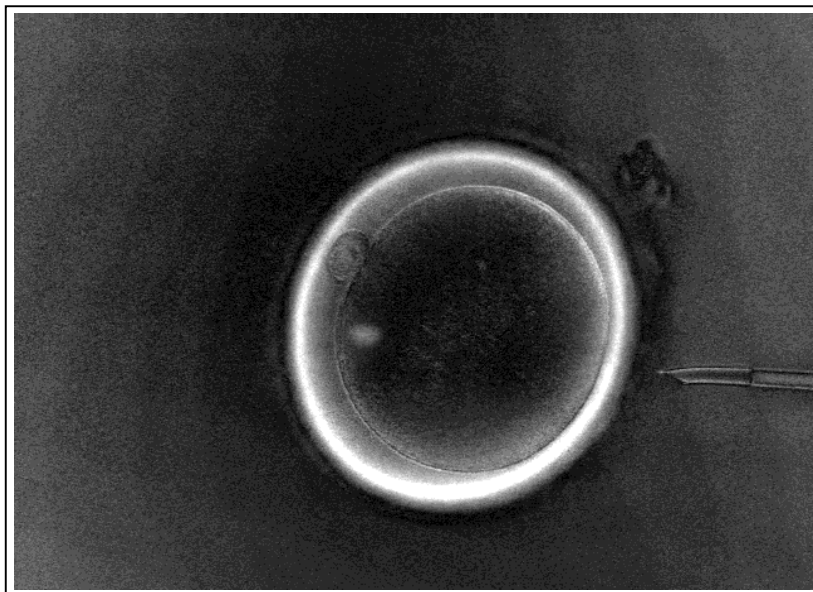
**Abb. 25** Metaphase-I-Oozyte mit meiotischer Spindel



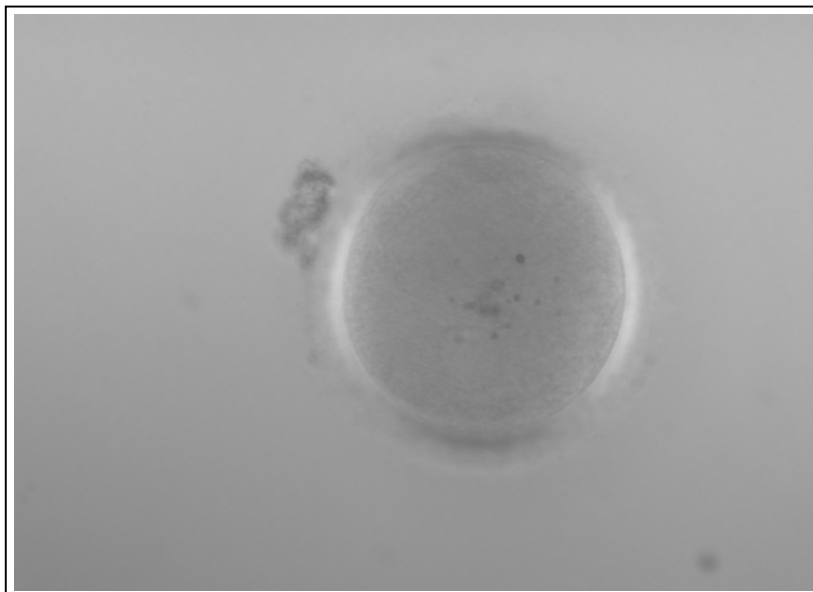
**Abb. 26** Gleiche Oozyte wie in Abb. 25 im Polscope-Bild  
Metaphase-I-Oozyte mit meiotischer Spindel  
Hoher Retardancewert der inneren Zonaschicht  
Durchschnittliche Retardance der MII-Oozyten:  $2,87 \pm 0,33$  nm.  
Retardancewert dieser Oozyte: 3,31 nm.



**Abb. 27** Metaphase-II-Oozyte mit meiotischer Spindel



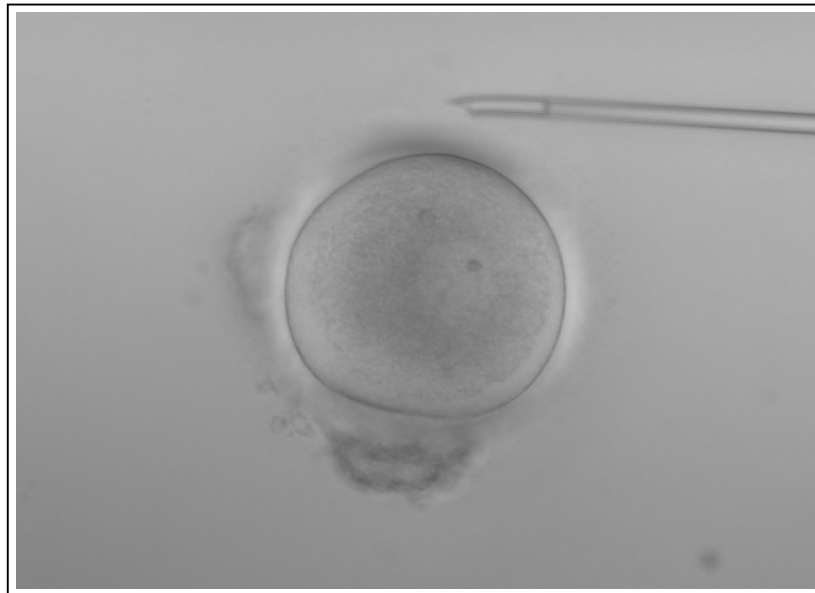
**Abb. 28** Gleiche Oozyte wie in Abb. 27 im Polscope-Bild  
Metaphase-II-Oozyte mit meiotischer Spindel  
Normaler Retardancewert der inneren Zonenschicht  
Durchschnittliche Retardance der MII-Oozyten:  $2,87 \pm 0,33$  nm.  
Retardancewert dieser Oozyte: 2,93 nm.



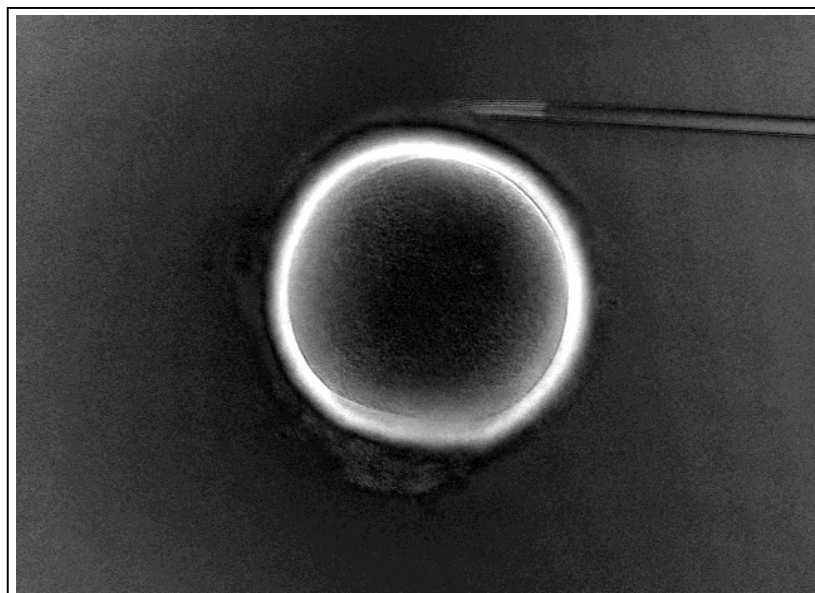
**Abb. 29** Prophase-I-Oozyte



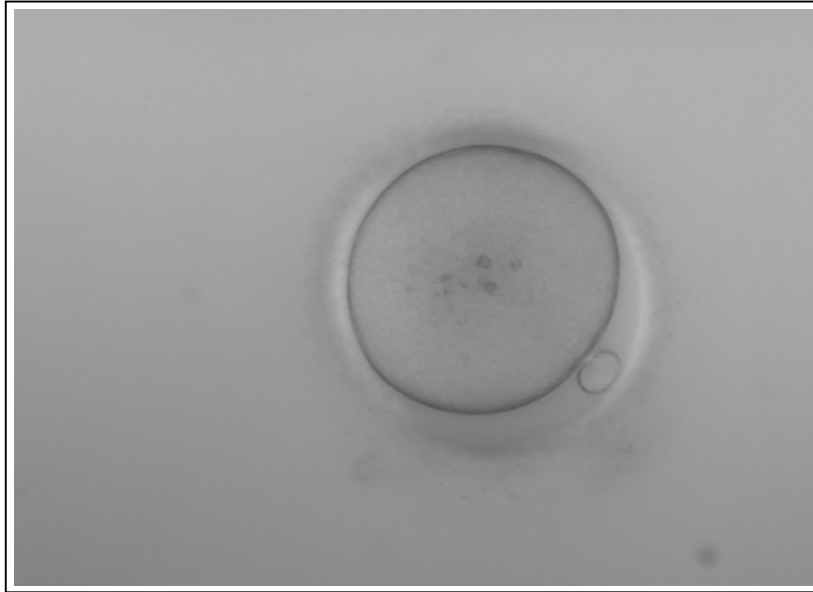
**Abb. 30** Gleiche Oozyte wie in Abb. 29 im Polscope-Bild  
Prophase-I-Oozyte  
Hoher Retardancewert der inneren Zonaschicht  
Durchschnittliche Retardance der MII-Oozyten:  $2,87 \pm 0,33$  nm.  
Retardancewert dieser Oozyte: 4,04 nm.



