

**Auswirkungen der Polkörperdiagnostik auf die nachfolgende Kryokonservierung  
im Vorkernstadium: Korrelation der Ergebnisse bei  
verschiedenen Kryokonservierungsmethoden**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

**vorgelegt von  
Brigitte Kolzem  
aus Bonn  
2009**

**Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. van der Ven**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Klingmüller**

**Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.**

**Tag der Mündlichen Prüfung: 24.02.2009**

**Aus dem Zentrum für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der  
Universität Bonn, Direktor: Prof. Dr. med. W. Kuhn  
Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. H. van der Ven**

## Inhaltsverzeichnis:

---

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
2.1	Einführung in die Thematik der Polkörperdiagnostik.....	7
2.2	Assistierte Reproduktion (IVF und ICSI).....	8
2.2.1	Mikroskopische Beurteilung der Eizelle im Vorkernstadium.....	12
2.2.2	Mikroskopische Beurteilung der Morphologie und Teilungsgeschwindigkeit des Embryos.....	12
2.2.3	Pränataldiagnostik (PND).....	13
2.2.4	Präimplantationsdiagnostik.....	14
2.2.5	Polkörperdiagnostik.....	16
2.3	Geschichte der Polkörperdiagnostik.....	17
2.4	Das Prinzip der Polkörperbiopsie.....	18
2.5	Indikationen zur Polkörperdiagnostik.....	20
2.6	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	21
2.7	Statistische Verfahren dieser Promotionsarbeit.....	23
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.1	<b>Kryokonservierungsmethoden: Langsames Einfrieren (Slow) und Vitrifikation.....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Langsames Einfrieren (Slowmethode).....	26
3.1.2	Vitrifikation (Schockgefrieren).....	29

## Inhaltsverzeichnis:

---

3.2	Definitionen.....	31
3.3	Durchführung der Polkörperbiopsie.....	32
3.3.1	Zeitlicher Ablauf der Polkörperbiopsie.....	32
3.3.2	Biopsiemethoden.....	34
3.3.3	Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenfehlverteilungen.....	36
3.4	Embryotransfer und Implantationserfolg.....	37
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Vergleich der gesamten Altersklasse nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen hinsichtlich der Schwangerschaftsrate .....	38
4.2	Vergleich der Kryokonservierungsmethoden (langsames Einfrieren und Vitrifikation) nach Polkörperdiagnostik in der gesamten Altersklasse (27 bis 46 Jahre) hinsichtlich der Schwangerschaftsrate.....	41
4.3	Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung in der gesamten Altersklasse (26 bis 46 Jahre). .....	45
4.4	Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen unterteilt in Altersstufen.....	48
4.5	Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik beim langsamen Einfrieren und bei der Vitrifikation in der gesamten Altersklasse (27 bis 46 Jahre).....	54
4.6	Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik beim langsamen Einfrieren und bei der Vitrifikation unterteilt in Altersklassen.....	56

## Inhaltsverzeichnis:

---

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
5.1	Polkörperdiagnostik; Methode zur genetischen Frühdiagnostik.....	62
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	66
5.2.1	Vergleich der Patientinnen nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen in der gesamten Altersklasse (26 Jahre bis 46 Jahre).....	66
5.2.2	Vergleichsdaten der langsamen Einfrieremethode und der Vitrifikation nach Polkörperdiagnostik in der gesamten Altersklasse (27 Jahre bis 46 Jahre).....	68
5.2.3	Vergleich der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen in der gesamten Altersklasse (26 Jahre bis 46 Jahre).....	70
5.2.4	Vergleich der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik bei der langsamen Einfrieremethode und bei der Vitrifikation der Eizellen in der gesamten Altersklasse (27 Jahre bis 46 Jahre) .....	72
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>85</b>

**1 Abkürzungsverzeichnis**

<b>CGH</b>	<b>Comparative genomic hybridisation (vergleichende genomische Hybridisierung)</b>
<b>EschG</b>	<b>Embryonenschutzgesetz</b>
<b>FISH</b>	<b>Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung</b>
<b>HCG</b>	<b>Humanes Choriongonadotropin</b>
<b>ICSI</b>	<b>Intracytoplasmatische Spermieninjektion</b>
<b>IVF</b>	<b>In-Vitro-Fertilisation</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)</b>
<b>PID</b>	<b>Präimplantationsdiagnostik</b>
<b>PKD</b>	<b>Polkörperdiagnostik</b>
<b>PND</b>	<b>Pränataldiagnostik</b>
<b>Slow</b>	<b>langsames Einfrieren</b>

## **2 Einleitung**

### **2.1 Einführung in die Thematik der Polkörperdiagnostik**

Die Zahl der ungewollt kinderlosen Paare ist ein zunehmendes Problem unserer Gesellschaft geworden. In Europa liegt die Zahl des unerfüllten Kinderwunsches derzeit bei circa 15 %. Auf Deutschland bezogen bleiben somit mehr als zwei Millionen Paare innerhalb eines Jahres kinderlos (Diedrich, 2003).

Die Gründe für eine ungewollte Kinderlosigkeit sind vielfältig und verteilen sich zu jeweils 40 % auf Mann und Frau.

Störungen der weiblichen Fertilität können Störungen im hypothalamisch-hypophysären Regelkreis, ovariell, tubar, uterin, zervikal und vaginal, aber auch psychisch und extragenital bedingt sein. Als häufigste hormonelle, funktionelle und organische Ursachen sind hier der Eileiterverschluss, die Funktionsstörung der Eierstöcke, die Endometriose, Myome und Gebärmutterfehlbildungen zu erwähnen (Breckwoldt und Keck, 2001).

Die männliche Infertilität kann auf Störungen im hypothalamisch-hypophysären Regelkreis und primärer Schädigung der Hoden mit Beeinflussung der Spermienproduktion beruhen; des Weiteren kommen Transportstörungen im Bereich der Samenwege, immunologische Sterilität in Form von Spermatozoenantikörpern, sowie psychische und extragenitale Ursachen in Frage (Breckwoldt und Keck, 2001).

Bei etwa 10 % der kinderlosen Paare ist die Ursache bei beiden Partnern gleichermaßen zu finden. Störungen der Interaktion in der Partnerschaft, Antikörper gegen Spermien, gestörte Samenzell-Eizell-Interaktion und Störungen in der Embryonalentwicklung können hierfür maßgebend sein.

Bei der idiopathischen Sterilität (10 %) lassen sich trotz intensiver Untersuchungen und Nachforschungen, weder beim Mann noch bei der Frau, Erklärungen für die ungewollte Kinderlosigkeit finden.

Neben den bereits erwähnten organischen, immunologischen und biologischen Ursachen können psychische Aspekte, Umweltbelastungen, Stress, Rauchen und ungesunde Ernährung die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

Nicht zu vernachlässigen ist die Rolle der gesellschaftlichen Entwicklung.

Durch die verbesserte Möglichkeit zur Verhütung entscheiden sich heutzutage viele Frauen erst für eine berufliche Karriere und in einem höheren Alter für die Planung einer Familiengründung (Griesinger et al., 2004).

Die Wahrscheinlichkeit auf natürlichem Wege schwanger zu werden beträgt selbst unter optimalen Bedingungen nur ca. 20 % pro Monatszyklus.

Die Aussichten für ein Paar durch eine medizinische Behandlung ein Kind zu bekommen, hängt von der Schwere der Fertilitätsstörung, dem Alter der Frau und der Behandlungsmethode ab.

Die derzeitigen Behandlungsmethoden variieren und können im Einzelfall von einer hormonellen Stimulation bis zur künstlichen Befruchtung reichen. Dennoch kann der Hälfte aller Paare mit einem Sterilitätsproblem durch medizinische Maßnahmen geholfen werden.

Insbesondere der Fortschritt in den Methoden der assistierten Reproduktion der In-Vitro-Fertilisation (IVF) und der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) – hat in den letzten Jahren zu einer entscheidenden Erfolgsverbesserung beigetragen.

