

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Schmidt

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

sowie in Zusammenarbeit mit der

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg

Chefarzt Prof. Dr. med. Roland Sudik

Zur Bedeutung des Assisted hatching bei der Behandlung von Kinderwunschpaaren
mit den Methoden der assistierten Reproduktion

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Susann Schöpf geb. Flamann

aus Freiberg

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 19.10.2007.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Roland Sudik

Korreferent: Prof. Dr. med. Stephan Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielstellung der Arbeit	6
2. Theoretischer Hintergrund	7
2.1. Oogenese	7
2.1.1 Differenzierung der Gonaden	8
2.2 Follikelmorphologie und Differenzierung	9
2.3 Bedeutung der Zona pellucida	10
2.4 Befruchtung / Präimplantation	12
2.5 Hatching und Implantation	12
2.6 Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten der humanen Sterilität	14
2.6.1 Sterilitätsursachen	14
2.6.2 Behandlungsmöglichkeiten der Sterilität	15
Daten aus dem Deutschen IVF-Register 2003	17
2.6.3 Sterilitätstherapie und präimplantative Embryonalentwicklung	18
2.6.3.1 Eizellmorphologie – Zellkern- und Zytoplasmabeurteilung	18
2.7 Assisted hatching	18
2.7.1 Methoden des Assisted hatching	19
2.7.2 Risiken des Assisted hatching	21
2.8 Einflussfaktoren für den IVF-Erfolg	22
2.9 Indikationen zum Einsatz von Assisted hatching - Welche Patientinnen haben möglicher Weise einen besonderen Vorteil von dieser Methode?	26
3. Material und Methoden	30
3.1 Patientenkollektiv	30
3.1.1 bestes Ergebnis pro Frau	31
3.2 Hormonelle Stimulation	32

3.3 Eizellgewinnung und Präparation	33
3.4 Spermagewinnung und Präparation	34
3.4.1 Swim-up-Präparation	35
3.4.2 Dichtegradientenzentrifugation	35
3.4.3 Zentrifugation	36
3.5 In-vitro-Fertilisation	36
3.5.1 IVF im 100 µl Tropfen unter Öl	37
3.5.2 IVF im offenen System	37
3.6 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion	38
3.7 Vorkernbeurteilung	39
3.8 In-vitro-Kultur befruchteter Eizellen vor dem Embryotransfer	40
3.9 Assisted hatching mit dem Infrarotlaser	40
3.10 Embryotransfer	41
3.11 Datenerfassung und Statistik	42
4. Ergebnisse	44
4.1 Patientenkollektiv	44
4.2 Anzahl der Embryotransfers entsprechend der Vorbehandlungen in der Kinderwunschsprechstunde	45
4.3 Schwangerschaftsrate, Implantationsrate und Befruchtungsrate nach ICSI bzw. IVF im Untersuchungszeitraum 2000-2003	45
4.4 Schwangerschaftsergebnisse im Zeitraum 2000-2003	46
4.5 Anzahl der Schwangerschaften und Schwangerschaftsrate in Abhängig- keit von der Durchführung des Assisted hatching im Zeitraum 2000-2003	46
4.6 Untersuchungsergebnisse zum Einfluss des Assisted hatching im Rahmen der Kinderwunschbehandlung im Kinderwunschzentrum Neubrandenburg im Zeitraum 2000-2003	47
4.6.1 Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Alter der Patientin	47

und der Durchführung von Assisted hatching im Zeitraum 2000-2003	
4.6.2 Schwangerschaftsrate in Bezug auf Behandlungsmethode vor dem Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching	49
4.6.3 Anzahl der Schwangerschaften und Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen im Zeitraum 2000-2003	52
4.6.4 Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Embryo-Grading der übertragenen Embryonen im Zeitraum 2000-2003	54
4.7 Bestes Behandlungsergebnis pro Frau im Untersuchungszeitraum 2000-2003 in Bezug auf die Durchführung von Assisted hatching – kumulierte Schwangerschaftsrate	56
4.7.1 Schwangerschaftsraten und Anzahl der Schwangerschaften im besten Ergebnis pro Frau in Abhängigkeit vom Alter der Patientin und Durchführung von AH	57
4.7.2 Schwangerschaftsrate in Bezug auf Behandlungsmethode vor dem Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching im besten Ergebnis pro Frau	60
4.7.3 Anzahl der Schwangerschaften und Schwangerschaftsrate in Bezug auf Anzahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau ohne Unterscheidung nach AH	62
4.7.3.1 Differenzierung des besten Ergebnisses pro Frau in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen und der Durchführung von AH	63
4.7.4 Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im besten Ergebnis pro Frau ohne Unterscheidung nach AH	65
4.7.4.1 Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im besten Ergebnis pro Frau unter Berücksichtigung von AH	66
4.8 Auswertung der eingetretenen Schwangerschaften in Beziehung zu durchgeführten Vorversuchen und AH	68

5. Diskussion	73
6. Zusammenfassung	90
6.1 Summary	93
7. Thesen	96
8. Literaturverzeichnis	98
9. Abkürzungsverzeichnis	109
10. Anhang	110
10.1 Verzeichnis genutzter Geräte	110
10.2 Verzeichnis genutzter Chemikalien	112

1. Einleitung und Zielstellung der Arbeit

In Mitteleuropa sind etwa 10-15 % aller Paare ungewollt kinderlos. Von dauerhafter, therapieresistenter Unfruchtbarkeit muss man in weniger als 5 % der Fälle ausgehen (Keck, 2002).

Im Jahre 1978 wurde das erste Baby nach in vitro Fertilisation (IVF) geboren (Steptoe und Edwards). Nach extrakorporaler Befruchtung der im Spontanzyklus laparoskopisch gewonnenen Eizelle entwickelte sich ein Achtzellembryo, der transferiert wurde und zur Geburt eines gesunden Mädchens führte. Dies war ein Durchbruch auf dem Gebiet der Sterilitätsbehandlung. Die Gewinnung von Eizellen und ihre extrakorporale Befruchtung sowie der Retransfer mit normaler Schwangerschaft und Geburt eines gesunden Kindes waren nunmehr möglich geworden. Die Technik der IVF eröffnete eine Behandlungsmöglichkeit der zuvor hoffnungslosen tubaren Sterilität, bei der keine mikrochirurgische Refertilisierung möglich ist.

Die anfänglich geringen Konzeptionschancen nach IVF im unstimulierten Zyklus konnten deutlich durch Einführung der hormonellen Stimulation der Ovarien verbunden mit einer Zunahme der Anzahl an Eizellen und Embryonen pro Zyklus verbessert werden (Jones et al., 1983). Clomifen wurde seit 1981 genutzt, 1983 folgte die Einführung der Gonadotropine.

Einen weiteren Anstieg der Schwangerschaftsrate brachte die Einführung der GnRH-Analoga zur Verhinderung der vorzeitigen Luteinisierung der Follikel. Durch ihren Einsatz mussten weniger Behandlungsversuche vorzeitig abgebrochen werden, die Anzahl der erfolgreich beendeten IVF-Behandlungszyklen stieg. Ab 1984 wurde die ultraschallkontrollierte transvaginale Follikelpunktion zunehmend durchgeführt. Diese Art der Eizellgewinnung war nicht nur einfacher sondern auch weniger gefährlich als die Eizellgewinnung per Laparoskopie (Dellenbach et al., 1984).

Weitere Meilensteine in der Entwicklung der assistierten Reproduktion waren die Einführung des intratubaren Gametentransfers (GIFT, gamete intrafallopian transfer) 1984, die erste erfolgreiche Kryokonservierung von Oozyten 1986, die Einführung von subzonaler Spermatozoeninjektion (SUZI) und mikrochirurgischer epididymaler Spermatozoenaspiration (MESA) 1988 sowie die erste Schwangerschaft nach Präimplantationsdiagnostik (PID) 1990.

Der Indikationsbereich der IVF erweiterte sich in den letzten Jahren deutlich. Neben der Endometriose und der idiopathischen Sterilität spielt zunehmend der andrologische Faktor eine Rolle. Mit Einführung der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) 1992 kann nun auch Paaren geholfen werden, die bisher als unbehandelbar galten. Therapierbar wurden das schwere Oligoasthenoteratozoospermie-Syndrom (OAT-Syndrom) oder die Kryptozoospermie durch MESA bzw. testikuläre Spermatozoenextraktion (TESE) (Palermo et al., 1992).

Die Implantationsraten der übertragenen Embryonen blieben trotz dieser Fortschritte gleich.

Es werden deshalb Methoden gesucht, die die Implantationsraten der Embryonen und damit auch die Zahl der geborenen Kinder nach einer künstlichen Befruchtung erhöhen können. Eine dieser Methoden ist das so genannte „Assisted hatching“, mit dem der Schlüpfungsprozess der Blastozyste aus der Zona pellucida, der bei bestimmten Patientinnen und unter den Bedingungen der In-vitro-Kultur möglicherweise gestört ist, beeinflusst werden soll. Diese Technik wurde erstmals 1990 beschrieben (Cohen et al., 1990). Zahlreiche Studien sind zu dieser reproduktionstechnischen Methode durchgeführt worden, die im Verlauf dieser Arbeit näher erläutert werden.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit soll der Einfluss des Assisted hatching auf die Ergebnisse der IVF- und ICSI- Behandlungen von Patienten des Kinderwunschzentrums Neubrandenburg am Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg untersucht werden.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Oogenese

In der 5. bis 6. Embryonalwoche wandern die Gonozyten aus dem Entoderm der Dottersackwand in die Ovarialanlage ein. Das Ursprungsgewebe der primordialen Geschlechtszellen ist unbekannt. Die indifferente Gonadenanlage – als Genitalleiste bezeichnet – wird als eine Verdickung des Zölomepithels im Bereich des Mesonephros zwischen dem 31. und 35. Tag post conceptionem sichtbar. Im weiteren Verlauf kommt es zur Abfaltung der Gonadenanlage von der Urnierenfalte und zur Ausbildung eines Mesogonadiums. Parallel zur Gonadenanlage entwickelt sich die Urniere, die sich später wieder zurückbildet. Ca. 7 Mio. Oogonien entstehen durch Mitosen. Aus ihnen

entwickeln sich durch Wachstum die primären Oozyten. Die von flachen Epithelzellen umgebenen Oozyten werden dann Primordialfollikel genannt. Während der weiteren Fetalzeit durchlaufen die weiblichen Gameten die Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän), bis sie im Diktyotän verharren. Erst mit Beginn der Pubertät wird in der ersten Hälfte des ovulatorischen Zykluses die erste Reifeteilung vollendet. Die zweite meiotische Reifeteilung erfolgt nur bei Penetration eines Spermatozoons. Infolge Follikelatresie liegen zum Zeitpunkt der Geburt nur noch ca. 1 Mio. Oozyten vor, durch weitere Rückbildung sind zu Beginn der Pubertät nur noch ca. 400 000 Primordialfollikel nachweisbar (Kern et al., 1985; Ludwig et al., 1998a).

2.1.1 Differenzierung der Gonaden

Die Gonade besteht aus einem Mesenchymkern, der von Epithel umgeben ist. Kranialer und kaudaler Anteil werden zu Keimdrüsenligamenten. Nur der mediale Teil entwickelt sich weiter nach Einwanderung der Urkeimzelle. Bei Vorhandensein eines Y-Chromosoms Differenzierung zum Testes, bei Fehlen desselben zum Ovar. Als Mediator der Testisanlage wird das H-Y-Antigen gesehen, seine Produktion wird durch y-chromosomale Gene induziert (Kern et al., 1985; MacLaughlin et al., 2001).

Für die Differenzierung der männlichen Gonade ist die Bindung dieses Faktors an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche notwendig. Bei Defekt dieser Rezeptoren resultiert eine phänotypisch weibliche, chromosomal männliche Form der Gonadendysgenese.

In der weiblichen Gonade sind am Ende der Fetalzeit ca. 7 Mio. primäre Oozyten in den Ovarien vorhanden. Vitale Oozyten sind nur vorhanden, wenn zwei X-Chromosomen vorliegen. Bei Fehlen eines X-Chromosoms (z.B. XO-Turner-Syndrom) gehen Eizellen, Follikel und schließlich auch die Gonadenanlagen zugrunde. Diese werden als so genannte Streak-Gonaden bezeichnet.

Die primären Oozyten bilden von flachem Epithel umrandet die Primordialfollikel. Diese Oozyten verharren bis zur Ovulation im Diktyotän, welches zur Prophase I der ersten meiotischen Reifeteilung gehört

Die männlichen primordialen Keimzellen vermehren sich bis zum zweiten Schwangerschaftsmonat auch sehr rasch, dann erfolgt aber die Umwandlung in

indifferente Gonozyten, die sich nicht teilen. Erst zur Geschlechtsreife beginnt die Entwicklung zu Spermato gonien (Kern et al., 1985).

2.2 Follikelmorphologie und Differenzierung

Während der Fetalperiode lagert sich einreihig flaches Epithel an die Oozyten. Es entstehen die Primordialfollikel. Unter Einfluss von hypophysären, steroidal en und nicht steroidal en Hormonen kommt es zur Umwandlung in Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Graaf-Follikel.

Primärfollikel: ca. 50 μm Durchmesser,

zentral Oozyte von amorpher Substanz umgeben

(spätere Zona pellucida)

umgebende Zellschicht kubisch bis hochprismatisch

perivitelliner Raum zwischen ZP und Oozyte

Sekundärfollikel: ca. 200 μm Durchmesser

Oozyte 50-80 μm , ZP,

Granulosazellen (vermehrte Follikelepithelzellen mit feiner

Granulierung)

Theka folliculi (zirkuläre Schicht von Stromazellen)

Tertiärfollikel: ca. 400 μm Durchmesser

Von innen nach außen: Oozyte-ZP-Granulosazellschicht-Theka interna-

Theka externa.

Zusätzlich entsteht das Antrum folliculi durch flüssigkeitsgefüllte,

zusammengeflossene Interzellularspalten. Die Oozyte bildet mit

Granulosazellen (Kumuluszellen) den Cumulus oophorus.

Wachstum zum präovulatorischen Follikel = Graafscher Follikel ca. 18-

22 mm.

2.3 Bedeutung der Zona pellucida

Die Zona pellucida (ZP) hat eine große Bedeutung für die Befruchtung der Eizelle und die präimplantative Embryonalentwicklung. Die ZP ist vermutlich ein Produkt der Granulosazellen und der Oozyte (Schiebler et al., 1986). Die Zellfortsätze der Granulosazellen penetrieren bei unreifen Eizellen die Zona pellucida und nehmen über Gap junctions Kontakt mit den Mikrovilli der Eizellen auf. Mit zunehmender Reifung gehen diese Zellverbindungen verloren, die Granulosazellfortsätze ziehen sich unter Bildung von Poren aus der ZP zurück. Die Poren werden im weiteren Verlauf der Reifung mit interzellulärer Matrix aufgefüllt, durch die möglicherweise später die Spermien penetrieren (Familiari et al., 1992). Die ZP besteht aus Proteinen und Polysacchariden. Besonders zu erwähnen sind hierbei die drei Glykoproteine ZP1, ZP2 und ZP3. Die extrazelluläre Matrix besteht aus Filamenten, die als Polymere von ZP2-ZP3-Dimeren gebildet werden und untereinander durch ZP1 vernetzt sind (Greve et al., 1985; Wassarman, 1990)

Die Zona pellucida sichert eine speziesspezifische Spermienbindung. Sie unterliegt biochemischen und strukturellen Veränderungen während Befruchtung und präimplantativer embryonaler Entwicklung. Die ZP sichert verschiedene Funktionen von der Ovulation bis hin zur Implantation. Anfangs induziert sie die Spermien-Eizell-Interaktion. Es kommt zur Bindung der Spermien an die ZP und zur Unterstützung der Akrosomreaktion. Nach Penetration der ZP und Bindung eines Spermiums an das Oolemma kommt es zum Polyspermieblock, d.h. zu Veränderungen an ZP und Oolemma, die eine weitere Penetration und somit Fertilisierung der Eizelle durch mehrere Spermatozoen verhindern. Bei der Ausbildung des Polyspermieblocks sammeln sich die corticalen Granula perlchnurartig in einer Linie unterhalb des Oolemmas an. Es kommt zur Exocytose von Proteasen und Peroxidasen aus diesen Granula in den perivitellinen Raum (PVS), die nicht nur das Oolemma für weitere Spermien undurchdringbar macht sondern auch zur Zonaverhärtung führt. Diese Zonaverhärtung ist gekennzeichnet durch strukturelle Veränderungen und Veränderungen in der Zusammensetzung der Zonapolypeptide (Ludwig et al., 1998a).

Im weiteren Verlauf schützt die ZP den Embryo nun nicht nur vor dem weiteren Eindringen von Spermien sondern auch vor zu frühem Anhaften an Tube und endometrialer Oberfläche. Außerdem bietet sie Schutz vor Giften, Bakterien, Viren und Phagozyten (De Vos et al., 2000; Herrler et al., 2000).

Eine Lysinproduktion durch den sich teilenden Embryo und / oder den Uterus sowie eine Ausdehnung des Embryos bewirken eine Reduzierung der ZP-Dicke als Vorbereitung auf das Schlüpfen desselben (hatching).

Die Zonaverhärtung kann auch durch In vitro-Kultur oder In vivo-Alterung induziert werden. Eine verlängerte Kultur von Eizellen oder Embryonen scheint ihre Implantation möglicherweise zu verschlechtern. Die Implantationsrate korreliert umgekehrt zum Alter. Ein Rupturversagen der embryonalen ZP nach Blastozystenexpansion könnte somit ein möglicher Faktor beim Implantationsversagen sein. In vitro-Studien an Mäusen und humanen Embryonen haben gezeigt, dass eine artifizielle Lücke in der ZP die Hatchingmöglichkeit bei Embryonen, die in vitro gewachsen sind, im Vergleich zu nicht mikromanipulierten verbessert (De Vos et al., 2000; De Felici et al., 1982).

Bertrand et al. (1995) untersuchten den Einfluss der Zona pellucida-Dicke auf die Fertilisationsrate im Rahmen eines IVF-Programms. Die ZP-Dicke variierte zwischen 10 und 31 μm . Befruchtete Eizellen zeigten eine wesentlich dünnere ZP (16,6 μm) als unbefruchtete Eizellen (18,9 μm). Die Dicke der ZP veränderte sich nicht bei mikrofertilisierten Eizellen zwischen Ovulation und 16-18 h nach Fertilisation, die Dicke stand nicht in Relation zum Eizelldurchmesser. Die ZP-Dicke beeinflusst die Spermienpenetration selbst bei normal erscheinenden Spermien.

Es existieren zwei Hypothesen zum Einfluss der Zonadicke auf die Fertilisationsrate:

1. Eine dicke Zona pellucida zwingt das Spermium, einen weiteren Weg durch die ZP zu nehmen. Es könnte auf dem Weg bis zum Zytoplasma schneller versagen.
2. Das Unterbleiben der Befruchtung ist ein Zeichen allgemeiner Eizelldysfunktion und nicht direkt von der ZP-Dicke abhängig.

Während der Eizellentwicklung ist eine Vielzahl von metabolischen Effekten zur Bildung der Zona pellucida notwendig. 10 % der gesamten Proteinsynthese, die während der Eizellentwicklung auftritt, steht mit der Bildung der ZP im Zusammenhang.

Es ist bisher nicht geklärt, ob die Bildung einer dicken ZP ein intrinsischer Faktor der Eizelle ist oder auch durch die hormonelle Stimulation verursacht werden kann (Bertrand et al., 1995).

Mehrere Studien zeigten, dass Patientinnen mit dünnerer Zona pellucida eine größere Chance hatten, schwanger zu werden als solche mit dickerer ZP (Cohen et al., 1991; Cohen, 1991). Die Ausdünnung der Zona pellucida ist zeitabhängig: 20 Stunden nach der Fertilisation war sie noch nicht vorhanden, aber nach 50-54 h deutlich messbar (Bertrand et al. 1995, Cohen et al., 1992).

Der Ausdünnungsprozess geschieht durch ein auflösendes Agens oder durch erhöhten Blastomerendruck während der präimplantativen Morphogenese. Er ist ein lokalisiertes Ereignis. Deshalb ist die Implantationsrate nicht mit der initialen ZP-Dicke verbunden sondern abhängig von der ZP-Dicke nach dem Ausdünnungsmechanismus. Bertrand et al. schlussfolgerten aus ihrer Studie, dass Patienten mit einer erhöhten Zona pellucida-Dicke ($> 22\mu\text{m}$) auf eine Behandlung mit Mikroinjektion statt der klassischen IVF orientiert werden sollten (Bertrand et al., 1995).

2.4 Befruchtung / Präimplantation

Die Fertilisierung der Eizelle findet ca. 6-12 Stunden nach der Ovulation im Eileiter statt. Nach dem Eindringen des Spermatozoons in die Oozyte wird das zweite Polkörperchen ausgestoßen, die zweite meiotische Teilung ist damit vollendet. Der Spermatozookopf schwillt an, das Chromatin kondensiert, der männliche Vorkern wird dadurch gebildet. Der weibliche Vorkern entsteht etwas später, beide haploiden Vorkerne vereinigen sich zur diploiden Zygote. Durch mitotische Teilungen erhöht sich die Zahl der Blastomeren, ohne dass sich die Gesamtmasse der Zygote ändert.

Bis zum Achtzeller besitzen die Zellen Totipotenz. Nach dem Achtzellstadium geht diese verloren. Der Stoffwechsel des Embryos verändert sich während der Entwicklung. Im Achtzellstadium stellt sich die Energiegewinnung von Pyruvat und Laktat auf Glucose um. Die Aktivierung des embryonalen Genoms mit Transkription und Translation von embryonaler mRNA beginnt ebenfalls ab der 3. Furchungsteilung. Die Morula tritt 3 bis 4 Tage nach der Befruchtung in das Cavum uteri und entwickelt sich zu einer Blastozyste (Schanz et al., 2004).

2.5 Hatching und Implantation

Am 4. bis 5. Tag der Embryonalentwicklung kommt es zur Bildung von interzellulären Spalträumen, welche durch Zusammenfließen die Blastozystenöhle bilden. Es gibt

dann einen Embryoblasten innenliegend und einen außenliegenden Trophoblasten. In diesem Entwicklungsstadium verlässt der Embryo die Zona pellucida – ein Prozess, der als Schlüpfen oder Hatching bezeichnet wird (Ludwig et al., 1998). Frühere Studien über die Entwicklung von Mäuseblastozysten unterstützen, dass der Verlust der Zona pellucida ein kombiniertes Resultat aus embryonalen und uterinen Funktionen ist. Mäuseembryonen sezernieren Glycoproteine im frühen Blastozystenstadium (Tag 4), mit der Zeit steigt die Zahl der Proteine, in vitro wird die Sekretion von makromolekularen Komponenten des Kulturmediums beeinflusst. Es scheint, dass diese Glycoproteine, spezifisch vom Trophoektoderm gebildet, in das Hatching und die uterine Anheftung einbezogen sind (Cohen, 1991).

In vivo tritt in menschlichen Blastozysten eine über die gesamte Trophoblastoberfläche verteilte Trypsinproduktion auf, die zur Ausdünnung und letztendlich zum Verschwinden der ZP führt. Es kommt vor dem Schlüpfen nicht zur Expansion und zum Kollabieren der Blastozyste.

In vitro zeigten die Embryonen den Zyklus der Expansion und des Kollabierens vor dem Schlüpfen. Außerdem ist in vitro das erfolgreiche Hatching von einer bestimmten Zahl embryonaler Zellen abhängig (Gonzales et al., 1995). Eine ausreichend hohe Zellzahl ermöglicht durch Expansion des Embryos eine Druckausübung auf die ZP mit folgender Ausdehnung, Verdünnung und Verhärtung. Durch fokale Lyse wird dann das Ausschlüpfen erreicht. Die niedrige Zellzahl, die in vivo für erfolgreiches Hatching erforderlich ist, weist darauf hin, dass der Mechanismus in vivo und in vitro verschieden ist, d. h. in vivo nicht von der Blastozystenexpansion abhängig ist und vermutlich lytische Faktoren vom Uterus (so genannte Lysine) einschließt. Die Blastozysten können die ZP in vivo früher verlassen als in vitro (Gonzales et al., 1995; Montag et al., 2000a).

Die Implantation des Embryos ist ein komplexer, störanfälliger Prozess. Synchronisation von Blastozystenreifung und endometrialer Vorbereitung der Einnistung des Embryos nach einem genauen Zeitplan sind entscheidend. Schon eine geringe zeitliche Abweichung verhindert eine erfolgreiche Implantation. Die Zahl der Frühaborte aller Schwangerschaften von ca. 30 % verdeutlicht dieses Phänomen (Schanz et al., 2004).

Der Beginn der Implantation liegt ungefähr am 5. bis 6. Tag post conceptionem. Nach dem Hatchen der Blastozyste lagert sich diese mit dem embryonalen Pol voran an das

Endometrium, es kommt zur Kontaktaufnahme mit dem oberflächlichen Endometrium und anschließend zum Eindringen in das Endometrium. Die Schritte bis zur Invasion sind Folge eines komplexen embryomaternalen Dialogs.

Es ist noch ungeklärt, wie das immunologische Phänomen der unkomplizierten Implantation eines semiallogenen Organismus möglich ist (Ludwig et al., 1998a). Der Implantationsprozess ist genetisch determiniert. Aneuploide Embryonen sind meist in der Lage, sich bis zum Morulastadium zu entwickeln, sterben dann aber ab, einer der Gründe für die altersabhängig abnehmende Fertilität der Frau (Keck, 2002).

2.6 Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten der Sterilität beim Menschen

2.6.1 Sterilitätsursachen

Es gibt eine Vielzahl von Ursachen für Sterilität und Infertilität, wobei sich diese Ursachen fast paritätisch auf Mann und Frau verteilen (40 % männlich, 45 % weiblich). In 15-20 % der Fälle weisen beide Partner zur Ehesterilität beitragende Störungen auf. Bei 10-15 % der betroffenen Paare bleibt die Ursache ungeklärt.

Die häufigste weibliche Sterilitätsursache ist mit ca. 40 % die ovarielle Funktionsstörung, gefolgt von den tubaren Ursachen wie z. B. Tubenschaden nach Entzündungen, durch Endometriose oder Fehlbildungen sowie operativ bedingt (Dietrich et al., 1998). Weitere Ursachen in absteigender Häufigkeit liegen im uterinen, zervikalen, immunologischen, vaginalen Bereich sowie extragenital und auf psychischer Ebene.

Beim Mann stehen die Einschränkungen des Spermioграмms im Vordergrund, wobei in etwa 1/3 der Fälle die Ätiologie unklar bleibt. Bekannte Ursachen für die männliche Infertilität sind Infektionen, die Varikozele, Allgemeinerkrankungen, Deszensusstörungen, endokrine Störungen, Erektionsstörungen und Tumorleiden (Keck, 2002). Genetisch bedingte Formen der männlichen Infertilität betragen ca. 10 Prozent, dazu gehören Chromosomenanomalien, Y-Mikrodeletion, Ductus deferens Aplasie, monomorpher Spermiendefekt und verschiedene Syndrome (Dr. Meschede, PAN-Klinik Köln; Seminar Kittendorf, 10/2003). Alkoholabusus und starkes Rauchen beeinträchtigen ebenfalls die Spermienqualität (Zitzmann et al., 2003).

Es ist wichtig, dass zur Abklärung von Sterilität und Infertilität grundsätzlich von Anfang an beide Partner untersucht werden.

2.6.2 Behandlungsmöglichkeiten der Sterilität

Bei der Behandlung der humanen Sterilität unterscheidet man zwischen den assistierten und den nicht assistierten Reproduktionstechniken.

Eine nicht assistierte Reproduktionstechnik ist die ovarielle Stimulation mit anschließendem Verkehr zum optimalen Zeitpunkt (VZO), die vor allem bei funktionellen Sterilitätsursachen angewendet wird.

Die intrauterine Insemination (IUI) im Spontanzklus oder nach ovarieller Stimulationsbehandlung ist die einfachste Form der assistierten Reproduktion, während IVF und ICSI ein deutlich komplexeres Vorgehen benötigen.

Das Vorgehen bei diesen beiden soll näher erläutert werden:

Unter der IVF versteht man die Befruchtung von Eizellen (EZ) der Frau mit den Spermien des Partners außerhalb des mütterlichen Körpers. Die Gewinnung der Eizellen erfolgt nach kontrollierter, ovarieller Stimulation durch transvaginale und ultraschallgesteuerte Follikelpunktion. Eizelle und Spermien (100 000 Spermien / EZ) werden für einen definierten Zeitraum gemeinsam kultiviert (Keck, 2002).

16 bis 18 Stunden nach dem Beginn der gemeinsamen Kultur von EZ und Spermien erfolgt die Kontrolle des Befruchtungserfolges. EZ mit zwei deutlich sichtbaren Pronuklei (PN) werden selektiert und entweder bis zum Transfer weiter kultiviert, kryokonserviert oder verworfen. Auf Grund des Embryonenschutzgesetzes dürfen in Deutschland maximal 3 befruchtete Eizellen pro Patientin und Behandlungszyklus kultiviert und transferiert werden. Sind mehr EZ befruchtet als das Paar für den Transfer wünscht, können diese überzähligen 2PN-Stadien kryokonserviert werden. Wird dies durch das Paar nicht gewünscht, müssen die überzähligen, befruchteten EZ verworfen werden.

Etwa 48 Stunden nach der Befruchtung werden die Embryonen in das Cavum uteri mittels Katheter übertragen. Aber auch eine in vitro Kultur bis zum Blastozystenstadium ist möglich.

Eine Lutealphasenunterstützung mit HCG und/oder Progesteron ist obligat. Eine Studie von Ludwig et al. zeigte für die Gabe von HCG allein oder in Kombination mit vaginal applizierten Gestagenen keine Vorteile hinsichtlich der Erhöhung der Schwangerschaftsrate verglichen mit der vaginalen Applikation von Gestagenen, wohl aber eine Erhöhung des Risikos eines Überstimulationssyndroms (Ludwig et al., 2002).

Aus der Sicht scheint die alleinige, vaginale Progesterongabe vollkommen ausreichend (Schröder et al., 2003).

Für die ICSI werden die Eizellen von den sie umgebenden Granulosazellen befreit. Nach Spermienaufbereitung wird die Eizelle mittels Haltepipette so fixiert, dass der Polkörper bei 6 oder 12 Uhr sichtbar ist. Ein immobilisiertes Spermium wird mit einer Injektionspipette aufgenommen und nach Penetration von Zona pellucida und Oolemma in das Zytoplasma der Eizelle injiziert (Schröder et al., 2003).

Absolute Indikationen für eine ICSI sind: Kryptozoospermie, schweres OAT-Syndrom, Zustand nach MESA, TESE bei Azoospermie, Kartagener-Syndrom, Globozoospermie, immotile Spermien und PID (Strowitzki, 2000).

Relative Indikationen für ICSI sind: niedrige Fertilisationsraten nach konventioneller IVF, reduzierte Motilität bei kryokonservierten Spermien und reduzierte Eizellqualität (Saito et al., 2000). Vereinzelt Versuche der Reinsemination mit ICSI bei ausbleibender Fertilisation am Tag nach IVF zeigten nur niedrige Schwangerschaftsraten bei hohem Aufwand, so dass diese Technik bis jetzt keine Routinemethode geworden ist (Strowitzki, 2000).

Das Alter der Frau, tubare Sterilität sowie „poor responder“ sind keine alleinige Indikation für eine ICSI.

Die postpartale Entwicklung von ICSI-Kindern wird überwiegend unauffällig beschrieben, aber es gibt Hinweise auf eine Beeinträchtigung der embryonalen Entwicklung in vitro (Griffiths et al., 2000). Die morphologisch unauffällige Entwicklung bis zur Blastozyste ist nach ICSI signifikant niedriger als nach IVF (8,9 % vs. 23,5 %). Ebenso ist die Rate von Embryonen am Tag 3 nach ICSI mit 8 oder mehr Blastomeren deutlich niedriger im Vergleich zu IVF (Hsu et al., 1999). Einflüsse auf die Schwangerschaftsraten zeigten diese Studien allerdings nicht. Obengenannte Berichte sowie die Kostenfrage bei ICSI sollten Anlass für eine differenzierte Indikationsstellung zwischen IVF und ICSI auch in Zukunft geben, appelliert Strowitzki in seinen Recherchen (Strowitzki, 2000).