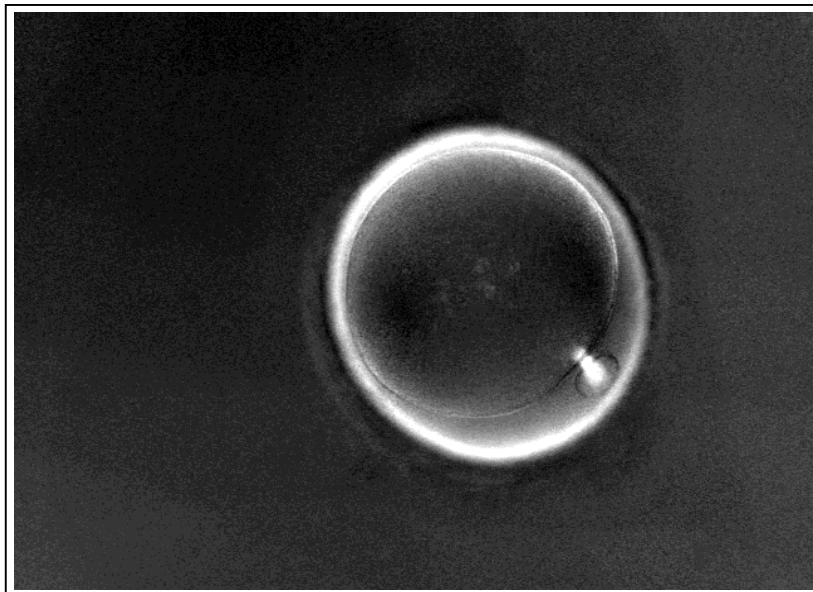
**Abb. 31** Prophase-I-Oozyte



**Abb. 32** Gleiche Oozyte wie in Abb. 31 im Polscope-Bild  
Prophase-I-Oozyte  
Hoher Retardancewert der inneren Zonaschicht  
Durchschnittliche Retardance der MII-Oozyten:  $2,87 \pm 0,33$  nm.  
Retardancewert dieser Oozyte: 4,30 nm.

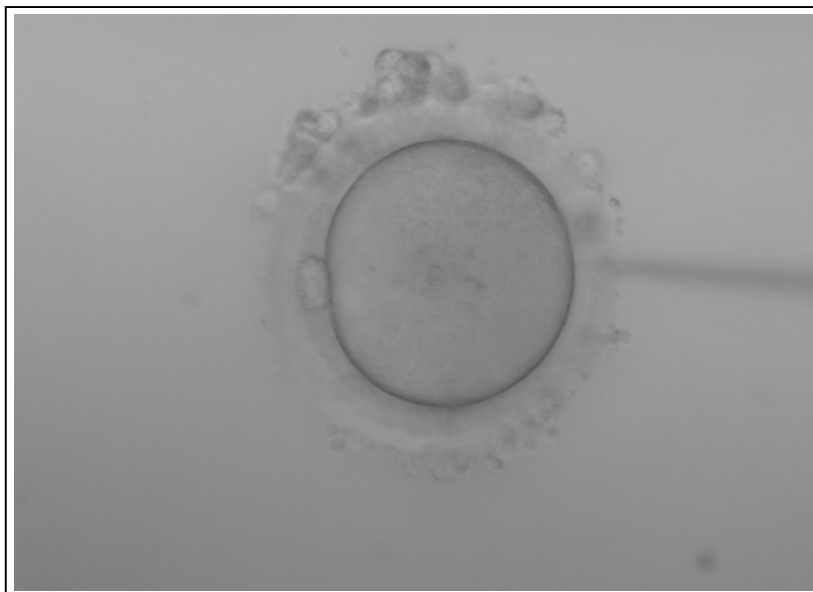


**Abb. 33** Telophase-I-Oozyte

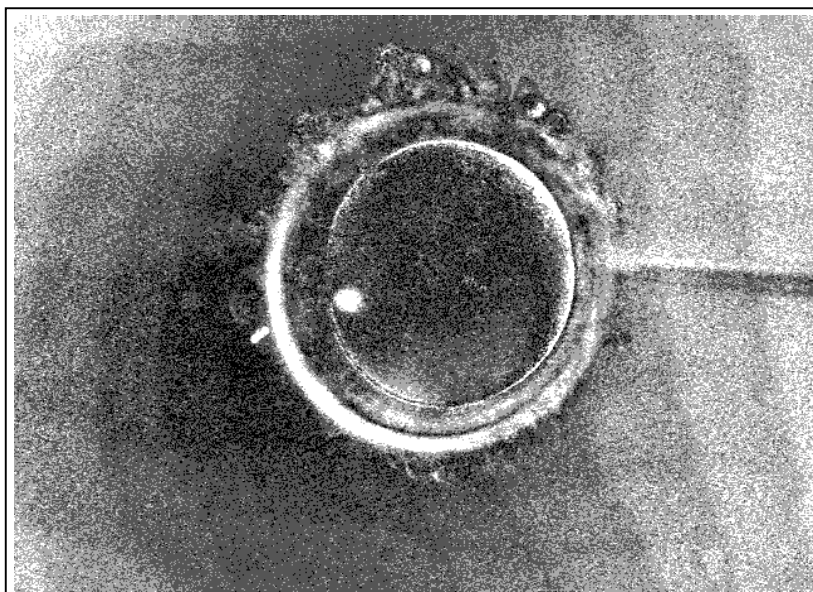


**Abb. 34** Gleiche Oozyte wie in Abb. 33 im Polscope-Bild  
Telophase-I-Oozyte  
Hoher Retardancewert der inneren Zonaschicht  
Durchschnittliche Retardance der MII-Oozyten:  $2,87 \pm 0,33$  nm.  
Retardancewert dieser Oozyte: 3,26 nm.

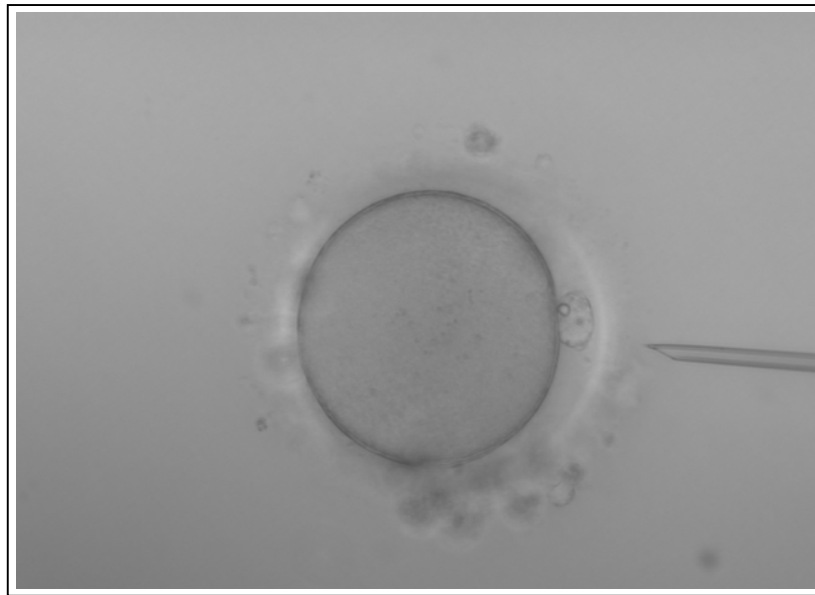




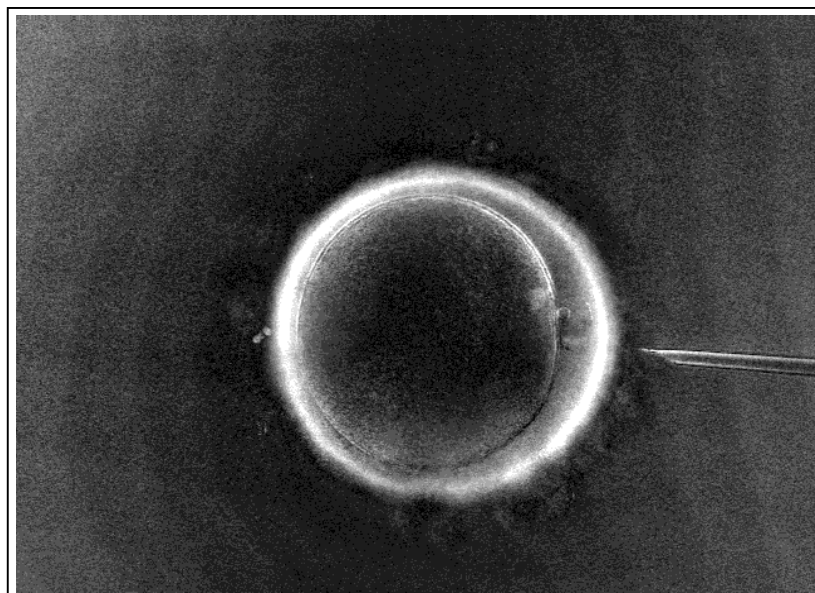
**Abb. 35** Metaphase-II-Oozyte



**Abb. 36** Gleiche Oozyte wie in Abb. 35 im Polscope-Bild  
Metaphase-II-Oozyte  
Niedriger Retardancewert der inneren Zonenschicht  
Durchschnittliche Retardance der MII-Oozyten:  $1,45 \pm 0,70$  nm.  
Retardancewert dieser Oozyte: 0,30 nm.



**Abb. 37** Metaphase-II-Oozyte



**Abb. 38** Gleiche Oozyte wie in Abb. 37 im Polscope-Bild  
Metaphase-II-Oozyte  
Hoher Retardancewert der inneren Zonaschicht  
Durchschnittliche Retardance der MII-Oozyten:  $1,45 \pm 0,70$  nm.  
Retardancewert dieser Oozyte: 2,16 nm.

## **6. Diskussion**

### ***6.1 Ergebnisse der in-vitro-Fertilisation***

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob die Struktur der inneren Schicht der Zona pellucida humaner Oozyten einen neuen Parameter der Eizellqualität darstellt, welcher bei der In-vitro-Fertilisation beim Menschen die Erkennung von Embryonen mit hohem Implantationspotenzial verbessern kann. Dazu wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen konventionellen Parametern der Qualität von Oozyten, Zygoten und Embryonen und der optischen Retardance der inneren Zonaschicht im zirkular polarisierten Licht bestehen.

In der In-vitro-Fertilisation können die Fertilisierungsrate, Embryonalparameter wie Blastomerenanzahl und Fragmentierungsgrad 40 Stunden nach Insemination sowie die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer als Kontrollparameter ordnungsgemäßer Durchführung der Laborverfahren dienen.