Mit dem Einsatz der genetischen Diagnostik (Präimplantationsdiagnostik, Präkonzeptionsdiagnostik), im Rahmen einer Maßnahme der assistierten Reproduktion, kann die Erfolgsrate der künstlichen Befruchtung gegebenenfalls weiter erhöht werden.

## **2.2 Assistierte Reproduktion (IVF und ICSI)**

Die In-Vitro-Fertilisation und die intracytoplasmatische Spermieninjektion sind Methoden der assistierten Reproduktion.

Die grundlegenden Ziele einer künstlichen Befruchtung sind zum einen die Steigerung von Schwangerschaftsraten und zum anderen die Reduktion von Mehrlingsgeburten und Fehlgeburten.

Ursprünglich wurde die In-Vitro-Fertilisation mit nachfolgendem Embryotransfer für Patientinnen mit verschlossenen Eileitern (tubarer Sterilität) entwickelt. Heutzutage wird sie ebenfalls bei mittelschweren männlichen Fertilitätsstörungen, bei Endometriose und bei idiopathischer Sterilität eingesetzt.

Die Methode der extrakorporalen Befruchtung, das heißt die Vereinigung von Eizelle und Samenzelle im Reagenzglas, ist heute ein gesellschaftlich akzeptiertes Verfahren. Dabei



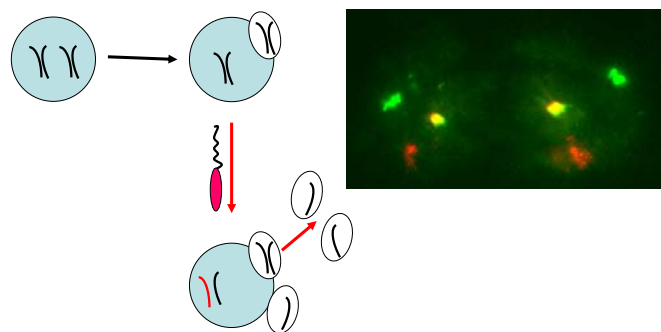
wird nach Aufbereitung des Ejakulats (Swim-up-Verfahren) die Insemination mit rund 50.000 Spermatozoen durchgeführt.

Ein männlicher und weiblicher Vorkern bilden sich innerhalb von 16 bis 18 Stunden nach Eindringen des Spermiums in die Eizelle. In diesem so genannten Vorkernstadium sind die mütterlichen und väterlichen Erbinformationen noch nicht verschmolzen, sie liegen getrennt vor. Von einer Zygote spricht man, wenn nach der Befruchtung der Eizelle durch eine Samenzelle, die Vorkerne (mit einem haploiden Chromosomensatz) miteinander verschmelzen (diploider Chromosomensatz). Sie ist das Ausgangsstadium der gesamten Embryonalentwicklung.

Eine erfolgreiche Insemination wird definiert als Vorhandensein von zwei Vorkernen sowie zwei Polkörpern.

## Biologie der Polkörper

- Bildung der Polkörper



**Abbildung 1:**

Der diploide Chromosomensatz der Eizelle wird vor der Ovulation, nachdem die Reifeteilung 1 vollendet ist, auf die Hälfte reduziert (haploider Chromosomensatz). Die eine Hälfte des Chromosomensatzes verbleibt in der Eizelle, die andere Hälfte des Chromosomensatzes wird unter der Bildung des ersten Polkörpers aus dem Zytoplasma geschleust.

Nach dem Eindringen des Spermiums in die Eizelle spalten sich die Chromosomen in zwei Chromatiden auf, wobei ein Chromatidensatz unter Bildung des zweiten Polkörpers wiederum ausgeschleust wird. Die Zahl der Chromosomen, sowie die Zahl der Chromatiden sind nun in der Eizelle und im Polkörper gleich, vorausgesetzt die Reifeteilung 1 und 2 sind regelrecht abgelaufen. Da die Polkörper erwiesenermaßen keine Bedeutung für die embryonale Entwicklung haben, stehen sie in unserem Fall der Diagnostik zur Verfügung.

Die fluoreszenzmarkierten Bilder stellen die sogenannte FISH Untersuchung dar.

Die jeweils beiden gleichfarbigen, aufleuchtenden Areale stellen den ersten geteilten Polkörper dar. Die gelben Signale zeigen das Chromosom X, die grünen Signale lassen das Chromosom 21 erkennen und die roten Signale spiegeln das Chromosom 13 wieder.

Nach Vorschriften des Embryonenschutzgesetzes (EschG) dürfen nur maximal drei Vorkernstadien weiter kultiviert und transferiert werden. Die restlichen Vorkernstadien müssen vor der Befruchtung, also vor der Verschmelzung der Vorkerne, kryokonserviert werden (EschG, 1990). Das Embryonenschutzgesetz untersagt somit die Befruchtung von mehr Eizellen als innerhalb eines Behandlungszyklus übertragen werden sollen §1(1)5, wobei „Befruchtung“ als Verschmelzung der Vorkerne definiert wird.

1978 wurde der erste Erfolg dieser Methode mit der Geburt von Louise Brown in England verbucht (Felberbaum, 2003).

In Deutschland wurde die IVF-Methode erstmals 1982 von fünf Zentren angeboten. Die damals dokumentierte Anzahl von Behandlungszyklen betrug 742 (Deutsches IVF-Register, 2003).

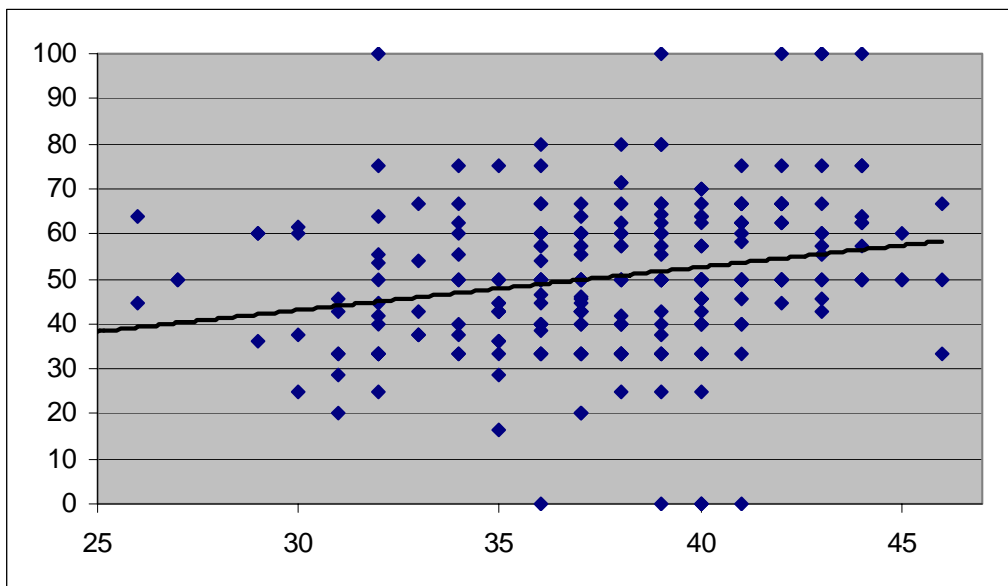
Im Jahr 2002 haben 114 deutsche Zentren die In-Vitro-Fertilisation angeboten und 28.058 durchführen können (Deutsches IVF-Register, 2003). Im Vergleich zum Jahr 1982 ist dies eine Steigerung um den Faktor 37,8.

Die intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) ist eine neuere, seit 1992 beim Menschen eingesetzte Weiterentwicklung der IVF-Methode, bei welcher eine einzige Samenzelle mit einer Mikronadel (Innendurchmesser ca. 7 µm) direkt ins Zytoplasma der Eizelle eingespritzt wird. Zur Mikroinjektion wird ein Invertmikroskop mit adaptierten Mikromanipulatoren verwendet (Montag et al., 1997).