Daten aus dem Deutschen IVF-Register 2003

Die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer (ET) gesamt betrug nach IVF-, ICSI- und kombinierter IVF/ICSI-Behandlung 27,98 %. Dabei betrug die Geburtenrate 44,32 %, die Abortrate 18,90 %, die Rate an EUG 2,23 %. Bis zum 20.09. 2004 waren 34,55 % der Schwangerschaftsausgänge noch nicht erfasst.

Eine Aufschlüsselung nach der Behandlung ergab folgende Schwangerschaftsraten:

nach IVF 28,56 %, nach ICSI 27,64 %, nach IVF/ICSI 30,15 %, nach Kryokonservierung 16,07 %.

Der Alterseinfluss der Frau auf die Schwangerschaftsrate pro ET nach IVF (bzw. ICSI) zeigte sich wie folgt:

< 31. Lebensjahr 32,38 % (31,77 %);

31.-35. Lebensjahr 30,56 % (29,45 %);

36.-40. Lebensjahr 24,63 % (22,61 %);

> 40. Lebensjahr 12,17 % (11,57 %).

Die Anzahl der übertragenen Embryonen hatte Einfluss auf die Schwangerschaftsrate. Im Mittel wurden 2,18 Embryonen übertragen. Gegenüber dem Transfer von einem Embryo birgt die Übertragung von zwei Embryonen einen deutlichen Vorteil. Die Schwangerschaftsrate beim Transfer von 1, 2 bzw. 3 Embryonen nach IVF lag bei < 35 jährigen bei 16,43 % / 32,91 % / 32,91 % (bei > 35 J.: 9,63 % / 25,37 % / 25,37 %). Nach ICSI betrug die Rate entsprechend der Embryonen bei < 35 J.: 15,33 % / 32,11 % / 31,33 %; > 35 J.: 8,87 % / 22,78 % / 24,29 % (Deutsches IVF Register 2003).

Nur Patientinnen > 40 Jahre hatten einen deutlichen Benefit beim Transfer von 3 Embryonen mit einer Schwangerschaftsrate von 18,3 % gegenüber 12,7 % bei nur 2 übertragenen Embryonen. Bei jüngeren Patientinnen wird der Transfer von maximal 2 Embryonen empfohlen zur Minimierung des Mehrlingsrisikos (Schröder, 2003).

2.6.3 Sterilitätstherapie und präimplantative Embryonalentwicklung

2.6.3.1 Eizellmorphologie – Zellkern- und Zytoplasmabeurteilung

Der Einfluss der Eizellmorphologie auf die Erfolgsrate nach ICSI wurde von Serhal et al. (1997) untersucht. Nach Entfernung der Cumuluszellen ist eine präzise Beurteilung von Zellkern und Zytoplasma der Eizelle möglich.

Sekundäre Oozyten, das heißt EZ, die das erste Polkörperchen ausgeschleust haben, gelten als chromosomal reif.

Auch die Ooplasmamorphologie scheint einen Einfluss auf die Entwicklungsrate der In-vitro-Embryonen zu haben. Fertilisationsrate und frühe Embryonalentwicklung waren in einer ICSI-Studie von Serhal et al. (1997) gleich zwischen Eizellen mit normalem und abnormalem Zytoplasma, aber Implantationsrate sowie Schwangerschaftsrate waren deutlich schlechter bei befruchteten EZ, deren Zytoplasma durch starke Granulierung, Zytoplasmaeinschlüsse, refraktile Körperchen und Clusterbildung gekennzeichnet war. Deshalb ist die Selektion der Eizellen entsprechend ihrer Zytoplasmamorphologie wichtig, um den ICSI-Erfolg zu steigern (Serhal et al., 1997).

Oozyten mit Zytoplasmaabnormalitäten haben eine höhere Frequenz an Aneuploidien. Dysmorphe Embryonen zeigen ebenfalls eine höhere Rate an Polyploidien und diploiden Mosaiken. Mit steigendem maternalen Alter erhöht sich die Aneuploidierate. Dies erklärt unter anderem das Implantationsversagen bei älteren Frauen (Munne' et al., 1995).

2.7 Assisted hatching

Der Hatchingprozess kann durch verschiedene Ursachen gestört sein, so dass letztendlich keine Implantation eintritt. Mögliche Störungen sind zum Beispiel Strukturveränderungen der ZP (erhöhte ZP-Dicke, Zonaverhärtung nach In vitro-Kultur) oder Mangel an uterinen Lysinen zum richtigen Zeitpunkt.

Die Verhärtung der Zona – „Zonahardening“ – wurde bei Mäuseembryonen in vitro experimentell induziert. Eine Kultur unter anaeroben Bedingungen sowie das Belassen der Follikelzellen um die Eizelle bzw. der Eizellkontakt mit Cumuluszellen von stimulierten Weibchen verhinderten in der Studie von De Felici (1982) das Zonahardening. De Felici berichtete von einem diffusiblen Faktor, der von den Follikelzellen produziert wird und die Zona vor der Verhärtung schützt (De Felici et al.,

1982). In einer Studie von Downs et al. (1986) zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der ZP-Resistenz nach Entfernung von Cumuluszellen, die Fertilisierbarkeit von Mausoozyten bei In vitro-Reifung blieb durch Zugabe von fetalem Rinderserum durch Verhinderung des Zonahardenings erhalten (Downs et al., 1986). Im Gegensatz dazu bewirkte der Zusatz von humanem fetalem Serum nicht den Erhalt der Fertilisierbarkeit (Eppig et al., 1986).

Zonaverhärtungen infolge Kryokonservierung sind ebenfalls ein iatrogenes Problem der IVF (Tucker et al., 1991; Check et al., 1996; Tao et al., 1997). Weiterhin wurde beobachtet, dass einige IVF-Embryonen nicht die Fähigkeit besitzen, Zonalytase zu produzieren oder dass ihre ZP zu elastisch ist, um eine normale Auflösung zu ermöglichen (Cohen et al., 1990). Um den Hatchingprozess zu verbessern, propagierten Cohen et al. das gezielte Eröffnen der ZP des Embryos mit der Folge des erleichterten Ausschlüpfens des Embryos. Diese Maßnahme wurde in der Literatur als „Assisted hatching“ bekannt.

2.7.1 Methoden des Assisted hatching

Man unterscheidet zwischen physikalischen und chemischen Methoden der ZP-Eröffnung. Zu den chemischen Methoden gehört das Öffnen der ZP mit saurer Tyrodelösung, zu den physikalischen Methoden das mechanische Öffnen mittels Mikronadel bzw. die Behandlung der ZP durch einen Infrarotlaser.

Bei der partiellen mechanischen Zonadissektion (PZD) wird der Embryo mit einer Haltepipette so fixiert, dass zwischen 2 und 3 Uhr die Mikronadel zwischen zwei Blastomeren eingestochen werden kann. Sie wird durch die Zona pellucida tangential am Embryo vorbei durch den perivitellinen Raum geführt und wieder nach außen gestochen. Anschließend wird der auf der Mikronadel fixierte Embryo so in Richtung Haltepipette bewegt, dass durch kurzes, intensives Reiben die ZP zwischen Haltepipette und Mikronadel eröffnet wird, der Embryo davon aber unbeeinflusst bleibt (Cohen et al., 1990; Malter et al., 1989).

Neben dem einfachen Schlitzen der ZP gibt es auch das kreuzweise Schlitzen der Zona pellucida, das auf ähnlichem Wege, wie bereits beschrieben, durchgeführt wird (Balaban et al., 2002; Cieslak et al., 1999). Bei begrenztem perivitellinen Raum kann mit dem kreuzweisen Schlitzen eine größere Öffnung erzeugt werden, eine V-förmige

Öffnung erleichtert die atraumatische Entfernung einer Blastomere bei der PID (Cieslak et al., 1999).

Für das Öffnen der ZP auf chemischem Wege wird saure Tyrodelösung, pH 2,5 verwendet. Dabei wird der Embryo mittels Haltepipette in 9 Uhr-Stellung fixiert. Die Tyrodelösung wird mit einer 10µm Pipette bei 3 Uhr in der Nähe eines blastomerenfreien Raumes schrittweise abgegeben bis ein ca. 30 µm langer Defekt in der Zona pellucida entstanden ist. Anschließend wird der Embryo mehrmals gewaschen, um Tyrodelösungsreste zu entfernen (Balaban et al., 2002; al Nuaim et al., 2002).

Eine moderne Methode der Zonaöffnung ist die Nutzung eines Infrarotlasers. Der Diodenlaser arbeitet auf Halbleiterbasis und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 1,48 µm. Mit einem einzigen Laserpuls im Bereich von Millisekunden (6-100 ms) ermöglicht der Laser das Eröffnen der Zona pellucida. Der Durchmesser der Öffnung kann durch die Länge des Pulses variiert werden (Germond et al., 1995; Montag et al., 1999b; Harper et al., 2002).

Neben dem vollständigen Öffnen der ZP mittels Laser untersuchten Blake et al. (2001) eine weitere Methode des Assisted hatching, das so genannte Zona thinning. Sie erzielten eine Verdünnung der Zona pellucida mittels maximal 6 Laserstrahlapplikationen (1,48µm-Diodenlaser) auf den Rand der Zona pellucida bei einer Eindringtiefe von 50-80 % der Zonadicke und insgesamt einer Länge von ca. 80 µm. Die Hatchingrate der Blastozysten bei Zona thinning war signifikant höher als in der Kontrollgruppe ohne Laserapplikation. Nach Meinung der Autoren ist diese Methode weniger invasiv als die Erzeugung eines Loches mittels Laserstrahl bzw. auf mechanischem oder chemischem Wege mit den Gefahren des Zurückbleibens von Zellresten nach dem Hatching, Blastomerenverlust, evtl. Infektion des Embryos. Embryoausdehnung und natürliche Verdünnung der Zona pellucida konnten bei allen „Zona verdünnten“ Blastozysten im Sinne der Bewahrung der physiologischen Entwicklung vor dem Hatching beobachtet werden (Blake et al., 2001).

Eine Maximalvariante des Assisted hatching ist der Transfer von Embryonen oder Blastozysten, die durch enzymatischen Verdau völlig von ihrer Zona pellucida befreit wurden („zona-free transfer“). Es soll dadurch ein Blastozystenverlust infolge Kollapses des Blastozoels bei erschwertem Schlüpfen verhindert und ein großflächiger Kontakt des Embryos mit dem Endometrium ermöglicht werden (Griesinger et al., 2003).

2.7.2 Risiken des Assisted hatching

Assisted hatching birgt auch Risiken in sich. Die extraembryonale Schutzhülle, die den Embryo auf seinem Weg zum Implantationsort vor äußeren Einflüssen wie zum Beispiel Toxinen, Bakterien, Viren, immunkompetenten Zellen etc. bewahrt, wird eröffnet. Es kann zur Infektion des Embryos kommen und sogar zu seinem Absterben führen. Deshalb propagiert Cohen (1990) eine routinemäßige Gabe von Immunsuppressiva und Antibiotika an Patienten, an deren Eizellen bzw. Embryonen Mikromanipulationen durchgeführt worden sind (Cohen et al., 1990).

Das häufigere Auftreten von monozygoten Zwillingen ist bekannt. Erklärung hierfür geben Sheen et al. (2001). Eine schmale Öffnung besonders durch PZD lässt die schlüpfende Blastozyste sich in einer so genannten Achterfigur verfangen. Die Unterteilung der Blastozyste kann zu monozygoten Zwillingen führen (Cohen et al., 1990). Der zweite Grund ist das vorzeitige Schlüpfen von Blastomeren z.B. durch große Öffnungen infolge Einwirken von Tyrodelösung auf die ZP vor dem Kompaktieren des Embryos durch Ausbildung von tight junctions (Sheen et al., 2001).

Die Gefahr der toxischen Blastomerenschädigung mit nachfolgender Entwicklungsstörung durch zu lange Einwirkung von Tyrodelösung wird ebenfalls erwähnt (Balaban et al., 2002; al Nuaim et al., 2002). Eine pH-Wert-Änderung des Kulturmediums durch Zurückbringen des mikromanipulierten Embryos muss ebenfalls verhindert werden. Deshalb wird das sofortige Waschen der Embryonen nach Zona drilling empfohlen.

Die Einführung des Diodenlasers brachte eine einfach durchführbare, sehr präzise, gut reproduzierbare, kontaktfreie Methode der Zonaöffnung auf den Markt. Die Sicherheit und Wirksamkeit wurde von Germond et al. (1995) untersucht. Die Laserenergie führte zu keinen sichtbaren mechanischen Veränderungen. Ebenso traten keine thermischen Effekte auf, der Rand des produzierten Loches schien scharf und glatt. Zytoplasma trat nicht aus. Dieser Laser ist in der Lage, einen lytischen Effekt an der Zona pellucida zu induzieren, aber nicht im Zytoplasma. Vermutlich ist die Empfindlichkeit der Zona pellucida-Glykoproteinmatrix größer als die des Zytoplasmas oder die Laserwellenlänge wird durch Komponenten der Zona pellucida in stärkerem Maße absorbiert. Während der In vitro-Kultur traten nach Laserbehandlung keine Zeichen der Schädigung auf, es kam zu keinem Entwicklungsstillstand, das gelaserte Loch blieb stabil bis zum Zeitpunkt des Hatching.

Im Vergleich zum UV-Laser traten keine mutagenen Effekte auf (Germond et al., 1995). Hsieh et al. (2002) verglichen in einer Studie die chemische Methode mit der Lasermethode und kamen zu dem Ergebnis, dass letztgenannte effektiver, sicherer und schneller ist insbesondere bei Frauen mit fortgeschrittenem Alter (Hsieh et al., 2002).

2.8 Einflussfaktoren für den IVF-Erfolg

Der entscheidende Faktor für den Erfolg einer IVF/ICSI- Behandlung ist die Qualität der übertragenen Embryonen. Die Embryoqualität ist von der Befruchtungsfähigkeit der Oozyten abhängig. Eine von Templeton und Morris 1998 durchgeführte Metaanalyse von 44236 IVF-Zyklen zeigte deutlich, dass die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit einer Patientin mit der Zahl ihrer befruchteten Oozyten ansteigt.

Die Beurteilung der Embryoqualität ist über die Entwicklungsgeschwindigkeit und die Morphologie der einzelnen Embryonalstadien möglich. Zygoten, die bereits 25-27 h nach Befruchtung das 2-Zellstadium erreichen, führen zu signifikant mehr Schwangerschaften als sich langsamer entwickelnde Embryonen (Michelmann, 2001).

In Deutschland ist jede Art der Embryonenselektion verboten. Es dürfen maximal drei ausgewählte Vorkernstadien zu Embryonen kultiviert werden und müssen dann unabhängig von ihrer Entwicklung übertragen werden.

Scott and Smith entwickelten einen Embryoscore, der sich aus dem Vorkernscore und der Erscheinung des Zytoplasmas 16-17 h nach Insemination zusammensetzt. Bei einem Score > 15 verzeichneten sie eine Schwangerschaftsrate von 34 %; bei einem Score < 15 lag sie nur bei 4 % (Scott et al., 1998). Tesarik et al. (1999) führten ebenfalls eine Studie zur Vorkernbeurteilung durch. Die Entwicklung von Embryonen mit guter Qualität trat bei Pattern OA und OB ein. Dabei müssen männlicher und weiblicher Vorkern eine größtmögliche, morphologisch erkennbare Synchronität aufweisen. Die Anzahl der Nucleolusvorläuferkörper (NVK) sollte in beiden Vorkernen nahezu gleich sein, bei NVK > 7 nicht polarisierte Verteilung (Pattern OA), bei NVK < 7 polarisierte Verteilung (Pattern OB) (Tesarik et al., 1999).

Eine noch frühere Qualitätsklassifikation geschieht durch die Beurteilung der Eizellqualität. Dies ist bei der Anwendung der ICSI-Technik möglich. Die chromosomale Reife (Metaphase II) zeigt sich durch das Vorhandensein des ersten Polkörpers, die Struktur des Zytoplasmas weist auf die zytoplasmatische Reife hin

(Scott et al., 1998). Nach Entfernung der Cumuluszellen ist eine präzise Beurteilung von Zellkern und Zytoplasma möglich. Hauptabnormalitäten des Zytoplasmas sind starke Granulierung, Zytoplasmaeinschlüsse wie Vakuolen sowie refraktile Körperchen. Serhal et al. (1997) konnten zeigen, dass Fertilisierungsrate und frühe Embryonalentwicklung bei normalem und abnormalem Zytoplasma nach ICSI gleich waren, aber Implantations- und Schwangerschaftsrate waren deutlich schlechter bei abnormalem Zytoplasma (Serhal et al., 1997).

Das Alter der Patientin spielt eine entscheidende Rolle für den IVF-Erfolg. Patientinnen > 38 Jahre haben altersbedingt eine erhöhte Rate an chromosomalen Aneuploidien und damit per se eine ungünstige Schwangerschaftsprognose. Eine PID könnte durch den Ausschluss von Aneuploidien in diesem Patientenkollektiv die Implantations- und Geburtenraten steigern (Gianaroli et al., 1997; Munné et al., 1995; Kuliev et al. 2002 und 2003). Zusätzlich tritt bei diesen Patientinnen oftmals eine verdickte Zona pellucida auf. Assisted hatching birgt eine Möglichkeit, diesen negativen Prognosefaktor auszugleichen (Montag et al., 2000b).

Embryonen von älteren Patientinnen zeigen eine signifikante Verschlechterung des Furchungsgrades, was einer schlechteren Wachstumsrate entspricht. Bei gleichem morphologischem Erscheinungsbild waren die Implantationsraten bei jüngeren Patientinnen höher als bei älteren. Daraus schlussfolgern Hsu et al. (1999), dass Embryofurchungsgrad und Alter der Patientin die signifikantesten unabhängigen Prädiktoren der Implantation bei IVF und ICSI sind. Wenn jedoch viele Embryonen transferiert werden, haben die Embryoqualitätsparameter nur eine begrenzte Aussagekraft in Bezug auf Implantation und Schwangerschaft (Hsu et al., 1999). Weitere Studien über die altersabhängige Verschlechterung des IVF-Outcome legen Templeton et al. (1996) sowie Pantos et al. (1999) dar. Templeton fand keine Unterschiede im IVF-Erfolg in Abhängigkeit von der Ursache der Infertilität. Lediglich bei der idiopathischen Infertilität konnte eine höhere Geburtenrate verzeichnet werden. Die Dauer der Infertilität hatte einen negativen Einfluss. Die Geburtenrate sank mit zunehmender Zahl erfolgloser IVF-Zyklen. Der beste Erfolg konnte im ersten IVF-Zyklus festgestellt werden. Vorherige Schwangerschaften wirkten sich günstig auf das IVF-Outcome aus (Templeton et al., 1996; Pantos et al., 1999).

Auch ein früher Schwangerschaftsverlust nach IVF (nur kurzzeitiger pos. β -HCG bzw. Abort) beeinflusst den Erfolg der unmittelbar folgenden IVF-Behandlung positiv.

Patientinnen haben eine höhere Wahrscheinlichkeit einer klinischen Schwangerschaft im nächsten Versuch als Frauen, die gar nicht konzipiert haben (Bates et al., 2002).

Das Reproduktionsvermögen hängt maßgeblich von der Endokrinologie der Frau ab. Entscheidend ist, ob ausreichend Follikel produziert werden und zur Reifung kommen bzw. wie viele Oozyten in der erforderlichen Qualität pro Zyklus zur Verfügung stehen. Mit der am 3. Zyklustag gemessenen FSH-Konzentration bzw. Follikelmenge kann eine Aussage über die Oozytenanzahl getroffen werden aber nicht über die weitere Oozytenentwicklung. Ein entscheidender Wert ist die Estradiolmenge. Bei einer Basalkonzentration < 200 pmol/l wurden mehr Schwangerschaften nach IVF erzielt als bei höheren Estradiolkonzentrationen (Appel, 2002). Zur Beratung der Patientin sollte die ovarielle Reserve aus der Bestimmung von FSH abgeschätzt werden. Erhöhte Werte deuten auf eine verminderte ovarielle Reserve hin. Loumaye et al. (1990) zeigten in einer Studie, dass ein Schwangerschaftseintritt nahezu ausgeschlossen ist, wenn die Summe der FSH-Serumkonzentration an Tag 3 und Tag 10 26 mIU/ml überschreitet (Loumaye et al., 1990). In der Studie von Watt et al. (2000) konzipierte keine Patientin bei FSH-Werten $> 11,1$ mIU/ml (Tag 3) bzw. $> 13,5$ mIU/ml (Tag 10) nach Stimulation (Watt et al., 2000).

Einen entscheidenden Einfluss auf die Schwangerschaftsrate hat die ovarielle Stimulationsbehandlung.

Am Anfang wurde die IVF im so genannten natürlichen Zyklus durchgeführt, d. h. durch Befruchtung der Eizelle, die physiologischer Weise herangereift war. Um die Schwangerschaftsrate zu erhöhen, wird heute im Regelfall die ovarielle Stimulationsbehandlung als Grundvoraussetzung für die assistierte Reproduktionstechnik (ART) vorangestellt.

Clomifen kann zur Ovulationsinduktion bei der normogonadotropen, normoprolaktinämischen Patientin in Kombination mit VZO oder IUI genutzt werden. Da Clomifen wegen seiner antioestrogenen Eigenschaften zur Veränderung der Zervixschleimviskosität führt, sollte es nicht bei eingeschränkter Samenqualität genutzt werden. Der negative Einfluss auf die Proliferation des Endometriums muss durch Oestrogengabe ausgeglichen werden, was oft nur zum Teil gelingt.

Zum „Goldstandard“ der Ovulationsinduktion gehört seit Jahren die Gonadotropinstimulation. Eine FSH-Monotherapie ist bei Frauen mit normaler Ovarialfunktion (endogen ausreichende LH-Konzentration) üblich. Die kombinierte

Gabe von FSH und LH ist bei hypothalamisch-hypophysärer Ovarialinsuffizienz erforderlich. Heutzutage ist eine Kombinationstherapie von rekombinantem FSH und LH möglich. Sonographisches Monitoring und Hormonanalysen sind obligat zur Überwachung der Follikelreifung. Im Gegensatz zu VZO oder IUI-Zyklus wird bei IVF/ICSI eine polyfollikuläre Reaktion gewünscht, da die besten Chancen auf Eintritt einer Schwangerschaft dann vorhanden sind, wenn mindestens 4 befruchtete Eizellen durch Stimulation und in vitro Fertilisation zur Verfügung stehen, wie Templeton 1996 berichtete. Auch Opsahl et al. (2001) konnten feststellen, dass sogar Frauen zwischen 40 und 43 Jahren mit normaler ovarieller Reserve eine signifikant größere Lebendgeburtensrate (17,8 %) hatten, wenn 4 oder mehr Embryonen für den Transfer vorhanden waren (Opsahl et al., 2001). Da sich bei oben genannten Verfahren nicht immer alle gewonnenen Eizellen befruchten lassen (Fertilisierungsrate zwischen 60-80 %), sollten 6-10 Eizellen nach Gonadotropinstimulation gewonnen werden, um einen guten Schwangerschaftserfolg zu haben (Keck, 2002).

Im Laufe der Entwicklung zeigten sich höhere Schwangerschaftsraten nach Anwendung von rekombinantem FSH im Vergleich zu urinären Präparaten (Daya, 2002). LH und hCG sind ebenfalls als rekombinante Präparate verfügbar. Ob die Zugabe von LH bei bestimmten Patientinnen (Low-responder, PCOS-Patientinnen) Vorteile bringt, bleibt abzuwarten. Ebenfalls noch ungeklärt ist, ob rekombinantes LH oder hCG zur Ovulationsinduktion Nutzen bringt.

Da es in ca. 20 % der Stimulationen mit Gonadotropinen zum vorzeitigen Eisprung kommt und demzufolge der Zyklus abgebrochen werden müsste, ist die Gabe von GnRH-Agonisten oder – Antagonisten sehr wichtig, um die Rate dieser Zyklen zu senken.

Verschiedene Protokolle kommen zur Anwendung – Long/ Short/ Ultrashort, selten Step-up/ Step-down – wobei die Schwangerschaftsraten beim Long-Protokoll am höchsten sind. Nachteilig ist die lange Behandlungsdauer, die erhöhte Inzidenz von Ovarialcysten vor Gonadotropinstimulation, klimakterische Probleme durch starke Suppression der Gonadotropine, dadurch auch erhöhter Bedarf an Gonadotropinen sowie verzögertes Wiedereinsetzen der ovariellen Funktion durch den Depoteffekt der Analoga. Die Neuentwicklung der GnRH-Antagonisten bietet Vorteile ohne oben genannte Nebenwirkungen. Durch kompetitive Hemmung des GnRH-Rezeptors wird eine sofortige Hemmung der Gonadotropinsekretion bewirkt, wenige Stunden nach der

Gabe sind FSH und LH erniedrigt. Der Vorzyklus entfällt, die Behandlung ist wesentlich kürzer und physiologischer. Die Ovulationsinduktion mit 5000-10 000 IU hCG erfolgt bei Follikeldurchmessern von 17-20 mm. Zur Lutealphasenunterstützung werden hCG und/oder Progesteron verabreicht. Die intravaginale Progesteronapplikation beeinflusst die Implantationsbedingungen am günstigsten (first uterine pass effect). Sie sollte bis zum positiven Schwangerschaftstest ca. 14 Tage nach ET fortgesetzt werden (Keck, 2002).

Problemgruppen in der ovariellen Stimulationstherapie sind Low- und High-responder. In der erstgenannten Gruppe ist die Reaktionsbereitschaft der Ovarien gegenüber Gonadotropinen herabgesetzt. Einerseits tritt dies mit zunehmendem Alter der Frau auf, aber es wird auch bei jüngeren Patientinnen beobachtet. Mit Short- oder Ultrashort-Protokoll kann man zum Teil den flare-up-Effekt der Agonisten als zusätzlichen Stimulationseffekt auszunutzen. Über eine entsprechende Steigerung der Gonadotropinmenge wird versucht, einen adäquaten Effekt zu erreichen. Eine Dosis über ca. 450 IE FSH zeigte sich als nicht sinnvoll (Keck, 2002). Kommt es auch unter dieser Dosierung nicht zu einer Reaktion wird vom Resistant Ovary-Syndrom gesprochen. In diesem Fall gibt es keinen rationalen Therapieansatz, außer der Eizellspende, die in Deutschland verboten ist.

Bei den High-respondern kommt es bei sonst üblichen FSH-Dosierungen zu einer massiven ovariellen Reaktion, die bis zur notwendigen stationären Therapie führen kann (schweres OHSS). Patientinnen mit PCOS/ Hyperandrogenämie neigen zu o.g. Reaktionen. Jüngere Patientinnen im Allgemeinen reagieren intensiver auf Gonadotropine. Eine vorsichtige, adaptierte Gonadotropindosis ist bei diesen Patientinnen notwendig.

2.9 Indikationen zum Einsatz von Assisted hatching - Welche Patientinnen haben möglicher Weise einen besonderen Vorteil von dieser Methode?

Eine genaue Synchronisation zwischen Embryo und Endometrium ist essentiell für die Implantation. Während der kritischen Periode - bei Liu et al. (1993) zwischen Tag 7 und 13 der Lutealphase - erreicht das Endometrium seine Reife für die Implantation. Embryonen mit optimaler Wachstumsrate sind in der Lage zu schlüpfen und während dieser normalen Rezeptivität des Endometriums zu implantieren. Embryonen mit langsamer Wachstumsrate schlüpfen und implantieren in dieser Zeit nicht. Beide o.g.

Embryonen haben einen Vorteil vom Assisted hatching. Liu et al. (1993) schlussfolgerten, dass der durch saure Tyrodelösung erleichterte Hatchingprozess einen früheren Embryo - Endometriumkontakt ermöglicht. Es kommt zur Erhöhung des Embryoentwicklungspotentials, da der Embryo eher Wachstumsfaktoren des Endometriums ausgesetzt ist. Der frühe Kontakt führt zur Optimierung der Synchronisation zwischen Embryo und Endometrium. Daraus folgt eine verbesserte Implantationseffizienz (Liu et al., 1993).

Es ist bekannt, dass die frühe Implantation prognostisch günstiger ist für die Überlebensfähigkeit der Embryonen, verspätete Implantation ist andererseits mit einer erhöhten Abortrate verbunden. Langsame Wachstums- und verminderte Hatchingrate könnten Folge von suboptimaler follikulärer Stimulation, suboptimalen Kulturbedingungen, dicker und/oder verhärteter ZP und intrinsischer ovarieller Faktoren sein. Zona drilling kann die zu dicke oder verhärtete ZP für das Hatching vorbereiten, außerdem erleichtert die artifizielle Öffnung in der ZP möglicher Weise das Eindringen von Wachstumsfaktoren zur Erhöhung der Lebensfähigkeit des Embryos. Deshalb haben auch Embryonen mit langsamer Wachstumsrate, die normaler Weise schlecht schlüpfen, einen Vorteil vom Zona drilling (Liu et al., 1993).

Wichtig ist die Größe der Öffnung, die in der ZP durch Assisted hatching entsteht. Bei zu kleinen Öffnungen bleibt der Embryo stecken, bei mehreren Öffnungen verfängt sich der Embryo (Cohen et al., 1991; Montag et al., 1999a).

Es wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um den Nutzen des Assisted hatching zu untersuchen. Dabei kam es zum Teil zu gegensätzlichen Ergebnissen.

Ältere Patientinnen > 38 Jahre hatten einen Vorteil vom Assisted hatching durch Laserapplikation oder Tyrodelösung (Montag et al., 1999a; Magli et al. 1998; Edi-Osagi et al., 2003). Lanzendorf et al. (1998) konnten bei > 36 jährigen keinen signifikanten Vorteil durch Zona drilling feststellen (Lanzendorf et al., 1998). Horng et al. (2002) berichteten ebenfalls über keine Steigerung der Implantations- und Schwangerschaftsraten bei Patientinnen > 37 Jahre nach Lasermikromanipulation (Horng et al., 2002).

Die Frage, ob Assisted hatching bei unselektierten Patientinnen eine Verbesserung der Schwangerschaftsrate erbringt, wurde von Hellebaut et al. (1996) und Tucker et al. (1996) verneint. Hu et al. (1996) konnten einen Vorteil bei unselektierten Patientinnen

feststellen. Hellebaut verwendete PZD, Tucker und Hu nutzten saure Tyrodelösung (Hellebaut et al., 1996; Tucker et al., 1996; Hu et al., 1996).

Eine Erhöhung der Implantations- und Schwangerschaftsraten konnte bei Embryonen mit schlechter Prognose (hoher Fragmentierungsgrad, schlechte Entwicklung, dicke Zona pellucida) durch Zona drilling festgestellt werden. In Abhängigkeit von der Dicke der ZP stellten Cohen et al. (1992) fest, dass bei Patientinnen mit einer ZP > 15µm mittels saurer Tyrodelösung ein Vorteil erreicht wird. Zusätzlich schien selektives Assisted hatching bei Frauen > 38 Jahre und bei jenen mit erhöhten basalen FSH-Spiegeln am effektivsten (Cohen et al., 1992).

Bei Embryonen mit guter Prognose (ZP < 13 µm; wenig Fragmentierung, jungen Patienten und normalem basalen FSH) war die Schwangerschaftsrate nach Assisted hatching mit Tyrodelösung schlechter als nach konventioneller IVF-Behandlung ohne hatching (Cohen et al., 1992; Hurst et al., 1998). Ali et al. (2003) berichten dagegen, dass routinemäßiges Assisted hatching mittels Laser bei jungen Patientinnen (≤ 36 Jahre), bei Embryonen mit dünner Zona pellucida (≤ 16µm) signifikant die klinischen Schwangerschaften erhöht (Ali et al., 2003).