Die in dieser Arbeit erzielten Fertilisierungsraten, Embryonalparameter sowie die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer lagen alle im Normbereich langjähriger Ergebnisse der assistierten Reproduktion (vgl. Tab. 5, Abschnitt 5.1). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass sich die Analyse der Zonaretardance auf eine sichere Datenbasis hinsichtlich des Outcome der In-vitro-Fertilisation stützt.

### ***6.2 PoIScope-Analyse***

#### **6.2.1 Vorhandensein einer Metaphasespindel**

Die Anwesenheit einer Metaphasespindel wurde in der vorliegenden Arbeit nicht als Untersuchungsparameter, sondern lediglich als Kontrollparameter in die Auswertung einbezogen.

In der Literatur wird die Anwesenheit von Metaphasespindeln bei Oozyten mit erstem Polkörper mit ca. 60 – 80 Prozent angegeben (WANG ET AL. 2001A, WANG ET AL. 2001B, VAN DER VEEN ET AL. 2006). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Rate des Vorhandenseins einer Metaphasespindel von ca. 60% bei Oozyten mit erstem Polkörper liegt damit im unteren Bereich der von anderen Arbeitsgruppen

aufgefunden Werte. Eine Beeinträchtigung der Spindelausbildung durch das Handling der Oozyten ist in diesem Zusammenhang als unwahrscheinlich anzusehen, da sämtliche anderen Parameter der Oozyten-, Zygoten- und Embryonalqualität, sowie Fertilisierungsrate, Embryonalentwicklungsrate und Schwangerschaftsrate sämtlich im Normbereich angesiedelt waren.

Es muss vielmehr davon ausgegangen werden, dass eine Abweichung der Spindellocalisation von der Fokusebene zu einer Nichterfassung der Spindel führte. In der vorliegenden Arbeit wurde von jeder Oozyte lediglich eine PolScope-Aufnahme in einer Fokusebene erstellt, um die Analysedauer auf ein Minimum zu beschränken. Es kann vermutet werden, dass eine PolScope-Analyse der Oozyten in mehreren Fokusebenen zu einer Erhöhung der Auffindungsrate der Spindel führen könnte.

### **6.2.2 Homogenität der Zonaschicht**

Die untersuchten Oozyten wiesen in der Regel keine einheitliche Verteilung der Retardance über den gesamten Zonaquerschnitt auf. Vielmehr wurden häufig mehr oder weniger ausgedehnte Bereiche festgestellt, in denen die Zonaretardance niedrigere Werte als in den benachbarten Regionen der Zona pellucida zeigte (vgl. Abb. 16, Abschnitt 5.2). Um die Messung der Retardance weitestgehend zu vereinheitlichen, wurden alle Oozyten, soweit möglich, in die gleiche Bezugsposition zu einer Symmetrieachse gebracht. Bei Metaphase II-Oozyten war die Symmetrieachse durch den 1. Polkörper definiert, bei Telophase I-Oozyten ebenfalls. Bei Prophase I-Oozyten diente der Nukleus als Symmetrieachse, bei Metaphase I-Oozyten eine Spindel, soweit sie vorhanden war. Existierte keine Symmetrieachse (dies war lediglich bei Metaphase I-Oozyten ohne Spindel der Fall), erfolgte die Positionierung der Oozyte zufällig.

Um ein möglichst genaues Abbild der Verteilung der Retardance der inneren Zonaschicht zu erhalten und eine Verfälschung durch Überrepräsentierungen z. B. der Bereiche niedriger Retardance zu vermeiden, wurde nach der Methode von Pelletier (PELLETIER ET AL. 2004) mit acht gleichmäßig über den Querschnitt der Zona verteilten Messpunkten gearbeitet. Die vergleichsweise große Anzahl der Messlokalisationen hatte zur Folge, dass aus Gründen der Praktikabilität der Maximalwert der Retardance („peak retardance“ bestimmt wurde, auch dies analog

zur Methode von Pelletier. Eine alternative Messmethodik stellte das Verfahren nach Shen dar (SHEN ET AL. 2005). Hierbei wurde die durchschnittliche Retardance („mean retardance“) über die gesamte Breite eines Linescans durch die innere Schicht der Zona pellucida ermittelt. Dieses Verfahren hat einerseits den Vorteil einer Stabilisierung des Messwertes, da entlang des Linescans eine Vielzahl von Messwerten erfasst werden. Andererseits ist die Festlegung des Linescanbereiches, innerhalb dessen die Messwerte gemittelt werden, einer gewissen Subjektivität des Untersuchers unterworfen. Weiterhin wurde in dieser Publikation durch die große Anzahl der zu mittellenden Messwerten lediglich drei Lokalisationen auf der Zona pellucida gemessen. Aufgrund der bereits beschriebenen Inhomogenität der Zona pellucida wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die Erfassung möglichst vieler Messlokalisationen gelegt. Eine Mittelung aller Messwerte, d. h. die Bestimmung der „mean retardance“ wurde aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit zugunsten der Bestimmung der „peak retardance“ verworfen.

Die Existenz von Bereichen niedriger Retardance auf der inneren Schicht der Zona pellucida könnte dennoch dazu führen, dass die durchschnittlichen Retardances (Ret) der analysierten Oozyten sehr große Varianzen zeigen. Um mögliche Verfälschungen der überprüften Zusammenhänge mit den Oozyten-, Zygoten- und Zyklusparametern auszuschließen, wurde der sogenannte Hauptwert (HW) eingeführt. Der Hauptwert war als der am häufigsten vorkommende Einzelmesswert innerhalb der acht gleichmäßig um den Oozytenquerschnitt verteilten Messpunkte definiert. Traten zwei Werte gleich häufig auf, wurde der höhere als Hauptwert angenommen. Erwartungsgemäß lagen die Hauptwerte in allen Fällen über den Retardancewerten (Ret). Dabei folgten sie stabil den Trends der Retardancewerte (Ret). Auf eine gesonderte statistische Auswertung des Hauptwertes wurde deshalb im Ergebnisteil zu Gunsten einer größeren Übersichtlichkeit verzichtet. Er wurde jedoch in allen Tabellen aufgeführt, um seine Reproduzierbarkeit bezüglich des Retardancewertes (Ret) zu dokumentieren.

### **6.2.3 Reliabilität der Messungen**

Die vorgenommenen Messungen folgten der Methode von Pelletier (PELLETIER ET AL. 2004). Die Auswertung der Dreifachbestimmungen der Zonaretardance bei 14

Oozyten ergab einen linearen Zusammenhang zwischen den Einzelmessungen mit einem  $R^2$ -Wert von 0,99. Dies bestätigte die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit des Imaging- und Analysesystems sowie der durchgeführten Messroutine.

### **6.3 Zusammenhänge der Zonaretardance mit Oozytenparametern**

#### **6.3.1 Inter- und Intrakohortenanalyse**

Bei der Datenanalyse wurde deutlich, dass die Retardance der inneren Zonaschicht sowohl im Vergleich zwischen den Zyklen, d.h. zwischen den Eizellkohorten, als auch innerhalb eines Zyklus, also innerhalb einer Eizellkohorte, eine erhebliche Bandbreite aufwies. Dieser Befund wurde bereits von Pelletier (PELLETIER ET AL. 2004) in der ersten Publikation, die sich mit der Thematik der Zonaretardanceanalyse befasste, gestellt.

Bis heute existiert jedoch keine Untersuchung, die systematisch einen eventuellen Zusammenhang der Zonaretardance der einzelnen Oozyte mit Patienten-, Zygoten- und Embryonalparametern im Kontext sowohl der Inter- als auch der Intrakohortenvarianz betrachtet.

Gerade die Analyse der Intrakohortenvarianz ist aber die unbedingte Voraussetzung dafür, die Retardanceanalyse als Kriterium zur Selektion von Oozyten mit hohem Entwicklungspotenzial in der In-vitro-Fertilisation einsetzen zu können. Allein von den absoluten Retardancewerten der untersuchten Oozyten können aufgrund des fehlenden Vergleiches der untersuchten Oozyten mit den anderen Oozyten der gleichen Kohorte und der hohen Varianz innerhalb der Kohorte keine allgemein gültigen Aussagen abgeleitet werden.

Eine rein auf den Mittelwerten der Zonaretardance basierende Auswertung bestimmter Ereignisse, wie zum Beispiel Schwangerschaftseintritt, kann lediglich zu Aussagen über die Kohorte bzw. den Zyklus führen, aus dem die untersuchten Oozyten stammen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der  $\Delta$ Ret-Wert eingeführt. Dieser zusätzliche Parameter sollte die relative Position der Retardance einer Oozyte innerhalb des Retardancebereiches aller Oozyten eines Zyklus (d. h. einer Eizellkohorte) bestimmen. Diese Positionsbestimmung erforderte die Definition eines

Bezugspunktes, zu dem die Differenz der Retardance jeder einzelnen Oozyte bestimmt werden konnte. Aufgrund der praktischen Bedeutung, die reife (d. h. Metaphase II-) Oozyten in der In-vitro-Fertilisation besitzen, wurde dieser Bezugspunkt als der Mittelwert der Retardance der inneren Zonaschicht aller Metaphase II-Oozyten der jeweiligen Eizellkohorte definiert.

### **6.3.2 Reifegrad und Zonaretardance**

In Abschnitt 5.4.1 und 5.4.2 wurde gezeigt, dass der Reifegrad der gewonnenen Oozyten nicht mit dem Alter oder dem Body-Mass-Index der Frauen assoziiert ist. Ein signifikanter Zusammenhang besteht jedoch mit der Retardance der inneren Zonaschicht.

Dabei zeigen in der Interkohortenanalyse die genomisch unreifen Oozyten (Prophase I, Metaphase I und Telophase I) höhere Retardancewerte als Metaphase II-Oozyten. Die durchschnittliche Retardance der Prophase I-Oozyten ist dabei am höchsten, gefolgt von den Telophase I- und den Metaphase I-Oozyten (Tab. 7, Abschnitt 5.4.2).