Weltweite Erfolge hat man mit der ICSI bei Männern mit Subfertilität bis hin zu Azoospermie erzielt. Die Vorgehensweise ist für das Paar identisch mit der IVF Methode. Seit 1994 wird die ICSI in deutschen Zentren eingesetzt. Im Jahr 2002 wurde die ICSI in 112 Zentren angeboten. Die 1994 dokumentierten 5.856 Behandlungszyklen sind innerhalb von acht Jahren auf 51.389 Behandlungszyklen angestiegen (Deutsches IVF Register, 2003). Die postnatale Entwicklung, beziehungsweise das Fehlbildungsrisiko der Kinder nach assistierter Reproduktion, wurde bisher kritisch hinterfragt. Die Annahme eines erhöhten Risikos für Fehlbildungen in der Schwangerschaft und bei der Geburt nach IVF bzw. ICSI konnte bisher nicht belegt werden (Schröder et al., 2003a).

Möglicherweise steht die beobachtete erhöhte Fehlbildungsrate der In-vitro-Kultur nach IVF und ICSI in Zusammenhang mit sterilitätsassoziierten und genetischen Hintergrundrisiken der Kinderwunschpatienten (Schröder et al., 2003a).

Ein gesteigertes Abortrisiko nach assistierter Reproduktion mit dem Vorhandensein vorheriger Aborte, einem mütterlichen Alter über 35 Jahren, sowie der Implantation von kryokonservierten Eizellen konnte belegt werden (Kupka et al., 2004).



**Abbildung 2:**

Aufgetragen sind in oben dargestellter Grafik die Aneuploidierate bezüglich der Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22 und X, gegen das zunehmende Alter der Frau. Hier lässt sich deutlich erkennen, dass die Inzidenz einer Chromosomenfehlverteilung mit steigendem Alter der Frau zunimmt. Ein besonderer Anstieg der Aneuploidien ist ab dem 35.sten Lebensjahr zu verzeichnen.

**Zur Beurteilung der Eizelle bzw. des Embryos/Fetus bieten sich mehrere Möglichkeit an:**

- **Mikroskopische Beurteilung der Eizelle im Vorkernstadium (siehe Abschnitt 2.2.1)**
- **Mikroskopische Beurteilung der Morphologie und Teilungsgeschwindigkeit des Embryos (siehe Abschnitt 2.2.2)**
- **Pränataldiagnostik (siehe Abschnitt 2.2.3)**
- **Präimplantationsdiagnostik (siehe Abschnitt 2.2.4)**
- **Polkörperdiagnostik (siehe Abschnitt 2.2.5)**

### **2.2.1 Mikroskopische Beurteilung der Eizelle im Vorkernstadium**

Mit Hilfe lichtmikroskopischer Untersuchungen lassen sich im Vorkernstadium anhand der Morphologie Aussagen zur Qualität der Eizelle treffen (Montag et al., 2001).

Die prognostische Relevanz besteht in der erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine gute Embryonalentwicklung. Anhand der morphologischen Beurteilung nach dem so genannten „Pronucleus-Scoring“ kann beim Einsetzen „ideal“ eingestufte Eizellen mit bestimmten Vorkernmustern eine deutlich höhere Schwangerschaftsrate erzielt werden (37 % versus 26 %) (Montag und van der Ven, 2003).

Voraussetzung ist, dass eine solche Beurteilung innerhalb eines kurzen Zeitraumes stattfinden muss. Es können ausschließlich Beurteilungen über die Korrelation zwischen Morphologie und Entwicklung der Eizelle getroffen werden, jedoch nicht zu möglicherweise vorhandenen Chromosomenfehlverteilungen, so genannten Aneuploidien. Diese sind nur im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik oder der Polkörperdiagnostik möglich.

### **2.2.2 Mikroskopische Beurteilung der Morphologie und Teilungsgeschwindigkeit des Embryos**

Zur Beurteilung der Morphologie von Embryonen wird eine Art „Punktesystem“, ein sogenannter „Embryoscore“ genutzt, in dem optische Kriterien beurteilt werden.

Darin werden die Symmetrie und die Intaktheit der zellulären Strukturen bewertet. Hinzu kommt die Bewertung der Teilungsrate; prognostisch günstig ist eine zeitgerechte kontinuierliche Weiterentwicklung der Zygote (Montag und van der Ven, 2003).

Analog der Beurteilung der Eizellen im Vorkernstadium ist der Transfer potenter Embryonen, die weder morphologische noch zeitlich entwicklungsbedingte Auffälligkeiten zeigen, für eine Erhöhung der Schwangerschaftsrate relevant.

Nachteile dieses Verfahrens basieren auf den Richtlinien des Embryonenschutzgesetzes (EschG, 1990). Da nur maximal drei Embryonen kultiviert und somit länger beurteilt werden dürfen, ist in vielen Fällen keine Eizelle mit hohem Einnistungspotential vorhanden. Da der Transfer von nicht lebensfähigen Embryonen als nicht sinnvoll erscheint, ist es diskussionswürdig, ob eine Erhöhung der Weiterkultivierung auf mindestens sechs Eizellen im Vorkernstadium gewährleistet werden sollte (Frommel, 2002; Montag und van der Ven, 2002; Schröder et al., 2003b).

### **2.2.3 Pränataldiagnostik (PND)**

Mittels der Pränataldiagnostik können vom Zeitpunkt der Einnistung in die Gebärmutter bis zur Geburt kindliche Erkrankungen und Fehlbildungen festgestellt werden. Das bedeutet, dass jede Vorsorgeuntersuchung der Schwangeren eine Pränataldiagnostik ist. Die PND bietet in einem begrenzten Rahmen die Möglichkeit Entwicklungsstörungen des Ungeborenen zu behandeln oder sich frühzeitig gegen eine Austragung des Kindes zu entscheiden. Der daraus resultierende Ausdruck „Schwangerschaft auf Probe“ drückt die Möglichkeit eines Abortes aus (Diedrich, 2003).

Man unterscheidet die oft unzuverlässigen nicht invasiven Methoden, wozu die mütterliche Blutuntersuchung, der Ultraschall und die Kardiotokographie gehören, von den invasiven Methoden wie die:

#### **Chorionzottenbiopsie/Plazentazottenbiopsie**

Ein Zellgewinn durch Biopsie des Chorion frondosum oder der Plazenta kann in der ca. 10. bis 12 Schwangerschaftswoche erfolgen. Das Ergebnis nach einem Tag ergibt sich aus der Möglichkeit der Chromosomendarstellung aus Direkt-Präparation, das Ergebnis nach zwei bis drei Wochen aus einer Langzeitkultur.

Das Risiko einer Komplikation bei transabdominaler Punktion beträgt 0,3 % bis 0,5 % (Gloning und Brusis, 1989).

### **Amniozentese (Fruchtwasserpunktion)**

Ab der 15. Woche können fetale Zellen aus dem Fruchtwasser gewonnen werden. Das Ergebnis der Chromosomendarstellung und Virusnachweise aus der Zellkultur liegt nach zwei bis drei Wochen und eine FISH-Analyse der Chromosomen 21, 18, 13, X, Y liegt nach ungefähr einem Tag vor.

Auch hier beträgt das Eingriffsrisiko für eine Komplikation 0,3 % bis 0,5 % (Gloning und Brusis, 1989).

### **Chordonzentese (Nabelschnurpunktion)**

Ab der 20. Schwangerschaftswoche bietet sich die Möglichkeit, das fetale Blut zu untersuchen und durch Zugang zum fetalen Blut gleichzeitig die direkte Behandlung des Fetus.

Das Komplikationsrisiko beträgt 0,3 % bis 1 % (Gloning und Brusis, 1989).

Die im Zuge der PND häufig festgestellten numerischen Chromosomenfehlverteilungen (insbesondere die Trisomie 21) wären zu einem hohen Prozentsatz mit einer genetischen Diagnostik am Embryo (Präimplantationsdiagnostik, siehe Abschnitt 2.2.4), sowie mit einer Diagnostik an der Eizelle (Polkörperdiagnostik, siehe Abschnitt 2.2.5) zu diagnostizieren.