Patientengruppen mit vorausgegangenen frustranen IVF- Versuchen profitieren vom Assisted hatching (Magli et al. 1998; Antinori et al., 1996; Stein et al., 1995; Edi-Osagi et al., 2003).

Tucker et al. (1991) zeigten in ihrer Studie, dass PZD nach Kryokonservierung das Blastozystenhatching, Implantations- und Schwangerschaftsrate erhöhen kann (Tucker et al., 1991). Check et al. (1996) stellten ebenfalls fest, dass Zona drilling vorteilhaft für zuvor kryokonservierte Embryonen sein kann (Check et al., 1996).

Porter et al. (2002) untersuchten die Blastozystenformation nach IVF und nach ICSI. Die Rate der Blastozystenbildung war in beiden Gruppen gleich, aber die Hatchingrate war in der ICSI-Gruppe deutlich schlechter. Deshalb wird Assisted hatching in diesen ausgewählten Fällen empfohlen (Porter et al., 2002).

Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse in den erwähnten Studien können sich aus den verschiedenen Techniken des Assisted hatching ergeben. Die erzeugten Öffnungen in der Zona pellucida sind nicht standardisierbar bei PZD und saurer Tyrodelösung. Die Wichtigkeit der Größe der Öffnungen wurde im Text schon erwähnt. Die Indikationsstellung und Patientenselektion waren in o.g. Studien ebenfalls uneinheitlich.

Zusammenfassend kristallisieren sich folgende mögliche Indikationen für die Anwendung von Assisted hatching heraus:

ältere Patientinnen > 38 Jahre

Patientinnen mit erhöhtem basalen FSH

Embryonen mit hohem Fragmentierungsgrad

dicke Zona pellucida (> 15 μm)

Zonaverhärtung nach Kryokonservierung

Patientinnen mit mehreren vorangegangenen Transferzyklen ohne Implantation (Montag et al. 2000b).

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit untersuchten wir den Einfluss des Assisted hatching auf den Erfolg der Kinderwunschbehandlung im Kinderwunschzentrum Neubrandenburg am Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg.

Im Zeitraum vom 01.01.2000 – 31.12.2003 wurden insgesamt 826 Embryotransfers durchgeführt. Dabei erhielten 461 Patientinnen eine IVF- bzw. ICSI- Behandlung.

400 x erfolgte der Embryotransfers nach IVF, 426 x wurden Embryonen nach ICSI übertragen.

Mit Assisted hatching wurde in 326 Fällen zusätzlich behandelt. 500 Zyklen fanden ohne hatching statt.

In unserem Patientenkollektiv wurden Frauen im Alter von 21 Jahren bis zu 44 Jahren behandelt.

Das Durchschnittsalter mit Standardabweichung betrug in der Gruppe ohne Assisted hatching 30,9 J.±3,98, in der Gruppe mit AH lag es bei 35,2 J.±4,51.

Die Altersverteilung ist in den Gruppen mit Hatching bzw. ohne Hatching signifikant verschieden ($p < 0,01$).

Die Anzahl der Embryotransfers pro Frau lag zwischen 1 und 7 Transfers im Zeitraum 01.01.2000 – 31.12.2003 ohne Zyklen mit Kryokonservierung und ohne IVF/ICSI-Behandlung.

Pro Embryotransfer wurden 1-3 Embryonen übertragen. In den Zyklen mit Assisted hatching wurden nicht generell alle zu übertragene Embryonen gelasert, was die Auswertung erschwert.

Im Abschnitt 4. Ergebnisse werden zunächst alle Embryotransfers pro Frau im Zeitraum 01.01. 2000 – 31.12. 2003 dargestellt (Abschnitt 4.2 bis 4.6.4). In dieser Auswertung gehören in der Regel zu einer Frau mehrere „Versuche“ (mehrere Transferzyklen). Aus statistischer Sicht ist damit die Unabhängigkeit der Versuche voneinander nicht gewährleistet. Damit sind die statistischen Tests nicht ganz korrekt, sondern nur approximativ. Sie können nur zur Hypothesenbildung dienen. Der Beweis einer

Signifikanz kann nur bei einem p-Wert deutlich kleiner als das übliche Signifikanzniveau von 0,05 angesehen werden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde außer der Betrachtung der Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Anwendung des AH in den verschiedenen Altersgruppen, der Anzahl der transferierten Embryonen und der Embryomorphologie im Gesamtkollektiv noch eine weitere Gruppe gebildet: Die Gruppe „Bestes Ergebnis pro Frau“ (Abschnitt 4.7 bis 4.7.4.1). Sie wurde aus der Gruppe „alle Embryotransfers (ET's)“ gebildet und diente dazu, eine statistische Unabhängigkeit der „Versuche“ zu gewährleisten, die bei der Auswertung der anderen Gruppen durch die Inhomogenität des Patientinnenkollektives nicht ausreichend vorhanden war (Statistiker Dr. Klaus Hermann).

Dazu wurden die vorhandenen Daten neu sortiert wie im Folgenden beschrieben.

3.1.1 Bestes Ergebnis pro Frau

Wurde die Frau in der Versuchsserie mindestens einmal **s c h w a n g e r**, wurde der 'erfolgreichste' Versuch bewertet, d.h. eine Schwangerschaft im höheren Alter wurde erfolgreicher als eine in jüngerem Alter bewertet, eine intakte Schwangerschaft besser als Abort oder Extrauterin gravidität (EUG)

Beispiele:

- a) Frau wurde im 1. Versuch schwanger mit Geburt eines Kindes und im 3. Versuch wurde sie schwanger aber mit Abort ==> nimm 1. Versuch
- b) Frau wurde im 2. Versuch schwanger aber EUG und im 3. Versuch schwanger mit Abort ==> nimm nur 3. Versuch
- c) Frau wurde sowohl im 1. als auch im 3. Versuch schwanger und hat in beiden Fällen ein Kind geboren ==> nimm nur 3. Versuch (weil sie hier älter ist und der Erfolg deshalb höher zu bewerten ist)

Wurde die Frau in der Versuchsserie **k e i n** mal schwanger, dann nimm den 1. Versuch (statt letzten Versuch) in die Auswertung und liste bei 'Behandlung' alle Methoden auf, die angewandt wurden. Setze 'AH' = 2 (entspricht Gruppe C), wenn sowohl 'AH'=0 (ohne hatching) und 'AH'=1 (mit hatching) in der Versuchsserie auftrat. D.h. die Angaben zur 'Behandlung' und 'AH' im 1. Versuch werden geändert, wenn in der Versuchsserie die 'Behandlung' geändert wurde oder Versuche ohne Hatching und Versuche mit Hatching stattfanden. Alle anderen Angaben im 1. Ver-

such bleiben unverändert.

Beispiele:

- a) Eine Frau hat 3 erfolglose Versuche; alle Versuche mit AH=0; der 1. Versuch mit IVF, die anderen beiden Versuche mit ICSI
==> 'Behandlung' = 'ICSI+IVF'; AH=0
- b) Eine Frau hat 5 erfolglose Versuche; den 3. Versuche mit AH=1 sonst AH=0; der 1. Versuch mit IVF, der 2.-4. Versuch mit ICSI, der 5. Versuch mit beidem
==> 'Behandlung' = 'ICSI+ICSI,IVF+IVF'; AH=2
- c) Eine Frau hat 4 erfolglose Versuche; alle Versuche mit AH=1; den 1. und 2. Versuch mit IVF, die anderen Versuche mit ICSI
==> 'Behandlung' = 'ICSI+IVF'; AH=1
- d) Eine Frau hat 3 erfolglose Versuche; 1 Versuch mit AH=0 und die anderen Versuche mit AH=1; alle Versuche mit ICSI
==> 'Behandlung' = 'ICSI'; AH=2

AH=0 - in der Versuchsserie fand nie Hatching statt (Gruppe A)

AH=1 - in der Versuchsserie fand immer Hatching statt (Gruppe B)

AH=2 - in der Versuchsserie fand sowohl Hatching als auch kein Hatching statt (Gruppe C).

3.2 Hormonelle Stimulation der Patienten

Um das Heranreifen mehrerer befruchtungsfähiger Eizellen zu ermöglichen, erfolgte bei allen Patientinnen die kontrollierte ovarielle Stimulation vor der eigentlichen IVF- bzw. IVF/ICSI-Behandlung.

Als Stimulationsprotokolle wurden das lange Protokoll mit GnRH-Agonistengabe oder das Antagonisten-Protokoll genutzt.

Im langen Protokoll erhielt die Patientin zur hypophysären Suppression ab dem 20. bis 22. Zyklustag einen GnRH-Agonisten (in Depotform Triptorelin oder täglich nasal Nafarelin). Die gleichzeitige Gabe eines oralen Kontrazeptivums im Vorzyklus wurde bei einigen Patientinnen angewendet, um eine ovarielle Zystenbildung, das Eintreten einer Spontanschwangerschaft unter GnRH-Analoga-Behandlung zu verhindern und die Ansprechrate bei den „poor respondern“ zu verbessern.

Zwischen dem 1. bis 5. Zyklustag begannen wir mit der Gonadotropinstimulation. Die Startdosis lag zwischen 75 und 150 IE/die FSH oder HMG (verwendete FSH-Präparate: Fertinorm HP; Gonal F bzw. das HMG-Präparat: Menogon HP). Die weitere Dosierung richtete sich nach dem Zyklusmonitoring (Follikulometrie, Estradiol, LH, Endometriumdicke).

Im Antagonisten-Protokoll begannen die Patientinnen ab dem 1. bis 5. Zyklustag mit der Gonadotropininjektion, nach entsprechender Follikelreifung erfolgte die Verabreichung des GnRH-Antagonisten (ca. 6. ZT) Cetrorelix (0,25 mg/die s.c. oder einmalig 3mg s.c.) oder Ganirelix (0,25 mg/die s.c.) bis zur Ovulationsinduktion mittels HCG-Gabe.

In beiden Protokollen erhielten die Patientinnen 10 000 IE HCG (Pregnesin; Predalon) bei ausreichender Follikelgröße von ca. 16-18 mm, ca. am 12.-15. Zyklustag, 36 Stunden vor der Follikelpunktion. 48 bis 72 Stunden später erfolgte dann der Embryotransfer.

Am Vortag des Embryotransfers begannen wir mit der Progesterongabe (Crinone Gel 8 % 1x/Tag oder Utrogest 3x2 Tabl.) insgesamt über 15 Tage.

Zusätzlich zur Unterstützung der Lutealphase verabreichten wir Tag 1 und Tag 4 nach dem Embryotransfer 5000 IE HCG oder 1 Ampulle Proluton (Hydroxyprogesteroncaproat) bei hohem Estradiolspiegel, stark erhöhter Eizellgewinnung bei der Follikelpunktion, bei Gefahr eines OHSS. Zum Teil erhielten Patientinnen auch die Kombination von 2500 IE HCG und Proluton.

Zur hormonellen Vorbereitung des Embryotransfers nach Kryokonservierung verordneten wir ab 7. Zyklustag Estradiol-Tabletten über insgesamt 28 Tage (7.-10. ZT: 3 Tabl. a 2mg, 11.-14. ZT: 4 Tabl., 15. ZT: 3 Tabl., 16.-17. ZT: 2 Tabl.). Zusätzliche Utrogest-Gabe (3x2 Tabletten) oder Crinone Gel 8 % 1x täglich erfolgte ab 15.ZT über insgesamt 15 Tage. Der Embryotransfer wurde bei Zustand nach Kryokonservierung am 18. Zyklustag durchgeführt.

3.3 Eizellgewinnung und Präparation

Die Gewinnung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COCs) erfolgte durch transvaginale ultraschallkontrollierte Follikelpunktion. Dazu wurde die mit dem Aspirator 4014 (Labotect GmbH, Göttingen) verbundene Punktionsnadel (Labotect GmbH, Göttingen,

REF 324106) durch die Scheide an die Ovarien herangeführt und der Follikelinhalt durch Anwendung von Unterdruck (300 mmHG) in sterilen 15 ml Röhren (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, REF 164 161) entleert. Die aspirierte Follikelflüssigkeit wurde in sterile Petrischalen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, REF 82.1473.001) überführt und unter dem Stereomikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf) bei 30 bis 60facher Vergrößerung nach COCs durchsucht.

Mit sterilen Unopetten (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, REF 365878) wurden die COCs in 60 mm Petrischalen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, REF 35 3037) überführt, die mit 4 ml Flushing Medium (MediCult, Jyllinge, REF 1076 4125) gefüllt waren. Zunächst wurden alle Punktate durchsucht und die gewonnenen COCs in dieser Schale gesammelt. Nach Kontrolle aller Punktate wurden die Eizellen in eine zweite 60 mm Petrischale umgesetzt und in IVFTM-100-Medium (Vitrolife, Göteborg, REF 10009) gewaschen. Follikelflüssigkeit, Blutbeimengungen und HEPES aus der ersten Spülung wurden vollständig entfernt. Falls Erythrozytenaggregate und wandständige Granulosazellkomplexe sich durch Pipettieren nicht entfernen ließen, erfolgte dies auf mechanischem Wege durch Abtrennen der genannten Bezirke mit Hilfe der Unopette. Abschließend wurden die COCs in vorbereitete 4-well-Schalen (Nalge Europe Ltd, Neerijse, REF 176740) in IVFTM-100-Medium umgesetzt und bis zur IVF bzw. ICSI dort aufbewahrt. Es wurden bis zu maximal 10 COCs pro Vertiefung gesammelt.

Alle Materialien und Medien, die bei der Punktion zum Einsatz kamen, wurden auf 37°C vorgewärmt. Während der Follikelpunktion wurden die 15 ml-Röhren mit den Punktaten im temperierten Heizblock bei 37°C aufbewahrt. Der Heiztisch des Stereomikroskopes war ebenfalls auf 37°C erwärmt.

3.4 Spermagewinnung und Präparation

Am Tag der Follikelpunktion erfolgte die Gewinnung der Ejakulate durch Masturbation.

Am andrologischen Arbeitsplatz wurden von jedem Patienten SpermioGramme angefertigt, in denen die von der WHO geforderten Parameter für die Bewertung der Ejakulate vor und nach der Aufarbeitung für die IVF und ICSI berücksichtigt wurden (Nieschlag et al., 1999).

Es wurden die drei nachfolgend beschriebenen Methoden der Ejakulataufarbeitung genutzt.

3.4.1 Swim-up-Präparation

Die swim-up Präparation wurde für die Aufarbeitung von Ejakulaten mit Normalbefunden aller Parameter (Normozoospermie) bzw. bei Ejakulaten mit eingeschränkter Spermienzahl und normaler Motilität (Oligozoospermie) genutzt.

Das Prinzip der swim -up Technik besteht in der Anreicherung progressiv motiler Spermien in der Medienphase über einem nach Zentrifugation des Ejakulates gewonnenen Pellet. Die Anreicherung erfolgt durch Aufschwimmen der Spermien aus dem Pellet in die Medienphase.

Der Ablauf der swim-up Präparation gestaltet sich wie folgt.

Nach Gewinnung der Ejakulate durch Masturbation und Abgabe wurden die Probengefäße im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt. Der Zeitpunkt der Abgabe wurde protokolliert und 30 Minuten später mit der Anfertigung des Spermigramms und der Präparation der Ejakulate begonnen. Vor Analyse und Präparation wurde die vollständige Verflüssigung des Ejakulats überprüft. War das Ejakulat nicht innerhalb dieser Zeitspanne verflüssigt, wurde eine Ampulle Chymotrypsin (Sigma^R, Taufkirchen, REF CHY-5S) zugesetzt.

Nach der Basisanalyse des nativen Ejakulates wurde es mit Sperm Preparation Medium (MediCult, Jyllinge, REF 10700060) im Verhältnis 1:3 verdünnt und 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 2 ml IVFTM-100-Medium überschichtet und das Röhrchen in den Brutschrank (37°C, 95 % RH) gestellt. Nach einer Stunde wurde der Überstand mit den darin befindlichen Spermien vorsichtig abgehoben und 10 min bei 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abpipettiert und das Pellet in ca. 3 ml IVF-100-Medium aufgenommen und für ca. zwei Stunden im Brutschrank (37°C, 95 % RH, 5 % CO₂) bis zum Beginn der IVF-, ICSI-Behandlung aufbewahrt.

3.4.2 Dichtegradientenzentrifugation

Die Präparation mittels Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei Ejakulaten mit Normbefunden und bei Ejakulaten mit verminderter Anzahl und Motilität, sowie eingeschränkter Morphologie der Spermien. Die Dichtegradientenzentrifugation ist die schonendste Methode zur Aufarbeitung von Ejakulaten und wurde am häufigsten angewendet.

Das Prinzip dieser Technik besteht darin, dass funktionell intakte Spermien während der Zentrifugation aufgrund ihrer höheren Dichte den gesamten Gradienten durchlaufen und

auf dem Gefäßboden in Form des Pellets sedimentieren. Die leichteren avitalen Spermien und Rundzellen bleiben im Gradienten hängen und werden mit dem Überstand vom Pellet abgetrennt. Diese Methode ist für die Spermien am schonendsten und liefert bei korrekter Handhabung eine gute Reinheit des Präparates.

In Vorbereitung auf die Dichtegradientenzentrifugation wurden 2,5 ml Sil-Select PlusTM „upper layer“ (FertiPro, Beernem) in ein 10 ml-Röhrchen pipettiert und mit 2,5 ml Sil-Select PlusTM „lower layer“ (FertiPro, Beernem) unterschichtet. Das Röhrchen wurde im Wärmeschrank vor dem Auftragen des verflüssigten Ejakulates auf 37 °C erwärmt. Das Ejakulat wurde auf die beiden Schichten des Dichtegradienten aufgetragen, indem man es vorsichtig an der Wand des Röhrchens ablaufen ließ. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 400xg wurde mit einer Pipette der Überstand abgehoben und verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml IVFTM-100-Medium aufgenommen, gewaschen und abermals zentrifugiert (400g, 10 min). Das Pellet wurde erneut in 3 ml IVFTM-100-Medium aufgenommen, resuspendiert und bis zum Beginn der IVF-, ICSI-Behandlung im Brutschrank (37°C, 95 % RH, 5 % CO₂) aufbewahrt.

Der Dichtegradient wurde mit maximal 5 ml Ejakulat beladen. Bei hoher Spermiedichte waren es maximal 3 ml. Bei geringer Spermiedichte wurde nur ein Gradient verwendet. Seine Konzentration lag dann zwischen 45 % und 80 %. Die Zentrifugationszeit wurde in diesem Fall auf 30 Minuten verlängert.

3.4.3 Zentrifugation

Die Präparation der Ejakulate durch Zentrifugation erfolgte nur, wenn im Spermogramm eine Kryptozoospermie beschrieben wurde.

In diesem Fall wurde das Ejakulat mit 6 ml Medium verdünnt und bei 600xg 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abpipettiert und das Pellet in ca. 3 ml IVFTM-100-Medium aufgenommen und für ca. zwei Stunden im Brutschrank (37°C, 95 % RH, 5 % CO₂) bis zum Beginn der ICSI-Behandlung aufbewahrt.

3.5 In-vitro-Fertilisation

Die IVF erfolgte in Abhängigkeit von der Anzahl der Eizellen und vom andrologischen Befund entweder im 100µl-Tropfen unter Öl oder im offenen System in der 4-well-Schale.

3.5.1 IVF im 100 µl Tropfen unter Öl

Am Tag vor der Follikelpunktion wurden 60 mm Petrischalen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, REF 35 3037) für die IVF vorbereitet. Entsprechend der Anzahl der zu erwartenden Eizellen wurden 100µl-IVFTM-100-Mediumtropfen in der Petrischale platziert und mit Mineralöl (Reproline medical GmbH, Rheinbach, REF 45 12 00) überschichtet. Die Schalen wurden im Brutschrank (37 °C, 95 % RH, 5 % CO₂) bis zum Beginn der IVF äquilibriert. Außerdem wurden 4-well-Schalen für die In-vitro-Kultur der COCs nach der Befruchtung präpariert. Dazu wurden in jeder Vertiefung der Schale 400 µl IVFTM-100-Medium pipettiert und in den Raum zwischen den wells 1,5 ml DPBS (Biochrom AG, Berlin, REF L1815). Die 4-well-Schalen wurden ebenfalls unter den genannten Bedingungen im Brutschrank äquilibriert.

Am Tag der Follikelpunktion wurden die gewaschenen COC einzeln auf die Medientropfen verteilt. Zusätzlich wurden in jeden Tropfen 50 000 Spermien übertragen. Bei der Einstellung der Spermienkonzentration nach der Präparation war darauf zu achten, dass das Volumen der für die Insemination der COCs genutzten Spermiesuspension 10 % des Gesamtvolumens (10 µl) nicht überschritt. Dies war nur im Ausnahmefall erlaubt, wenn bei sehr schlechtem Spermogramm die Durchführung einer IVF zwingend erforderlich war und keine ICSI durchgeführt werden durfte. COCs und Spermien wurden gemeinsam im Brutschrank zwei Stunden (37 °C, 95 % RH, 5 % CO₂) kultiviert. Danach wurden die COCs mit den noch anhaftenden Spermien in die zur In-vitro-Kultur vorbereiteten 4-well-Schalen umgesetzt. In jeder Vertiefung wurden maximal fünf COCs platziert. Die Kultur der COCs erfolgte über 16-18 Stunden im Brutschrank (37 °C, 95 % RH, 5 % CO₂) bis zur Vorkernkontrolle.

3.5.2 IVF im offenen System

Am Tag vor der Follikelpunktion wurden 4-well-Schalen für die IVF im offenen System präpariert. Dazu wurden in jeder Vertiefung der Schale 400 µl IVFTM-100-Medium pipettiert und in den Raum zwischen den wells 1,5 ml DPBS. Die 4-well-Schalen wurden bis zum Beginn der IVF im Brutschrank bei 37 °C, 95 % RH und 5 % CO₂ äquilibriert.

Am Tag der Follikelpunktion wurden in jedes well der vorbereiteten 4-well-Schale maximal fünf gewaschene COCs übertragen. Die Anzahl der pro well übertragenen Spermien richtete sich nach der Anzahl der darin kultivierten Eizellen. Es wurde mit

50000 A-motilen Spermien pro Eizelle inseminiert. Eizellen und Spermien wurden für 16 bis 18 Stunden gemeinsam im Brutschrank bei 37 °C, 95 % RH und 5 % CO₂ bis zur Vorkernkontrolle kultiviert.

3.6 Intracytoplasmatische Spermieninjektion

Um die reifen, sekundären Oozyten für die ICSI selektieren zu können und sie bei der Injektion der Spermien exakt zu positionieren, war es notwendig den Cumulus oophorus von den Eizellen zu entfernen.

Das Denudieren der COCs erfolgte 1 Stunde nach der Follikelpunktion. Dazu wurden am Tag vor der Follikelpunktion 60 mm Petrischalen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, REF 35 3037) vorbereitet. In den Petrischalen wurden mehrere 100 µl Tropfen Hyaluronidase-Lösung (MediCult, Jyllinge, REF 1011 0010) und 100 µl Tropfen IVFTM-100-Medium platziert und mit Mineralöl (Reproline medical GmbH, Rheinbach, REF 45 12 00) überschichtet. Die Schalen wurden bis zum Beginn der Denudierung im Brutschrank (37 °C, 95 % RH, 5 % CO₂) äquilibriert.

Etwa 2 Stunden vor dem Beginn der ICSI wurden die gewaschenen COCs in den Hyaluronidasetropfen platziert und dort für maximal drei Minuten aufbewahrt. In dieser Zeit wurde durch mehrmaliges Pipettieren der COCs mit Pipetten mit einem Innendurchmesser von 140 bzw. 130 µm (HUMAGENTM, Charlottesville, REF MIC-50-35) der Cumulus oophorus von den Eizellen entfernt.

Nach maximal 3 Minuten wurden die Eizellen mit den restlichen noch anhaftenden Cumuluszellen in die IVFTM-100-Tropfen übertragen, dort vollständig von den Cumuluszellen befreit, gewaschen und schließlich zurück in die 4-well-Schale übertragen und dort für mindestens zwei Stunden bis zum Beginn der Spermieninjektion aufbewahrt.

Die Petrischalen für die ICSI (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, REF 35 1006) wurden am Tag vor der Injektion vorbereitet. Dazu wurden zehn 5 µl-Tropfen IVFTM-100-Medium in der Petrischale und zwei 5 µl-Tropfen PVP-Medium (MediCult, Jyllinge, REF 1090 5000) in der Schale platziert und mit Mineralöl (Reproline medical GmbH, Rheinbach, REF 45 12 00) überschichtet. Die Schalen wurden bis zum Beginn der ICSI bei 37 °C, 95 % RH und 5 % CO₂ im Brutschrank aufbewahrt.

Die Spermieninjektion wurde mit Hilfe des Mikromanipulators Transfer Man (Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf) bei 200facher Vergrößerung unter einem inversen Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf) durchgeführt.

Nach Entfernung der Cumuluszellen und Einhaltung der zweistündigen Ruhezeit wurden die reifen, befruchtungskompetenten Eizellen einzeln in die Medientropfen der vorbereiteten Petrischalen übertragen. Die aufbereiteten Spermien wurden in den PVP-Tropfen platziert.

Es wurde jeweils ein einzelnes progressiv motiles Spermium immobilisiert und anschließend in die Injektionspipette (HUMAGENTM, Charlottesville, REF MIC-50-35) aufgenommen.

Danach wurde die Eizelle so an der Haltepipette (HUMAGENTM, Charlottesville, REF MPH-MED-35) fixiert, dass der Polkörper in 12-Uhr-Position orientiert war. Halte- und Injektionspipette lagen sich auf einer Ebene genau gegenüber, die Haltepipette in 9-Uhr-Position und die Injektionspipette in 3-Uhr-Position. Nach Penetration von Zona pellucida und Eizellmembran wurde das Spermium im Zytoplasma der Eizelle platziert und die Injektionspipette aus dem Zytoplasma entfernt.

Nachdem alle Eizellen einer Schale injiziert waren, wurden sie in die 4-well-Schale zurückgesetzt und bis zur Vorkernkontrolle über 16-18 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % RH und 5 % CO₂ kultiviert.

3.7 Vorkernbeurteilung

16 bis 18 Stunden nach Beginn von IVF bzw. ICSI wurde die Befruchtungsrate anhand der Ausbildung von männlichem und weiblichem Pronukleus bestimmt.

Die Zona pellucida der durch IVF befruchteten Eizellen wurde durch Pipettieren von anhaftenden Cumuluszellen und Spermien befreit, bevor die Eizellen in vorbereitete Scoringschalen übertragen wurden. Die Scoringschalen wurden am Tag vor der Pronukleus-Beurteilung vorbereitet. Dazu wurden entsprechend der Anzahl an Eizellen 5 µl-Tropfen IVFTM-100-Medium in 60 mm Petrischalen platziert, mit Mineralöl (Reproline medical GmbH, Rheinbach, REF 45 12 00) überschichtet und im Brutschrank (37 °C, 95 % RH, 5 % CO₂) bis zur Nutzung äquilibriert.

Eizellen, die durch Spermieninjektion befruchtet wurden, konnten unmittelbar aus der Kulturschale in die Scoringschale übertragen werden.

Die Beurteilung der Vorkerne erfolgte mit Hilfe des inversen Mikroskopes Diaphot 300 (Nikon GmbH, Düsseldorf) bei 200facher Vergrößerung. Eizellen galten als befruchtet, wenn sowohl der männliche als auch der weibliche Vorkern ausgebildet waren. Die Einteilung der befruchteten Eizellen erfolgte nach Tesarik et al. (1999) und Scott et al. (1998).

Nach der Beurteilung der Vorkerne erfolgte die Selektion der befruchteten Eizellen für Transfer und Kryokonservierung.

Befruchtete Eizellen mit nur einem oder mehr als zwei Vorkernen wurden verworfen.

In Abhängigkeit vom Wunsch der Patientin und in Übereinstimmung mit dem Embryonenschutzgesetz wurden die qualitativ besten Embryonen für den Transfer ausgewählt.

Wurde darüber hinaus eine Kryokonservierung der übrigen befruchteten Eizellen gewünscht, erfolgte diese am Tag der Vorkernkontrolle vor der Zygotenbildung.

3.8 In-vitro-Kultur befruchteter Eizellen vor dem Embryotransfer

Die In-vitro-Kultur der für den Transfer bestimmten befruchteten Eizellen erfolgte in IVFTM-100-Medium (Vitrolife, Göteborg, REF 10009) in 4-well-Schalen, die vor dem Einsetzen der Eizellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % RH über Nacht äquilibriert worden sind. Nach dem PN-scoring wurden die zum Transfer bestimmten befruchteten Eizellen aus der Scoringschale in die vorbereitete 4-well-Schale übertragen. Die Anzahl der kultivierten, befruchteten Eizellen richtete sich nach dem Wunsch des Paares und lag in Übereinstimmung mit dem Embryonenschutzgesetz bei maximal 3 befruchteten Eizellen. Die Kulturdauer nach dem PN-Scoring lag bei 24 bzw. 48 Stunden. Wurde 48 h kultiviert, erfolgte nach 24 h ein Umsetzen der Embryonen in frisches Medium.

3.9 Assisted hatching mit dem Infrarotlaser

Das Assisted hatching wurde mit dem Infrarotdiodenlaser OCTAX LasershotTM System (OCTAX Microscience GmbH, Herborn) unter dem inversen Mikroskop Diaphot 300 (Nikon GmbH, Düsseldorf) durchgeführt etwa 1 bis 2 h vor dem Transfer. Die Embryonen wurden einzeln in 5µl Tropfen IVFTM-100-Medium platziert. Die

Petrischalen für das Assisted hatching wurden am Tag vor dem Lasern vorbereitet und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % RH äquiliibriert. Die Petrischale mit den eingesetzten Embryonen wurde auf dem vorgewärmten Objektisch des Mikroskops platziert. Mit Hilfe der OCTAX EyeWare™ (Medical Technology-Vertriebs-GmbH, Altdorf) wurde das Lasern am Computer gesteuert und dokumentiert. Dazu wurde zunächst das Laserobjektiv in den Strahlengang des Mikroskops gebracht und der Laser aktiviert. Die Bestrahlungsleistung des Lasers lag zwischen 90 und 130 mW und die Bestrahlungszeit bei 10 ms. Mit Hilfe des Feintriebes am Mikroskop wurde die Petrischale so orientiert, dass der Fokus des Laserobjektives auf der Zona pellucida lag und bedingt durch den größten Abstand zu den benachbarten Blastomeren keinen Kontakt zu ihnen bekommen konnte. Danach wurde der Infrarotlaser ausgelöst und die Zona pellucida in einem Bereich von 40 µm (+/- 5 µm) Länge eröffnet. Eine vollständige Öffnung wurde angestrebt.

Das Aussehen jedes Embryos wurde vor und nach der Laserbehandlung fotografisch dokumentiert. Die Zonadicke und der Durchmesser der Zonaöffnung wurden am Computer vermessen und in einer Datenbank gespeichert.

3.10 Embryotransfer

Die Übertragung der Embryonen in den Uterus erfolgte am Tag 2 bzw. 3 nach Follikelpunktion. Es wurden drei verschiedene Kathetertypen für den Transfer verwendet (Labotect GmbH, Göttingen, REF 320200; COOK Deutschland GmbH, Mönchengladbach, REF K-SOFT-5000-PKG; Wallace - SIMS Portex Limited, Hythe, Kent, REF 1816NST). Nachdem der Führungskatheter im Uterus platziert war, wurden die Embryonen in den Innenkatheter aufgenommen und der Innenkatheter im Führungskatheter platziert. Der Innenkatheter war mit IVF™-100-Medium gefüllt und mit einer mit dem gleichen Medium gefüllten 1ml-Heparinspritze verbunden. Der Innenkatheter wurde in das Cavum des Uterus geschoben und die Embryonen mit ca. 20 µl IVF™-100-Medium in den Uterus gespült. Anschließend wurde der erfolgreiche Transfer durch Spülen des Transferkatheters überprüft. Waren Embryonen zurückgeblieben, mussten diese in einem Retransfer übertragen werden.