Betrachtet man die Intrakohortenanalyse, ist sogar ein linearer Zusammenhang zwischen dem Reifegrad und der Zonaretardance festzustellen (vgl. Tab. 8, Abschnitt 5.4.2). Danach nimmt der  $\Delta$ Ret-Wert in der Reihenfolge Prophase I>Metaphase I>Telophase I>Metaphase II ab, d.h. je „unreifer“ eine Oozyte ist, desto größer ist die Abweichung ihres Retardancewertes von der durchschnittlichen Retardance aller Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte.

Dieses Phänomen wird in der vorliegenden Arbeit erstmals eindeutig statistisch signifikant nachgewiesen. Pelletier zeigte in seiner Arbeit bereits Daten, die in die Richtung dieses Resultates deuteten, konnte dies jedoch aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Oozyten und der fehlenden Analyse des  $\Delta$ Ret-Wertes nicht eindeutig belegen (PELLETIER ET AL. 2004).

Die Retardance veränderte sich im Verlauf der weiteren in-vitro-Kultur nicht, sondern verblieb vielmehr auf konstantem Niveau (vgl. Tab. 10, Abschnitt 5.4.4). Dieser Befund wird in der Literatur bestätigt (KILANI ET AL. 2006). Im Gegensatz dazu lief die genomische Reifung in Kultur weiter ab, ein Phänomen, dass für Säuger bereits seit den 1930er Jahren bekannt ist (HUNTER 1998). Dabei erreichten Telophase I-,

Metaphase I- und Prophase I-Oozyten die Metaphase II mit einer in dieser Reihenfolge abnehmenden Wahrscheinlichkeit. Dies konnte explizit bei Oozyten beobachtet werden, die zum Zeitpunkt der Retardance-Analyse in einem Unreifestadium vorlagen, zum Zeitpunkt der ICSI-Insemination aber bereits in-vitro zur Metaphase II nachgereift waren (und inseminiert wurden).

Es muss also davon ausgegangen werden, dass Metaphase II-Oozyten, die eine im Vergleich mit den anderen Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus erhöhte Retardance der inneren Zona pellucida-Schicht aufwiesen (positiver  $\Delta\text{Ret}$ ), erst kurz vor der Analyse zur genomischen Reife, d. h. zur Metaphase II gelangt waren.

Das Verbleiben der Zona pellucida in einem für eine Metaphase II-Oozyte untypischen Organisationsgrad, der sich in der optischen Eigenschaft der erhöhten Retardance widerspiegelt, wird als Indiz für eine Entkopplung der genomischen und zytoplasmatischen Reifung gewertet. Eine solche Entkopplung wird seit langem als ein die Entwicklungskompetenz von Oozyten in negativer Weise beeinflussender Faktor diskutiert (HUNTER 1998, KRISHER 2004).

Die Zona-Retardance-Analyse bietet die bislang einzige Möglichkeit, vitale, nicht fixierte Oozyten zu identifizieren, bei denen vermutlich eine Entkopplung der genomischen und zytoplasmatischen Reife vorliegt. Diese Oozyten konnten bislang nicht erkannt werden, da die konventionelle Beurteilung der Reife über das Vorhandensein eines Nukleus oder des ersten Polkörpers, d. h. letztlich auf Basis der genomischen Reife erfolgt.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass Metaphase II-Oozyten mit erhöhter Retardance (insbesondere diejenigen, die zwischen Retardanceanalyse und Insemination nachgereift waren) eine deutlich verringerte Fertilisierungsrate aufwiesen als Metaphase II-Oozyten mit durchschnittlicher Retardance.

Es ist zu vermuten, dass dieser Effekt auf die hier postulierte Entkopplung von zytoplasmatischer und genomischer Reife zurückzuführen ist. Dieser Befund wird unterstützt durch die Arbeit von Huang, der zeigte, dass Oozyten, die erst kurz vor der Insemination das Metaphase II-Stadium erreichten, eine reduzierte Fertilisierungswahrscheinlichkeit aufweisen (HUANG ET AL. 2002). Der vorliegende



Befund unterstützt somit die These, dass die Retardance der inneren Zona pellucida-Schicht als ein Marker der zytoplasmatischen Reife aufgefasst werden kann.

Für die Praxis der In-vitro-Fertilisation scheint diese Tatsache jedoch zunächst von untergeordneter Bedeutung zu sein, da in der Regel genügend befruchtete Oozyten vorliegen, um einen Transfer von einem oder mehreren Embryonen zu ermöglichen. Dieser Aspekt gewinnt jedoch an Bedeutung, berücksichtigt man, dass bei einem nicht zu vernachlässigenden Anteil der Oozyten mit relativ erhöhter Retardance durchaus auch eine Fertilisierung eintritt. Hier stellt sich die Frage, ob sich die Entkopplung der zytoplasmatischen Reife advers auf die Embryonalentwicklung und damit auf die Implantationswahrscheinlichkeit auswirkt. Wäre dies der Fall, sollte man fertilisierte Oozyten mit erhöhter Retardance von der weiteren Kultur und einem Transfer ausschließen. Aus diesem Grund war es essentiell, mögliche Zusammenhänge der Retardance der inneren Zonaschicht mit weiteren Parametern der Zygoten- und Embryoqualität zu untersuchen. Diese werden in den Abschnitten 6.4ff diskutiert.

### **6.3.3 Nachreife von Prophase I-Oozyten**

In der vorliegenden Untersuchung reiften 33% der gewonnenen Prophase I-Oozyten (Germinalvesikel) in-vitro im Zeitraum zwischen Polscope-Analyse und ICSI-Insemination zu Oozyten mit erstem Polkörper nach. Diese zunächst recht hoch erscheinende Zahl wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt. Demnach lässt sich bei 88,9% der Oozyten im Germinalvesikelstadium eine Aufnahme der Meiose innerhalb von sechs Stunden nach Aspiration beobachten (COMBELLES ET AL. 2002). Nach 24 Stunden erreichen 55% bis 67% der Oozyten im Germinalvesikelstadium die Metaphase II (ROBERTS ET AL 2002, COMBELLES ET AL. 2002).

## **6.4 Zusammenhang der Zonaretardance mit Zygotenparametern**

### **6.4.1 Fertilisierung**

Der Zusammenhang der Fertilisierung mit der Zonaretardance wurde bereits in Abschnitt 6.2.2.2 unter dem Aspekt der Reife der Oozyten diskutiert. Es ist davon auszugehen, dass schlechtere Fertilisierungsergebnisse von Oozyten mit erhöhter Zonaretardance (sowohl Ret als auch  $\Delta$ Ret) auf eine Entkoppelung von genomischer und zytoplasmatischer Reife der Oozyten zurückzuführen ist.

Im Falle der regelrechten Fertilisierung der Oozyte konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Qualität der Pronuklei und der Retardance der inneren Zonaschicht nachgewiesen werden (vgl. Tab. 21, Abschnitt 5.5.2.1). Demnach wiesen Oozyten, die nach Fertilisierung den schlechtesten Pronukleus-Score (Score 1) zeigten, in der Interkohortenanalyse eine signifikant niedrigere Zonaretardance auf als die Oozyten mit besseren Pronukleus-Scores.

In der Intrakohortenanalyse wurde hingegen kein Zusammenhang zwischen  $\Delta$ Ret und Pronukleus-Score festgestellt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Qualität der Pronuklei eher durch die Oozytenkohorte bestimmt wird. Damit ergäbe sich auf dieser Basis keine Möglichkeit zur Selektion von Oozyten mit potenziell gutem PN-Score, sondern lediglich ein prognostischer Wert für den betreffenden Zyklus. Demnach würden fertilisierte Oozyten aus Kohorten, die (mit ihrer spezifischen Intrakohortenvarianz) insgesamt im niedrigen Bereich der Zonaretardance angesiedelt sind, eher einen schlechten Pronukleus-Score aufweisen als fertilisierte Oozyte, die Kohorten mit eher höheren Retardances entstammen.

### **6.4.2 Weitere morphologische Parameter**

Alle untersuchten Parameter werden in der Literatur als Marker der Zygotenqualität aufgeführt. Der Halo-Effekt spiegelt demnach eine Polarisierung des Zytoplasmas wieder, die für eine regelrechte Entwicklung des frühen Embryos von Bedeutung ist (STALF ET AL. 2002, PLANCHA ET AL. 2005). Refraktile Körper sind, ebenso wie Vakuolen, Granulierungen oder Deformierungen des Zytoplasmas negativ mit der

Fertilisierungs- und Implantationswahrscheinlichkeit von Embryonen assoziiert (SERHAL ET AL. 1997, KAHRAMAN 2000).

Das Vorhandensein refrakter Körper in den Pronukleusstadien zeigte in der vorliegenden Untersuchung einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Retardance der inneren Zonaschicht der zugrunde liegenden Oozyten. Dabei war mit zunehmender Dichte der refraktilen Körper eine Erhöhung der Retardancewerte festzustellen (Tab. 23, Abschnitt 5.5.2.2). In der Intrakohortenanalyse zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Retardance und Anwesenheit refrakter Körper.

Der Parameter Zytoplasmadeformierung zeigte ebenfalls einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Zonaretardance. Hier wiesen deformierte Zygoten zum Zeitpunkt der Retardanceanalyse in der Interkohortenanalyse signifikant höhere Retardancewerte auf als nicht deformierte Zygoten. In der Intrakohortenanalyse wird dieser Zusammenhang noch deutlicher. Demnach wiesen deformierte Oozyten ein  $\Delta\text{Ret}$  von  $0,350 \pm 0,545$  auf (vgl. Tab. 23, Abschnitt 5.5.2.2).

Aufgrund der vorliegenden Befunde zeigt sich, dass die Retardance der inneren Zonaschicht (Ret und  $\Delta\text{Ret}$ ) häufig derart mit Parametern der Oozyten- und Zygotenqualität assoziiert ist, dass eine höhere Retardance mit schlechter Qualität zusammenhängt.