## **2.2.4 Präimplantationsdiagnostik**

Bei der PID (englisch: preimplantation genetic diagnosis, PGD) handelt es sich um eine genetische Untersuchung am Embryo vor dem Embryotransfer (Handyside et al., 1990).

Die 1990 vorgestellte Methode beruht auf der Entnahme von ein bis zwei Blastomeren im 8-bis-12 Zellstadium des menschlichen Embryos mit anschließender genetischer Diagnostik (Handyside et al., 1990).

Alternativ bietet sich die Entnahme von Zellen im Blastozystenstadium an (Veiga et al., 1997). Diese Möglichkeit ist ethisch unbedenklicher (Schonung der inneren Zellmasse),

allerdings auf dem heutigen Stand der Forschung bisher noch nicht wirklich umzusetzen (Strowitzki, 2003).

Diagnostische Methoden der PID sind modifizierte PCR Methoden (nested PCR; Fluoreszenz-PCR; multiplex PCR), sowie die Darstellung bestimmter Chromosomen mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH).

Zur Durchführung einer PID gibt es mehrere Indikationen wie die Aneuploidie-Testung, maligne Erkrankungen, besonders monogen bedingte Erkrankungen, sowie die Geschlechterwahl aus medizinischen und nichtmedizinisch indizierten Gründen.

Das bedeutet im Einzelnen, dass die Indikation grundsätzlich in zwei Indikationsgruppen eingeteilt werden kann. Es können spezifisch genetische oder chromosomale Risiken für das ungeborene Kind aufgrund der familiären Situation beurteilt werden.

Mehrheitlich wird eine PID im Rahmen einer IVF Behandlung durchgeführt, um eine Erhöhung der Geburtenrate zu erreichen. Dies erfolgt mittels der FISH Methode und es werden hauptsächlich die Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22 und X untersucht.

Weitere nichtmedizinische Indikationen beruhen in der Regel auf problematischen sozialen und kulturellen Hintergründen. Die medizinisch indizierte Geschlechterwahl wird hauptsächlich bei den bislang über 200 X-chromosomalen identifizierten Erbkrankheiten eingesetzt (Handyside et al., 1990).

Weltweit sind es mehr als 100 Zentren, die die Präimplantationsdiagnostik anbieten. In Europa ist die PID am Embryo in Deutschland, Irland, Österreich und der Schweiz gesetzlich verboten bzw. nicht Gesetzes-konform durchführbar.

Nach dem Embryonenschutzgesetz ist in Deutschland die genetische Untersuchung von totipotenten Embryonalzellen (Zellen bis zum 8-Zell-Stadium) untersagt, eine Diagnostik an Zellen im pluripotenten Stadium, somit dem Blastozystenstadium, ist nach §1, I Nr.2 und §2, I Nr.2 des EschG rein rechtlich erlaubt. Die Unantastbarkeit der Menschenwürde, die im Grundgesetz (Artikel 1 Absatz 1 Satz 2 GG) verankert ist, steht hier im politischen Diskussionsmittelpunkt.

Ein besonderer Vorteil der PID ist die Detektion schwerwiegender genetischer Erbkrankheiten, die eine sehr hohe familiäre Belastung mit sich führen.

Immer wieder gibt es Paare, die besonders aus soziokulturellen und religiösen Gründen keinen indizierten Schwangerschaftsabbruch akzeptieren oder keine „Schwangerschaft auf Probe“ eingehen möchten und somit in der PID eine andere Alternative finden (Hardy und Handyside, 1992).

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass mit Hilfe der PID Rückschlüsse auf die Störungen des paternalen Erbgutes sowie eventuelle Fehlvorgänge während der Meiose und Zygotenbildung möglich sind (Gianaroli et al., 1997).

Der Nachteil des PID Verfahrens ist, dass es nicht bei einer Beobachtung des Embryos bleibt, sondern in Form von Zellentnahmen zu einem Eingriff in dessen Substanz kommt (Koch, 2003). Die Schutzbedürftigkeit des ungeborenen Lebens, sowie die Verfügung über den Menschen und dessen Würde ist unter ethischen Aspekten nicht zu ignorieren (Hüppe, 2003). Zudem ist die Anzahl der Kinder, die nach einer PID geboren wurden, nicht groß genug, um eine endgültige Aussage über die eventuellen Folgen dieses Eingriffs bezüglich der Entwicklung treffen zu können. Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2007 zur Wertigkeit der PID im Rahmen der Aneuploidie-Testung hat diese Diskussion zusätzlich angefacht (Mastenbroek et al., 2007; siehe auch Stellungnahmen: Cohen & Grifo, 2007; Munne et al., 2007; Montag & van der Ven, 2007).

### 2.2.5 Polkörperdiagnostik (PKD)

Die Polkörperdiagnostik wird zum indirekten Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenstörungen in der menschlichen Eizelle eingesetzt. Eine Erfassung monogener Erkrankungsbilder ist nur eingeschränkt möglich. Die Diagnose erfolgt über den ersten und zweiten Polkörper, nach dem Eindringen des Spermiums in die Eizelle und spielt für die weitere Entwicklung des Embryos keine Rolle (Montag et al., 2002).

Um eine PKD durchführen zu können, ist eine In-Vitro-Fertilisation mit intracytoplasmatischer Spermieninjektion notwendig. Eine invasive Manipulation am Embryo ist nicht erforderlich. Untersucht wird die Eizelle während des Vorkernstadiums unter partieller Eröffnung der Zona pellucida. Daher wird die PKD auch als Präfertilisationsdiagnostik bezeichnet (Montag et al., 2002). Eine Alternative ist diese



Untersuchung für diejenigen Länder, in denen aufgrund gesetzlicher Bestimmungen keine Embryobiopsie durchgeführt werden darf (Deutschland, Schweiz, Österreich, Italien).

Damit das Embryonenschutzgesetz nicht tangiert wird, muss die PKD in einem engen Zeitfenster stattfinden: nach der ICSI und vor dem Verschmelzen der Vorkerne (ca. 20 Stunden).

Für die Analyse des 2. Polkörpers steht ein Zeitraum von ca. 12 Stunden zur Verfügung. Für die Diagnostik monogenetischer Dispositionen ist es erforderlich den ersten und zweiten Polkörper zu untersuchen. Die Diagnose des zweiten Polkörpers lässt eine genetische Beurteilung der Vorkernstadien zu, welche im ersten Polkörper in Betracht der untersuchten Marker heterozygot waren.

Der Einsatz von einer ICSI ist bei den molekulargenetischen Untersuchungsmethoden wie der Präimplantationsdiagnostik und Polkörperdiagnostik unerlässlich.

### **2.3 Geschichte der Polkörperdiagnostik**

Das erste Mal wurde die Methode der Polkörperdiagnostik im Rahmen einer assistierten Reproduktion im Jahre 1990 von der Arbeitsgruppe Yuri Verlinsky et al. in Chicago vorgestellt (Verlinsky et al., 1990). Seitdem hat die Arbeitsgruppe, als Vorreiter auf diesem Gebiet der genetischen Diagnostik an der menschlichen Eizelle, nahezu 5000 Behandlungszyklen zu verzeichnen.

Die Polkörperdiagnostik wird international zur Detektion von numerischen Chromosomenfehlverteilungen (Aneuploidien) und strukturellen Chromosomenstörungen (Translokationen), sowie monogenen Erkrankungen der Eizelle genutzt. In der Regel erfolgt eine Absicherung der gestellten Diagnosen mit der Präimplantationsdiagnostik. In Deutschland wird die Polkörperdiagnostik im Rahmen der künstlichen Befruchtung in über 20 Zentren angeboten. Die Hauptgruppe, bei der die Indikation für eine Polkörperdiagnostik gestellt wird, sind Frauen im fortgeschrittenen reproduktiven Alter (> 35 Jahre), da die Häufigkeit von Chromosomenfehlverteilungen mit zunehmendem mütterlichen Alter steigt. Hier werden numerische Chromosomenstörungen untersucht.