3.11 Datenerfassung und Statistik

Die Erfassung der Patientendaten erfolgte am Computer. Mit Hilfe des Programms RecDate (Serono GmbH, Unterschleißheim) wurden alle Anamnesedaten sowie alle Daten der IVF- und ICSI-Behandlungen erfasst.

Mit dem Programm OCTAX EyeWare™ wurden alle Daten zum Assisted hatching zusammengetragen.

Die Zusammenführung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Excel. Hier wurden die Daten anonymisiert und ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes mit Yate's Stetigkeits- Korrektur sowie des exakten Fisher-Testes.

Die Standardabweichung (σ) wurde nach folgender Formel berechnet (Ziegler, 1993):

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2 \frac{1}{N}}$$

N Anzahl der Merkmale

x_i Merkmalswerte

μ arithmetisches Mittel

Die Formel des Chi-Quadrat-Testes lautet:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(h_i - h_E)^2}{h_E}$$

h_i relative Häufigkeit / reale Verteilung über die Kategorien

h_E erwartete absolute Häufigkeit / Erwartungswert

Für kategoriale Merkmale gilt die Ablehnung der Nullhypothese H_0 (keine Gleichverteilung bzw. beide Merkmale sind voneinander unabhängig), wenn

$$\chi^2 > \chi^2_{1-\alpha} (k-1) \quad \alpha: \text{Signifikanzniveau}$$

$k-1$: Freiheitsgrad

ist.

Für die statistische Auswertung wurde das unten zitierte Programm genutzt:

R Development Core Team (2004). R: A language and environment for statistical computing.

R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0,
URL <http://www.R-project.org>.

4. Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit untersuchten wir den Einfluss des Assisted hatching auf den Erfolg der Kinderwunschbehandlung im Kinderwunschzentrum Neubrandenburg am Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg.

Im Zeitraum vom 01.01.2000 – 31.12.2003 wurden insgesamt 826 Embryotransfers durchgeführt. Dabei erhielten 461 Patientinnen eine IVF- bzw. ICSI- Behandlung.

Assisted hatching wurde in 326 Zyklen durchgeführt.

In unserem Patientenkollektiv wurden Frauen im Alter von 21 Jahren bis zu 44 Jahren behandelt.

Die Altersverteilung ist in den Gruppen mit Hatching (AH=1) bzw. ohne Hatching (AH=0) signifikant verschieden ($p < 0,01$). Der Altersdurchschnitt in der Hatching-Gruppe ist deutlich höher als in der Patientengruppe ohne Assisted hatching. Die Altersverteilung mit Standardabweichung zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Altersverteilung und Standardabweichung in Abhängigkeit von Assisted hatching; bezogen auf alle ET's (Zyklen) bzw. auf die Patienten

	Anzahl	Durchschnittsalter	Standardabweichung
I. Zyklen			
1. Gesamt	826	32,43 Jahre	4,36 Jahre
1.1. AH=0	500	31,06 Jahre	3,90 Jahre
1.2. AH=1	326	34,52 Jahre	4,19 Jahre
II. Patienten			
2. Gesamt	461	31,72 Jahre	4,43 Jahre
2.1. AH=0	373	30,90 Jahre	3,98 Jahre
2.2. AH=1	88	35,22 Jahre	4,51 Jahre

Die Anzahl der Embryotransfers pro Frau lag zwischen 1 und 7 Transfers im Zeitraum 01.01.2000 – 31.12.2003 ohne Zyklen mit Kryokonservierung und ohne IVF/ICSI-Behandlung.

4.2 Anzahl der Embryotransfers entsprechend der Vorbehandlungen in der Kinderwunschsprechstunde

Im Untersuchungszeitraum 01.01.2000 – 31.12.2003 wurden im Klinikum Neubrandenburg 400 x Embryotransfers nach IVF sowie 426 x Transfers nach ICSI durchgeführt.

Abbildung 1 stellt die zahlenmäßige Verteilung der Embryotransfers in Bezug auf die Art der Vorbehandlung dar.

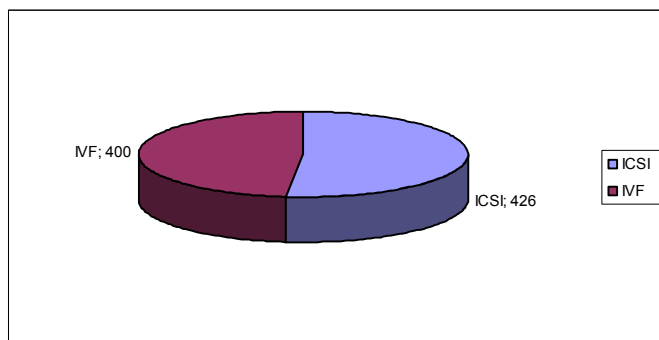


Abb.1: Anzahl der Embryotransfers in Abhängigkeit von der Art der Behandlung im Untersuchungszeitraum 2000-2003

4.3 Schwangerschaftsrate, Implantationsrate und Befruchtungsrate nach ICSI bzw. IVF im Untersuchungszeitraum 2000-2003

In unserem Patientenkollektiv wurden 461 Patientinnen behandelt. Die Anzahl der Embryotransfers pro Frau lag zwischen 1 und 7 Transfers.

Aus den 826 Transfers resultierten 172 Schwangerschaften. Das entspricht einer Schwangerschaftsrate (SS-Rate) von 20,8 % für den gesamten Untersuchungszeitraum. In dieser Zeit wurden 1938 Embryonen insgesamt übertragen sowie 220 Fruchthöhlen per Vaginalsonographie registriert. Daraus resultiert eine Implantationsrate von 11,4 %.

Die Befruchtungsrate nach ICSI ergab einen Durchschnittswert von 55,3 %, nach IVF betrug sie 49,5 %.

4.4 Schwangerschaftsergebnisse im Zeitraum 2000-2003

Die 172 Schwangerschaften (SS) endeten in 126 Geburten, 39 Aborten, 5 Extrauteringraviditäten, von zwei Schwangerschaften blieb der Ausgang unbekannt. Bei den Geburten traten 30 Zwillings- und 96 Einlingsgeburten auf. Die Geburtenrate bezogen auf 461 Patientinnen betrug 27,3 %.

4.5 Anzahl der Schwangerschaften und Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Durchführung des Assisted hatching im Zeitraum 2000-2003

Nach Durchführung von 326 Zyklen mit Assisted hatching entstanden 54 Schwangerschaften, bei 500 Zyklen ohne Assisted hatching 118 Schwangerschaften, was einer Schwangerschaftsrate von 16,6 % mit AH bzw. 23,6 % ohne AH über den gesamten Untersuchungszeitraum entspricht. Dabei fand die Art der Behandlung vor dem Embryotransfer keine Berücksichtigung (ET nach IVF bzw. ICSI). Die Schwangerschaftsraten mit und ohne hatching unterscheiden sich signifikant ($p = 0,02$).

Abbildung 2 zeigt die Anzahl der Schwangerschaften im Zeitraum vom 01.01.2000 – 31.12.2003.

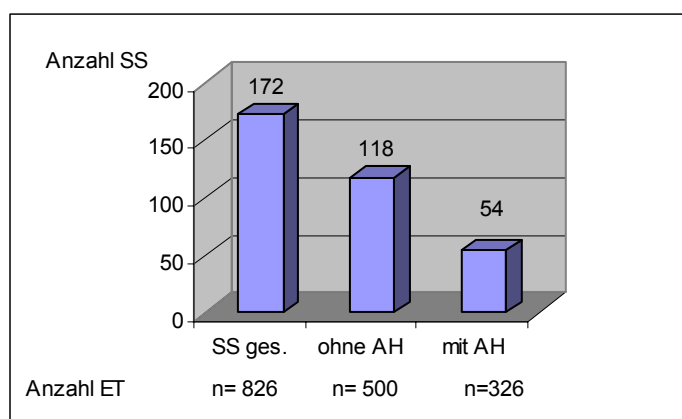


Abb. 2: Darstellung der Anzahl der Schwangerschaften 2000-2003 mit/ohne AH ($p = 0,02$; signifikant)

4.6 Untersuchungsergebnisse zum Einfluss des Assisted hatching im Rahmen der Kinderwunschbehandlung im Kinderwunschzentrum Neubrandenburg im Zeitraum 2000-2003

Im Folgenden möchten wir unsere Untersuchungsergebnisse bezüglich des Einflusses von Assisted hatching auf die Schwangerschaftsrate im Rahmen der Kinderwunschbehandlung im Kinderwunschzentrum Neubrandenburg am Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg im Zeitraum 01.01.2000 - 31.12.2003 darstellen. Dabei gingen nur die Embryotransfers nach reiner IVF- bzw. ICSI-Behandlung in die Auswertung ein. Die Zyklen mit Embryotransfer nach Kryokonservierung sowie nach IVF/ICSI-Behandlung wurden nicht mit einbezogen.

4.6.1 Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Alter der Patientin und der Durchführung von Assisted hatching im Zeitraum 2000-2003

Um die Altersabhängigkeit in unserem Patientenkollektiv zu prüfen, unterteilten wir in folgende vier Gruppen:

I \leq 30 Jahre	(AH=0: 216 Zyklen; AH=1: 53 Zyklen)
II 31-35 Jahre	(AH=0: 222 Zyklen; AH=1: 135 Zyklen)
III 36-40 Jahre	(AH=0: 58 Zyklen; AH=1: 116 Zyklen)
IV $>$ 40 Jahre	(AH=0: 4 Zyklen; AH=1: 22 Zyklen)

Zunächst wurden alle Transferzyklen im Zeitraum 01.01.2000 bis 31.12.2003 betrachtet.

In Gruppe I traten ohne Assisted hatching 62 Schwangerschaften ein, in Gruppe II 49 Schwangerschaften, in Gruppe III 7 Schwangerschaften, in Gruppe IV kam es zu keiner Schwangerschaft ohne Assisted hatching.

In der Hatching-Gruppe kam es zu 9 Schwangerschaften in Gruppe I, zu 21 Schwangerschaften in Gruppe II, 18 Schwangerschaften traten in Gruppe III auf. Bei den Patientinnen über 40 Jahre konnten nach Assisted hatching 6 Schwangerschaften verzeichnet werden.

Der Vergleich der Schwangerschaftsraten zwischen Hatching-Gruppe und Nicht-Hatching-Gruppe in der gleichen Altersklasse erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Die Schwangerschaftsraten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Signifikante Unterschiede in der SS-Rate lagen in den folgenden Gruppen vor ($p < 0,05$): Gruppe I ohne AH und Gruppe III ohne AH, sowie Gruppe I ohne AH und Gruppe II mit AH.

Tabelle 2: Darstellung der Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Alter der Patientin sowie in Abhängigkeit von der Durchführung des Assisted hatching im Zeitraum 2000-2003 (p^* : Chi-Quadrat-Test mit Yate's Stetigkeits Korrektur / p^{**} : exakter Fisher-Test)

	Gruppen	Alter		alle ET/Frau SS-Rate p^*/p^{**}	SS / Anzahl ET
SS-Rate	I	≤ 30	ohne AH mit AH	28,7 % 17,0 % $p=0,12 / p=0,12$ (n.s.)	62 / 216 9 / 53
	II	31-35	ohne AH mit AH	22,1 % 15,6 % $p=0,17 / p=0,17$ (n.s.)	49 / 222 21 / 135
	III	36-40	ohne AH mit AH	12,1 % 15,5 % $p=0,70 / p=0,65$ (n.s.)	7 / 58 18 / 116
	IV	> 40	ohne AH mit AH	0 % 27,3 % $p=0,58 / p=0,54$ (n.s.)	0 / 4 6 / 22

Abbildung 3 zeigt die Anzahl der Schwangerschaften in unserem Patientengut mit und ohne Assisted hatching in Abhängigkeit vom Alter der Patientin im Zeitraum 2000-2003.

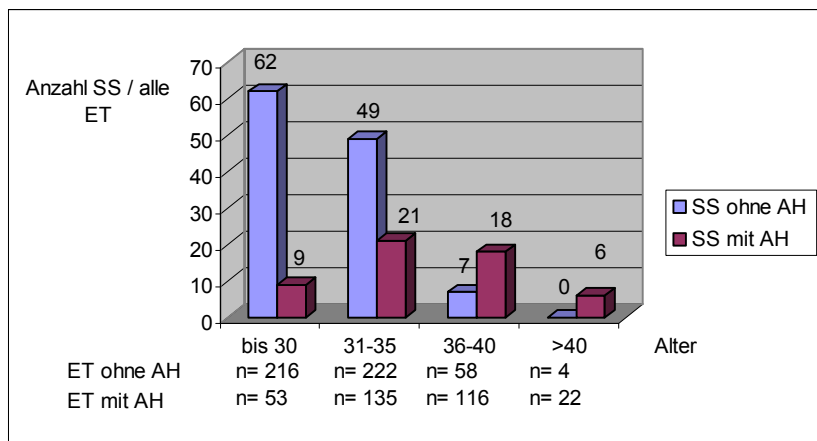


Abbildung 3: Anzahl der Schwangerschaften im Zeitraum 2000-2003 in Abhängigkeit von der Durchführung des Assisted hatching und vom Alter der Patientin, Anzahl der Embryotransfers

Bei 826 Transfers trat in 118 Fällen ohne Assisted hatching eine Schwangerschaft auf, was einer Schwangerschaftsrate von 23,6 % entspricht. Mit Assisted hatching waren im oben genannten Zeitraum 54 Schwangerschaften zu verzeichnen. Dies entspricht einer Schwangerschaftsrate von 16,6 %. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,02$).

4.6.2 Schwangerschaftsrate in Bezug auf Behandlungsmethode vor dem Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching

Um eine eventuelle Abhängigkeit der Schwangerschaftsrate von der vorangegangenen Behandlungsmethode darzustellen, verglichen wir die ICSI-Behandlung sowie die IVF-Behandlung bezüglich eingetretener Schwangerschaften in Abhängigkeit vom Alter sowie von der Durchführung des Assisted hatching (Tabelle 3).

Tabelle 3: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode vor Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching im Zeitraum 2000-2003

	Gruppen	Alter		ICSI SS-Anzahl	IVF SS-Anzahl
SS-Anzahl	I	≤ 30	ohne AH mit AH	28 7	34 2
	II	31-35	ohne AH mit AH	25 12	24 9
	III	36-40	ohne AH mit AH	1 11	6 7
	IV	> 40	ohne AH mit AH	0 4	0 2

Abbildung 4 zeigt die SS-Rate nach ICSI in Abhängigkeit vom Alter der Patientin und der Durchführung von Assisted hatching. Es besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Schwangerschaftsrate in den einzelnen Altersgruppen zwischen Hatching- und Nicht-Hatching-Gruppe.

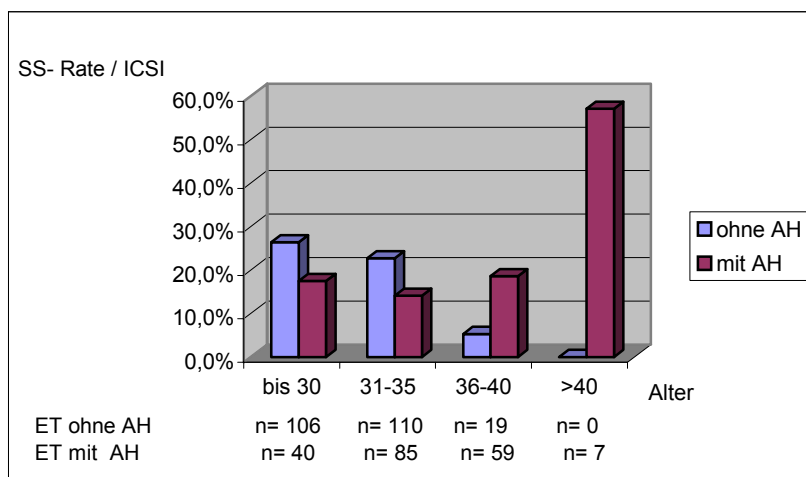


Abbildung 4: SS-Rate nach ICSI in Abhängigkeit von Alter, Anzahl der Embryotransfers und AH im Zeitraum 2000-2003, (n.s.)

Abbildung 5 stellt die SS-Raten nach IVF mit Bezug auf Alter der Patientin und Durchführung des Assisted hatching dar. Es zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der SS-Rate nach IVF unter Berücksichtigung des Alters der Patientin.

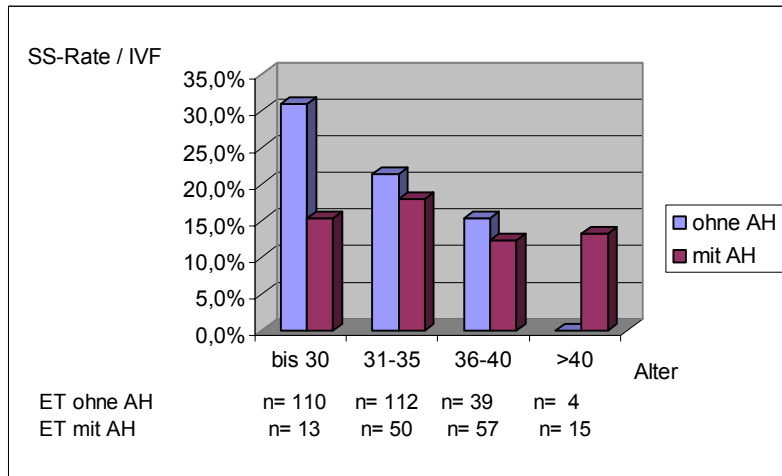


Abbildung 5: SS-Rate nach IVF in Abhängigkeit von Alter, Anzahl der Embryotransfers und AH im Zeitraum 2000-2003, (n.s.)

Die Signifikanzberechnungen durch Chi-Quadrat-Test mit Yate's Stetigkeits Korrektur sowie mit exaktem Fisher-Test für die Schwangerschaftsraten nach ICSI- bzw. IVF-Behandlung in Abhängigkeit vom Alter der Patienten werden in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: SS-Rate und p-Werte in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode vor Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching im Zeitraum 2000-2003 (p*: Chi-Quadrat-Test mit Yate's Stetigkeits Korrektur / p**: exakter Fisher-Test)

	Gruppen	Alter		ICSI SS-Rate p* / p**	IVF SS-Rate p* / p**
SS-Rate	I	≤ 30	ohne AH mit AH	26,4 % 17,5 % p=0,36 / p=0,29 (n.s.)	30,9 % 15,4 % p=0,40 / p=0,34 (n.s.)
	II	31-35	ohne AH mit AH	22,7 % 14,1 % p=0,18 / p=0,14 (n.s.)	21,4 % 18,0 % p=0,77 / p=0,68 (n.s.)
	III	36-40	ohne AH mit AH	5,3 % 18,6 % p=0,30 / p=0,27 (n.s.)	15,4 % 12,3 % p=0,89 / p=0,76 (n.s.)
	IV	> 40	ohne AH mit AH	0,0 % 57,1 % p=NaN / p=1	0,0 % 13,3 % p=1 / p=1 (n.s.)

4.6.3 Anzahl der Schwangerschaften und Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen im Zeitraum 2000-2003

Die Anzahl der Schwangerschaften variierte in Abhängigkeit von der Zahl der transferierten Embryonen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Zahl transferierter Embryonen im Zeitraum 2000-2003 (ohne Berücksichtigung von AH)

transf. Embryonen/alle ET	1	2	3
Schwangerschaft			
nein	87	267	300
ja	9	81	82

In Abbildung 6 folgt die Darstellung der Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen in Bezug auf alle Transferzyklen ohne Unterscheidung nach Durchführung von Assisted hatching oder nicht.

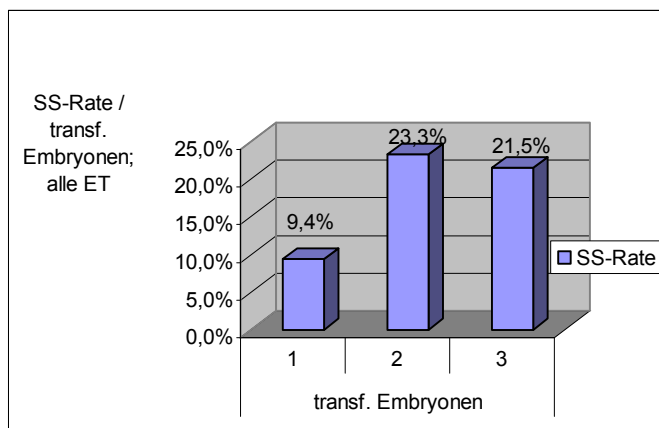


Abbildung 6: SS-Rate in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im Zeitraum 2000-2003 (ohne Berücksichtigung von AH)

Nach Differenzierung der Zyklen entsprechend der Durchführung von Assisted hatching oder nicht im Zeitraum 2000-2003 ergeben sich Tabellen 6 und 7.

Tabelle 6: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im Zeitraum 2000-2003 ohne Assisted hatching

alle ET ohne AH			
transf. Embryonen	1	2	3
Schwangerschaft			
nein	51	198	133
ja	7	66	45

Tabelle 7: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im Zeitraum 2000-2003 mit Assisted hatching

alle ET mit AH			
transf. Embryonen	1	2	3
Schwangerschaft			
nein	36	69	167
ja	2	15	37

In Abbildung 7 erfolgt die Darstellung der Schwangerschaftsraten pro Anzahl transferierter Embryonen mit und ohne AH im Säulendiagramm für alle Transferzyklen im Zeitraum 2000-2003.

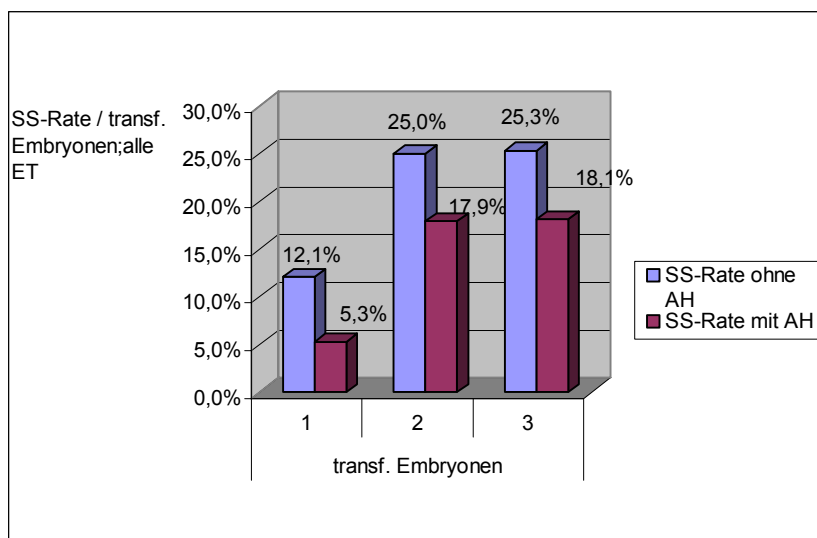


Abbildung 7: SS-Rate in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im Zeitraum 2000-2003 mit Berücksichtigung von AH

4.6.4 Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Embryo-Grading der übertragenen Embryonen im Zeitraum 2000-2003

In Abhängigkeit vom Embryo-Grading zeigten sich unterschiedliche Schwangerschaftsraten in unserem Patientengut.

Dazu erfolgte am Tag 2 oder 3 nach Follikelpunktion in unserem Patientenkollektiv die Beurteilung der Embryonen vor dem Embryotransfer.

Wir unterteilten die Embryonen nach einem Grading: A-B-C-D (entspricht Grade 4 bis 1 nach Steer et al., 1992), wobei Grading A (= Grade 4 nach Steer) die morphologisch besten Embryonen mit gleich großen, symmetrischen Blastomeren ohne Fragmentation beinhaltet. Grading B (= Grade 3 nach Steer) zeigt ungleiche Blastomeren mit < 10 % Fragmentation, Grading C (= Grade 2 nach Steer) hat ungleiche Blastomeren mit 10-50 % Fragmentation. Zu Grading D (= Grade 1 nach Steer) wurden Embryonen mit ungleichen Blastomeren und > 50 % Fragmentation zugeordnet.

Die Abbildungen 8a / 8b zeigen die SS-Raten bezüglich des Embryo-Gradings im Säulendiagramm im Untersuchungszeitraum von 2000-2003 ohne Berücksichtigung von AH.

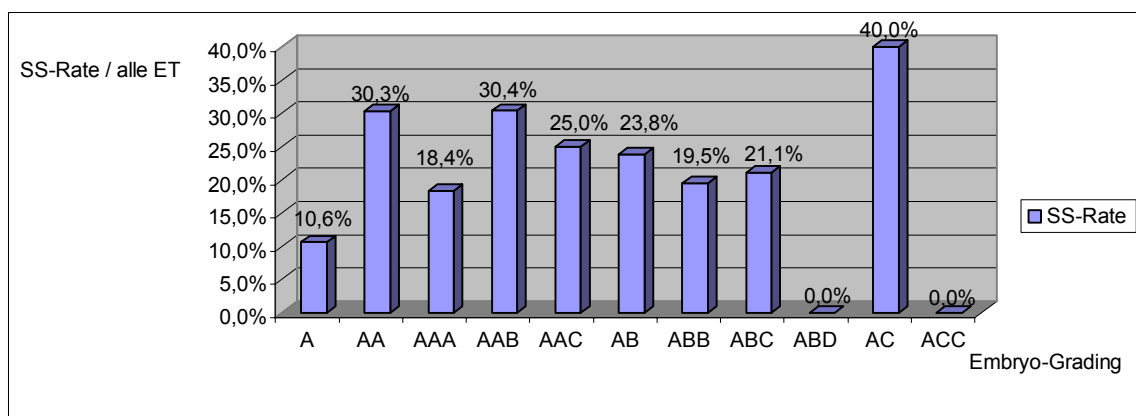


Abbildung 8a: SS-Rate in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im Zeitraum 2000-2003 (ohne Berücksichtigung von AH)

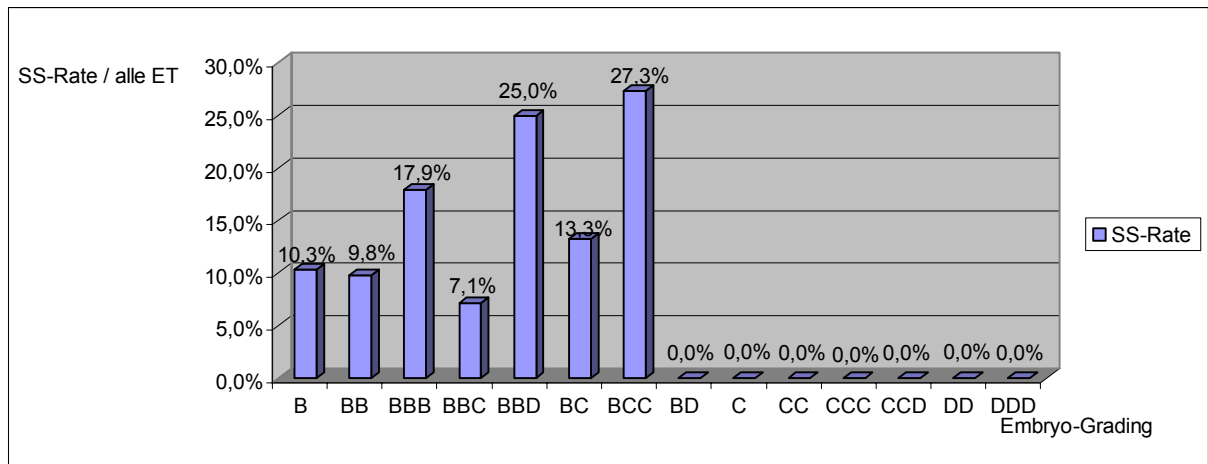


Abbildung 8b: SS-Rate in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im Zeitraum 2000-2003 (ohne Berücksichtigung von AH)

In der Gruppe mit Embryo-Grading C, CC, CCC, CCD, CD, DD, DDD war die Schwangerschaftsrate stets 0%.

Nach Differenzierung in Transfer-Zyklen ohne Assisted hatching und mit Assisted hatching ergeben sich die Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Embryo-Grading wie aus dem Säulendiagramm 9a / 9b ersichtlich ist.

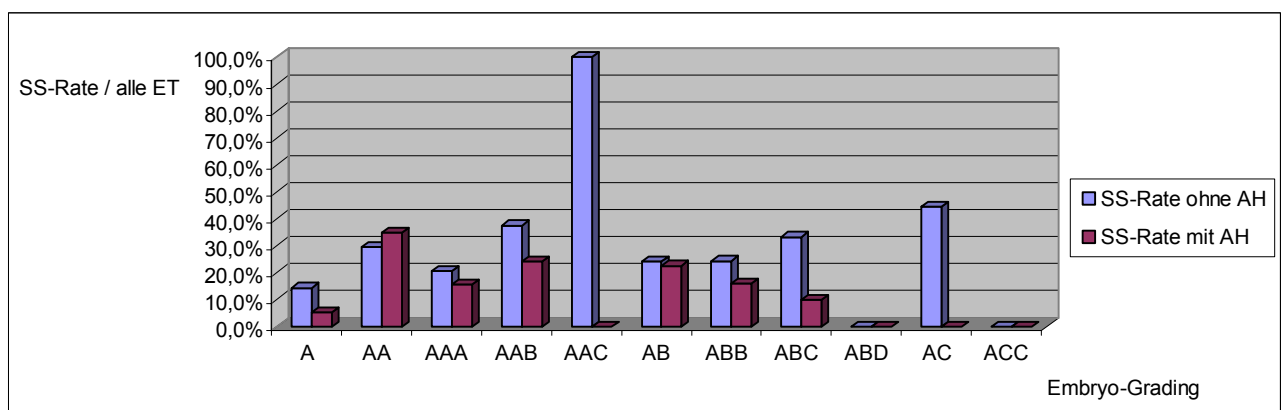


Abbildung 9a: SS-Rate in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im Zeitraum 2000-2003, unter Berücksichtigung von AH

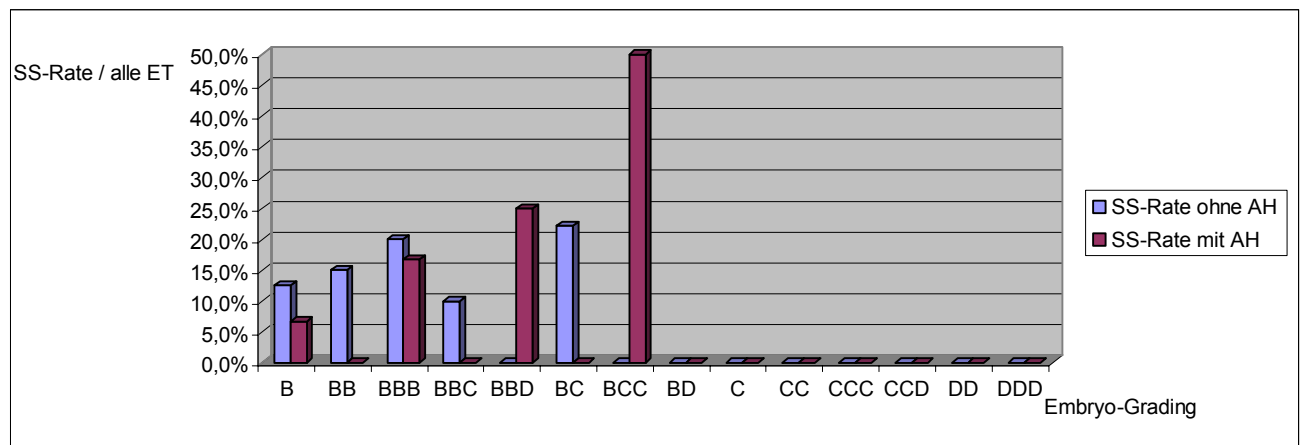


Abbildung 9b: SS-Rate in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im Zeitraum 2000-2003, unter Berücksichtigung von AH

4.7 Bestes Behandlungsergebnis pro Frau im Untersuchungszeitraum 2000-2003 in Bezug auf die Durchführung von Assisted hatching – kumulierte Schwangerschaftsrate

Im Folgenden möchten wir das so genannte „beste Ergebnis pro Frau“ im Untersuchungszeitraum darlegen. Dabei betrachteten wir insgesamt den Schwangerschaftserfolg für die einzelne Patientin im gesamten Untersuchungszeitraum unabhängig von der Anzahl der durchgeführten Embryotransfers.