### **6.5 Zusammenhang der Zonaretardance mit Embryonalparametern**

Es ist bekannt, dass das Entwicklungs- und Implantationspotenzial von Embryonen mit ihrer Tendenz, Zytoplasmafragmente von den Blastomeren abzuschneiden (VAN BLERKOM ET AL. 2001) sowie ihrer Mitoserate zusammenhängt (CHECK ET AL. 2001). Dabei besitzen Embryonen ein umso höheres Implantationspotenzial, je weniger fragmentiert ihre Blastomere und je höher die Mitoserate ist. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Zusammenhänge zwischen diesen beiden Embryonalparametern und der Retardance der inneren Zonenschicht der zugrunde liegenden Oozyten untersucht.

Es konnte hierbei statistisch signifikant nachgewiesen werden, dass Embryonen, die 40 Stunden nach der Insemination einen niedrigen Fragmentierungsgrad aufwiesen, sich aus Oozyten entwickelt hatten, die eine niedrigere Retardance (Ret) der inneren Zonenschicht aufwiesen als Oozyten die sich zu stärker fragmentierten Embryonen entwickelten (vgl. Tab. 24, Abschnitt 5.6.1).

Dieses Ergebnis bestätigte sich auch, betrachtet man ausschließlich Oozyten, die zum Zeitpunkt der Insemination bereits in Metaphase II vorlagen (vgl. Tab. 25, Abschnitt 5.6.1). Einflüsse auf den Zusammenhang Retardance - Fragmentierungsgrad durch den Einbezug nachgereifter Oozyten in die Auswertung können daher ausgeschlossen werden.

Dieses Resultat zeigte sich sowohl in der Inter- als auch in der Intrakohortenanalyse. Die am wenigsten fragmentierten Embryonen wiesen in der Intrakohortenanalyse negative  $\Delta$ Ret-Werte auf (vg. Tab. 26, 27, Abschnitt 5.6.1). Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass zytoplasmatisch unreife Oozyten (d. h. Oozyten mit reduziertem Entwicklungspotenzial) Retardancewerte aufweisen, die über dem Mittelwert aller Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte liegen. Zytoplasmatisch reife Oozyten müssten demnach einen Retardance-Wert aufweisen, der genau auf bzw. tendenziell eher unter dem Mittelwert aller Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte liegen, also einen  $\Delta$ Ret-Wert von nahezu Null oder im negativen Bereich.

Ein ähnlicher, statistisch aber nicht signifikanter Trend wie bei dem Zusammenhang der Retardance mit dem Fragmentierungsgrad ist zu beobachten, betrachtet man die

Anzahl der Blastomere 40 Stunden nach Insemination. Hierbei stammten Embryonen, die sich zu diesem Zeitpunkt im 4-Zellstadium befanden, von Metaphase II-Oozyten ab, deren Retardancewert ( $\Delta\text{Ret}$ ) unter oder nahe bei dem durchschnittlichen Retardancewert der Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte lagen.

Embryonen, die 40 Stunden nach Insemination weniger als vier Blastomere aufwiesen, stammten von Oozyten mit positiven  $\Delta\text{Ret}$ , d.h. im Vergleich zum Mittelwert der Metaphase II-Oozyten des gleichen Zyklus leicht erhöhten Retardance ab (Tab. 30, 31 Abschnitt 5.6.2). Die Interkohortenanalyse zeigte bei dieser Betrachtung keine Zusammenhänge zwischen Retardance und Blastomerenanzahl.

## **6.6 Zusammenhang der Retardance mit Zyklusparametern**

### **6.6.1 Alter**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Retardance (Ret) der inneren Zonenschicht tendenziell mit dem Alter der Frau, von der die Oozyten stammen, abnimmt (Abb. 19, Tab. 32, 33, Abschnitt 5.7.1). Dieser Trend trat nur bei Oozyten der Reifegrade Metaphase II bzw. Telophase I auf. Bei Metaphase I- und Prophase I-Oozyten war keinerlei Zusammenhang der Retardance mit dem Alter erkennbar.

Der Zusammenhang Alter – Retardance wurde als zyklusabhängig betrachtet und erreichte aufgrund zu geringer Zyklenzahlen keine statistische Signifikanz. In der Arbeit von Kilani wurde ebenfalls die Struktur der Zona pellucida mittels PoIScope untersucht (KILANI ET AL. 2006). Hierbei konnten keine Unterschiede der Zonaretardance bei Oozyten festgestellt werden, die von Frauen gewonnen wurden, die jünger bzw. älter als 38 Jahre waren. Allerdings wurden in dieser Studie lediglich 193 Oozyten von 29 Frauen analysiert. Es muss davon ausgegangen werden, dass der in der vorliegenden Arbeit festgestellte Trend erst durch hohe Zahl der untersuchten Oozyten erkennbar wurde.

### 6.6.2 Stimulation

Die Eizellreifung findet bei der ovariellen Hyperstimulation im Rahmen einer IVF-Behandlung unter dem Einfluss superphysiologischer Gonadotropindosen statt. Dabei kamen bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Behandlungszyklen Präparate zur Anwendung, die entweder gentechnisch hergestelltes, reines FSH oder aus Urin gewonnenes menopausales Gonadotropin enthielten. Humanes menopausales Gonadotropin enthält im Gegensatz zum rekombinanten FSH sowohl eine FSH- als auch eine LH-Aktivität.

Interessanterweise konnten Unterschiede in der Retardance der inneren Zonaschicht von Oozyten festgestellt werden, die aus Zyklen mit FSH- bzw. hmG-Regime stammten. Dabei zeigten Oozyten aus rekFSH-Zyklen keinen Zusammenhang der Retardance mit der Dosis des applizierten Gonadotropins (vgl. Abschnitt 5.7.3.2, Abb. 21, 22, Tab. 41, 42). Bei Oozyten aus hmG-Zyklen wurde jedoch ein Trend von mit höherer Dosis ansteigender Retardance der inneren Zonaschicht erkennbar (vgl. Abschnitt 5.7.3.1, Abb. 19, Tab. 39). Dieser Trend wurde am deutlichsten, betrachtet man ausschließlich die Metaphase II-Oozyten einer Kohorte (vgl. Abschnitt 5.7.3.1, Abb. 20, Tab. 40). Er erreichte jedoch keine statistische Signifikanz, da dieser Zusammenhang in die Gruppe der zyklenabhängigen Korrelationen eingeordnet wurde.

Das Alter der Patientinnen mit rek. FSH-Regime lag mit  $31,0 \pm 4,1$  Jahren signifikant niedriger als bei Patientinnen mit hmG-Regime ( $35,2 \pm 4,1$  Jahre). Allerdings steigt die Dosis der verabreichten Gonadotropine normalerweise mit zunehmendem Alter der Frau an. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem beobachteten Zusammenhang der Zonaretardance mit der Dosis des hmG nicht um einen Alterseffekt handelt. Vielmehr nahm die Retardance der untersuchten Oozyten, wie in Abschnitt 6.6.1 diskutiert wurde, mit zunehmendem Alter eher ab. Dieser Effekt wirkt also dem beobachteten Anstieg der Zonaretardance mit zunehmender hmG-Dosis sogar noch entgegen.

In der Literatur werden die Auswirkungen der Verwendung von reinem FSH bzw. FSH-LH-Präparaten auf den Behandlungserfolg von IVF-Zyklen intensiv diskutiert.

Unter dem Aspekt des Stimulationserfolges ist festzustellen, dass eine ausreichende ovarielle Stimulation in den meisten Fällen durch die Verwendung von reinem FSH erreicht werden kann. Spezifische Subgruppen von Patientinnen, wie beispielsweise Frauen in höherem reproduktiven Alter, profitieren jedoch von kombinierter FSH-LH-Medikamentation, wie sie auch durch die Applizierung von hmG erreicht wird. Weiterhin kann durch die Verabreichung von LH die Ausbeute reifer Oozyten bei „poor responders“ erhöht werden (ALVIGGI ET AL. 2006).

Es werden jedoch auch Unterschiede bezüglich des Follikelwachstums sowie der Eizell- und Embryoqualität diskutiert (ANDERSEN ET AL. 2006). Demnach ist die Eizell- bzw. Embryoqualität nach ovarieller Hyperstimulation mit hMG besser. Auf welche Weise sich die Anwesenheit einer LH-Aktivität auf die Eizellqualität auswirken könnte, ist bisher nicht untersucht. Es wird spekuliert, dass die LH-Aktivität über die Granulosazellen einen Einfluss auf die Eizellreifung ausübt (PLATTEAU ET AL. 2004, FILICORI UND COGNIGNI 2001). So kann die Gabe von LH-Aktivität während der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation die Bildung kleiner (<10 mm) provulatorischer Follikel signifikant reduzieren und gleichzeitig die Entwicklung größerer und reiferer Follikel fördern (FILICORI ET AL. 2002).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in vielen Studien nach Vergleich von mittels rekFSH- bzw. hmG-stimulierten Zyklen Unterschiede in Patienten-, Oozyten- und Embryonalparametern gefunden wurden (PLATTEAU ET AL. 2006, VAN WELY ET AL. 2003, WESTERGAARD ET AL. 2001, WESTON ET AL. 1996). Ein Einfluss der LH-Aktivität auf die Eizellreifung kann damit als gesichert angenommen werden und bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

### 6.6.3 Schwangerschaftseintritt

Die Retardance der inneren Schicht der Zona pellucida zeigte in der vorliegenden Untersuchung Zusammenhänge mit individuellen Parametern der Patientinnen (Alter), Behandlungsparametern (Dosis der zur hormonellen Stimulation verabreichten Medikamente), Zygotenparametern (Fertilisierungsrate und Pronukleus-Score) und Embryonalparametern (Fragmentierungsgrad).

Weiterhin wurde ein, allerdings statistisch nicht signifikanter Zusammenhang zwischen der Retardance der inneren Zonaschicht und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit beobachtet. Demnach war die mittlere Retardance der Oozyten aus Zyklen, die zu einer Schwangerschaft führten, höher als die Retardance von Oozyten aus Zyklen, die nicht zu einer Schwangerschaft führten. In der Intrakohortenanalyse ( $\Delta$ Ret) ausschließlich der transferierten Oozyten konnten hingegen keine Unterschiede der Retardances in Schwangerschafts- bzw. Nicht-Schwangerschaftszyklen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass Eizellkohorten, die im höheren Retardancebereich liegen, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer Schwangerschaft führen. Die Betrachtung der ganzen Kohorte böte somit einen prognostischen Wert hinsichtlich des Schwangerschaftseintritts. Eine Möglichkeit zur Selektion von Oozyten mit besonders hohem Implantationspotenzial auf Basis des Vergleiches mit den anderen Oozyten der gleichen Kohorte ( $\Delta$ Ret) wäre hingegen nicht gegeben. Eine Intervention auf der Grundlage der Retardanceanalyse zu Gunsten einer Erhöhung der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit wäre somit nicht möglich.