Seit 1997 beschäftigt sich eine Arbeitsgruppe an der Frauenklinik der Universität Bonn mit der Polkörperdiagnostik. Seit Mai 2001 wird nach ausreichender tierexperimenteller Vorarbeit und positivem Ethikvotum die Polkörperdiagnostik klinisch angewandt. Die erste Geburt nach einer Polkörperdiagnostik in Deutschland wurde von den Mitarbeitern der Bonner Universitätsklinik mitgeteilt (van der Ven et al., 2002).

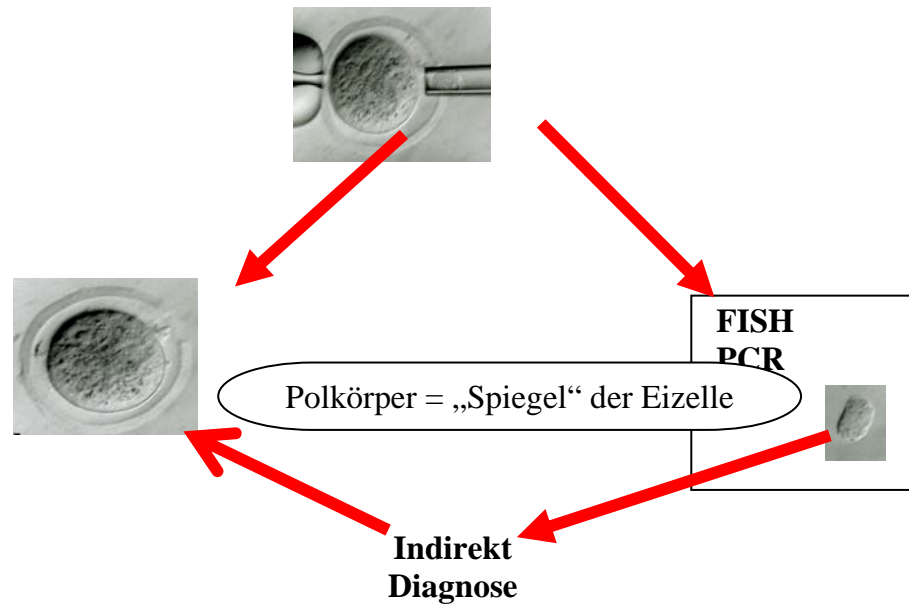
## **2.4 Das Prinzip der Polkörperbiopsie**

Die Polkörperdiagnostik erlaubt eine indirekte Aussage über die genetische Beschaffenheit der Eizelle durch Biopsie und Analyse der Polkörper (Montag et al., 2003).

Bei der ersten Reifeteilung der Eizelle, der Meiose I, kommt es zur Reduktion vom diploiden Chromosomensatz zum haploiden/einfachen Chromosomensatz. Ein einfacher Chromosomensatz bleibt in der Eizelle, währenddessen der zweite einfache Chromosomensatz unter Bildung des ersten Polkörpers ausgeschleust wird.

Nach Befruchtung der Eizelle, durch Eindringen des Spermiums in die Eizelle, erfolgt die Meiose II, bei der jedes Chromosom in zwei Schwesterchromatiden aufgespaltet wird. Es verbleibt wiederum ein Chromatidensatz in der Eizelle, während der zweite Chromatidensatz unter Bildung des zweiten Polkörpers ausgeschleust wird.

Im Normalfall sind die Anzahl der Chromosomen beziehungsweise der Chromatiden im ersten Polkörper und in der Eizelle gleich. Im zweiten Polkörper ist im gesunden Zustand je eine Chromatide vorhanden. Das bedeutet, dass sich Polkörper und Eizelle wie „Bild und Spiegelbild“ verhalten und sich durch Biopsie der Polkörper und Darstellung derer Chromosomen und Chromatiden Rückschlüsse auf die der Eizelle ziehen lassen (Montag et al., 2002).



**Abbildung 3:**

Im obersten Bild sehen wir die laserassistierte Eröffnung der Zona pellucida der Eizelle, vor der Biopsie des ersten Polkörpers zur nachfolgenden FISH Untersuchung. Die Eizelle verbleibt in der Kulturlösung (linkes Bild). Der Polkörper als „Spiegelbild“ der Eizelle (rechtes Bild) lässt eine indirekte Aussage über die chromosomale Konstitution der Eizelle zu. Wenn zum Beispiel im Polkörper ein Chromosom mehr als normal vorhanden ist, dann bedeutet dies, dass ein Chromosom in der Eizelle fehlt und in einem heranwachsenden Embryo würde sich somit eine Monosomie für dieses Chromosom entwickeln.

Man hat herausgefunden, dass sich 77,1% der Chromosomenfehlverteilungen in der Meiose I entwickeln und 22,9% in der Meiose II (Verlinsky und Kuliev, 1996). Lässt sich im Rahmen der Aneuploidie-Testung im Polkörper ein überschüssiges Chromosom beziehungsweise Chromatid darstellen, kann man auf eine Monosomie in der befruchteten Eizelle schließen. Analog dazu muss beim Fehlen eines Chromosoms beziehungsweise Chromatids im Polkörper dieses während der vorangegangenen Meiose in der Eizelle verblieben sein. Nach einer Befruchtung der Eizelle würde man eine Trisomie vorfinden. Fehlende Chromosomen beziehungsweise Chromatiden in Polkörpern, mit daraus resultierenden Aneuploidien der Eizelle (meist Trisomien), findet man häufiger als umgekehrt (Kuliev et al., 2003).

Rein prozentual reduziert sich allein bei der Untersuchung des ersten Polkörpers und dessen Chromosomenverteilung die Aneuploidierate der gebildeten Embryonen um mindestens zwei Drittel (Kuliev et al., 2003a; Munne´ et al., 1995).

Bei einem Drittel der Aneuploidien lassen sich die Fehlverteilungen während der Meiose II, somit bei der Diagnostik des zweiten Polkörpers, finden. Da zum Teil noch Fehlverteilungen aus der Meiose I resultieren, lassen sich bei der Meiose II häufiger Chromatidfehlverteilungen, als komplette Chromosomenfehlverteilungen finden (Chromatid/Chromosomenfehlerrate 9:1) (Kuliev et al., 2003a).

Im Ausland und in wenigen Zentren in Deutschland wird die Polkörperdiagnostik zusätzlich zur Detektion monogener Erbkrankheiten (meist x-rezessive und autosomal-rezessive Erbkrankheiten) eingesetzt. Der Grund dieser Detektion ist, dass bestimmte Patientinnen als Konduktoren (d. h. heterozygot für eine rezessive Erbkrankheit sind und somit phänotypisch unauffällig) für das rezessive Gen fungieren. Findet sich nun im Polkörper eine homozygote Form des entsprechend krankmachenden Gens, ist die heterozygote Form des Gens während der Reifeteilung in der Eizelle verblieben. Diese befruchtete Eizelle wäre prinzipiell für den Transfer geeignet (Verlinsky et al., 1994; Verlinsky und Kuliev, 1996).

Da die Fehldiagnosen aber relativ häufig vorkommen, werden diese Indikationen in der Regel mit einer Präimplantationsdiagnostik abgesichert (Montag et al., 2003).

## **2.5 Indikationen zur Polkörperdiagnostik**

Eine Polkörperdiagnostik dient in der Regel im Rahmen einer assistierten Reproduktion dem indirekten Nachweis von Chromosomenfehlverteilungen in der menschlichen Eizelle, unter Vermeidung einer invasiven Manipulation am Embryo.

Die Polkörperdiagnostik wird insbesondere bei Patientinnen eingesetzt, die über 35 Jahre alt sind und/oder mehrere Aborte in der Anamnese angeben, schon bereits erfolglose Embryotransfers (im Rahmen einer ICSI/IVF Behandlung) hatten, Aneuploidien oder Translokationen bei der Frau in der Vorgeschichte bekannt sind.