Dazu selektierten wir die Patientinnen, die mindestens 1x schwanger geworden sind im Zeitraum Januar 2000 bis Dezember 2003. Es erfolgte die Einteilung nach Altersgruppen und Behandlung: ohne Assisted hatching (Gruppe A) oder stets mit Assisted hatching (Gruppe B). Die Anzahl der Versuche (ET's) pro Frau blieb unberücksichtigt.

Wenn keine Schwangerschaft im gesamten Untersuchungszeitraum mit und ohne Assisted hatching auftrat, wurde die Patientin gesondert gezählt (Gruppe C).

Weitere Erläuterungen zu den Auswahlprinzipien sind im Abschnitt Material und Methoden 3.1 zu finden.

4.7.1 Schwangerschaftsraten und Anzahl der Schwangerschaften im besten Ergebnis pro Frau in Abhängigkeit vom Alter der Patientin und Durchführung von AH

Tabelle 8a zeigt die Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Alter der Patientin und Durchführung von konsequentem Assisted hatching (bei jedem Transfer) oder nicht hatching, wenn die Patientin mindestens einmal schwanger geworden ist.

Tabelle 8a: Darstellung der Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Alter der Patientin sowie in Abhängigkeit von der Durchführung des Assisted hatching im besten Ergebnis pro Frau ohne Gruppe C; (p*: Chi-Quadrat-Test / p**: exakter Fisher-Test)

	Gruppen	Alter			Bestes Ergebnis/Frau ohne Gruppe C SS-Rate (%)	p-Wert p* / p**
SS-Rate	I	Gruppe A Gruppe B Gruppe C	≤ 30	ohne AH mit AH	44,6 (58/130) 45,0 (9/ 20) (0/22)	n.s. p=1,0 / p=1,0
	II	Gruppe A Gruppe B Gruppe C	31-35	ohne AH mit AH	46,0 (46/100) 53,8 (21/ 39) (0/ 39)	n.s. p=0,52 / p=0,45
	III	Gruppe A Gruppe B Gruppe C	36-40	ohne AH mit AH	29,2 (7/ 24) 31,2 (15/ 48) (0/ 14)	n.s. p=1,0 / p=1,0
	IV	Gruppe A Gruppe B Gruppe C	> 40	ohne AH mit AH	NaN (0/ 0) 40 (4/ 10) (0/ 2)	n.s. NaN / p=1,0

In Tabelle 8b wird die SS-Rate unter Berücksichtigung der Gruppe C, d.h. der Frauen, die weder mit hatching noch ohne hatching eine Schwangerschaft erzielen konnten,

Tabelle 8b: Darstellung der Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Alter der Patientin, von der Durchführung des Assisted hatching sowie unter Berücksichtigung der erfolglosen Versuche Gruppe C im besten Ergebnis pro Frau; (p*: Chi-Quadrat-Test p**: exakter Fisher-Test)

	Gruppen	Alter			SS-Rate (%) mit Berücksichtigung erfolgloser Versuche Gruppe C	p-Wert p* / p**
		Gruppe A+C Gruppe B+C				
SS-Rate	I	Gruppe A+C Gruppe B+C	≤ 30	ohne AH	38,2	n.s. p=0,07 / p=0,05
				mit AH	21,4	
	II	Gruppe A+C Gruppe B+C	31-35	ohne AH	33,1	n.s. p=0,43 / p=0,36
				mit AH	26,9	
	III	Gruppe A+C Gruppe B+C	36-40	ohne AH	18,4	n.s. p=0,67 / p=0,62
				mit AH	24,2	
	IV	Gruppe A+C Gruppe B+C	> 40	ohne AH	0,0	n.s. p=0,90 / p=1,0
				mit AH	33,3	

Abbildung 10 zeigt die Anzahl der Schwangerschaften im besten Behandlungsergebnis pro Frau bei konsequentem hatching oder nicht hatching (ohne Gruppe C).

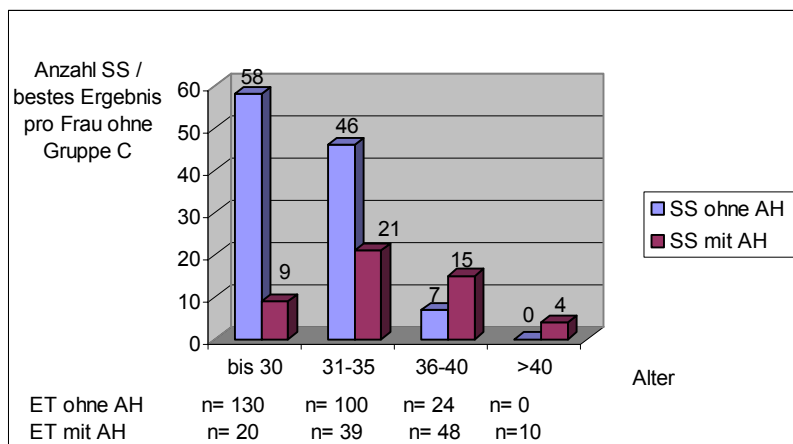


Abbildung 10: Anzahl der Schwangerschaften mit oder ohne AH im besten Ergebnis pro Frau in Abhängigkeit vom Alter der Patientin im Zeitraum 2000-2003 (ohne Gruppe C)

In Abbildung 11 wird die Schwangerschaftsrate unter Berücksichtigung der erfolglosen Versuche (Gruppe C) dargestellt. Das heißt, in die Berechnung fallen sowohl die eingetretenen Schwangerschaften im besten Versuch pro Frau hinein als auch die Patientinnen, die weder mit Assisted hatching noch ohne Assisted hatching eine Schwangerschaft erzielen konnten.

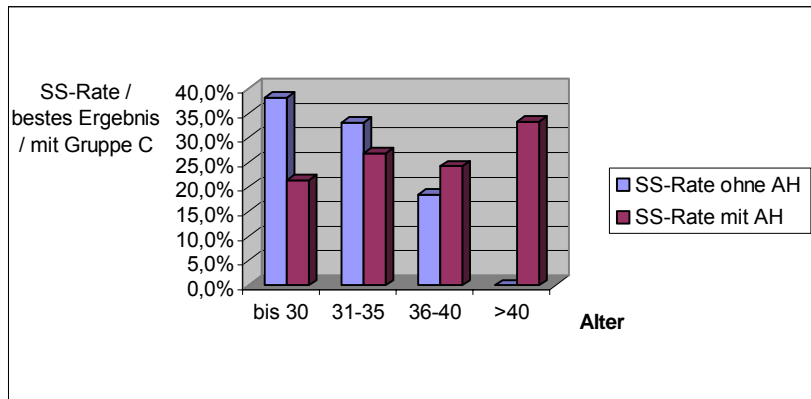


Abbildung 11: Darstellung der altersabhängigen Schwangerschaftsraten im besten Ergebnis pro Frau unter Berücksichtigung der erfolglosen Transfers (Gruppe C) im Zeitraum 2000-2003

Abbildung 12 fasst die Anzahl der Zyklen und die Zahl der Schwangerschaften unter Berücksichtigung der Gruppe C im besten Ergebnis pro Frau zusammen.

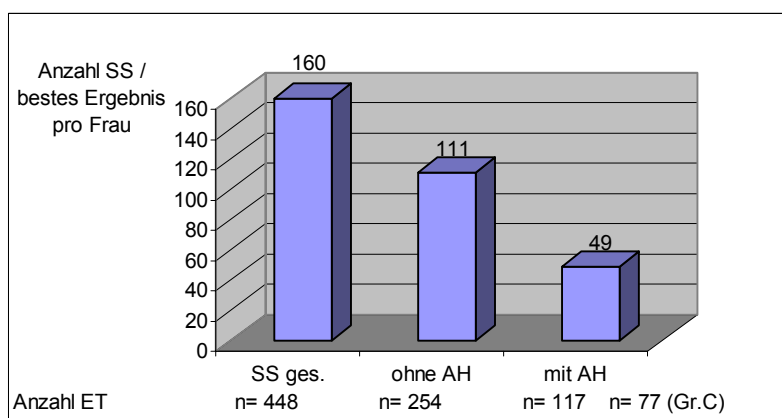


Abbildung 12: Anzahl der Schwangerschaften, Anzahl der Transferzyklen im besten Ergebnis pro Frau

4.7.2 Schwangerschaftsrate in Bezug auf Behandlungsmethode vor dem Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching im besten Ergebnis pro Frau

Tabelle 9 führt die nach ICSI- bzw. nach IVF-Behandlung erzielten Schwangerschaften in Abhängigkeit von Alter der Patientin und Durchführung des Assisted hatching im besten Ergebnis pro Frau auf.

Tabelle 9: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode vor Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching im besten Ergebnis pro Frau

	Gruppen	Alter		ICSI SS-Anzahl	IVF SS-Anzahl
SS-Anzahl	I	≤ 30	ohne AH mit AH Gruppe C	26 7 0/13	32 2 0/9
	II	31-35	ohne AH mit AH Gruppe C	24 12 0/24	22 9 0/15
	III	36-40	ohne AH mit AH Gruppe C	1 10 0/5	6 5 0/9
	IV	> 40	ohne AH mit AH Gruppe C	0 3 0/0	0 1 0/2

Die Schwangerschaftsraten unterschieden sich nicht signifikant in den einzelnen Altersklassen mit und ohne Hatching nach ICSI- bzw. IVF-Behandlung. In Tabelle 10 sind die entsprechenden p-Werte und Schwangerschaftsraten aufgelistet.

Tabelle 10: SS-Rate und p-Werte in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode vor Embryotransfer, Alter der Patientin und Durchführung von Assisted hatching im besten Ergebnis pro Frau mit Gruppe C (p*: Chi-Quadrat-Test mit Yate's Stetigkeits Korrektur / p**: exakter Fisher-Test)

	Gruppen	Alter		ICSI SS-Rate p* / p**	IVF SS-Rate p* / p**
SS-Rate	I	≤ 30	ohne AH	35,6 %	40,5 %
			mit AH	23,3 %	16,7 %
				p=0,33 / p=0,25 (n.s.)	p=0,20 / p=0,20 (n.s.)
	II	31-35	ohne AH	32,0 %	34,4 %
mit AH			25,5 %	29,0 %	
			p=0,58 / p=0,54 (n.s.)	p=0,77 / p=0,65 (n.s.)	
III	36-40	ohne AH	10,0 %	21,4 %	
		mit AH	29,4 %	17,9 %	
			p=0,41 / p=0,41 (n.s.)	p=1,00 / p=1,00 (n.s.)	
IV	> 40	ohne AH	0,0 %	0,0 %	
		mit AH	50,0 %	16,7 %	
			p=NaN / p=1	p=1 / p=1 (n.s.)	

In Abbildung 13 und 14 kommen die Schwangerschaftsraten nach ICSI bzw. nach IVF im Säulendiagramm zu Darstellung.

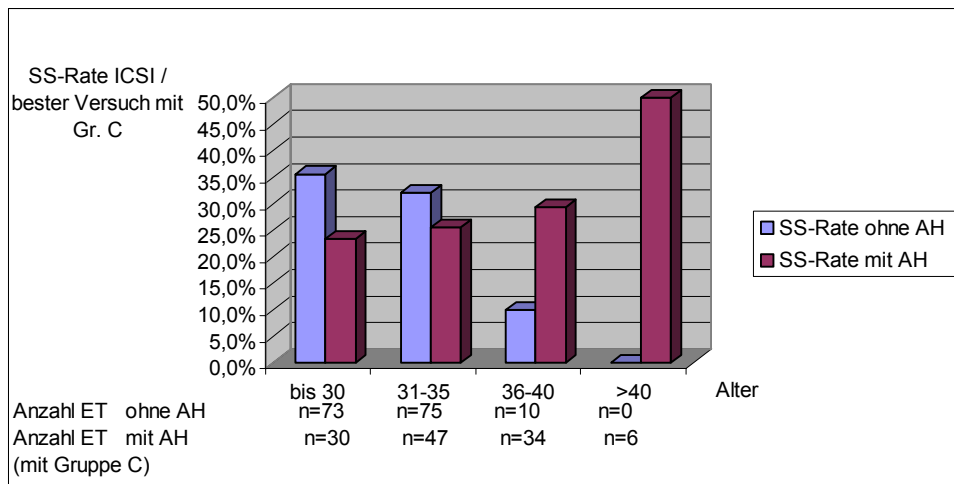


Abbildung 13: Schwangerschaftsrate nach ICSI in Abhängigkeit von Alter der Patientin und Durchführung von AH im besten Ergebnis pro Frau mit Gruppe C

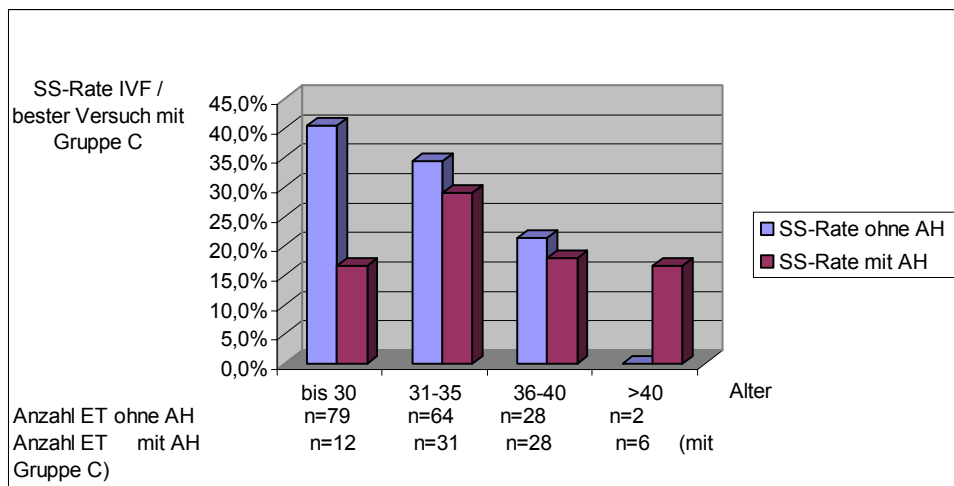


Abbildung 14: Schwangerschaftsrate nach IVF in Abhängigkeit von Alter der Patientin und Durchführung von AH im besten Ergebnis pro Frau mit Gruppe C

4.7.3 Anzahl der Schwangerschaften und Schwangerschaftsrate in Bezug auf Anzahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau ohne Unterscheidung nach AH

In Tabelle 11 kommt die Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im besten Versuch pro Frau ohne Unterscheidung nach Assisted hatching zur Darstellung.

Tabelle 11: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Zahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau (ohne Berücksichtigung von AH)

transf. Embryonen/bester Versuch	1	2	3
Schwangerschaft			
nein	48	155	85
ja	9	73	78

Die Abbildung 15 zeigt die Schwangerschaftsrate bezüglich der Anzahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau unabhängig von der Durchführung von Assisted hatching.

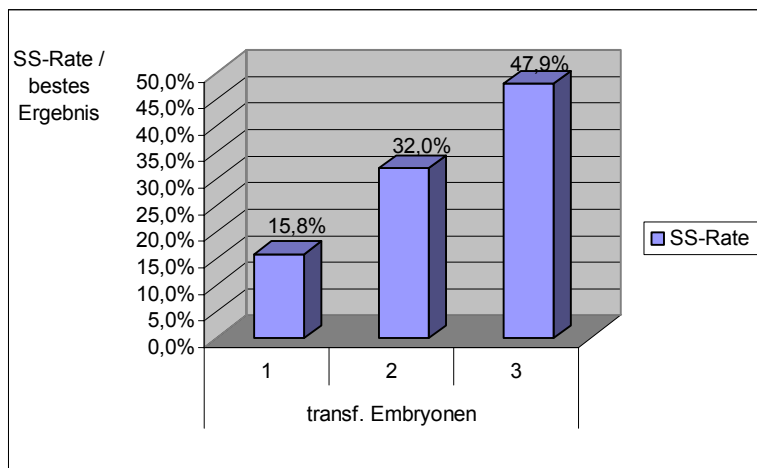


Abbildung 15: SS-Rate in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau (ohne Berücksichtigung von AH)

4.7.3.1 Differenzierung des besten Ergebnisses pro Frau in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen und der Durchführung von AH

Im Folgenden differenzierten wir das beste Ergebnis pro Frau nach Zyklen ohne Assisted hatching bzw. mit Assisted hatching. Gruppe C betrifft wiederum die Frauen, die weder mit Assisted hatching noch ohne hatching eine Schwangerschaft erzielen konnten.

Tabelle 12 zeigt die Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau ohne Assisted hatching.

Tabelle 12: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Zahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau ohne AH

bestes Ergebnis	ohne AH			
	transf. Embryonen	1	2	3
Schwangerschaft				
nein		22	87	34
ja		7	59	45

Tabelle 13 demonstriert die Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Zahl der transferierten Embryonen im besten Ergebnis pro Patientin mit Assisted hatching.

Tabelle 13: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Zahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau mit AH

bestes Ergebnis	mit AH		
	1	2	3
transf. Embryonen			
Schwangerschaft			
nein	16	26	26
ja	2	14	33

Tabelle 14 führt die Zahl der transferierten Embryonen in Gruppe C ohne Schwangerschaftserfolg auf.

Tabelle 14: Anzahl transferierter Embryonen ohne SS-Erfolg ohne/mit AH

Gruppe C	ohne / mit AH		
	1	2	3
transf. Embryonen			
Schwangerschaft			
nein	10	42	25

Abbildung 16 stellt die Schwangerschaftsrate entsprechend der transferierten Embryonen ohne Durchführung von Assisted hatching bzw. mit konsequentem Assisted hatching im besten Ergebnis pro Frau dar.

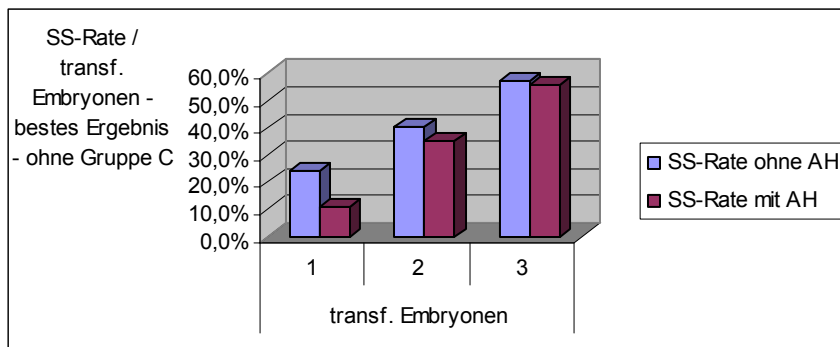


Abbildung 16: SS-Rate in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau unter Berücksichtigung von AH (ohne Gruppe C)

In Abbildung 17 wird die Schwangerschaftsrate unter Berücksichtigung der Gruppe C gezeigt.

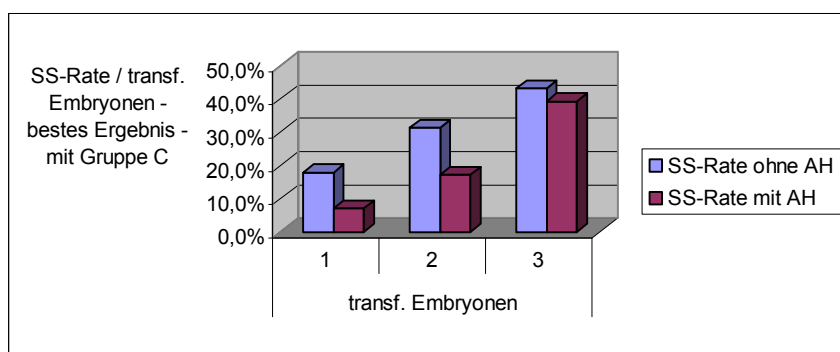


Abbildung 17: SS-Rate in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen im besten Ergebnis pro Frau unter Berücksichtigung der erfolglosen Transfers (Gruppe C) und AH

4.7.4 Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im besten Ergebnis pro Frau ohne Unterscheidung nach AH

Abbildung 18 stellt die Schwangerschaftsraten im besten Ergebnis pro Frau in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im Säulendiagramm ohne Berücksichtigung von Assisted hatching dar.

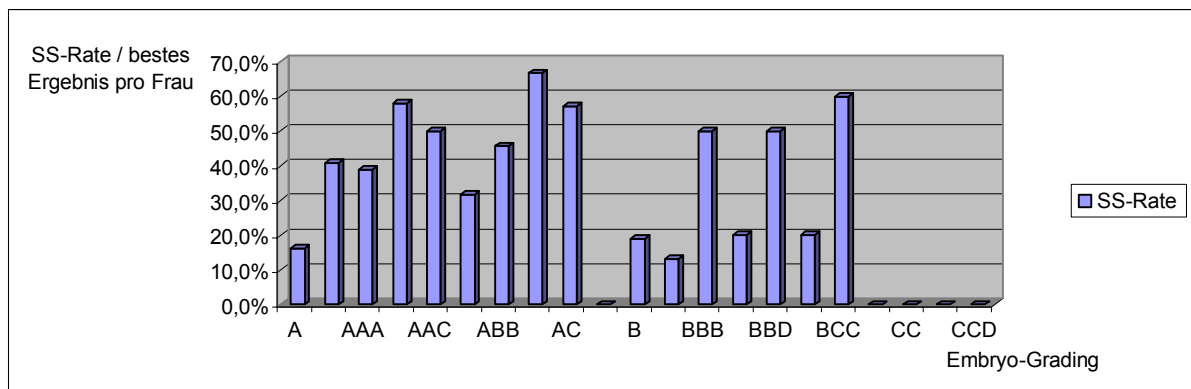


Abbildung 18: Darstellung der SS-Rate pro Frau in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im besten Ergebnis pro Frau ohne Berücksichtigung von AH

4.7.4.1 Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im besten Ergebnis pro Frau unter Berücksichtigung von AH

Abbildung 19 verdeutlicht die SS-Raten ohne bzw. mit konsequentem Assisted hatching in Abhängigkeit vom Embryo-Grading ohne Berücksichtigung der Gruppe C.

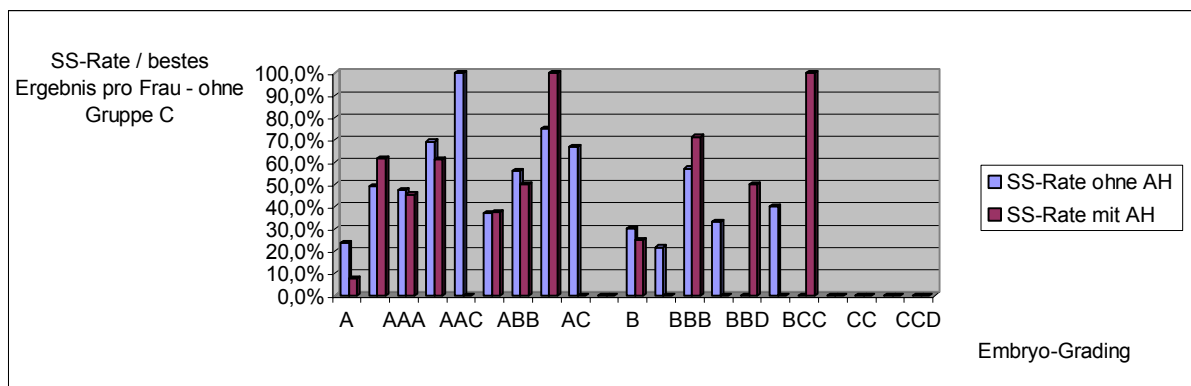


Abbildung 19: Darstellung der SS-Rate pro Frau in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im besten Versuch unter Berücksichtigung der Durchführung von AH (ohne Gruppe C)

Unter Berücksichtigung der erfolglosen Embryonentransfers mit als auch ohne Assisted hatching aus Gruppe C ergeben sich die Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit vom Embryo-Grading (Tabelle 15).

Tabelle 15: SS-Anzahl im besten Versuch pro Frau in Abhängigkeit von Embryo-Grading und AH unter Einbeziehung der Gruppe C.

bestes Ergebnis	Anzahl SS (mit Gruppe C)	
	ohne AH	mit AH
Embryo-Grading		
A	4/18	1/14
AA	28/75	8/31
AAA	9/25	5/17
AAB	18/32	11/24
AAC	1/1	0/1
AB	20/66	6/28
ABB	9/21	7/19
ABC	3/5	1/2
AC	4/7	0/1
ACC	0/1	0/1
B	3/17	1/11
BB	5/30	0/15
BBB	4/11	5/11
BBC	1/4	0/2
BBD	0/0	1/2
BC	2/8	0/5
BCC	0/2	3/4
C	0/4	0/3
CC	0/2	0/2
CCC	0/2	0/0
CCD	0/0	0/1

Abbildung 20 veranschaulicht die entsprechenden SS-Raten im besten Ergebnis pro Frau mit und ohne Assisted hatching unter Berücksichtigung des Embryo-Grading und Gruppe C.

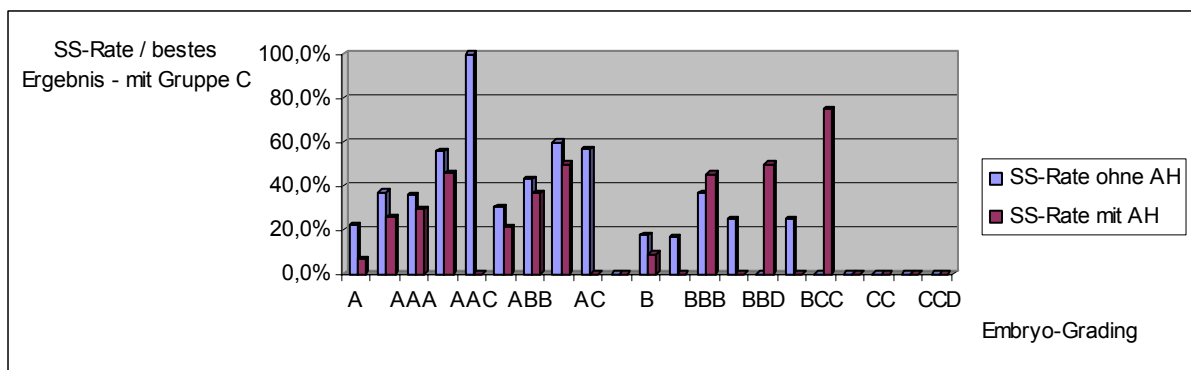


Abbildung 20: Darstellung der SS-Rate pro Frau in Abhängigkeit vom Embryo-Grading im besten Ergebnis unter Berücksichtigung der Durchführung von AH (mit Gruppe C)

4.8 Auswertung der eingetretenen Schwangerschaften in Beziehung zu durchgeführten Vorversuchen und AH

In unserem Patientengut traten Schwangerschaften nach bis zu maximal 9 Vorversuchen ein. Um die Beziehung zwischen Vorversuchen und eingetretenen Schwangerschaften auszuwerten, wurden auch die vor dem Jahre 2000 durchgeführten Zyklen pro Frau sowie die Embryotransfers nach Kryokonservierung und kombinierter IVF/ICSI-Behandlung berücksichtigt. In der Patientengruppe mit AH fand nicht bei jedem Vorversuch Assisted hatching statt. Insgesamt 192 Schwangerschaften waren zu verzeichnen - 58 mit Assisted hatching, 134 ohne hatching.

In Tabelle 16 werden die Schwangerschaften entsprechend der Vorversuche sowie des Alters der Patientin (Gruppe I-IV) aufgeführt ohne Berücksichtigung von AH.

Tabelle 16: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von den Vorversuchen und dem Patientenalter ohne Unterscheidung nach AH

alle ET /	Anzahl SS				
Vorversuche	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gesamt
0	44	26	8	1	79
1	14	18	8	0	40
2	3	10	3	0	16
3	7	13	2	2	24
4	5	6	2	0	13
5	0	5	2	3	10
6	3	3	1	0	7
7	1	0	0	0	1
8	1	0	0	0	1
9	1	0	0	0	1
Gesamt	79	81	26	6	192

Nach Differenzierung in Behandlung ohne bzw. mit Assisted hatching ergeben sich die nachfolgenden Tabellen 17 und 18.

Tabelle 17: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von Vorversuchen und Patientenalter ohne AH

ohne AH	Anzahl SS				
Vorversuche	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gesamt
0	43	24	3	0	70
1	12	16	3	0	31
2	3	5	1	0	9
3	5	8	0	0	13
4	2	1	0	0	3
5	0	3	0	0	3
6	1	1	0	0	2
7	1	0	0	0	1
8	1	0	0	0	1
9	1	0	0	0	1
Gesamt	69	58	7	0	134

Tabelle 18: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit von Vorversuchen und Patientenalter mit AH

mit AH	Anzahl SS				
Vorversuche	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gesamt
0	1	2	5	1	9
1	2	2	5	0	9
2	0	5	2	0	7
3	2	5	2	2	11
4	3	5	2	0	10
5	0	2	2	3	7
6	2	2	1	0	5
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
Gesamt	10	23	19	6	58

In Abbildung 21 und 22 kommen die Schwangerschaftsraten ohne bzw. mit Assisted hatching unter Berücksichtigung der Altersgruppen und der entsprechenden Vorversuche zur Darstellung.