Die beschriebenen Ergebnisse sind zu in der Literatur beschriebenen Ergebnissen teilweise konsistent. In der Arbeit von Shen et al. (SHEN ET AL. 2005) wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Retardance der inneren Zonaschicht und dem Schwangerschaftseintritt festgestellt. Dabei wurden die Retardances der transferierten Oozyten ausgewertet. Die Analyse eines dem  $\Delta$ Ret-Wert vergleichbaren Parameters wurde aber nicht durchgeführt.



Die Retardanceanalyse in der Arbeit von Shen et al. erfolgte allerdings nicht nach der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode von Pelletier (PELLETIER ET AL. 2004), so dass eine Vergleichbarkeit der vorliegenden Ergebnisse in diesem Fall nicht a priori vorausgesetzt werden kann. Jedoch weist Vorhandensein des in dieser Arbeit beschriebenen Trends einer Erhöhung der Retardance von Oozyten aus Schwangerschaftszyklen (betrachtet man die betreffenden Kohorten in ihrer Gesamtheit) in die gleiche Richtung wie die zitierte Arbeit.

Nach den vorliegenden Ergebnissen sowie den Arbeiten von Shen (SHEN ET AL. 2005) und Montag (MONTAG ET AL. 2006) ist somit zu vermuten, dass Patientinnen mit einer Kohorte von Oozyten höherer Retardance mit größerer Wahrscheinlichkeit schwanger werden als Patientinnen mit einer Oozytenkohorte niedrigerer Retardance. Hierbei ist aufgrund der eigenen vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht auszuschließen, dass es sich dabei um einen Alterseffekt handelt. Wie in Abschnitt 5.7.1 gezeigt werden konnte, nimmt die Retardance der inneren Zonaschicht mit zunehmendem Alter der Frau ab. Zyklen mit Oozyten höherer mittlerer Retardance werden demnach eher bei jüngeren Frauen auftreten, die ohnehin eine höhere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Zyklus haben als ältere Frauen.

In der Arbeit von Shen (SHEN ET AL. 2005) wurde auch deutlich, dass Oozyten mit besonders niedriger Retardance der inneren Zonaschicht nur in seltenen Fällen zu einer Schwangerschaft führten. Dieses Resultat wird in der vorliegenden Arbeit durch den Befund bestätigt, dass sich Oozyten mit einer stark erniedrigten Retardance statistisch signifikant zu Zygoten mit dem schlechtesten Pronukleus-Score entwickelten.

Die Tatsache, dass die Intrakohortenanalyse hier keine Zusammenhänge des  $\Delta$ Ret-Wertes mit dem Pronukleus-Score zeigte, spricht für die Annahme, dass es sich hierbei um ein zyklusabhängiges Phänomen handelt. Demnach entwickeln sich Oozyten, die aus Zyklen stammen, die insgesamt im sehr niedrigen Retardancebereich angesiedelt sind, zu Zygoten schlechter Qualität. Unter dem Aspekt, dass andererseits erhöhte Retardancewerte mit zytoplasmatischen Anomalien der Zygoten und einem erhöhten Fragmentierungsgrad der Embryonen

assoziiert waren, muss vermutet werden, dass die Oozyten mit dem höchsten Entwicklungspotenzial eher in Kohorten mittlerer Retardance angesiedelt sind.

Generell ist aber anzumerken, dass die statistische Auswertung des Ereignisses Schwangerschaftseintritt mit einer prinzipiellen Schwierigkeit verbunden ist. Da in der Regel mehrere Embryonen in einem Behandlungszyklus transferiert werden, kann im Falle des Schwangerschaftseintrittes nicht mehr nachvollzogen werden, welcher Embryo letztlich implantiert und damit zur Schwangerschaft geführt hat. Diese prinzipielle Einschränkung ist bei der individuellen, sukzessiven Analyse von Oozyten, Zygoten und Embryonen nicht gegeben, so dass der Untersuchung der Entwicklung von der Oozyte zum Embryo ein höherer Stellenwert eingeräumt werden sollte.

Abschließend ist festzustellen, dass aus den Ergebnissen von Shen und Montag (SHEN ET AL. 2005, MONTAG ET AL. 2006) nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keinesfalls geschlossen werden sollte, in einem IVF-Zyklus Oozyten mit möglichst hoher Retardance für einen Embryotransfer auszuwählen. Dies könnte zur Folge haben, Oozyten zu präferieren, die eine nach den Ergebnissen dieser Arbeit relative zytoplasmatische Unreife aufweisen und sich zu Zygoten und Embryonen schlechter Qualität entwickeln. Eine Reduzierung der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit kann durch eine solche Negativselektion nicht ausgeschlossen werden.

Vielmehr sollten Oozyten vom Transfer ausgeschlossen werden, die einen im Vergleich zum Mittelwert der Retardances der Metaphase II-Oozyten der gleichen Kohorte erhöhten Retardancewert ( $\Delta\text{Ret}$ ) aufwiesen. Weiterhin könnte nach den vorliegenden Ergebnissen eine Auswahl von Oozyten mit hohem Entwicklungspotenzial eher nach einem  $\Delta\text{Ret}$  getroffen werden, der nahe Null liegt oder einen negativen Betrag aufweist.

Bei diesen Oozyten ist nach den vorliegenden Ergebnissen davon auszugehen, dass keine Entkopplung der genomischen und zytoplasmatischen Reife (und daraus resultierend eine relative zytoplasmatische Unreife) vorliegt, wie er für Oozyten postuliert wurde, die einen erhöhten  $\Delta\text{Ret}$ -Wert aufweisen.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines In-vitro-Fertilisations-Programmes beim Menschen die Struktur der inneren der drei Schichten der Zona pellucida aller 1058 gewonnenen Oozyten aus 103 Behandlungszyklen mit intrazytoplasmatischer Spermieninjektion analysiert. Die Analyse der Struktur erfolgte dabei mittels Polarisationsmikroskopie (Polscope) an vitalen Oozyten. Die Verschiebung der Schwingungsebene zirkular polarisierten Lichtes beim Durchgang durch die Zona pellucida lässt sich dabei als sogenannter Retardancewert ausdrücken, der eine qualitative Analyse der Zonastruktur erlaubt.

Die Zona pellucida ist während der Oogenese eng mit der Oozyte assoziiert. In diesem Zusammenhang sollte die Frage bearbeitet werden, ob die Struktur der inneren Schicht der Zona pellucida einen neuen Parameter der Oozytenqualität darstellt. Aus diesem Grunde wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der Retardance der inneren Zonaschicht und weiteren Parametern der Oozyten-, Zygoten- und Embryoqualität sowie einigen patienten- und stimulationsspezifischen Parametern untersucht.

Aufgrund der großen Varianz der Retardancewerte der Oozyten sowohl im Vergleich verschiedener Behandlungszyklen als auch innerhalb eines Zyklus wurden alle potentiellen Zusammenhänge sowohl unter dem Aspekt der durchschnittlichen Retardance aller untersuchten Oozyten („Interkohortenanalyse“, Ret) als auch unter dem Aspekt der Einordnung der Oozyte in den Zusammenhang ihrer Eizellkohorte („Intrakohortenanalyse“,  $\Delta$ Ret) ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass der genomische Reifegrad der Oozyten signifikant mit der Struktur der inneren Zonaschicht korrelierte. Unreife Oozyten zeigten dabei erhöhte Retardances der inneren Zonaschicht. Dabei verändert sich die Zonastruktur im Verlauf der in-vitro-Kultur nicht mehr, im Gegensatz zur genomischen Reifung der Oozyten, die in-vitro weiter fortschritt. Dadurch war es mittels der Messung der Zonaretardance möglich, ursprünglich unreife, dann aber im Zeitintervall zwischen Retardanceanalyse und Insemination nachgereifte Oozyten zu erkennen.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zonaretardance einen Marker zytoplasmatischer Reife darstellt, da sie zunächst mit der genomischen Reife korrelierte, sich im weiteren Kulturverlauf aber nicht mehr veränderte. Die genomische Reifung unreifer Oozyten lief hingegen in Kultur weiter ab, so dass bei solchen Oozyten eine Entkopplung der zytoplasmatischen und genomischen Reife vermutet wurde. Diese Hypothese wurde durch die Tatsache unterstützt, dass die Retardance der inneren Zonaschicht (Ret und  $\Delta$ Ret) häufig derart mit Parametern der Oozyten-, Zygoten- und Embryoqualität assoziiert war, dass eine höhere Retardance mit einer schlechteren Qualität einherging.

Statistisch signifikante Zusammenhänge konnten zwischen der Retardance der inneren Zonaschicht und der Fertilisierungsrate der untersuchten Oozyten, der Morphologie der Pronuklei der fertilisierten Oozyten, weiterer Parameter der Zytoplasmamorphologie der Zygoten sowie dem Fragmentierungsgrad der Embryonen 40 Stunden nach Insemination demonstriert werden.

Weiterhin wurden tendenzielle Zusammenhänge zwischen der Retardance der inneren Zonaschicht und dem Alter der Frau, sowie der für die kontrollierte ovarielle Hyperstimulation im Rahmen der IVF-Behandlung administrierten Dosis humanen menopausalen Gonadotropins deutlich.

Die Retardanceanalyse der im Rahmen einer In-vitro-Fertilisation gewonnenen Oozyten kann somit als eine neue, zusätzliche Methode gewertet werden, die es erlaubt, Oozyten mit großem Entwicklungspotenzial zu identifizieren. Dabei ist für die Auswahl individueller Eizellen aus der Kohorte eines Behandlungszyklus die Analyse der Retardance individueller Oozyten im Vergleich zu den weiteren Oozyten der gleichen Kohorte (Intrakohortenanalyse) von wesentlicher Bedeutung.