In diesem Rahmen kann die Polkörperdiagnostik zur Verbesserung der Schwangerschafts- und Geburtenrate beziehungsweise zur Minimierung der Abortrate führen (Verlinsky et al., 1996, 1998; van der Ven et al., 2008).

Schließlich bietet sich mit der PKD eine Alternative für die Patientinnen, die die belastende PND umgehen möchten, aber dennoch eine, wenn auch eingeschränkte, genetische Diagnostik wünschen (Ludwig et al., 2001; Schwinger, 2004; Verlinsky und Kuliev, 1996).

## **2.6 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit**

Nach Polkörperdiagnostik wurde bei Patientinnen mit ausreichender Anzahl an chromosomal unauffälligen Eizellen eine Kryokonservierung im Vorkernstadium vorgenommen. Es bestand somit die Möglichkeit bei nur einem Zyklus die überzähligen, chromosomal unauffälligen, Eizellen für einen späteren Embryotransfer einzufrieren. Dies ersparte den Patientinnen einen weiteren Behandlungszyklus inklusive der medikamentösen Vorbehandlung und der invasiven Follikelpunktion.

Ziel dieser retrospektiven Promotionsarbeit war es, mittels Vergleich zwei verschiedener Kryokonservierungsmethoden und des Frischzyklus, bei Patientinnen nach einer Polkörperdiagnostik verschiedene Indikations- bzw. Fragestellungen herauszuarbeiten.

Insbesondere stellte sich die Frage, ob die Kryokonservierung als zusätzliche Maßnahme nach PKD Sinn macht und welche Kryokonservierungsmethode die Bessere ist. Hintergrund war, dass durch die Entnahme der Polkörper eine permanente Eröffnung in der Zona pellucida erzeugt wird, die möglicherweise Einfluss auf das kryobiologische Verhalten der Eizellen hat.

Die Konservierung der Eizellen (in der Frauenklinik Bonn) geschah mit Hilfe von Stickstoff in Form von zwei unterschiedlichen Kryokonservierungsmethoden, wobei es sich bei der ersten um die herkömmliche langsame Einfriermethode (Slow Methode) und bei der zweiten um die Vitrifikationsmethode (Schockgefrieren) handelte.

Die beiden Einfriermethoden wurden hinsichtlich verschiedener Prüfgrößen wie Degeneration und Arretierung der Eizellen nach dem Auftauen, Eizellentwicklung, Schwangerschaftsrate und Einfluss des mütterlichen Alters verglichen.

Die statistischen Daten dieser Studie wurden aus einem Patientinnenkollektiv ermittelt, das sich im Rahmen eines unerfüllten Kinderwunsches nach bereits mehrmaliger künstlicher

Befruchtung, in dem Zeitraum von 2001 bis 2007, an der Bonner Universitäts-Frauenklinik zur Polkörperdiagnostik einfindet und erfasst wurde. Alle erhobenen Daten wurden aus einer Datenbank, mit in Bonn durchgeführten Behandlungszyklen, ermittelt. Insgesamt wurden in die Studie 74 Patientinnen mit 90 Frischzyklusbehandlungen und 101 Kryozyklen eingeschlossen.

Vor Durchführung der Behandlung wurden die Patientinnen umfassend humangenetisch, andrologisch, zytogenetisch und gynäkologisch abklärend untersucht (Montag et al., 1997).

Indikationen zur Durchführung einer Polkörperdiagnostik waren vorangegangene Schwangerschaften mit habituellen Aborten, bekannte Aneuploidien oder Translokationen in der Vorgeschichte, sowie eine ausbleibende Schwangerschaft nach drei oder mehr vorangegangenen Embryotransfers mit qualitativ geeigneten Embryonen (Montag et al., 2003).

### **Vorbehandlung**

Um die Patientinnen auf die bevorstehende Follikelpunktion mit anschließender Gewinnung von durchschnittlich sechs bis acht Eizellen pro Zyklus vorzubereiten, bieten sich verschiedene Methoden an. Die ovarielle Stimulation, die Ovulationsinduktion, die Unterstützung der Lutealphase. Zur Verbesserung der Ergebnisse werden die Spermatozoen aufbereitet (Montag et al., 1997). Die Methoden sind grundlegend für eine IVF Behandlung und wurden bereits mehrfach beschrieben.

**Fragestellungen, die sich bei der Studie ergaben, sind:**

1. **Inwieweit spielt das mütterliche Alter für den Erfolg der assistierten Reproduktion nach Polkörperdiagnostik bei den verschiedenen Einfriermethoden und bei der In-Vitro-Fertilisation im Frischzyklus eine Rolle?**

2. **Wie verhält sich die serologische und klinische Schwangerschaftsrate beim frischen Embryotransfer verglichen mit dem Embryotransfer nach Kryokonservierung der Vorkerneizellen, bei vorheriger Polkörperdiagnostik?**
3. **Gibt es Unterschiede bei den Überlebensraten der Vorkerneizellen (Arretierung und Degeneration) nach dem Auftauen in beiden untersuchten Kryokonservierungsmethoden (langsames Einfrieren und Vitrifikation)?**
4. **Gibt es eine Korrelation bei der Embryoentwicklung in Bezug auf die Blastomerenstadien, Qualität, Score und mütterlichem Alter in beiden unterschiedlichen Kryokonservierungsmethoden versus Frischzyklusverfahren ?**

## **2.7 Statistische Verfahren dieser Promotionsarbeit**

Die Daten wurden in der Bonner Universitäts-Frauenklinik erhoben. Mit Hilfe von handschriftlichen Dokumentationen wurden Patientendaten erfasst und in eine Tabellenkalkulation eingegeben (Microsoft Excel, Office Paket 2003).

Es wurden Tabellenkalkulationen von Polkörper Untersuchungen bei Patientinnen nach einem Frischpunktionszyklus und bei Patientinnen nach einem Kryokonservierungszyklus miteinander verglichen. Weiterhin wurden zwei verschiedene Kryokonservierungsmethoden gegenübergestellt, das langsame Einfrieren und die Vitrifikation. Die daraus resultierenden drei Stammtabellen bildeten die Grundlage für die anschließenden statistischen Testverfahren.

**Folgende Kriterien waren für die retrospektive Studie entscheidend:**

- **Mütterliches Alter**
- **Behandlungsverfahren (Frisch, langsames Einfrieren, Vitrifikation)**
- **Anzahl der überlebenden Eizellen nach dem Auftauen**
- **Anzahl der degenerierten und arretierten Eizellen**
- **Anzahl der chromosomal unauffälligen Eizellen**
- **Entwicklung der Embryonen (Blastomerenstadium, Qualität, Score)**
- **Anzahl der Embryotransfers**
- **Schwangerschaftsraten (Anzahl und Ausgang: serologische und klinische Schwangerschaften, Abort, Geburt)**

**Zur Auswertung dieser Daten sind statistische Methoden genutzt und Signifikanzprüfungen durchgeführt worden. Dabei wurde die Fehlerwahrscheinlichkeit  $p$  anhand der angegebenen Daten berechnet und mit der vorgegebenen Fehlerwahrscheinlichkeit  $\alpha$  verglichen.**

**Zur Anwendung kamen folgende mathematische Verfahren für unabhängige Stichproben:**

- **Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen**
- **Berechnung von Medianen**
- **Welch-Test (2-Stichproben-t-Test für unverbundene Stichproben für unterschiedliche Varianzen)**
- **Vierfelder- $\chi^2$ -Test für unverbundene Stichproben**

**Die Ermittlung des Median bezog sich auf die Prüfgröße „mütterliches Alter“.**

**Die Berechnung Mittelwert und Standardabweichungen zielten auf folgende Prüfgrößen ab: Anzahl der überlebenden Eizellen nach dem Auftauen, Anzahl der Embryotransfers, Anzahl der degenerierten und arretierten Eizellen und die Anzahl der chromosomal unauffälligen Eizellen. Des Weiteren wurde damit der Unterschied zwischen den Frisch-**



beziehungsweise Einfriermethoden, der Abstieg oder Anstieg des mütterlichen Alters und der Schwangerschaftsrate beurteilt.