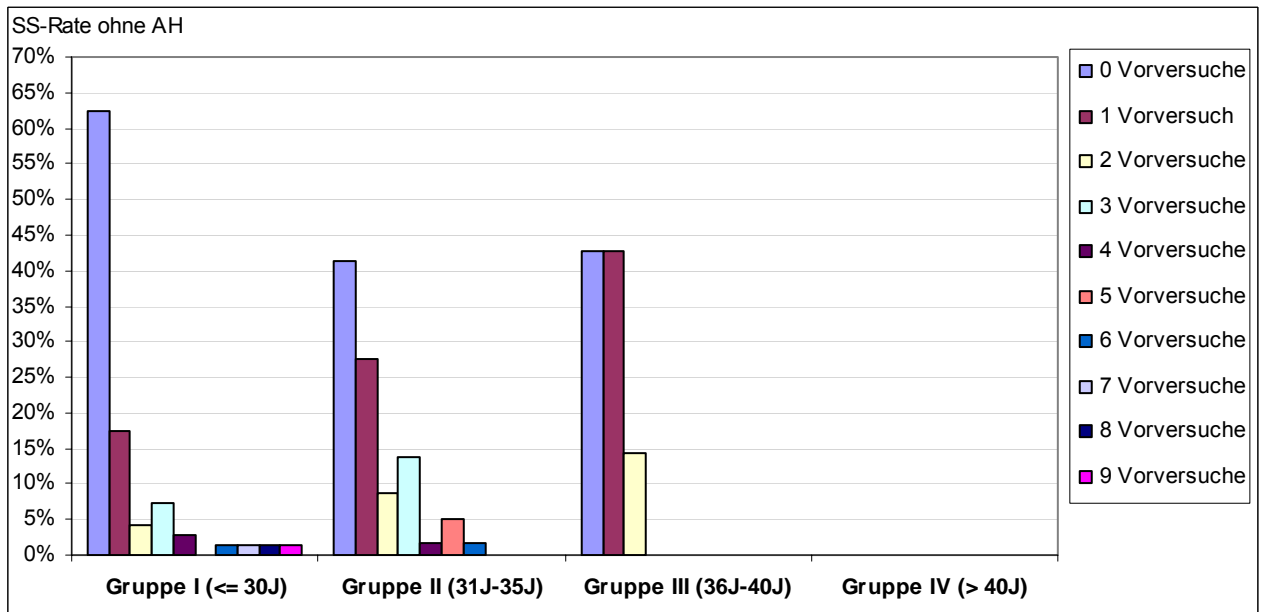


Abbildung 21: Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von Alter und Vorversuchen ohne AH

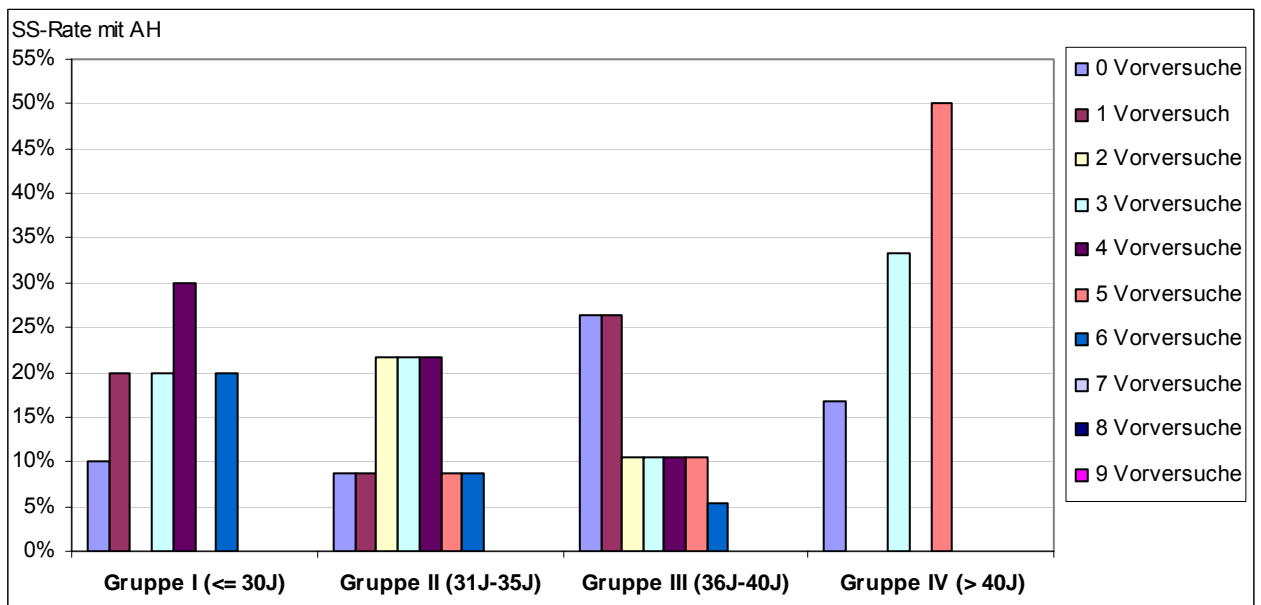


Abbildung 22: Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von Alter und Vorversuchen mit AH

Die Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der Vorversuche unter Berücksichtigung von Assisted hatching ohne Altersverteilung zeigt Abbildung 23.

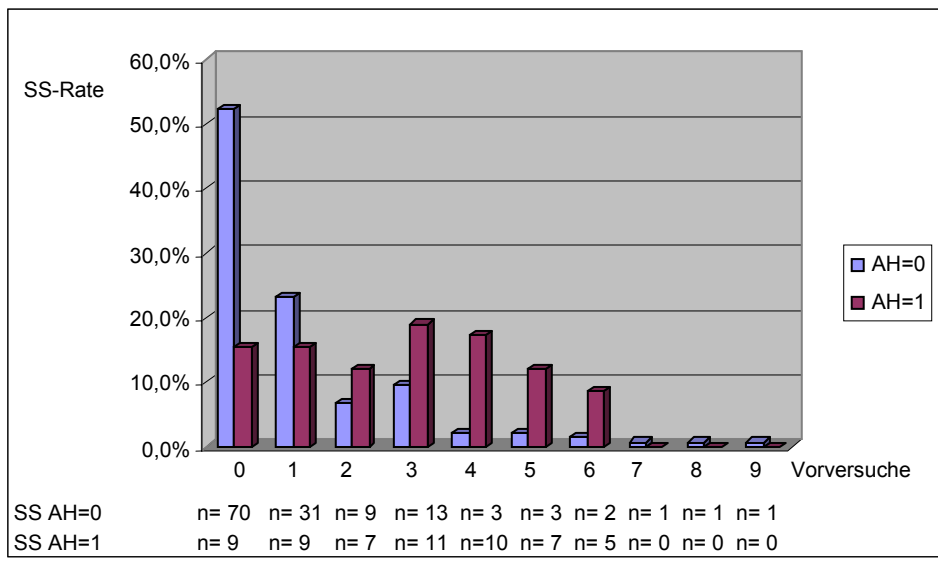


Abbildung 23: Darstellung der Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der Vorversuche und Durchführung von AH ohne Bezug zum Alter der Patientin

Zusätzlich schlüsselten wir auf, nach welchem Hatchingversuch die Schwangerschaft eintrat (Tabelle 19). Dabei sind Anzahl der Vorversuche und AH –Versuche nicht generell identisch.

Tabelle 19: Darstellung der Anzahl der Schwangerschaften entsprechend der Vorversuche in Abhängigkeit vom 1.-5. Hatching –Versuch

	Anzahl SS/ Vorversuche						
Vorversuche	0	1	2	3	4	5	6
1. AH-Versuch	11	5	6	4	5	2	1
2. AH-Versuch	0	4	2	4	1	0	0
3. AH-Versuch	0	0	0	1	3	2	1
4. AH-Versuch	0	0	0	1	1	1	2
5. AH-Versuch	0	0	0	0	1	0	0

Abbildung 24 fasst die Daten aus Tabelle 19 im Säulendiagramm zusammen. In Abbildung 25 werden die entsprechenden Schwangerschaftsraten aufgezeigt.

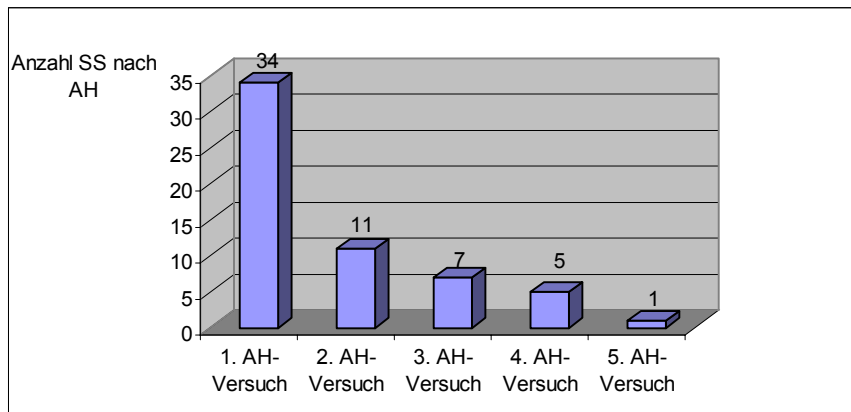


Abbildung 24: Anzahl der Schwangerschaften in Abhängigkeit vom Hatching –Versuch

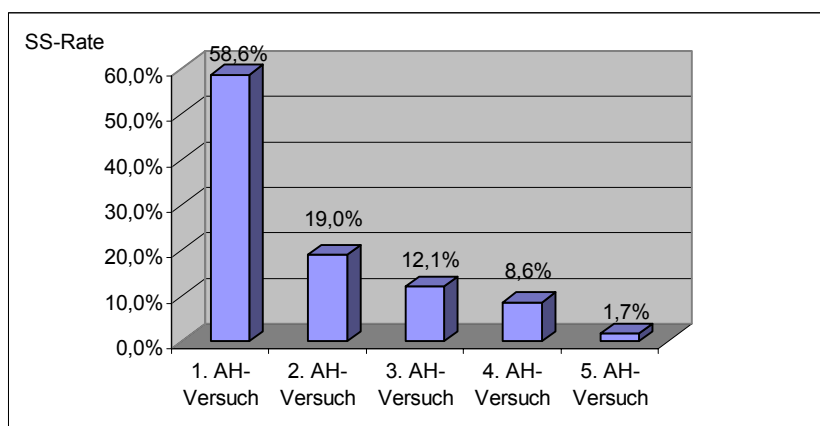


Abbildung 25: Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Hatching - Versuch

5. Diskussion

Damit sich der präimplantative Embryo in die Gebärmutterschleimhaut einnisten kann, muss er seine schützende Hülle, die Zona pellucida (ZP), verlassen. Um dies zu erreichen, expandiert die Blastozyste und zerreißt die zuvor unter enzymatischem Einfluss dünner gewordene ZP – ein Prozess, der im medizinischen Sprachgebrauch mit dem englischen Wort „hatching“ umschrieben wird.

Ist die ZP zu dick oder ist sie härter als normal, kann die Blastozyste die Zona pellucida nicht zerreißen. Der Embryo bleibt in seiner schützenden Hülle gefangen, die Implantation bleibt aus. Um dieses Phänomen im Rahmen der Kinderwunschbehandlung zu vermeiden, wurden verschiedene Techniken des Assisted hatching, d.h. des „unterstützten Schlüpfens“, entwickelt.

Im Rahmen der hier dargestellten Untersuchung wird in vergleichender Weise auf die verschiedenen Techniken des Assisted hatching (AH) eingegangen und sie werden in Bezug auf die von uns verwendete Technik des AH durch Behandlung der ZP mit dem Infrarotlaser gewertet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass viele Faktoren Einfluss auf die Schwangerschaftsrate im Rahmen der Kinderwunschbehandlung haben. Zu diesen Faktoren gehören das Alter der Patientin, das Embryo-Grading, die Zahl der gewonnenen Eizellen, die Eizellqualität, die Blastomerenzahl, die hormonelle Vorbehandlung, die Behandlungsmethode sowie die Anzahl der übertragenen Embryonen. Im Rahmen der hier dargestellten Untersuchung standen das Assisted hatching und sein Einfluss auf die Schwangerschaftsrate im Mittelpunkt.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Einfluss des Assisted hatching mittels Infrarotlaser im Rahmen der Kinderwunschbehandlung im Kinderwunschzentrum Neubrandenburg am Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg.

In unserem Patientenkollektiv wurden Frauen im Alter von 21 Jahren bis zu 44 Jahren behandelt. Die Anzahl der Embryotransfers (ET's) pro Frau lag zwischen 1 und 7 Transfers.

Das Assisted hatching wurde bei Patienten durchgeführt, bei denen aufgrund einer Reihe frustrierender IVF- u./o. ICSI- Behandlungen das AH indiziert war bzw. bei

Patienten, deren ZP-Dicke $> 20\mu\text{m}$ betrug. Weitere Indikationen waren ein Patientinnenalter ≥ 36 Jahre sowie der Zustand nach Kryokonservierung. Das AH wurde aber auch bei Patienten durchgeführt, die ohne besondere Indikation diese zusätzliche Behandlung wünschten, um alle Möglichkeiten der Kinderwunschbehandlung zu nutzen und die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft zu erhöhen.

Es handelt sich um eine retrospektive Auswertung aller im Zeitraum 01.01.2000 - 31.12.2003 durchgeführten IVF- und ICSI-Behandlungen bei insgesamt 461 Patientinnen. Assisted hatching mit dem Infrarotlaser wurde in 326 Zyklen angewendet, 500 Zyklen fanden ohne Hatching statt.

-Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Durchführung des Assisted hatching

In unserem Untersuchungskollektiv waren im gesamten Untersuchungszeitraum 2000-2003 ohne Assisted hatching 118 Schwangerschaften zu verzeichnen, mit Assisted hatching traten insgesamt 54 Schwangerschaften ein. Dies entspricht Schwangerschaftsraten von 23,6 % ohne AH bzw. 16,6 % mit AH ohne Berücksichtigung der Art der Behandlung sowie ohne Unterscheidung nach Alter der Patientinnen.

Im Vergleich der Gesamtgruppen zeigte sich also offenbar bei Anwendung des AH kein Vorteil der Methode bei Erreichung von Schwangerschaften. Die pauschale Betrachtung führt jedoch wegen der Inhomogenität der zu vergleichenden Gruppen zu keiner praktisch verwertbaren Aussage. So ist der Altersdurchschnitt in der Hatchinggruppe deutlich höher als bei den Patienten ohne hatching (35,2 J. \pm 4,51 vs. 30,9 J. \pm 3,98). Da das Alter eine große Rolle bei der Chance auf Erreichen einer Schwangerschaft spielt, könnte diese Korrelation schon eine Ursache für das schlechtere Abschneiden der Hatchinggruppe sein (Montag et al., 2001; Pantos et al., 1999).

In der Literatur finden sich Schwangerschaftsraten ohne Assisted hatching zwischen 13 % und 42 % an unselektierten Patienten nach IVF bzw. ICSI (al Nuaim et al., 2002). Im D.I.R. 2003 sind Schwangerschaftsraten nach IVF von 28,56 %, nach ICSI von 27,64 % dokumentiert (D.I.R. 2003).

Die Schwangerschaftsrate nach Assisted hatching mit dem Laser liegt zwischen 30,2 % und 39,6 % (Antinori et al., 1996; al Nuaim et al., 2002), nach Assisted hatching mittels

PZD zwischen 42,1 % und 47 % (Cohen et al., 1990; Hellebaut et al., 1996). Nach Applikation von saurer Tyrode-Lösung sind Schwangerschaftsraten von 23 % bis 54 % erreicht worden (Cohen et al., 1992; Hu et al., 1996; Hurst et al., 1998).

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Angaben aus der Literatur zur Schwangerschaftsrate mit und ohne Assisted hatching ist allerdings kaum möglich. Die Anzahl der Patientinnen in oben genannten Studien ist sehr unterschiedlich, die Methoden des Assisted hatching variieren. Auch werden verschiedene Klassifikationsschemata für die Patientinnen eingesetzt (vorangegangene frustrane IVF-Versuche, Patientenalter, Dicke der Zona pellucida, Embryotransfer nach Kryokonservierung etc.).

In unsere Auswertung fließen Patienten mit unterschiedlicher Anzahl von Versuchen bei der Betrachtung aller ET's ein. Die Zahl der übertragenen Embryonen und ihre Qualität differieren. Die Zona pellucida-Dicke variiert zwischen 10 und 40 µm. Die Anzahl der Blastomeren am Tag 2 oder 3 nach Follikelpunktion schwankt zwischen 2 und 12 pro Embryo, was ein Hinweiszeichen für die Entwicklungsfähigkeit des Embryos ist (Magli et al., 1998). Das Patientenkollektiv ist damit auch in unserer Arbeit relativ inhomogen.

Um eine gewisse Unabhängigkeit der „Versuche“ (d.h. Embryonentransfers der Patientin) im statistischen Sinne zu erreichen, wurde pro Frau der so genannte beste Versuch (siehe bestes Ergebnis pro Frau, Abschnitt 4. - Ergebnisse) in die Auswertung genommen. Nähere Erläuterungen zu den Auswahlkriterien sind in Abschnitt 3. - Material und Methoden - zu finden.

Es wurden zunächst alle Patientinnen in die Auswertung einbezogen, die im Untersuchungszeitraum 2000-2003 mindestens einmal schwanger geworden waren (bestes Ergebnis / Frau).

Es erfolgte eine Unterteilung der Patientinnen in drei Gruppen:

Gruppe A: AH wurde nie durchgeführt.

Gruppe B: AH wurde vor jedem ET durchgeführt.

Gruppe C: Patientin hatte ET's mit und ohne AH ohne Eintritt einer Schwangerschaft.

Diese Gruppen wurden zusätzlich nach dem Alter der Patienten unterschieden (Gruppe I-IV).

Die Anzahl der Versuche pro Frau blieb unberücksichtigt.

Unsere Ergebnisse werden im Folgenden unter Berücksichtigung dieser „kumulativen“ Schwangerschaftsrate diskutiert:

-Schwangerschaftsrate und Patientenalter

In der Altersgruppe I (≤ 30 Jahre) wurden ohne Assisted hatching 58 von 130 Patientinnen schwanger. Das entspricht einer Schwangerschaftsrate von 44,6 %. In der gleichen Altersgruppe wurden 9 von 20 Patientinnen mit konsequentem Assisted hatching (vor jedem Transfer) schwanger. Die SS-Rate beträgt demzufolge 45,0 %. Zählt man die 22 Frauen hinzu, die sowohl mit als auch ohne Assisted hatching keine Schwangerschaft erzielten (Gruppe C), so liegt die SS-Rate bei 38,2 % für die Gruppe ohne Assisted hatching, für die Gruppe mit Assisted hatching bei nur 21,4 %. Die Schwangerschaftsraten unterscheiden sich nicht signifikant zwischen konsequentem Hatching und gar keinem Hatching, bei Hinzurechnen der Gruppe C mit nicht konsequentem Hatching ist die Schwangerschaftsrate tendenziell niedriger (16,8 %) aber auch ohne Signifikanz.

Scheinbar bringt Assisted hatching in der Gruppe der jüngeren Patientinnen keinen Vorteil.

Die Altersgruppe II (31-35 Jahre) zeigt ein ähnliches Ergebnis. In der Gruppe ohne hatching lag die SS-Rate bei 46,0 %. 46 Patientinnen von 100 Patientinnen wurden schwanger. Die SS-Rate mit konsequentem hatching betrug 53,8 %. 21 von 39 Patientinnen erzielten in Gruppe B eine Schwangerschaft. 7,8 % mehr Frauen wurden mit konsequentem Hatching schwanger. Da die Anzahl der beteiligten Patientinnen (Gruppe A vs. Gruppe B) sehr differiert, stellen die Zahlen nur einen gewissen positiven Trend für das Hatching dar, ein signifikanter Vorteil ergibt sich nicht.

39 Frauen dieser Altersgruppe wurden nach Embryotransfers mit und ohne Assisted hatching nicht schwanger. Daraus resultieren SS-Raten von 33,1 % ohne AH vs. 26,9 % mit AH unter Berücksichtigung der Gruppe C. Der Unterschied von 6,2 % bezüglich der Schwangerschaftsraten unter Berücksichtigung der Gruppe C ist nicht signifikant.

Hurst et al. legten in einer Studie ähnliche Ergebnisse dar. Bei einer Gruppe von ≤ 30 -jährigen Patientinnen mit guter Prognose verzeichneten sie ohne Assisted hatching eine SS-Rate von 43 %, unter Durchführung von Assisted hatching mittels saurer Tyrode-Lösung nur eine SS-Rate von 23 % (Hurst et al., 1998). Rufas et al. untersuchten den

Einfluss von PZD auf die Schwangerschaftsrate. Bei Patientinnen < 34 Jahren kam es sogar zu einer signifikanten Senkung der SS-Rate nach hatching (15 %) im Vergleich zu ohne hatching (35 %) (Rufas-Sapir et al., 2004).

Die Ursache für das schlechtere Abschneiden der Gruppe mit Assisted hatching wurde mit einer eventuellen Schädigung des Embryos durch das Einwirken der sauren Tyrode-Lösung bzw. durch mechanische Schädigung nach PZD begründet. Eine mögliche Schädigung des Embryos in unserem Patientengut nach Laserapplikation wurde in unserer Auswertung nicht erfasst. Aus der Literatur ist aber die Laserbehandlung als relativ nebenwirkungsarm bekannt.

Laser Assisted hatching gilt als berührungsfreie Methode ohne thermische, mechanische und mutagene Nebenwirkungen, mit standardisierbaren Lochgrößen, schnell und einfach zu handhaben (Germond et al., 1995; Rink et al., 1996). Die Applikation des Laserstrahls wurde auch in der Arbeit von Hsieh et al. als effektiver im Vergleich zur chemischen Methode dargestellt (Hsieh et al., 2002).

Vermutlich liegt die Ursache für das schlechtere Abschneiden in der Hatching-Gruppe in der Struktur unseres Patientenkollektives. Patientinnen, die sich in jüngerem Alter zum Hatching entschlossen, zeigten durch mehrere frustrane Vorversuche per se schon eine schlechtere Chance auf Schwangerschaft.

Andere Arbeitsgruppen (Ali et al., 2003) stellten sehr gute SS-Raten mit 64,9 % nach Assisted hatching mit dem Laser bei ≤ 36 -jährigen Patientinnen im Vergleich zu 33,3 % SS-Rate ohne Laserhatching fest. Da im Ausland Embryoselektion durchgeführt wird, welche in Deutschland wegen des Embryonenschutzgesetzes verboten ist, ist ein Vergleich oben genannter Schwangerschaftsraten mit unseren Ergebnissen nicht möglich.

Die Daten der Arbeitsgruppe von Ali et al., 2003 sind außerdem nicht ohne weiteres mit unseren Schwangerschaftsraten vergleichbar, da in unserem Patientenpool keine Unterscheidung nach Embryo-Grading durchgeführt wurde, in der Gruppe von Ali et al., 2003 wurden nur Embryonen von sehr guter Qualität übertragen.

In der Altersgruppe III (36-40 Jahre) erreichten 7 von 24 Frauen eine Schwangerschaft ohne Assisted hatching, das entspricht einer SS-Rate von 29,2 %. In der Hatching-Gruppe wurden 15 von 48 Patientinnen schwanger (SS-Rate 31,2 %). 14 Frauen konnten in dieser Altersgruppe weder mit noch ohne Assisted hatching eine Schwangerschaft erzielen. Die Schwangerschaftsraten betragen dementsprechend in der

Gruppe ohne hatching 18,4 %, mit hatching 24,2 % unter Berücksichtigung der Gruppe C.

In der Altersgruppe der 36-40 jährigen zeigt sich eine Steigerung der SS-Rate um ca. 6 % bei Durchführung des Assisted hatching mit dem Diodenlaser, die gering erhöhte SS-Rate ist aber nicht signifikant.

In der Literatur gibt es viele Untersuchungen bezüglich der Verbesserung der SS-Rate bei älteren Patientinnen mittels Assisted hatching.

Magli et al. untersuchte den Einfluss von Assisted hatching mit saurer Tyrodelösung bei Patienten ≥ 38 Jahre. Die SS-Rate betrug 31 % in der Hatching-Gruppe, signifikant geringer fiel mit 10 % die SS-Rate in der Kontrollgruppe aus (Magli et al., 1998). Die Arbeitsgruppe Tucker et al. stellte bei Frauen ≥ 35 Jahre einen Vorteil von Assisted hatching mittels Tyrode-Lösung fest. Die SS-Raten lagen bei 35,5 % in der Hatching-Gruppe vs. 11,1 % in der Kontrollgruppe (Tucker et al., 1996). In der Untersuchung von Cohen et al. schien selektives Assisted hatching mittels Tyrode-Lösung bei Patienten > 38 Jahre und Patienten mit erhöhtem basalen FSH-Spiegel am effektivsten zu sein (Cohen et al., 1992).

Antinori et al. stellten in ihrer Studie drei Gruppen auf. Alle Patienten waren älter als 36 Jahre. In Gruppe A wurden Embryonen sowohl mit als auch ohne Laserhatching übertragen, Gruppe B erhielt nur mit Laser vorbehandelte Embryonen, Gruppe C war die Kontrollgruppe ohne hatching. Die SS-Raten lagen bei 36,4 %; 44,4 % vs. 19,3 %. Bei konsequenter Anwendung von Assisted hatching wurden die besten SS-Raten erreicht (Antinori et al., 1996).

Weitere Arbeiten belegen den positiven Einfluss von Assisted hatching bei älteren Patientinnen. Die PR (pregnancy rate) in der Arbeitsgruppe um Stein betrug bei > 38 -jährigen mit Assisted hatching 23,9 % vs. 7 % in der Kontrollgruppe. Wobei Stein bei jüngeren Patienten ≤ 38 Jahre umgekehrte Verhältnisse aufzuzeigen hatte – SS-Rate mit hatching 15,4 %; vs. 23 % in der Kontrollgruppe (Stein et al., 1995).

In unserer Patientengruppe IV (> 40 Jahre) sind 4 von 10 Frauen mit konsequentem Laserhatching schwanger geworden. 2 Patientinnen konnten mit und ohne hatching keine Schwangerschaft erzielen. Daraus folgt eine Schwangerschaftsrate bei > 40 -jährigen von 33,3 % in unserem Patientengut unter Berücksichtigung von Gruppe C. In dieser Altersgruppe konnten nur wenige Frauen erfasst werden, aber nach konsequentem Assisted hatching erreichten diese Patientinnen die gleiche SS-Rate wie

Patientinnen der Gruppe II (31-35 Jahre) ohne Assisted hatching. In diesen Fällen erlangten ältere Patientinnen mit Assisted hatching die gleiche SS-Rate wie jüngere ohne Assisted hatching.

In allen Gruppen I-IV gibt es Unterschiede in der Anamnese. In unserer Auswertung musste von Divergenzen in Eizellqualität, Zahl der gewonnenen Eizellen, Embryonenmorphologie, Blastomerenzahl, hormoneller Vorbehandlung, Art der Behandlungsmethode (IVF, ICSI) und Zahl der Vorbehandlungen ausgegangen werden, da es sich um eine retrospektive Auswertung handelt.

Unter der Voraussetzung, dass die oben genannten Divergenzen in allen Gruppen gleich sind, kann ein tendenzieller Anstieg der SS-Rate in den Gruppen III und IV - bei den älteren Patientinnen - nach Durchführung des Assisted hatching festgestellt werden, obwohl ein signifikanter Beweis wegen der geringen Zahl der älteren Patientinnen nicht möglich ist (Abbildung 11).

Primär haben jüngere Patienten eine bessere Chance auf Schwangerschaft. Pantos et al. untersuchten den Einfluss des Alters auf Blastozystenentwicklungsrate, Schwangerschaftsrate (PR), Implantationsrate (IR) und Abortrate. In der Gruppe > 40 Jahre waren Blastozystenentwicklungsrate, PR sowie IR deutlich schlechter als in der Gruppe mit Patientinnen < 40 Jahre (22,2 %; 21,1 %; 8,9 % vs. 40,5 %; 44,6 %; 19,9 %) (Pantos et al., 1999). Die Abortrate war bei den > 40-jährigen gestiegen (25 % vs. 13,3 %).

Daten aus dem D.I.R. (2003) zeigen ebenfalls die sinkende Schwangerschaftsrate mit Älterwerden der Patientin: 30,35 % - bis 34 Jahre; 25,15 % - bis 39 Jahre; 14,69 % - bis 44 Jahre; 3,87 % - bis 49 Jahre.

In einer Studie von Jansen betrug die Chance auf Lebendgeburt bei Frauen \leq 34 Jahre nach einer IVF-Behandlung im Durchschnitt 52,4 %. Ein linearer Abfall der Lebendgeburtenrate war zu verzeichnen. Mit \geq 45 Jahren wurde in dieser australischen Studie keine Schwangerschaft mehr erreicht (Jansen RP, 2003). In einer Übersicht von Templeton sind altersabhängige Geburtenraten pro Embryotransfer wie folgt erwähnt: < 29 Jahre – 23,7 %; 30-34 Jahre – 21,9 %; 35-39 Jahre - 17,6 %; 40-44 Jahre – 8,1 %; \geq 45 Jahre - 3,5 % (Templeton et al., 1996). Sicherlich können SS-Rate und Geburtenrate nicht direkt verglichen werden, aber es stellt zumindest einen Trend der abnehmenden Schwangerschaftschance mit zunehmendem Alter der Frau dar.

Es werden viele Ursachen für die verminderte Fertilität mit zunehmendem Alter in der Literatur genannt. Dazu gehören verminderte Eizellqualität und – quantität, verminderte uterine Rezeptivität, spontanes Zonahardening als Folge endokriner Veränderungen, schlechtere Embryonenqualität und eine erhöhte Rate an chromosomalen Aberrationen (al Nuaim et al., 2002; Yaron et al., 1994) .

In unserem Patientengut spiegelt sich in der abnehmenden SS-Rate zwischen Gruppe I ohne AH mit 38,2 % und Gruppe III ohne AH mit 18,4 % dieser Trend der verminderten Fertilität mit steigendem Alter der Frau wider. Wenn man diese Altersgruppen unter Berücksichtigung der Durchführung von Assisted hatching vergleicht, hat die ältere Patientengruppe in unserem Kollektiv tendenziell einen Nutzen durch das Laserhatching. Es wurden 24,2 % der 36- bis 40-jährigen schwanger, 21,4 % der ≤ 30 -jährigen Frauen erzielten eine Schwangerschaft. Bei den Frauen > 40 Jahre lag die SS-Rate mit Laserhatching sogar bei 33,3 % der behandelten Patientinnen, allerdings umfasste diese Gruppe nur 12 Frauen (Tabelle 8b).

Im oben diskutierten besten Ergebnis pro Frau wurde insgesamt der Schwangerschaftserfolg für die einzelne Patientin betrachtet unabhängig von der Anzahl der durchgeführten Embryotransfers.

In der Auswertung aller Embryotransfers im Zeitraum 2000-2003 zeigt sich ein ähnlicher Trend in den Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Durchführung des Assisted hatching sowie der Alterskategorie der Patientinnen. Aus statistischer Sicht ist die Unabhängigkeit der „Versuche“ voneinander nicht gewährleistet, da in der Regel zu einer Frau mehrere „Versuche“ gehören (d.h. mehrere ET`s pro Frau). Folgende SS-Raten konnten ohne AH bzw. mit AH verzeichnet werden: 28,7 % vs. 17,0 % (Gruppe I); 22,1 % vs. 15,6 % (Gruppe II); 12,1 % vs. 15,5 % (Gruppe III); 0 % vs. 27,3 % (Gruppe IV). Die Unterschiede der SS-Raten in den einzelnen Altersgruppen sind nicht signifikant. Tendenziell scheint die Gruppe der Patienten unter 36 Jahren keinen Vorteil durch Assisted hatching zu haben, bei Frauen über 36 Jahre erhöht hatching eventuell die Chance auf eine Schwangerschaft.

Andere Autoren fanden keinen Vorteil des Assisted hatching bei Frauen in höheren Altersgruppen (Lanzendorf et al., 1998).

In der Arbeit von Edirisinghe zeigt sich kein signifikanter Vorteil für Patientinnen ≥ 38 Jahre nach mechanischem Assisted hatching (Edirisinghe et al., 1999). An unselektierten Patienten konnten Tucker und Hellebaut ebenfalls keine signifikante

Überlegenheit der Methode Assisted hatching feststellen (Tucker et al., 1996; Hellebaut et al., 1996). Die Gruppe um Horng demonstrierte mit ihrer Studie zum Laserhatching auch keinen Benefit bezüglich der Schwangerschaftsrate bei Frauen in fortgeschrittenem Alter (> 37 Jahre) – mit AH 17,5 % vs. 16,3 % ohne AH (Horng et al., 2002).

- Schwangerschaftsrate und Art der Behandlung

Im Zeitraum 01.01. 2000 bis 31.12. 2003 wurden 400 Zyklen mit IVF- und 426 Zyklen mit ICSI-Behandlung durchgeführt, wobei eine Patientin mehrere Zyklen in dieser Zeit durchlaufen haben kann.

Bei der Betrachtung des besten Ergebnisses pro Frau beziehen wir uns auf den Embryotransfer mit mindestens 1x positivem Schwangerschaftsausgang, wobei eine Unterteilung nach Durchführung von Assisted hatching erfolgt. Gruppe A: Behandlung ohne hatching, Gruppe B: Behandlung stets mit hatching sowie Gruppe C: mit als auch ohne AH kein Schwangerschaftserfolg. In Gruppe A ohne AH traten 111 Schwangerschaften bei 254 Patienten auf, Gruppe B mit konsequentem hatching erzielte 49 Schwangerschaften von 117 Frauen. In 77 Fällen fand zum Teil Assisted hatching statt ohne Schwangerschaftserfolg.

Nach Differenzierung in ICSI- bzw. IVF-Behandlung waren nach ICSI 83 Schwangerschaften (51 SS ohne AH; 32 SS mit AH), nach IVF 77 Schwangerschaften (60 SS ohne AH; 17 mit AH) zu verzeichnen. Insgesamt wurden 160 von 448 Frauen mindestens 1x schwanger.