## 8. Summary

In the present study the structure of the innermost of the three human zona pellucida layers was analysed in 1058 vital oocytes retrieved in 103 treatment cycles in a routine IVF-program.

Structural analysis of the zona was done by polarized light microscopy (Polscope). The shift of the plane of circular polarized light during passage through the zona pellucida can be expressed as the so called Retardance value which in turn allows a quantitative analysis of the zona structure.

During oogenesis the zona pellucida is closely associated to the oocyte. In this context, the aim of the present study was to investigate if the structure of the innermost zona layer could be utilized as a new marker of oocyte quality. Therefore, we examined possible correlations between the retardance value of the inner zona layer and further parameters of oocyte-, zygote- and embryo quality as well as several patient- and stimulation dependent parameters of ART-cycles.

Remarkable variance of the inner layer retardances both, comparing oocytes from different treatment cycles and oocytes originating from one individual treatment cycle was found.

Due to this fact, every correlation was evaluated with respect to the average retardance of the total number of the examined oocytes („Intercohortanalysis“, Ret) as well as to the retardances of the oocytes from every individual cycle („Intracohortanalysis“,  $\Delta$ Ret).

It could be shown that the genomic maturity of oocytes correlated significantly with the zona pellucida inner layer shortly after retrieval. Immature oocytes showed high retardances of the inner layer. Zona structure did not change during the first 18 hours of in-vitro culture in contrast to genomic maturation which went on in-vitro. This result made it possible to identify originally immature but subsequently matured oocytes in the time intervall between retardance analysis and insemination via ICSI.

This result leads to the hypothesis that the zona innermost layer retardance may be used as a marker of cytoplasmic maturity of the oocytes because initially retardance

correlates with genomic maturity and does not change during culture. In contrast, genomic maturity of the oocytes improved during culture, possibly leading to a decoupling of cytoplasmic and genomic maturity. This hypothesis may be supported by the fact that higher inner layer retardances were negatively associated with several parameters of oocyte-, zygote- and embryo quality.

Statistically significant correlations were found between the zona pellucida inner layer retardance and

1. fertilization rate
2. morphology of pronuclei of zygotes
3. several parameters of zygote cytoplasmic morphology
4. fragmentation rate of embryos 40 hours post insemination.

Furthermore, correlations between the inner layer retardance and

1. age of patient
2. dose of administered human menopausal gonadotropine

became apparent, though did not reach statistical significance.

The analysis of the retardance of the innermost layer of the zona pellucida of oocytes retrieved during an in-vitro-fertilization cycle can be rated as a new, additional method to identify oocytes with a high developmental potential.

Of high importance at this is the evaluation of the zona inner layer retardance of an individual oocyte in comparison to the retardance of the other oocytes retrieved from the same cycle ("Intracohortanalysis"). Only this consideration allows the appropriate use of the retardance analysis as a tool for the selection of high potential oocytes out of an oocyte pool retrieved in an ART-cycle.

## 9. Literaturverzeichnis

Ahuja KK, Bolwell GP

Probable asymmetry in the organization of components of the hamster zona pellucida.

J Reprod Fertil 1983; 69: 49-55

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi G, Kokot M, Cohen J

Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro.

Hum Reprod 2000; 15: 2634-2643

Alvigg C, Clarizia R, Mollo A, Ranieri A, DePlacido G

Who needs LH in ovarian stimulation?

Reprod Biomed Online 2006; 12(5): 599-607

Andersen AN, Devroey P, Arce JC

Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial.

Hum Reprod 2006 Dec; 21(12):3217-27

Antcak M, Van Blerkom J

Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains.

Hum Reprod 1999; 14: 429-447

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alata C, Aksoy S, Mercan R

Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection.

Hum Reprod 1998; 13: 3431-3433

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R

Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer.

Fertil Steril 2000; 74: 282-287

Balaban B, Urman B, Isklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nunhglu A

The effects of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome.

Hum Reprod 2001; 16: 2357-2361

Balaban B, Urman B

Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation.

Reprod Biomed Online 2006; 12: 608-615

Baranska W, Konwinski M, Kuhawa M

Fine structure of the zona pellucida of unfertilized egg cells and embryos.

J Exp Zool 1975; 192: 193-202

Bender HG, Diedrich K, Künzel W

Endokrinologie und Reproduktionsmedizin I.

In: „Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe“, Band 1

Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 4. Auflage 2001

Ben-Yosef D, Shalgi R

Early ionic events in activation of the mammalian egg.

Rev. Reprod. 1998; 3: 96-103

Bercegeay S, Jean M, Lucas H, Barriere P

Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining.

Mol Reprod Dev 1995; 41: 355-359

Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y

Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate?

Hum Reprod 1995; 10: 1189-1193



Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y

Clinical parameters influencing human zona pellucida thickness

Fertil Steril 1996; 66: 408-411

Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D

Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception  
(Cochrane review).

Cochrane Database System Review 2

Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E

Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey  
(*Callithrix jacchus*) ovary.

Mol Hum Reprod 2004; 10: 481-488

Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN

Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful  
IVF/ICSI outcome.

Hum Reprod 2001; 16: 2658-2661

Check J, Wilson C, Summers-Chase D, Choe J, Nazari A, Lurie D

Pregnancy rates (prs) according to embryo cell number at time of embryo transfer  
(ET).

Clin Exp Obstet Gynecol 2001; 28: 73-77

Chen C

Pregnancy after human oocyte cryopreservation.

Lancet 1986; 1(8486): 884-886

Cohen J, Simons RF, Fehilly CB, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J, Rowland GF,  
Steptoe PC, Webster JM

Birth after replacement of hatching blastocyst cryopreserved at expanded blastocyst  
stage.

Lancet 1985; 1(8429): 647

Combelles CMH, Cekleniac NA, Racowsky C, Albertini DF  
Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes.  
Hum Reprod 2002; 17(4): 1006-1016

Craft I, Bennett V, Nicholson N  
Fertilising ability of testicular spermatozoa.  
Lancet 1993; 342: 1237-1238

Deanesly R  
Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing.  
J Endocrinol 1954; 11: 197-200

Desai N, Goldstein J, Rowland D, Goldfarb J  
Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: preliminary study.  
Hum Reprod 2000; 15: 2190-2196

DeSutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M  
Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection.  
Hum Reprod 1996; 11: 595-597

Devroey P, Silber S, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Van Steirteghem A  
Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa.  
Hum Reprod 1995; 10: 903-906

Dokras A, Sargent IL, Barlow DH  
Human blastocyst grading: in indicator of developmental potential.  
Hum Reprod 1993; 8: 2119-2127

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G

Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review.

Hum Reprod Update 2003; 9: 251-262

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM

Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro.

Br J Obstet Gynecol 1980; 87: 737-757

Eppig JJ.

Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells.

Bioessays. 1991 Nov;13(11):569-74

Eppig JJ.

Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.

Reproduction. 2001 Dec;122(6):829-38

Familiari G, Nottolo SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, Motta PM

Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide.

Mol Reprod Dev 1992; 32: 51-61

Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M

Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro.

Hum Reprod 2002; 17: 407-412

Filicori M, Cognigni GE

Roles and novel regimens of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in ovulation induction.

J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1437-1441

Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Tabarelli C, Spettoli D, Taraborrelli S, Ciampaglia W  
Modulation of folliculogenesis and steroidogenesis in women by graded menotropin administration.

Hum Reprod 2002; 17: 2009-2015

Galan A, O'Connor E, Valbuena D, Herrero R, Remohi J, Pampfer S, Pellicer A, Simon C

The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion.

Biol Reprod 2000; 63: 430-439

Gardner DK, Lane M

Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?

Hum Reprod Update 1997; 3: 367-382

Gianaroli L, Plachot M, Magli MC

The atlas of embryology.

Hum Reprod 2000; 15 (Suppl.): 1-79

Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, Simon C

Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst.

J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:4883-4888

Hadarson T, Lofman C, Coull G, Sjogren A, Hamberger L, Edwards R

Internalization of cellular fragments in a human embryo: time lapse recordings.

Reprod BioMedicine Online 2002; 5: 36-38

Huang FJ, Huang HW, Lan KC, Kung FT, Lin YC, Chang HW, Chang SY

The maturity of human cumulus-free oocytes is positively related to blastocyst development and viability.

J Assist Reprod Genet 2002; 19(12): 555-560

Hunter MG

Follicular factors regulating oocyte maturation and quality.

Hum Fertil (Camb.) 1998; 1(1): 69-74

Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Salmi H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Salmi M, Imirzahoglu N

Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection.

Hum Reprod 2000; 15: 2390-2393

Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R

Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida.

Hum Reprod 1997; 12: 1250-1252

Kilani SS, Cooke S, Kan AK, Chapman MG

Do age and extended culture affect the architecture of the zona pellucida of human oocytes and embryos?

Zygote 2006; 14(1): 39-44

Krisher RL

The effect of oocyte quality on development.

J Anim Sci 2004; 82(E. Suppl.): E14-E23

Loret De Mola JR, Garside WT, Bucci J, Tureck RW, Heyner S

Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment.

J Assist Reprod Genet 1997; 14: 332-336

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S

Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection.

Fertil Steril 1999; 72(2): 240-244

Lundin K, Bergh C, Hardarson T

Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF.

Hum Reprod 2001; 16: 2652-2657

Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S, Diedrich K

Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the german embryo protection law.

Hum Reprod. 2000 Feb;15(2):325-9

Ludwig M, Schopper B, Katalinic A, Sturm R, Al-Hasani S, Diedrich K

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. 2000 Feb;15(2):319-24

Mahadevan MM, Trounson A, Leeton JF

The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspect male infertility, and endometriosis to success of in vitro fertilization and embryo transfer.

Fertil Steril 1983; 40: 755-762

Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B

Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations.

Fertil Steril 2000; 73: 126-129

Montag M, Schimming T, Gassner P, Van der Ven H

Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential.

Abstracts of the 22<sup>nd</sup> ESHRE meeting, O-168, Prag 2006

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC

Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.