Der Welch-Test für unverbundene Stichproben diene dem Vergleich folgender Prüfgrößen: Anzahl der Embryonen pro Transfer, Anzahl der punktierten Eizellen, mütterliches Alter, Vergleichsdaten der verschiedenen Methoden (Frischzyklus und nach Kryokonservierung), Entwicklung der Embryonen, Anzahl der überlebenden Eizellen nach dem Auftauen, Schwangerschaftsraten, Anzahl der degenerierten und arretierten Eizellen, Anzahl der chromosomal unauffälligen Eizellen.

Dieser Test nimmt an, dass die Mittelwerte zweier Datensätze unterschiedlich sind und daraus resultierend ein signifikanter Unterschied besteht. Somit lässt sich mit Hilfe des Welch-Tests bestimmen, ob die Mittelwerte zweier Stichproben gleich sind und es können Aussagen zur Signifikanz des Untersuchungsergebnisses getroffen werden.

Der Vierfelder- $\chi^2$ -Test wurde bei folgenden Prüfgrößen angewandt:  
verschiedene Zyklen (frisch und kryokonserviert), Schwangerschaften (serologisch, klinisch, Abort, Geburt).

Dabei wurden die errechneten kritischen Werte der Prüfgrößen mit dem zu  $\alpha$  gehörigen kritischen Wert  $k_\alpha$  verglichen, um Aussagen zur Signifikanz des Untersuchungsergebnisses zu machen.

Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde mit  $\alpha = 5\%$  (= 0,05) festgelegt.

Werte zwischen  $p < 0.1$  und  $p > 0.05$  wurden als Trend bezeichnet.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Kryokonservierungsmethoden: Langsames Einfrieren und Vitrifikation**

Die Kryokonservierung ist heutzutage innerhalb der Reproduktionsmedizin ein integriertes Behandlungskonzept.

Das herkömmliche langsame Einfrieren (Slow) ist seit nahezu zwanzig Jahren etabliert. Neuere Verfahren wie die Vitrifikation rücken allerdings zusehends in den Vordergrund. Die erste Schwangerschaft nach dem Einfrieren und wieder Auftauen eines menschlichen Embryos wurde 1983 mitgeteilt (IVF Register, 1996-2006).

##### **3.1.1. Langsames Einfrieren (Slow)**

Beim langsamen Einfrieren werden die Vorkernstadien stufenweise langsam eingefroren. Die dazu benötigten qualitätsuntersuchten Medien bestehen aus drei verschiedenen Phasen. Bei den, dieser Arbeit zu Grunde liegenden, Einfrier- und Auftauzyklen, wurden die Kryokonservierungsprodukte der Firma Vitrolife verwendet. Sie bestehen aus drei unterschiedlichen Lösungen. Der erste Schritt erfolgt mit einer gepufferten Salzlösung (PBS), die mit einem Antibiotikum versetzt ist, im zweiten Schritt wird eine 1,5 molare-1,2 Propandiol Lösung eingesetzt, im dritten Arbeitsschritt kommt eine 1,5 molare-1,2 Propandiol und eine 0,1 molare Saccharose Lösung zur Anwendung.

Durch die kryoprotektive Lösung, speziell durch den Zusatz von Saccharose, wird den Vorkernen die Flüssigkeit entzogen, welches die intrazelluläre Kristallisation verhindert und damit die Destruktion des Zellinhaltes vermeidet.

Die Kryoprotektiva werden zu je 400 µl in Vierwellschalen pipettiert.

Die gewonnen Vorkerne werden in jeder der drei Lösungen je fünf Minuten belassen, wobei die Lösungen selber auf einer mit ca. 37 Grad beheizten Arbeitsplatte stehen.

Ein sogenannter „Kryostraw“ (Halm) wird mit der letzten kryoprotektiven Lösung vorgefüllt; im Anschluss daran werden maximal zwei Eizellen im Vorkernstadium in den vorgefüllten Halm pipettiert.

Der Halm wird an einer Seite mit einer kleinen Metallkugel verschlossen und an der anderen Seite mit Hilfe einer Wärmepinzette oder eines Ultraschallgerätes verschweißt, damit nichts entweichen oder hinzugefügt werden kann.

Der Einfriervorgang wird durch das Einfriergerät, CTE 920 (Cryotechnik Erlangen), welches konstante Abkühlraten sichert, ausgeführt.

Dieses Gerät ist an einen Drucker angeschlossen, der während des gesamten Einfriervorganges den Verlauf in Form eines Zeit- und Temperaturprotokolls dokumentiert.

Der Halm wird nun in das Stativ des eigentlichen Kryokonservierungsgerätes, welches mit einem Temperatursensor versehen ist, eingespannt.

Der Sensor zeigt die aktuelle Temperatur an und ist in einen Regelkreis für das automatische Einfrieren eingebunden.

Die Flüssigphase des Stickstoffs, welche in eine Gasphase transformiert wird und sich am Boden des Behälters befindet, beträgt ca. -196 Grad.

Der Stativkopf senkt sich langsam ab und wird nach vorgegebener Zeit immer mehr in Richtung Flüssigphase, d. h. in die kältere Phase eingetaucht.

#### Schritte des Einfrierens:

Die Halme werden zunächst bei Raumtemperatur eingespannt und im Anschluss bei

1. -5 Grad Celsius pro Minute bis -4 Grad Celsius abgesenkt
  2. -2 Grad Celsius pro Minute bis -4 Grad Celsius abgesenkt
  3. -1 Grad Celsius pro Minute bis -5 Grad Celsius abgesenkt
  4. -0,5 Grad Celsius pro Minute bis -6 Grad Celsius abgesenkt
  5. Automatischer Seedingprozess für 10 Minuten bei -6 Grad Celsius (das ist die Temperatur, bei der die Kryoprotektoren die Bildung von Eiskristallen initiiert).
  6. - 0,3 Grad Celsius pro Minute bis -30 Grad Celsius abgesenkt, danach erfolgt
  7. direktes Überführen in flüssigen Stickstoff.
- Der Einfriervorgang ist beendet.

Die Halme werden noch einmal auf ihre vollständige Beschriftung überprüft und in flüssigem Stickstoff (-140 bis -196 Grad Celsius) in einem speziellen Container, welcher durch Türme und Schubladen unterteilt und sortiert ist, gelagert.

### **Auftauen beim langsamen Einfrieren**

Die Halme werden zunächst aus dem Stickstoffcontainer in 37 Grad Celsius warmer isotonomischer Kochsalzlösung geschwenkt und somit aufgetaut (30 bis 60 Sekunden).

Die Verschweißung an dem einen Ende und die Metallkugel am anderen Ende werden entfernt und die Lösung mit den Vorkernstadien wird aus dem Halm gespült. Die aufgetauten Vorkerneizellen werden in die erste Auftaulösung überführt.

In Ergänzung zum Freezing Kit wird beim Auftauen das Thawing Kit von der Firma Vitrolife verwendet. Dieses besteht aus vier unterschiedlichen Lösungen. Im ersten Schritt bestehend aus einer 1,0 molaren 1,2 Propandiol Lösung und einer 0,2 molaren Saccharose Lösung in einer gepufferten Salzlösung (PBS), im zweiten Schritt aus einer 0,5 molaren 1,2 Propandiol Lösung und einer 0,2 molaren Saccharose Lösung in PBS, im dritten Schritt aus einer 0,2 molaren Saccharose Lösung in PBS und im vierten Schritt aus einer PBS.