In allen Altersgruppen mit ICSI-Behandlung unterscheiden sich die Schwangerschaftsraten zwischen Hatching-Gruppe und Gruppe ohne AH nicht signifikant. Bei den jüngeren Patienten (≤ 35 J.) scheint AH tendenziell keinen positiven Effekt zu haben. In der Altersgruppe 36-40 Jahre schneidet die Hatching-Gruppe mit einer SS-Rate von 29,4 % versus 10,0 % ohne AH tendenziell besser ab, wobei man in der Betrachtung unterschiedliche Patientenzahlen (10 ohne AH; 34 mit AH) berücksichtigen muss. Im Alter > 40 Jahre traten 3 Schwangerschaften von 6 Patienten ausschließlich nach hatching ein. Patienten ohne AH fehlen in dieser Altersgruppe (Abbildung 13).

In der Arbeitsgruppe um Tucker zeigte sich ein marginaler positiver Effekt von AH mit Tyrode-Lösung bei Frauen ≥ 35 Jahre und ICSI-Behandlung (Tucker et al., 1996). In einer Studie mit unselektierten Patienten fand sich keine Verbesserung der PR und IR mittels partieller Zonadisektion nach IVF oder ICSI (Hellebaut et al., 1996).

In unserem Patientengut sind nach IVF-Behandlung bezüglich der Schwangerschaftsraten im besten Ergebnis pro Frau in den Altersgruppen I-IV keine signifikanten Unterschiede mit bzw. ohne Assisted hatching. Hier zeigt sich auch kein tendenzieller positiver Einfluss von AH in der Gruppe 36-40 Jahre. Nur 1 Schwangerschaft trat bei 6 behandelten Frauen > 40 J. mit AH ein. 2 Patienten ohne AH, ohne SS-Erfolg sind in dieser Altersgruppe vertreten (Abbildung 14).

In der Auswertung aller Embryotransfers im Zeitraum 2000-2003 zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den SS-Raten in Bezug auf Alter, Assisted hatching und Art der Behandlung. Nur in Gruppe III (36-40 Jahre) stellt sich ein tendenzieller Vorteil mit AH nach ICSI-Behandlung dar (SS-Rate 5,3 % ohne AH vs. 18,6 % mit AH). In der Altersgruppe > 40 Jahre traten 4 Schwangerschaften nach 7 ICSI-Zyklen sowie 2 Schwangerschaften nach 15 IVF-Zyklen ausschließlich in der Hatching-Gruppe ein. Ohne AH konnte in dieser Alterskategorie nach 4 Zyklen IVF keine Schwangerschaft erzielt werden. ICSI-Zyklen ohne AH gab es bei > 40 jährigen nicht in unserem Untersuchungskollektiv.

In der Literatur gibt es Hinweise auf eine Beeinträchtigung der embryonalen Entwicklung in vitro nach ICSI. Die Rate von Embryonen mit morphologisch unauffälliger Entwicklung bis zur Blastozyste ist nach ICSI mit 8,9 % signifikant niedriger als nach IVF mit 23,5 % (Griffiths et al., 2000). Auch die Zahl von Embryonen am Tag 3 nach ICSI mit 8 oder mehr Blastomeren ist signifikant niedriger im Vergleich zu IVF (Hsu et al., 1999). Einflüsse auf die Schwangerschaftsrate zeigen diese Studien aber nicht. In den erwähnten Studien wurde kein Vergleich mit Assisted hatching durchgeführt.

In einer anderen Untersuchung war die Rate der Blastozystenbildung nach IVF und nach ICSI gleich, aber die Hatchingrate lag in der ICSI-Gruppe deutlicher unter derjenigen nach IVF. Deshalb wurde AH nach ICSI empfohlen (Porter et al., 2002).

- Schwangerschaftsrate und Anzahl transferierter Embryonen

Die Schwangerschaftsrate variiert bekanntermaßen mit der Anzahl der übertragenen Embryonen (Hsu et al., 1999; D.I.R. 2003).

Die klinischen SS-Raten / ET betragen bei < 35-jährigen: 15,4 % / 31,82 % / 31,27 % bei 1 / 2 / 3 übertragenen Embryonen; bei Patienten > 35 Jahre entsprechend 9,02 % / 23,25 % / 24,39 % laut D.I.R. 2003 ohne Unterscheidung nach Behandlungsart.

In unserem Patientengut zeigt sich die Abhängigkeit der SS-Rate von der Anzahl der transferierten Embryonen ebenfalls bei Betrachtung des besten Versuches pro Frau (Abbildung 15).

Bei Übertragung von nur einem Embryo lagen die SS-Raten bei 24,1 % ohne AH; 11,1 % mit konsequentem AH; unter Berücksichtigung von Gruppe C: 17,9 % ohne AH vs. 7,1 % mit AH. Der Transfer von 2 Embryonen zeigt eine deutliche Steigerung der SS-Rate: 40,4 % ohne AH / 35,0 % mit konsequentem AH (ohne Gruppe C); mit Gruppe C: 31,4 % ohne AH vs. 17,1 % mit AH. In der Gruppe mit 3 transferierten Embryonen lagen die SS-Raten bei 57,0 % ohne AH vs. 55,9 % mit konsequentem AH. Nach Berücksichtigung der erfolglosen Versuche mit und ohne AH (Gruppe C) waren SS-Raten von 43,3 % ohne AH vs. 39,3 % mit AH zu verzeichnen.

Bei Transfer von 2 bzw. 3 Embryonen ist die Chance eindeutig besser, eine Schwangerschaft zu erzielen. Es muss allerdings das Risiko einer Mehrlingsschwangerschaft beachtet werden. In unserem Patientengut wurde deshalb < 36-jährigen Patientinnen, die per se eine höhere Chance auf erfolgreiche Schwangerschaft als die älteren Patientinnen haben, die Übertragung von nur 2 Embryonen angeraten. Ali et al. verzeichneten in ihrer Studie mit Laserhatching sehr hohe SS-Raten bei < 36-jährigen, so dass diese Arbeitsgruppe ebenfalls den Transfer von nur 2 statt 3 Embryonen propagiert zur Senkung des Mehrlingsrisikos (Ali et al., 2003).

- Schwangerschaftsrate und Embryo-Grading

Neben der Altersabhängigkeit und der Anzahl transferierter Embryonen spielt das Embryo-Grading eine wichtige Rolle für die Schwangerschaftsrate (Hsu et al., 1999). Patienten mit schlechter Prognose haben Embryonen mit niedriger Blastomerenzahl und höherer Fragmentation. Dies sind Zeichen für eine Entwicklungsverzögerung, die

Schwangerschaftsraten sind in diesen Fällen niedriger. Möglicherweise kann durch Assisted hatching der Embryo leichter und eher schlüpfen und dadurch im günstigen Zeitraum implantieren (im so genannten Implantationsfenster). Durch AH wäre eine Kompensation der niedrigen Blastomerenzahl oder evtl. eine Entfernung von Fragmenten möglich (Magli et al., 1998).

Am Tag 2 oder 3 nach Follikelpunktion erfolgte in unserem Patientenkollektiv die Beurteilung der Embryonen vor dem Embryotransfer.

Wir unterteilten die Embryonen nach einem Grading: A-B-C-D (entspricht Grad 4-1 nach Steer), wobei Grading A die morphologisch besten Embryonen mit gleich großen, symmetrischen Blastomeren ohne Fragmentation beinhaltet. Grading B zeigt ungleiche Blastomeren mit < 10 % Fragmentation, Grading C hat ungleiche Blastomeren mit 10-50 % Fragmentation. Zu Grading D wurden Embryonen mit > 50 % Fragmentation zugeordnet (Steer et al., 1992).

Im besten Versuch pro Frau ohne AH unter Berücksichtigung der Patientinnen, die keine Schwangerschaft mit sowie ohne Laserhatching erreichen konnten (Gruppe C), ergaben sich folgende Schwangerschaftsraten:

Mit Embryonen Grading A zeigte sich eine SS-Rate ohne AH zwischen 22,2 % und 100 %, mit Embryonen Grading B wurden Schwangerschaftsraten ohne AH zwischen 16,7 % und 25,0 % erreicht, bei Grading C war die SS-Rate stets 0 %. Bei den letztgenannten, morphologisch sehr schlecht aussehenden Embryonen konnte demzufolge keine Schwangerschaft erzielt werden.

In der Gruppe mit Assisted hatching lagen die SS-Raten mit Grading A zwischen 7,1 % und 50,0 %; mit Grading B zwischen 9,1 % und 75,0 %; mit Grading C wiederum bei 0 % (Abbildung 20).

Betrachtet man die SS-Rate bezüglich der übertragenen Embryonen entsprechend dem Grading etwas genauer, sind die SS-Raten in den Gruppen mit den morphologisch besten Embryonen ohne Laserhatching besser als mit hatching (A, AA, AAA, AAB und AB). Dies bedeutet, dass primär gute Embryonen schon ohne AH eine gute Schwangerschaftschance haben, evtl. auch wegen einer dünnen Zona pellucida, und Assisted hatching in diesen Fällen keinen günstigen Einfluss hat. Cohen et al. stellte eine mögliche Gefährdung der Embryonen mit dünner ZP (< 13µm) durch hatching mit saurer Tyrode-Lösung fest, bei einer ZP > 15µm hatte Zona-Drilling in seiner Studie einen positiven Effekt (Cohen et al., 1992). Magli und Mitarbeiter fanden ebenfalls eine

Steigerung der Schwangerschaftsrate durch chemisches hatching bei Embryonen mit höherem Fragmentationsgrad (Magli et al., 1998).

In unserem Patientengut mit Embryonen Grading B, BB, BBB und BC hat die Hatching-Gruppe ebenfalls niedrigere SS-Raten als die Gruppe ohne AH.

Ein Vergleich der Gruppen mit AH und ohne AH ist schwierig, da die Anzahl der Patienten, die Altersverteilung sowie die Vorgeschichte der untersuchten Frauen unterschiedlich ist. Außerdem ist nicht bekannt, welcher Embryo mit entsprechendem Grading zur Schwangerschaft führte, wenn mehrere Embryonen transferiert wurden. Es gibt zum Teil keine Embryonen mit identischem Grading in der Gruppe mit hatching bzw. ohne AH.

Morphologisch gute Embryonen können genetisch gut oder schlecht sein, was eine Erklärung für die divergierenden Schwangerschaftsraten bei den Grading-Gruppen AAA vs. AAB ohne AH (36,0 % / 56,3 %) als auch mit AH (29,4 % / 45,8 %) geben könnte. In der Gruppe mit Grading BBB könnte ein genetisch guter Embryo sein, der zu einer erfolgreichen Schwangerschaft führt im Vergleich zu Embryonen mit Grading BB und BBC (ohne AH: 36,4 % / 16,7 % / 25,0 %; mit AH: 45,5 % / 0,0 % / 0,0 %).

Bei Embryonen mit Grading C, CC, CCC und CCD trat in unserem Patientengut nie eine Schwangerschaft ein, was die sehr niedrige Chance auf Schwangerschaft bei niedriger Embryonenqualität mit als auch ohne Assisted hatching dokumentiert.

Die Studiengruppe um Nakayama untersuchte den Einfluss von Assisted hatching mit dem Piezo-Mikromanipulator in Abhängigkeit von der Embryonenmorphologie. In der Auswertung steigerte AH nur die SS-Rate bei Patientinnen mit 2 oder 3 morphologisch guten Embryonen, bei schlechter Embryonenqualität bewirkte AH keine Verbesserung der SS-Rate (22,4 % vs. 3,4 % mit AH – Kontrollgruppe: 7,4 % vs. 3,7 % ohne AH). Zur Begründung wurden vermehrt chromosomale Abnormalitäten bei niedriger Embryonenqualität und demzufolge verminderter Implantation angeführt. In der Studie von Nakayama profitierten aber Patienten mit langer Infertilitätszeit und guten Embryonen von der Methode des Assisted hatching (Nakayama et al., 1999).

Mit steigendem Alter der Frau nehmen chromosomale Aberrationen zu. Munne`et al., 1995 fanden trotz normaler Embryonenmorphologie mit zunehmendem Patientenalter erhöhte Aneuploidieraten, was wiederum die niedrigere SS-Rate mit dem Älterwerden der Frau erklärt. Genetisch gute Embryonen können durch die Präimplantationsdiagnostik herausgefunden werden. Die Arbeitsgruppe um Gianaroli

zeigte in ihrer Untersuchung von älteren Frauen eine Steigerung der Schwangerschaftsrate durch AH und zusätzlich durchgeführte PID (Gianaroli et al., 1997).

- Schwangerschaftsrate und Vorversuche

Die Chance auf Erreichen einer Schwangerschaft liegt im 1. Behandlungszyklus nach IVF bzw. ICSI bei ca. 24-25 %. Die kumulative Schwangerschaftsrate nach sechs Behandlungen beträgt ca. 60 % (Diedrich et al., 1998).

In unserem Patientenkollektiv traten Schwangerschaften nach bis zu maximal 9 Vorversuchen ein. Bei der Auswertung der Anzahl der insgesamt durchgeführten Embryotransfers zählten wir auch die vor dem Jahre 2000 durchgeführten Zyklen pro Frau sowie die Embryotransfers nach Kryokonservierung und kombinierter IVF/ICSI-Behandlung. Insgesamt 192 Schwangerschaften waren zu verzeichnen - 58 mit Assisted hatching, 134 ohne hatching (Abbildung 23).

- Schwangerschaftsrate und Vorversuche ohne Assisted hatching

In der Patientengruppe ohne AH traten 70 Schwangerschaften nach der 1. Behandlung ein, 31 Schwangerschaften nach einem Vorversuch. 75,3 % der Frauen, die schwanger wurden ohne hatching, erreichten dies im 1. oder 2. Behandlungszyklus, wobei die Gruppe der jüngeren Patientinnen den Hauptanteil trägt (< 30 J. 43 SS; 31-35 J. 24 SS nach 0 Vorversuchen; nach 1 Vorversuch Gruppe I: 12 SS; Gruppe II: 16 SS). Die jüngeren Patientinnen haben per se eine höhere Chance auf Schwangerschaft wegen besserer Eizellqualität und -quantität, besserer uteriner Rezeptivität, weniger chromosomaler Aberrationen (al Nuaim et al., 2002). In unseren Zahlen spiegelt sich die höhere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit bei jüngeren Frauen wider.

Mit 2 bis 6 Vorversuchen differiert die SS-Rate zwischen 2,2 und 9,7 %. Nach 7-9 Vorversuchen ohne AH konnte jeweils nur noch eine Schwangerschaft verzeichnet werden, was die äußerst geringe Chance auf eine Gravidität nach sehr vielen frustrierten Versuchen symbolisiert (Tabelle 17).

Templeton et al. untersuchten die Einflussfaktoren auf den IVF-Behandlungserfolg. Die günstigste Altersgruppe lag bei 25-30 Jahren, der beste Erfolg war im 1. Behandlungszyklus, die Dauer der Infertilität wirkte sich negativ aus. Die

Schwangerschafts- und Geburtenrate sanken mit zunehmender Zahl von erfolglosen IVF-Zyklen (Templeton et al., 1996).

Die Ursache für wiederholtes Versagen nach ART scheint physiologisch zu sein, d.h. Gameten oder Embryo sind in ihrer Funktion gestört. Zur Überwindung der rekurrenten Behandlungsversager propagiert Scott eine sorgfältige Auswahl der Embryonen. Zygotenmorphologie, Entwicklungsstand am Tag 2 oder 3 nach Befruchtung sowie Blastozystenstadium können Implantationsrate und Schwangerschaftsrate beeinflussen (Scott L, 2002).

Außerdem könnte wiederholtes Implantationsversagen ein Hinweis darauf sein, dass das Zusammenspiel von embryonalen und uterinen Faktoren beim Hatching-Prozess gestört ist. Assisted hatching könnte in diesen Fällen evtl. die Implantation unterstützen und die Schwangerschaftsrate verbessern (Montag et al., 2001).

- Schwangerschaftsrate und Vorversuche mit Assisted hatching

In der Gruppe der Patientinnen, die mit Assisted hatching schwanger wurden, verteilen sich die Schwangerschaften in Abhängigkeit von den Vorversuchen wie im Folgenden beschrieben. Es muss aber erwähnt werden, dass in dieser Aufzählung nicht alle Vorversuche mit Assisted hatching durchgeführt wurden (Tabelle 18).

Jeweils 9 Schwangerschaften traten nach 0 bzw. 1 Vorversuch ein. 7 Schwangerschaften konnten nach 2 bzw. 5 erfolglosen Versuchen verzeichnet werden. Nach 3 frustrierten Versuchen wurden 11 Schwangerschaften mit AH erzielt, nach 4 Vorversuchen traten noch 10 Schwangerschaften ein. Nach jeweils 6 Vorversuchen ergaben sich nach Assisted hatching 5 Schwangerschaften.

Im Falle des Eintretens einer Schwangerschaft im 1. Versuch bzw. nach 1 Vorversuch muss von einer günstigen Prognose bezüglich der Patientensituation und der Embryomorphologie ausgegangen werden.

11 bzw. 10 Schwangerschaften in der Gruppe mit AH nach 3 und 4 frustrierten Vorversuchen möchten wir als sehr positiv für die Patientin werten. Auch die 7 bzw. 5 Schwangerschaften nach 5 bzw. 6 Vorversuchen sind erfreulich. Allerdings sind die Zahlen zu klein, um statistische Signifikanz dokumentieren zu können. Es zeigt sich aber eine deutliche Tendenz für den Nutzen von Assisted hatching bei mehreren erfolglosen Vorbehandlungen.

Bei Vergleich der Gruppen ohne AH versus mit AH zeigte sich auch, dass in der ersten Patientengruppe weniger Vorversuche bis zum Erreichen einer Schwangerschaft notwendig waren. 75,3 % der Schwangerschaften traten bei 0 bzw. nach einem Vorversuch ein. Im Gegensatz dazu mussten in der Hatching-Gruppe mehr Vorversuche durchgeführt werden bis zum Eintritt einer Schwangerschaft. Nur 31 % der Schwangerschaften traten nach 0 bzw. 1 Vorversuch ein. Dies deutet auf ein Patientengut mit primär schlechterer Prognose hin. Der Hauptanteil der Schwangerschaften in der Hatching-Gruppe stammt aus den Altersgruppen II und III, d.h. > 30 J. bis ≤ 40 Jahre.

Wenn wir die SS-Rate im Einzelfall betrachten und differenzieren nach welchem Hatchingversuch die Schwangerschaft eintrat, zeigen sich folgende Ergebnisse:

Die SS-Rate betrug 58,6 % nach dem 1. AH, wobei 11 Schwangerschaften ohne Vorversuch zu verzeichnen waren, 23 nach 1-4 Vorversuchen (ohne AH). Im 2. AH-Versuch konnten 11 Schwangerschaften nach 1-4 Vorversuchen erzielt werden. Dies entspricht einer SS-Rate von 19,0 %. Im 3. bzw. 4. AH-Versuch lag die SS-Rate bei 12,1 % bzw. 8,6 % mit 7 / 5 Schwangerschaften nach 3-6 Vorversuchen. 1 Schwangerschaft trat im 5. AH-Versuch nach 4 Vorversuchen auf (Tabelle 19; Abbildung 25).

In dieser Auswertung zeigt sich tendenziell ein positiver Einfluss des hatching. Im 1. bzw. 2. AH-Versuch traten 23 bzw. 11 Schwangerschaften nach insgesamt 1-4 Vorversuchen ohne AH auf. In diesen Fällen hatte AH einen deutlichen Nutzen für die Patientinnen, wenn man die bis zu 4 erfolglosen Vorversuche einbezieht.

Es gibt eine Reihe von Studien, die zeigen, dass Assisted hatching bei Patienten mit wiederholtem Versagen einen positiven Einfluss auf die Schwangerschaftsrate hat (Ali et al., 2003; Montag et al., 2001; Nakayama et al., 1999; Stein et al., 1995; Antinori et al., 1996; Magli et al., 1998).

Edi-Osagie et al., 2003 werteten 23 Studien mit 2572 Frauen aus. Darin zeigte sich ein signifikanter Nutzen des AH auf die klinische SS-Rate besonders in der Subgruppe der Frauen mit wiederholtem Versagen der ART. Die Auswertung unterstützt die bekannte Tatsache, dass AH nützlicher bei älteren Patientinnen sein kann. In den oben genannten 23 Studien berichteten nur 6 Studien über die Lebendgeburtenrate. AH hatte keinen signifikanten Effekt auf die Lebendgeburten.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten positiven Studien bezüglich des Einflusses von Assisted hatching bei wiederholten frustranen Versuchen, konnten andere Untersuchungen keinen Vorteil feststellen. Bei Frischzyklen sowie Zyklen nach Kryokonservierung, Patienten ≥ 38 Jahre, mit einer Zona pellucida-Dicke der Embryonen von $\geq 15\mu\text{m}$ und 2 oder mehr Versagern zeigte sich kein signifikanter Vorteil durch mechanisches Assisted hatching (Edirisinghe et al., 1999).

Eine europäische Multicenter-Studie konnte ebenfalls keinen signifikanten Nutzen der Laserbehandlung feststellen bei Patienten mit wiederholtem Versagen nach Transfer von frischen Embryonen, nach 1. bzw. 3. Transfer von Kryo-Embryonen sowie bei Patienten mit schlechter Prognose im 1. Hatching-Versuch. In dieser Studie wurde die Verordnung von Immunsuppressiva / Antibiotika-Behandlung bei der Anwendung von AH als essentiell befunden. Die Abwesenheit von Implantation nach verschiedenen Transfers von guten Embryonen wurde in dieser Auswertung als das strengste Patientenselektionskriterium für AH bezeichnet (Primi et al., 2004).

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des Assisted hatching (AH) auf den Erfolg der Kinderwunschbehandlung im Kinderwunschzentrum Neubrandenburg des Dietrich-Bonhoeffer-Klinikums Neubrandenburg.

Hervorzuheben ist, dass es sich hier nicht um einen experimentellen Ansatz zur Untersuchung des AH unter Idealbedingungen handelte, sondern die Bedeutung des Verfahrens, das in vielen deutschen Kinderwunschzentren eingesetzt wird, unter „Praxisbedingungen“ evaluiert werden sollte.

Dazu wurden insgesamt 826 Embryotransfers von 461 Patientinnen mit IVF- bzw. ICSI- Behandlung aus dem Zeitraum vom 01.01.2000 – 31.12.2003 retrospektiv ausgewertet.

Als Stimulationsprotokolle wurden das lange Protokoll mit GnRH-Agonistengabe oder das Antagonisten-Protokoll eingesetzt.

400 x erfolgten Embryotransfers nach IVF, 426 x wurden Embryonen nach ICSI übertragen. 326 Zyklen bei 88 Patientinnen wurden mit Assisted hatching durchgeführt, 373 Patientinnen wurden in 500 Zyklen ohne AH behandelt. Das AH wurde 1 bis 2 h vor dem Transfer durchgeführt, es kamen der Infrarotdiodenlaser OCTAX Lasershot™ System der Firma OCTAX Microscience GmbH, Herborn und das Inversmikroskop Diaphot 300 (Nikon GmbH, Düsseldorf) zum Einsatz.

Es wurden Frauen im Alter von 21 Jahren bis 44 Jahren behandelt. Das Durchschnittsalter betrug in der Gruppe ohne AH 30,9 J.±3,98, in der Gruppe mit AH 35,2 J.±4,51 ($p < 0,01$). Die Anzahl der Embryotransfers pro Frau lag zwischen 1 und 7. Zyklen mit Kryokonservierung und kombinierte IVF/ICSI-Behandlungen wurden nicht berücksichtigt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde außer der Betrachtung der Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Anwendung des AH in den verschiedenen Altersgruppen, der Anzahl der transferierten Embryonen und der Embryomorphologie im Gesamtkollektiv noch eine weitere Gruppe gebildet: Die Gruppe „Bestes Ergebnis pro Frau“ (Abschnitt 4.7 bis 4.7.4.1). Sie wurde aus der Gruppe „alle Embryotransfers (ET's)“ gebildet und diente dazu, eine statistische Unabhängigkeit der „Versuche“ zu gewährleisten, die bei der Auswertung der anderen Gruppen durch die Inhomogenität des Patientinnenkollektives besonders wegen des

unterschiedlichen Alters sowie der differierenden Zahl der Embryotransfers pro Frau in den Gruppen mit und ohne Hatching nicht ausreichend vorhanden war.

Die Schwangerschaftsraten zwischen der Patientengruppe mit AH im Vergleich zu der ohne AH waren signifikant verschieden (16,6 % vs. 23,6 %, $p=0,02$). Da das Alter per se einen Einfluss auf den Schwangerschaftserfolg hat, ist der Vergleich der beiden Gruppen nur eingeschränkt möglich. Außerdem war die Anzahl der Versuche (ET`s) pro Patientin unterschiedlich. In der Gruppe ohne AH brauchten die Patienten weniger Vorversuche bis zum Erreichen einer Schwangerschaft im Gegensatz zur Patientengruppe mit AH. Dies verdeutlicht die schlechtere Ausgangslage in der Hatchinggruppe.

Auch die Aufschlüsselung der Patienten in verschiedene Altersklassen (Gruppe I-IV, siehe Ergebnisteil) ergab keine signifikant unterschiedlichen Schwangerschaftsraten zwischen Hatching- und Nicht-Hatchinggruppe. Allerdings zeigte sich ein deutlich positiver Trend zu höheren Schwangerschaftsraten nach AH in den Gruppen der älteren Patientinnen (≥ 36 Jahre: ohne AH: 12,1 % / mit AH: 15,5 %; > 40 Jahre: ohne AH keine SS / mit AH: 27,3 %). Die vorhandenen Daten in der Gruppe der Patientinnen > 40 Jahre sind jedoch zu gering, um eine Signifikanz zu erreichen. (12 mit AH behandelte Frauen / 26 Zyklen). Auch bei Betrachtung des „Besten Ergebnisses pro Frau“ scheint die konsequente Anwendung des AH in diesen Altergruppen einen Vorteil zu bringen, aber auch hier ist keine statistische Signifikanz nachzuweisen.

Beim Vergleich der Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von Behandlungsmethode und Assisted hatching scheint AH bei den ≥ 36 jährigen Patientinnen nach ICSI einen marginalen Vorteil zu bringen, ebenfalls ohne Signifikanz. In der IVF-Gruppe sind bis zum Alter von 40 Jahren keine Vorteile durch AH erkennbar.

In unserem Kollektiv traten Schwangerschaften nach bis zu maximal 9 Behandlungen ein. In der Patientinnengruppe ohne AH gab es 70 Schwangerschaften nach der 1. Behandlung. Die Gravität trat in 75,3 % der Frauen im ersten oder zweiten Behandlungszyklus ein. Hierbei lag der Hauptanteil der Schwangerschaften bei Frauen ≤ 30 Jahren. Im Vergleich der Gruppen ohne und mit AH zeigte sich, dass in der Hatching-Gruppe nur 31 % im ersten oder zweiten Versuch schwanger wurden. Insgesamt erwies sich, dass Frauen mit mehreren erfolglosen Vorversuchen und im Alter über 35 Jahre einen Nutzen von der Anwendung des AH hatten. Auch nach 4 Vorbehandlungen konnte beim 5. AH-Versuch noch eine Schwangerschaft erreicht werden.

Die Schwangerschaftsrate steigt mit der Zahl der transferierten Embryonen. Dies zeigte sich auch in unserem Patientenkollektiv. Sie betrug 23,3 % nach Transfer von 2 Embryonen und war deutlich besser als nach 1 übertragenen Embryo (9,4 %). Keine Verbesserung brachten 3 transferierte Embryonen (21,5 %). Ein ähnlicher Trend erwies sich nach Differenzierung der Zyklen mit und ohne AH, wobei in der Gruppe mit AH die SS-Raten bei Transfer von 1 / 2 / 3 Embryonen niedriger als in der Gruppe ohne AH waren.

Bei der Untersuchung zum Einfluss des Embryo-Gradings lässt sich allgemein feststellen, dass die Schwangerschaftsrate bei morphologisch guten Embryonen höher war (AA: 30,3 %; AAA: 18,4 %; AAB: 30,4 %; BBB: 17,9 %). Bei einem Grading von C, CC, CCC und CCD wurde keine Schwangerschaft erreicht. Da bei einem Transfer von 2 oder 3 Embryonen unbekannt ist, welcher Embryo zur Schwangerschaft geführt hat und nicht bei jedem Transfer alle Embryonen mit AH behandelt wurden, lässt sich jedoch die in der Literatur anzutreffende Vermutung, dass AH in der Gruppe mit schlechterer Embryonenmorphologie einen Nutzen hat, anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigen.

Als Schlussfolgerung aus der vorliegenden Arbeit ist zu konstatieren, dass eine generelle Anwendung des AH bei der assistierten Reproduktion zu keiner Erhöhung der Schwangerschaftsraten führt. Vom AH scheinen nur Frauen zu profitieren, die älter als 35 Jahre sind und/oder bei denen mehrere erfolglose Vorbehandlungen auf Probleme bei der Implantation hindeuten. Kinderwunschaare sollten beim Erstgespräch auf diese limitierten, individuell unterschiedlichen Erfolgchancen des Assisted hatching hingewiesen werden.

6.1 Summary

This study examines the influence of the Assisted hatching (AH) for the success of the child desire treatment in the IVF-centre Neubrandenburg, Dietrich-Bonhoeffer-clinic Neubrandenburg.

I would like to emphasize that this study is not an experimental approach in order to investigate the AH on “ideal conditions”, but an evaluation of the importance of the procedure under “real conditions”, which is used in many German fertility centres.

Altogether 826 embryo transfers were retrospectively evaluated by 461 female patients with IVF- and/or ICSI treatment from the period of 01.01.2000 - 31.12.2003.

The long protocol with GnRH agonist or the protocol with antagonist was used for the stimulation.

400 embryo transfers took place after IVF, 426 embryos after ICSI were transferred. 326 cycles with 88 female patients were accomplished with assisted hatching, 373 female patients were treated in 500 cycles without AH. The AH was accomplished 1 to 2 hrs before the transfer, it was used the infrared diode laser OCTAX laser SHOT TM system of the Fa.OCTAX Microscience GmbH, Herborn and the inverse microscope Diaphot 300 (Nikon GmbH, Duesseldorf).

Women at the age of 21 to 44 years were treated. The average age amounted to 30.9 years \pm 3.98 in the group without AH, in the group with AH 35.2 years \pm 4.51 ($p < 0.01$). The number of embryo transfers per woman lay between 1 and 7. Cycles with cryopreservation and combined IVF/ICSI treatments were not considered.

During the evaluation of the results with respect to the view of the pregnancy rates in dependence of the application of the AH in the different age groups, the number of the transferred embryos and the embryo morphology in the total collective still another further group was formed: the group "best result per woman" (Section 4.7 to 4.7.4.1). It was formed from the group "all embryo transfers (ET`s)" and served to ensure a statistic independence of the "attempts" which was sufficiently missing particularly during the evaluation of the other groups by the in-homogeneity of the female patient collective because of the different age as well as the differing number of the embryo transfers per woman in the groups with and without Hatching.

The pregnancy rates between the group of patients with AH compared with the group without AH were significantly different (16.6 % vs. 23.6 %, $p=0.02$). Since the age has an influence on pregnancy success, the comparison of the two groups is only reduced possible. In addition the number of attempts per female patient was different. In the group without AH the patients needed fewer preliminary trials up to reaching a pregnancy in contrast to the group of patients with AH. This clarifies the worse initial position in the Hatching-group.

Also the classification of the patients into different age groups (group I-IV, see result part) did not result in significantly different pregnancy rates between hatching and no-hatching-group. However a clearly positive trend pointed itself to higher pregnancy rates after AH in the groups of the older female patients (≥ 36 years: without AH: 12.1 % / with AH: 15.5 %; > 40 years: without AH no pregnancy / with AH: 27.3 %). The existing data in the group of the female patients over 40 years are however too small, in order to reach a significance. (12 women treated with AH / 26 cycles). Also with view of the "best result per woman" the consistent application of the AH seems to bring an advantage in these groups of ages, but here, too, no statistic significance is to be proven.