Lancet 1992; 340: 17-18

Parrot DM

The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue.

J Reprod Fertil 1960; 1: 230-241

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Mathews CD

Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography.

Hum Reprod 1997; 12: 532-541

Paz G, Amit A, Yavetz H

Case report: Pregnancy outcome following ICSI of oocytes with abnormal cytoplasm and zona pellucida.

Hum Reprod 2004; 19: 586-589

Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR

Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos.

Fertil Steril 2004; 81 Suppl. 1: 850-856

Petersen CG, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RL, Franco Junior JG

Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI.

J Assist Reprod Genet 2001; 18:209-212

Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Serkine AM, Tesquier L

Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer.

Hum Reprod 2000; 15 (Suppl.): 24-30

Plancha CE, Sanfins A, Rodrigues P, Albertini D

Cell polarity during folliculogenesis and oogenesis.

Reprod Biomed Online 2005; 10: 478-484

Platteau P, Smitz J, Albano C, Sorensen P, Arce JC, Devroey P

Exogenous luteinizing hormone activity may influence the treatment outcome in in vitro fertilization but not in intracytoplasmic sperm injection cycles.

Fertil Steril 2004; 81: 1401-1404

Platteau P, Nyboe Andersen A, Balen A, Devroey P, Sorensen P, Helmggaard L, Arce JC

Similar ovulation rates, but different follicular development with highly purified menotropin compared with recombinant FSH in WHO Group II anovulatory infertility: a randomized controlled study.

Hum Reprod 2006; 21: 1798-1804

Polge C, Smith A, Parkes A,

Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.

Nature 1949; 164: 666-667

Powell K

Fertility treatments: Seeds of doubt.

Nature 2003; 422: 656-658

Racowsky C, Jackson K, Cekleniak N, Fox J, Hornstein M, Ginsburg E

The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer.

Fertil Steril 2000; 73: 558-564

Rankin T, Soyal S, Dean J

The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and preimplantation development.

Mol Cell Endocrinol 2000; 163: 21-25

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi MG, Martinez F, Tesarik J, Greco E

Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer.

Hum Reprod 2002; 17: 1852-1855



Rijnders PM, Jansen CA

The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection.

Hum Reprod 1998; 13: 2869-2873

Roberts R, Franks S, Hardy K

Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes.

Hum Reprod 2002; 17: 2950-2956

Roux C, Joanne C, Agnani G, Fromm M, Clavequin MC, Bresson JL

Morphometric parameters of living human in-vitro fertilization embryos: importance of the asynchronous division process.

Hum Reprod 1995; 10: 1201-1207

Sakkas D, Percival G, D`Arcy Y, Sharif K, Afnan M

Assessment of early cleaving in vitro human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection.

Fertil Steril 2001; 76: 1150-1156

Scholtes MCW, Zeilmaker GH

Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not the age.

Fertil Steril 1998; 69: 78-83

Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Rosendaal E, Schoysman D

Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa.

Lancet 1993; 342: 1237

Scott LA, Smith S

The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval.

Hum Reprod 1998; 13: 1003-1013

Scott L, Alvero L, Leondires M, Miller B

The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation.

Hum Reprod 2000; 15: 2394-2403

Scott L

The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos.

Hum Reprod Update 2003; 3: 237-249

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant A, Davies M, Khadum IM

Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection.

Hum Reprod 1997; 12: 1267-1270

Shalgi R, Raz T

The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization

Histol Histopathol 1997; 12: 813-822

Shapiro B, Harris D, Richter K

Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based based on the degree of blastocyst development.

Fertil Steril 2000; 73: 582-586

Shen Y, Staf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR

High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles.

Hum Reprod 2005; 20: 1596-1606

Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D

Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability.

Hum Reprod 1997; 12: 153-156

Sinowatz F, Topfer-Petersen E, Kolle S, Palma G

Functional morphology of the zona pellucida.

Anat Histol Embryol 2001; 30: 257-263

Sinowatz F, Rüsse I (Hrsg.)

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.

Verlag Paul Parey, Berlin, 2. Auflage 1999

Smith AU

Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and low temperatures.

Nature 1952; 170: 374-375

Soyal SM, Amleh A, Dean J

FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation.

Development 2000; 127:4645-54

Stalf T, Herrero J, Mehnert C, Manolopoulos K, Lenhard A, Gips H

Influence of polarization effects in ooplasm and pronuclei on embryo quality and implantation in an IVF program.

J Assist Reprod Genet 2002; 19: 355-362

Steer CV, Mills CI, Tan SL, Campbell S, Edwards RG

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 1992; 7: 117-119

Steptoe PC, Edwards RG

Birth after the reimplantation of a human embryo.

Lancet 1978; 2: 366

Tan SL, Royston P, Campbell S

Cumulative conception and live birth rates after in-vitro fertilization.

Lancet 1992; 339: 1390-1394

Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M

Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology.

Hum Reprod 2000; 15: 1396-1399

Tournaye H, Devroey P, Camus M, Staessen C, Bollen N, Smitz J, Van Steirteghem AC

Comparison of in-vitro fertilization in male and tubal infertility: a 3 year survey.

Hum Reprod 1992; 7: 218-222

Trounson A, Mohr L

Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo.

Nature 1983; 305: 707-709

Van Blerkom J, Davis P, Alexander S

A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos.

Hum Reprod 2001; 16: 719-729

Van der Veen H, Schimming T, Montag M

Impact of the meiotic cell cycle on spindle imaging in human oocytes.

Abstracts of the 22<sup>nd</sup> ESHRE meeting; I-21, Prag 2006

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenbourg M, Van de Meersche M, Ryckaer G, Masterminds W, Gerris J

Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer.

Hum Reprod 1999; 14: 2345-2349

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaer G, W, Gerris J  
Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38  
years of age: a new model.

Hum Reprod 2001; 16: 326-332

Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PMM, Van der Veen F

Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for  
ovarian stimulation in assisted reproductive cycles.

Cochrane Database of Systematic Reviews 2003; Issue 1

Van Uem JFHM, Siebzehnuebl ER, Schun B, Koch R, Trotnow S, Lang N

Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes.

Lancet 1987; 1(8535): 752-753

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL

The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic  
sperm injection in living human oocytes.

Fertil Steril 2001; 75: 348-353

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL

Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged  
by Polscope before insemination.

Hum Reprod 2001; 16: 1464-1468

Wassarman PM, Mortillo S

Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida.

Int Rev Cytol 1991; 130: 85-110

Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, Williams Z

Structure and function of the mammalian egg zona pellucida.

J Exp Zool 1999; 285: 251-258

Westergaard LG, Erb K, Laursen SB, Rex S, Rasmussen PE

Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone in normogonadotropic women down-regulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist who were undergoing in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection.

Fertil Steril 2001; 76: 543-549

Weston AM, Zelinski-Wooten MB, Hutchinson JS, Stouffer RL, Wolf DP

Developmental potential of embryos produced by in-vitro fertilization from gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated macaques stimulated with recombinant human follicle stimulating hormone alone or in combination with luteinising hormone.

Hum Reprod 1996; 11: 608-613

Whittingham D, Leibo S, Mazur P

Survival of mouse embryos frozen to  $-196$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ .

Science 1972; 178: 411-414

Willadsen SM

Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing.

Ciba Foundation Symposium 1977; 52: 175-201

Wilmot I

The low temperature preservation of mammalian embryos.

J Reprod Fertil 1972; 31: 513-514

Witteimer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Niesand I, Gerlinger P

Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection.

Hum Reprod 2000; 15: 2591-2597

Xia P

Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality.

Hum Reprod 1997; 12: 1750-1755

Zhao M, Dean J

The zona pellucida in folliculogenesis, fertilization and early development.

Rev Endocr Metab Disord 2002; 3(1): 19-26

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T

The use of a detailed zygote score after IVF-ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience.

Hum Reprod 2002; 17: 1327-1333

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 24. Oktober 2006



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Mehnert
Vorname	Claas
Geburtsdatum/-ort	12. Juni 1972, Hannover
Anschrift	Hillebrandstr. 10, 35392 Gießen
Familienstand	ledig

## Schulbildung

1978-1982	Grundschule Hannover, Bremen
1982-1984	Orientierungsstufe, Bremen
1984-1988	Gymnasiale Mittelstufe, Bremen
1988-1991	Gymnasiale Oberstufe, Bremen
Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst

1991-1992	Dienststelle "Biologische Station Osterholz-Scharmbeck"
-----------	---

## Hochschulbildung

1992-1998	Studium der Biologie, Universität Göttingen
4/1994	Vordiplom
6/1997	mündliche Diplomprüfungen
10/1997-10/1998	Anfertigung der Diplomarbeit "Altersabhängige Veränderungen der Dichte von Monoamintransportern im Rattenhirn" im neurobiologischen Labor der psychiatrischen Universitätsklinik
10/1998-5/2000	Studium Lehramt Sek I und II Biologie und Chemie an der Universität Potsdam

## Berufliche Tätigkeit

6/2000 – 12/03	Reproduktionsbiologe (stellvertretender Laborleiter) in der „Gesellschaft zur Förderung der Reproduktionsmedizin und In-vitro-Fertilisation GbR“, Gießen
01/04 – 12/06	Reproduktionsbiologe (stellvertretender Laborleiter) im „Centrum für In-vitro-Fertilisation“, Gießen

seit 01/07

Reproduktionsbiologe (Laborleiter) in der  
Gemeinschaftspraxis FERA, Berlin, Abt.  
Reproduktionsmedizin

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im „Centrum für In-vitro-Fertilisation“ an der Justus Liebig-Universität Gießen.

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. H.-R. Tinneberg für die Überlassung des Themas, die Betreuung sowie die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und Geräte. Für die Anregungen und Ratschläge beim Verfassen dieser Arbeit bin ich Frau Prof. Dr. U. Eichenlaub-Ritter zu großem Dank verpflichtet. Für die Unterstützung bei der Arbeit mit der Microsoft Access-Datenbank danke ich Herrn Dr. T. Stalf.

Allen Mitarbeitern des „Centrums für In-vitro-Fertilisation“ gilt mein besonderer Dank für ihre Geduld und die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.