The comparison of the pregnancy rates in dependence of the treatment method and assisted hatching it seems that AH brings the ≥ 36 year old female patients after ICSI a marginal advantage, likewise without significance. In the IVF group no benefit is recognizable through AH up to the age of 40 years.

In our collective pregnancies occurred after up to a maximum of 9 treatments. In the group of female patients without AH there were 70 pregnancies after the 1st treatment. The pregnancy occurred at 75.3 % of the cases in the first or second treatment cycle. Here was the main part of the pregnancies with women ≤ 30 years. In the comparison of the groups without and with AH it showed up that in the Hatching group only 31% in the first or second attempt became pregnant. Altogether it proved that women with several unsuccessful preliminary trials and at the age over 35 years had a benefit of the application of the AH. Also after 4 pre-treatments at the 5th AH-trial a pregnancy could be reached.

The pregnancy rate rises with the number of the transferred embryos. This showed up also in our patient collective. It amounted to 23.3 % after the transfer of 2 embryos and was clearly better than after the 1st transferred embryo (9.4 %). No improvement brought 3 transferred embryos (21.5 %). A similar trend proved after differentiation of

the cycles with and without AH, whereby in the group with AH the pregnancy rates were lower with transfer of 1/2/3 embryos than in the group without AH.

During the investigation of the influence of the embryo-grading it can be generally stated that the pregnancy rate was higher with morphologically good embryos (AA: 30.3 %; AAA: 18.4 %; AAB: 30.4 %; BBB: 17.9 %). With a grading of C, CC, CCC and CCD no pregnancies were reached. Since with a transfer of 2 or 3 embryos it is unknown which embryo led to the pregnancy and not with each transfer all embryos were treated with AH, however the assumption that AH in the group with worse embryo morphology has a use, which can be found in the literature, cannot be confirmed on the basis of our results.

As conclusion from our study it is to be stated that a general application of the AH during the assisted reproduction does not lead to an increase of the pregnancy rates. From AH only women seem to profit, who are older than 35 years and/or several repeated failures seem to indicate problems during the implantation. Couples wishing a child should be particularly referred to these limited chances of success of the assisted hatching during their first appointment.

7. Thesen

Die Technik der IVF ist eine Behandlungsmöglichkeit der tubaren Sterilität, bei der keine mikrochirurgische Refertilisierung möglich ist

Mit der Methode der ICSI kann auch Paaren geholfen werden mit schwerem Oligoasthenoteratozoospermie-Syndrom oder mit Kryptozoospermie durch MESA bzw. testikuläre Spermatozoenextraktion

Das Alter der Frau hat einen bedeutenden Einfluss auf den Schwangerschaftserfolg

Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit einer Patientin steigt mit der Zahl ihrer befruchteten Oozyten an

Erfolgreiche Vorbehandlungen deuten auf Probleme bei der Implantation hin

Die Schwangerschaftsrate steigt mit der Zahl der transferierten Embryonen

Der Transfer von 3 statt 2 Embryonen bringt nur Patientinnen > 40 Jahre einen Vorteil

Die Schwangerschaftsrate korreliert mit der Morphologie der Embryonen

Die Embryoqualität ist von der Befruchtungsfähigkeit der Oozyten abhängig

Der entscheidende Faktor für den Erfolg einer IVF/ICSI- Behandlung ist die Qualität der übertragenen Embryonen

Patientinnen > 38 Jahre haben altersbedingt eine erhöhte Rate an chromosomalen Aneuploidien und damit per se eine ungünstige Schwangerschaftsprognose

Die Zona pellucida hat eine große Bedeutung für die Befruchtung der Eizelle und die präimplantative Embryonalentwicklung

Eine Zonaverhärtung kann durch verlängerte In vitro-Kultur oder In vivo-Alterung induziert werden, der Hatchingprozess kann dadurch gestört sein

Ältere Patientinnen haben oftmals eine verdickte Zona pellucida, Assisted hatching kann möglicher Weise diesen negativen Prognosefaktor ausgleichen

Das gezielte Eröffnen der Zona pellucida des Embryos auf mechanischem, chemischem bzw. physikalischem Wege zur Erleichterung des Schlüpfens wurde in der Literatur als „Assisted hatching“ bekannt

Die Anwendung des Diodenlasers ist eine einfach durchführbare, sehr präzise, gut reproduzierbare, kontaktfreie Methode der Zonaeröffnung. Die Laserenergie führt weder zu sichtbaren mechanischen Veränderungen noch zu thermischen Effekten

Eine generelle Anwendung des Assisted hatching bei der assistierten Reproduktion führt zu keiner Erhöhung der Schwangerschaftsraten

Frauen mit mehreren erfolglosen Vorversuchen und einem Alter über 35 Jahre haben einen Nutzen von der Anwendung des Assisted hatching

Kinderwunschaare sollten beim Erstgespräch auf die limitierten, individuell unterschiedlichen Erfolgchancen des Assisted hatching hingewiesen werden

8. Literaturverzeichnis

- Ali J, Rahbar S, Burjaq H, Sultan AM, Al Flamerzi M, Shahata MA (2003)**
Routine laser assisted hatching results in significantly increased clinical pregnancies. J Assist Reprod Genet 20 (5), 177-181
- Antinori S, Selman HA, Caffa B, Panci C, Dani GL, Versaci C (1996)**
Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching patients with poor prognosis of pregnancy. Hum Reprod 11 (11), 2488-2492
- Appel K, (2002)**
Schwangerschaft nach In-vitro-Oozytenreifung und IVF bei normalem Zyklus. Geburtsh Frauenheilk 62
- Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Nuhoglu A (2001)**
Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. Hum Reprod 16 (1), 125-129
- Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A (2002)**
A comparison of four different techniques of assisted hatching. Hum Reprod 17 (5) 1239-1243
- Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I (2003)**
Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in-vitro fertilization. Fertil Steril 79 (6), 1317-1322
- Bates GW Jr, Ginsburg ES (2002)**
Early pregnancy loss in in vitro fertilization (IVF) is a positive predictor of subsequent IVF success. Fertil Steril 77 (2), 337-341
- Bavister BD (2002)**
Early history of in vitro fertilization. Reproduction 124 (2), 181-196
- Bertrand E, Van Den Bergh M, Englert Y (1995)**
Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? Hum Reprod 10 (5), 1189-1193
- Blake DA, Forsberg AS, Johannsson BR, Wikland M (2001)**
Laser zona pellucida thinning – an alternative approach to assisted hatching. Hum Reprod 16 (9), 1959-1964
- Branigan EF, Estes MA (2000)**
Minimal stimulation ivf using clomiphene citrate and oral contraceptive pill pretreatment for LH suppression. Fertil Steril 73 (3), 587-590
- Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM (2002)**
Preimplantation genetic diagnosis. Nat Rev Genet 3 (12), 941-953

- Check JH, Hoover L, Nazari A, O'Shaughnessy A, Summers D (1996)**
The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 65 (2), 254-257
- Choe JK, Nazari A, Check JH, Summers-Chase D, Swenson K (2001)**
Marked improvement in clinical pregnancy rates following in vitro fertilization-embryo transfer seen when transfer technique and catheter were changed. *Clin Exp Obstet* 28 (4), 223-224
- Cieslak J, Ivakhenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y (1999)**
Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril* 17 (2), 308-313
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z (1992)**
Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 7 (5), 685-691
- Cohen J (1991)**
Assisted hatching of human embryos. *J invitro Fertil Embryo Transfer* 8 (4), 179-191
- Cohen J, Feldberg D (1991)**
Effects of the size and number of zona pellucida openings on hatching and trophoblast outgrowth in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 30, 70-78
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer M, Wiemer K (1990)**
Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 5 (1), 7-13.
- Daya S (2002)**
Updated meta-analysis of recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) versus urinary FSH for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Fertil Steril* 77 (4), 711-714
- De Felici M, Siracusa G (1982)**
„Spontaneous“ hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro-culture. *Gamete Res* 6, 107-113
- De Geyter Ch (1999)**
20 Jahre in – vitro Fertilisation: Was kommt danach? *Therapeutische Umschau* 56 (5), 240-245
- Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Feger B, Plumere C, Gerlinger P, Brun B, Rumpler Y (1984)**
Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *Lancet* i, 1467
- De Vos A, van Steirteghem A (2000)**
Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cell Tissues Organs*, 166 (2), 220-227

Diedrich K, Felberbaum R (1998)

Einführung in die Thematik der Infertilität und Sterilität. In: Dietrich K. (Hrsg.) : Endokrinologie und Reproduktionsmedizin III. Urban & Schwarzenberg, 4. Auflage, München-Wien-Baltimore 1998, 85-88

Douglas-Hamilton DH, Conia J (2001)

Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. J Biomed Opt 6 (2), 205-213

Downs SM, Schroeder AC, Eppig JJ (1986)

Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida. Gamete Res 15, 115-122

Edi-Osagie E, Hooper L, Seif MW (2003)

The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systematic review. Hum Reprod 18 (9), 1828-1835

Edirisinghe WR, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, Suwajanakorn S, Pruksananonda K, Chinpilas V, Virutamasen P (1999)

A study failing to determine significant benefits from assisted hatching: patients selected for advanced age, zonal thickness of embryos, and previous failed attempts. J Assist Reprod Genet 16 (6), 294-301

Eppig JJ, Schröder AC (1986)

Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects. Theriogenology 25, 97-106

Ericson A, Källen B (2001)

Congenital malformations in infants born after ivf: a population-based study. Hum Reprod 16 (3), 504-509

Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G et al (1992)

Human zona pellucida during in vitro fertilisation: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium thiocarbohydrazide. Mol Reprod Dev 32, 51-61

Felberbaum R (1998)

Zervixfaktor der weiblichen Sterilität. In: Dietrich K. (Hrsg): Endokrinologie und Reproduktionsmedizin III. Urban & Schwarzenberg, 4. Auflage, München-Wien-Baltimore 1998, 127-135

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K (2001)

The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. Human Reprod 16 (10), 2166-2170

Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Fakan S (1995)

Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1, 48µm diode laser beam: Efficacy and safety of the procedure. Fertil Steril 64 (3), 604-611

- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S (1997)**
Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 68 (6), 1128-1131
- Gonzales DS, Bavister BD (1995)**
Zona pellucida escape by hamster blastocysts in vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in vivo. *Biol Reprod* 52, 470-480
- Greve JM, Wassarman PM (1985)**
Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural Repeat. *J Mol Biol* 181, 253-264
- Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Felberbaum R, Dietrich K (2003)**
Reproduktionsmedizin: Aktueller Stand und Zukunft. *Frauenarzt* 44, 860-867
- Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M (2000)**
Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod* 15, 1592-1596
- Harper JC, Bui TH (2002)**
Pre-implantation genetic diagnosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16 (5), 659-670
- Hellebaut S, De Sutter P, Dozortsev D, Onghena A, Qian C, Dhont M (1996)**
Does assisted hatching improve implantation rates after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in all patients? A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet*, 13 (1), 19-22
- Herrler A, Beier HM (2000)**
Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs* 166 (2), 233-46
- Hohmann FP, Macklon NS, Fauser BC (2003)**
A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (1), 166-173
- Horng SG, Chang CL, Wu HW, Wang CW, Cheng CK, Huang HY, Wang HS, Soong YK (2002)**
Laser assisted hatching of embryos in women of advanced age after in vitro fertilization: a preliminary report. *Chang Gung Med J* 25 (8), 531-536
- Hsieh YY, Huang CC, Cheng TC, Chang CC, Tsai HD, Lee MS (2002)**
Laser assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. *Fertil Steril* 78 (1), 179-182

Hsu MI, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P, Oehner S (1999)

Embryo implantation in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: Impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. *Fertil Steril*, 72 (4), 679-685

Hu Y, Hoffmann DI, Maxson WS, Ory SJ (1996)

Clinical application of nonselective assisted hatching of human embryos. *Fertil Steril* 66 (6), 991-994

Hurst BS, Tucker KE, Awoniyi CA, Schlaff WD (1998)

Assisted hatching does not enhance ivf success in good prognosis patients. *J Assist Reprod Genet* 15 (2), 62-64

Jansen RP (2003)

The effect of female age on the likelihood of a live birth from one in-vitro fertilization treatment. *Med J Aust* 178 (6), 258-261

Jones JrHW, Acosta A, Andrews MC, Garcia JE et al. (1983)

The importance of the follicular phase to success and failure in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 40, 317-321

Keck Ch (2002)

Diagnostik und Therapie des unerfüllten Kinderwunsches/ Christoph Keck- 1. Auflage – Bremen: UNI-MED, 2002

Kern G (1985)

Gynäkologie: Kurzgefasstes Lehrbuch, 4., neubearbeitete Auflage, Jörg Baltzer u. Harald Mickan. Geleitwort von J. Zander. – Stuttgart; New York: Thieme, 1985

Kuliev A, Verlinsky Y (2002)

Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 5 (3), 294-299

Kuliev A, Verlinsky Y (2003)

The role of preimplantation genetic diagnosis in women of advanced reproductive age. *Curr Opin Obstet Gynecol* 15 (3), 233-238

Lanzendorf SE, Nehchiri F, Mayer JF, Oehninger S, Muasher SJ (1998)

A prospective, randomized, double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age. *Hum Reprod* 13 (2), 409-413

Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z (1993)

Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 60 (5), 871-875

Loumaye E, Billion JM, Mine JM (1990)

Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomifen citrate challenge test. *Fertil Steril* 53, 295-301

Ludwig M, Küpker W, Dietrich K (1998 a)

Physiologie der reproduktiven Funktionen der Frau. In: Dietrich K.(Hrsg.): Endokrinologie und Reproduktionsmedizin III. Urban & Schwarzenberg, 4. Auflage, München-Wien- Baltimore 1998, 3-36

Ludwig M, Dietrich K (1998 b)

Präimplantationsdiagnostik. In: Dietrich K. (Hrsg.): Endokrinologie und Reproduktions- Medizin III. Urban & Schwarzenberg, 4. Auflage, München-Wien- Baltimore 1998, 300-313

Ludwig M, Al-Hasani S, Dietrich K (2001)

Die Anwendung der Technik des Assisted hatching. Eine kritische und reservierte Betrachtung vorhandener Erfahrungen und biologischer Grundlagen. Reproduktionsmedizin 17, 112-115

Ludwig M, Dietrich K (2002)

Evaluation of an optimal luteal phase support protocol in IVF. Acta Obstet Gynecol Scand 80, 452-466

MacLaughlin DT, Teixeira J, Donahoe PK (2001)

Perspective: reproductive tract development – new discoveries and future directions. Endocrinology 142 (6), 2167-2172

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Aicardi G, Montanaro M (1998)

Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted hatching. Hum Reprod 13 (5), 1331-1335

Malter HE, Cohen J (1989)

Partial zona dissection of the human oocytes: a non-traumatic method using a micromanipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil Steril 51 (1), 139-148

Mandelbaum J (1996)

The effects of assisted hatching on the hatching process and implantation. Human Reprod 11 (1), 43-50

Michelmann HW (2001)

Der Blastozysten transfer. Die Dilemmasituation der deutschen Reproduktionsmedizin. M'gladbacher Sterilitätskolloquium (Zeitschriftenangabe fehlt)

Milki AA, Hinckley MD, Behr B (2002)

Comparison of blastocyst transfer to day 3 transfer with assisted hatching in the older patient. Fertil Steril 78 (6), 1244-1247

Montag M, van der Ven H (1999a)

Laser assisted hatching in assisted reproduction. Croat Med J 40 (3), 398-403

Montag M, Rink K, Delacretaz G, van der Ven H (1999b)

Anwendung der Lasertechnik im Bereich der assistierten Reproduktion. Reproduktionsmedizin 15, 45-54

- Montag M, Koll B, Holmes P, van der Ven H (2000 a)**
The significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. *Biol Reprod* 209, 1738-1744
- Montag M, van der Ven H (2000 b)**
Gibt es Indikationen für „Assisted hatching“. *Der Gynäkologe* 33 (11), 772-776
- Montag M, van der Ven H (2001)**
Kritische und befürwortende Betrachtungen zur Diskussion über den Stellenwert der Technik des Assisted hatching. *Reproduktionsmedizin* 17, 108-111
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1995)**
Embryo morphology, development rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64 (2), 382-391
- Nakayama T, Fujiwara H, Yamada S, Tastumi K, Honda T, Fuji S (1999)**
Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo-micromanipulator for morphologically low quality embryos in poor-prognosis infertile patients. *Fertil Steril* 71(6), 1014-1018
- Nieschlag E, Nieschlag S (1999)**
WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikal-Interaktion. Eberhard Nieschlag und Susan Nieschlag: Springer-Verlag, 4. Auflage, 1999
- al-Nuaim LA, Jenkins JM (2002)**
Assisted hatching in assisted reproduction. *BJOG* 109 (8), 856-862
- Oehninger S, Mayer J, Muasher S (2000)**
Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 169 (1-2), 73-77
- Opsahl MS, Blauer KL, Black SH, Lincoln SR, Thorsell L, Sherins RJ (2001)**
The number of embryos available for transfer predicts successful pregnancy outcome in women over 39 years with normal ovarian hormonal reserve testing. *J Assist Reprod Genet* 18 (10), 551-556
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992)**
Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17-18
- Pantos K, Athanasiou V, Stefanidis K, Stavrou D, Vaxevanoglou T, Chronopoulou M (1999)**
Influence of advanced age on the blastocyst development rate and pregnancy rate in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 71 (6), 1144-1146
- Poehl M, Holagschwandtner M, Bichler K, Krischker U, Jürgen S, Feichtinger W (2001)**
IVF-patients with nonmale factor „to ICSI“ or „not to ICSI“ that is the question? *J Assist Reprod Genet* 18 (4), 205-208

- Porter RN, Tucker MJ, Graham J, Sills ES (2002)**
Advanced embryo development during extended in vitro culture: observations of formation and hatching patterns in non-transferred human blastozysts. *Hum Fertil (Camb)* 5 (4), 215-220
- Primi MP, Senn A, Montag M, van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A, Barri P, Germond M (2004)**
A European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Hum Reprod* 19 (10), 2325-2333
- Rink K, Delacretaz G, Salathe RP, Senn A, Nocera D, Germond M, et al. (1996)**
Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida with an objective-delivered 1.48-microns diode laser. *Lasers Surg Med* 18, 52-62
- Rufas-Sapir O, Stein A, Orvieto R, Avrech OM, Kotler N, Pinkas H, Bar J, Fisch B (2004)**
Is assisted hatching beneficial in patients with recurrent implantations failures? *Clin Exp Obstet Gynecol* 31 (2), 110-112
- Saito H, Saito T, Kaneko T, Sasagawa I, Kuramoto T, Hiroi M (2000)**
Relatively poor oocyte quality is an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 73, 465-469
- Schachter M, Raziel A, Friedler S, Stassburger D, Bern O, Ron-El R (2001)**
Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation. *Hum Reprod* 16 (6), 1264-1269
- Schanz A, Hess A, Shahin A, Hirchenhain J, Griesinger G, Krüssel JS (2004)**
Molekulare Mechanismen der Embryoimplantation im Endometrium. *Gynäkologie* 2004 37, 123-127
- Schiebler TH, Peiper U, Schneider F (1986)**
Weibliche Geschlechtsorgane. In: Schiebler TH, Peiper U, Schneider F (eds): *Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Springer, Berlin-Heidelberg- New York, 1986, 517-555
- Schiewe MC, Araujo E, Asch RH, Balmaceda JP (1995)**
Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *J Assist Reprod Genet* 12 (1), 2-7
- Schopper B, Ludwig M, Edenfeld J, Al-Hasani S, Dietrich K (1999)**
Possible applications of lasers in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 14 (1), 186-193
- Schröder AK, Dietrich K, Ludwig M (2003)**
Techniken und Erfolge der assistierten Reproduktion. *gyn - Praktische Gynäkologie* 3, 222-228

Scott LA, Smith S (1998)

The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Hum Reprod, 13 (4), 1003-1013

Scott L (2002)

Embryological strategies for overcoming recurrent assisted reproductive technology treatment failure. Hum Fertil (Camb) 5 (4), 206-214

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM (1997)

Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12 (6), 1267-1270

Sheen TC, Chen SR, Au HK, Chien YY, Wu KY, Tzeng CR (2001)

Herniated blastomere following chemically assisted hatching may result in monozygotic twins. Fertil Steril 75 (2), 442-444

Shi Q, Martin RH (2000)

Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. Cytogenet Cell Genet 90, 219-226

Stalf T, Mehnert C, Hajimohammad A, Manolopoulos K, Lenhard A, Henkel R, Gips H (2003)

Aspekte der Gameten- und Zygotenqualität in der Reproduktionsmedizin. gyn – Praktische Gynäkologie 3, 211-220

Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG (1992)

The cumulative embryoscore: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. Hum Reprod 7 (1), 117-119

Stein A, Rufas O, Amit S, Avrech O, Pinkas H, Ovadia J, Fisch B (1995)

Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after in-vitro fertilization. Fertil Steril 63 (4), 838-841

Strowitzki T (2000)

Indikationsbereiche IVF vs. ICSI. Der Gynäkologe 33 (11), 777-781

Strowitzki T (2002)

Aktuelle Diagnostik und Therapie in der Reproduktionsmedizin. gyn – Praktische Gynäkologie 3, 196-203

Tao J, Tamis R (1997)

Application of assisted hatching for 2-day-old, frozen-thawed embryo transfer in a poor-prognosis population. J Assist Reprod Genet 14 (2), 128-130

Tarlatzis BG, Grimbizis G (1999)

Pregnancy and child outcome after assisted reproduction techniques. Hum Reprod 14 (1), 231-242

Templeton A, Morris JK, Parslow W (1996)

Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *The Lancet* 348 (23), 1402-1406

Tesarik J, Greco E (1999)

The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 14 (5), 1318-1323

Testart J (1998)

Safety of embryo cryopreservation: statistical facts and artefacts: episcientific aspects of the Epigenetic factors in artificial procreation. *Debate. Hum Reprod* 13 (4), 783-785

Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer MP, Wiker SR, Wright G (1991)

Partial dissection of the Zona pellucida of frozen-thawed human embryos may enhance blastozyst hatching, implantation, and pregnancy rates. *Am J Obstet Gynecol* 165 (2), 341-345

Tucker MJ, Morten PC, Wright G et al. (1996)

Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection: does co-culture or assisted hatching improve implantation rates? *Hum Reprod* 11 (11), 2434-2437

Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Kenigsberg D, Moshella J, Ivakhnenko V, Masciangelo C, Strom C, Kuliev A (2002)

Polar body-based preimplantation diagnosis for x-linked disorders. *Reprod Biomed Online* 4 (1), 38-42

Wassarman PM (1990)

Biochemistry and functions of mouse zona pellucida glycoproteins. In: Edwards RG (ed): *Establishing a successful human pregnancy*. Raven press, New York 1990

Watt AH, Legedza AT, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD (2000)

The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 17 (5), 264-268

Weichselbaum A, Paltieli Y, Philosoph R, Rivnay B, Coleman R, Seibel MM, Bar-Ami S (2002)

Improved development of very-poor-quality human preembryos by coculture with human fallopian ampullary cells. *J Assist Reprod Genet* 19 (1), 7-13

Westphal LM, Hinckley MD, Behr B, Milki AA (2003)

Effect of ICSI on subsequent blastocyst development and pregnancy rates. *J Assist Reprod Genet* 20 (3), 113-116

Wilton L (2002)

Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 22 (6), 512-518

Yaron Y, Botchan B, Amir A, Peyser MR, David MP, Lessing JB (1994)

Endometrial receptivity in the light of modern assisted reproductive technologies.
Fertil Steril 62, 225-232

Ziegler B (1993)

Grundlagen der statistischen Methodenlehre / Bernd Ziegler. – Gernsbach: Deutscher Betriebswirte-Verlag, 1993

Zitzmann M, Rolf C, Nordhoff V, Schröder G, Rickert-Föhning M, Gassner P, Behre HM, Greb RI, Kiesel L, Nieschlag E (2003)

Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 79 (3), 32-36

9. Abkürzungsverzeichnis

AH	Assisted hatching
ART	assistierte Reproduktionstechniken
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	Estradiol
ET	Embryotransfer
EUG	Extrauterin gravidität
EZ	Eizelle(n)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GIFT	gamete intrafallopian transfer, intratubarer Gametentransfer
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
HCG	humanes Choriongonadotropin
ICSI	intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion
IR	Implantationsrate
IUI	intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
Kryotransfer	Embryotransfer nach Kryokonservierung
LH	Luteinisierungshormon
MESA	mikrochirurgische epididymale Spermatozoenaspiration
NVK	Nucleolusvorläuferkörper
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
PCOS	polyzystisches Ovar-Syndrom
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PID	Präimplantationsdiagnostik
PN	Vorkerne, Pronuklei
PR	pregnancy rate, Schwangerschaftsrate
PVS	perivitelliner Raum
PZD	partielle mechanische Zonadisektion
SS-Rate	Schwangerschaftsrate
SUZI	subzonale Spermatozoeninjektion
TESE	testikuläre Spermatozoenextraktion
VZO	Verkehr zum optimalen Zeitpunkt
ZP	Zona pellucida

10. Anhang

10.1 Verzeichnis genutzter Geräte

Aspirator 4014		Labotect GmbH Willi-Eichler-Str.25 37079 Göttingen / Germany
Brutschrank BB 6060		Heraeus Holding GmbH Heraeusstr. 12-14 63450 Hanau / Germany
Infrarotdiodenlaser OCTAX Lasershot™ System		OCTAX Microscience GmbH Hohe Strasse 700 / 5a 35745 Herborn / Germany
inverses Mikroskop Diaphot 300		Nikon GmbH Tiefenbroicher Weg 25 40472 Düsseldorf / Germany
Kryogerät CTE 800		Cryo-Technik-Erlangen GmbH Peter-Vischer-Str. 1a 91315 Höchstadt / Germany
Mikromanipulator Transfer Man		Eppendorf AG Peter-Henlein-Str. 2 50389 Wesseling-Berzdorf / Germany
Petrischale	REF 82.1473.001	Sarstedt AG & Co Rommelsdorfer Str. Postfach 1220 51582 Nümbrecht / Germany
Petrischale	REF 35 3037 REF 35 1006	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg / Germany
Pipetten	REF MIC-50-35 REF MPH-MED-35	HUMAGEN™ Charlottesville VA 22911 / U.S.A
PS-Röhrchen	REF 164 161	Greiner Bio-One GmbH Maybachstr. 2 72636 Frickenhausen / Germany
Punktionsnadel	REF 324106	Labotect GmbH Willi-Eichler-Str. 25 37079 Göttingen / Germany

Stereomikroskop		Nikon GmbH Tiefenbroicher Weg 25 40472 Düsseldorf / Germany
Transferkatheter		
COOK	REF K-SOFT-5000-PKG	Cook Deutschland GmbH Malmedyer Str. 10 41066 Mönchengladbach / Germany
Embryo Transfer Catheter Set	REF 320200	Labotect GmbH Willi-Eichler-Str. 25 37079 Göttingen / Germany
Wallace	REF 1816NST	SIMS Portex Limited CT21 6JL Hythe, Kent / UK
Unopetten	REF 365878	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 69126 Heidelberg / Germany
4-well-Schale	REF 176740	Nalge Europe Ltd Ridderstraat 26 3040 Neerijse / Belgium
Centrifuge 5804		Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Peter-Henlein-Str. 2 50389 Wesseling-Berzdorf
Datenerfassung am Computer		
RecDate		Serono GmbH Freisinger Str. 5 85716 Unterschleißheim / Germany
OCTAX EyeWare™		Medical Technology VertriebsGmbH Opalstr. 32 84032 Altdorf / Germany

10.2 Verzeichnis genutzter Chemikalien

Chymotrypsin	REF CHY-5S	Sigma ^R Eschenstr. 5 82024 Taufkirchen / Germany
DPBS	REF L1815	Biochrom AG Leonorenstr. 2-6 12247 Berlin / Germany
EmbryoFreeze TM -Propanediol	REF	FertiPro N.V. Industriepark Noord 32 8730 Beernem / Belgium
Flushing Medium	REF 1076 4125	MediCult Mollehaven 12 4040 Jyllinge / Denmark
Hyaluronidase-Lösung	REF 1011 0010	MediCult Mollehaven 12 4040 Jyllinge / Denmark
IVF TM -100-Medium	REF 10009	Vitrolife Mölnsdalsvägen 30 412 63 Göteborg / Sweden
Mineralöl	REF 45 12 00	Reproline medical GmbH Marie-Curie-Str.5 53359 Rheinbach / Germany
PVP-Medium	REF 1090 5000	MediCult Mollehaven 12 4040 Jyllinge / Denmark
Sil-Select Plus TM	REF	FertiPro N.V. Industriepark Noord 32 8730 Beernem / Belgium
Sperm Preparation Medium	REF 10700060	MediCult Mollehaven 12 4040 Jyllinge / Denmark

Lebenslauf

Von Susann Schöpf

- 11.01.1968 in Freiberg/Sachsen geboren
- September 1974 Einschulung an der Polytechnischen Oberschule in Bergen/Rügen
- März 1982 Jugendweihe
- Sept. 1982 – Aug. 1984 Besuch der Sprachklasse an der Hansa-Oberschule in Stralsund
- Sept. 1984 Aufnahme in die Erweiterte Oberschule Ernst-Moritz-Arndt, Bergen
- Juni 1986 Abitur
- Sept. 1986 – Aug. 1987 Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Bergen
- September 1987 Beginn des Medizinstudiums an der Humboldt-Universität zu Berlin
- Juni 1989 Physikum
- September 1989 Studienortwechsel nach Greifswald an die Ernst-Moritz-Arndt Universität
- September 1990 Hochzeit mit Herrn Reinhard Schöpf
- April 1992 Geburt unserer Tochter Henriette
- Okt. 1992 – März 1993 Erziehungsurlaub
- April 1993 – April 1994 Pflichtassistenz im SANA-Krankenhaus Bergen/Rügen
- 30.04.1994 Staatsexamen; Erhalt des Zeugnisses über den Hochschulabschluss
- Mai 1994 – Okt. 1995 Ärztin im Praktikum im SANA-Krankenhaus Bergen/Rügen
- 01.11.1995 Erteilung der Approbation
- November 1995 Assistenzärztin an der Frauenklinik im SANA-Krankenhaus Bergen
- Dez. 1995 – Nov. 1996 Assistenzärztin an der Frauenklinik im Kreiskrankenhaus Freiberg
- 1997 – 2001 Assistenzärztin in der Frauenklinik Bergen/Rügen

25. April 2001 Facharztprüfung, Erteilung der Anerkennung als Fachärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
- Juli 2001 Niederlassung als Fachärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Bergen/Rügen
- April 2002 Geburt unseres Sohnes Henrik

„Mein akademischer Lehrer war Herr Prof. Dr. med. Roland Sudik in Neubrandenburg.“

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Roland Sudik möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Sehr herzlich danke ich Herrn Dr. Thomas Greising für die umfangreiche Hilfe bei der Erfassung der Daten und für die wertvollen Anregungen zu inhaltlichen und formalen Fragestellungen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Klaus Hermann gebührt mein ausdrücklicher Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen der Bibliothek des Klinikums Neubrandenburg für ihre freundliche Unterstützung bei der Literaturerfassung.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis, ihre Geduld und für die moralische Unterstützung während der gesamten Zeit der Anfertigung der Arbeit.

Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Zur Bedeutung des Assisted hatching bei der Behandlung von
Kinderwunschaaren mit den Methoden der assistierten Reproduktion

in der IVF-Abteilung, Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg, in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Roland Sudik, Chefarzt der Frauenklinik, und mit Unterstützung durch Herrn Dr. Klaus Hermann, Dr. der Mathematik und Bioinformatik (Signature diagnostics AG Potsdam) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.“

Binz, den 01.02.2007