Da die oben genannten Lösungen bei längerer Anwendung toxisch wirken, muss in sehr zügigen Schritten gearbeitet werden. Andererseits schützt die Flüssigkeit die Vorkerne vor Degeneration (Es verhindert die osmolaren Schwankungen).

Während des Durchlaufens der einzelnen Lösungen, was für je 5 Minuten bei 37 Grad Celsius geschieht, werden die Vorkerne auf Degeneration und Arretierung beobachtet.

Falls die Zellen ohne Schäden überlebt haben, werden sie für 2 bis 4 Tage in ein bikarbonathaltiges Kulturmedium gebracht und in den Brutschrank (bei 6 % CO<sub>2</sub> Begasung) gestellt.

Bis zum Embryotransfer werden sie täglich auf Vitalität, Teilung und Qualität beurteilt.

### 3.1.2 Vitrifikation (Schockgefrieren)

Bei der Vitrifikation wird die langsame Phase des Einfrierens umgangen und ohne zusätzliche Gerätschaften „Schock“ eingefroren. Bei dieser Methode wird die Bildung von Eiskristallen verhindert. Die Proben werden aus dem flüssigen Zustand sofort in einen glasartigen Zustand überführt. Bevor die Proben verfestigt werden benötigen sie einen Zusatz von verschiedenen Kryoprotektoren.

Man unterscheidet permeable von nicht permeablen Stoffen. Als wichtiger und nicht permeabler Kryoprotektor ist die Saccharose zu erwähnen.

Saccharose hat einen Dehydrierungseffekt (osmotische Komponente) und kann nicht durch die Zytoplasmamembran hindurch, weil das Molekül zu groß ist.

Weitere Polymere in der Lösung dienen als rein physikalische Kryoprotektoren, weil sie, wie oben erwähnt, zu groß sind, das heißt sie verschließen die Membranporen der Zellmembran mechanisch.

Weitere Protektoren sind z. B. Polivinylpirolidon (PVP 10.000), Polyethylenglykol, Polyethylenoxid.

Als permeable Kryoprotektoren seien Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylenglykol 40 % (mit hydrophilen und hydrophoben Anteilen), Propandiol und Glycerol zu nennen.

#### Einfriervorgang bei der Vitrifikation:

Beim Einfriervorgang werden die entnommenen Vorkerneizellstadien mit einer kryoprotektiven Lösung, bestehend aus 20 % Dimethylsulfoxid, 20 % Ethylen Glykol und einer osmotisch aktiven, aber nicht permeablen 0,75 mol/l Sucrose Lösung (in der Uni-Frauenklinik Bonn verwendeter Kryoprotektor) in vier einzelnen Schritten und für unterschiedliche Zeiten bei Raumtemperatur für die bevorstehende Schockgefrierung versetzt.

1. in einer 20 prozentigen Lösung verbleiben die Eizellstadien für 2 Minuten
2. in einer 33 prozentigen Lösung verbleiben die Eizellstadien für 1 Minute
3. in einer 50 prozentigen Lösung verbleiben die Eizellstadien für 1 Minute
4. in einer 100 prozentigen Lösung verbleiben die Eizellstadien für 30 bis 50 Sek.
5. Beladen der Halme mit den Eizellen
6. direktes Überführen der Halme mit Vorkerneizellstadien in flüssigen Stickstoff.

Das Volumen der Vitrifikationslösung in den Halmen beträgt 0,5 µl bis 1,0 µl, das Gesamtvolumen eines solchen Halms beträgt 0,2 ml. Dieser mit der Vitrifikationslösung und den Eizellen im Vorkernstadium befüllte Halm, wird in einen 0.5 ml großen äußeren Halm gesteckt. Dieser wird an beiden Enden durch ein Ultraschallschweißgerät hermetisch verschlossen. Durch diese Art Abdichtung der Halme wird jegliche Art von Kontamination verhindert.

Nach der Präparation werden die Halme umgehend in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Durch die „Halm in Halm“- Methode wird eine Einfriergeschwindigkeit von ca. -600 Grad Celsius pro Minute erreicht.

Die doppelt eingeschweißten Vorkerneizellstadien werden sofort in einen speziellen Lagerbehälter überführt.

### **Auftauen bei der Vitrifikation**

Beim Auftauen der Halme werden diese zunächst aus den Stickstoffcontainern/Vaporen entnommen und bei einer Geschwindigkeit von 2000 Grad Celsius pro Minute bei Raumtemperatur aufgetaut.

Dies geschieht in folgenden Schritten. Der äußere Halm wird, noch während er im flüssigen Stickstoff taucht, an einem Ende mittels einer Schere von der Schweißnaht befreit; anschließend wird mit einer feinen Pinzette der innere Halm entnommen und zunächst in eine 0,5 molare Saccharoselösung eingebracht. Die Flüssigkeit steigt nach oben und die Konzentration der Kryoprotektoren verdünnt sich. Danach werden die Vorkerneizellstadien aus den Halmen in die unten aufgezählten absteigenden hypertonen Saccharoselösungen gebracht, um die permeablen Kryoprotektoren sukzessive auszuwaschen.

Dies geschieht in 2 Minuten Abständen, bei jeweils um die Hälfte reduzierter Konzentration von Saccharose.

2 Minuten in einer 0,50 molaren Saccharose Lösung in 600 µl

2 Minuten in einer 0,25 molaren Saccharose Lösung in 600 µl

2 Minuten in einer 0,12 molaren Saccharose Lösung in 600 µl

2 Minuten in einer 0,06 molaren Saccharose Lösung in 600 µl

2 Minuten in einer 0,03 molaren Saccharose Lösung in 1200 µl

Anschließend werden die Vorkerne noch einmal mit einem isotonen Kulturmedium ausgewaschen.

Direktes Auftauen und Rehydratation würden letale osmotische Zustände hervorrufen.

Die entsprechend präparierten Vorkerne verbleiben nun 2-3 Tage im Inkubator (6% CO<sub>2</sub> Begasung) und werden täglich auf Vitalität, Teilung und Qualität überprüft, bevor sie transferiert werden.

Bei der Vitrifizierung ist besonders darauf zu achten, dass das Auftauen schnell erfolgt.

Das schnelle Auftauen ist in diesem Fall wichtiger als das schnelle Einfrieren.

Ebenfalls von besonderer Wichtigkeit ist das Einhalten des Kontaminationsschutzes.

### **3.2 Definitionen**

#### **Embryonen pro Transfer :**

Summenzahl der zurückgesetzten Embryonen pro Transfer im Rahmen eines Behandlungszyklus.

#### **Serologische/Biochemische Schwangerschaft:**

Als serologische Schwangerschaft wird derjenige Zustand bezeichnet, in dem zunächst ein positiver HCG Wert (human chorionic gonadotropine) im Urin und im Blutserum (mittels RIA, ELISA) nachgewiesen werden kann, der dann innerhalb von 2 bis 4 Tagen abfällt, ohne dass eine Fruchthöhle nachzuweisen ist.

#### **Klinische Schwangerschaft:**

Von einer klinischen Schwangerschaft spricht man per definitionem, wenn vier Wochen nach dem Embryotransfer sonografisch eine Fruchthöhle nachzuweisen ist.

**Abort:**

**Vorzeitige Beendigung einer klinischen Schwangerschaft (spontan oder durch entsprechende Indikation, indizierter Abort).**

**Eizellen im Arrest:**

**Eine Eizelle im Arrest bedeutet, dass die Eizelle während der Entwicklung inne gehalten und sich nicht weiter entwickelt hat.**

**Degenerierte Eizellen:**

**Eine degenerierte Eizelle ist zu Beginn des Entwicklungsprozesses zu Grunde gegangen.**

**3.3 Durchführung der Polkörperbiopsie****3.3.1 Zeitlicher Ablauf der Polkörperbiopsie**

**Das Embryonenschutzgesetz gibt ein zeitlich begrenztes Fenster des Ablaufes bei der Polkörperdiagnostik vor (EschG, 1990; Montag et al., 2004a).**

**Das Zeitfenster beginnt somit mit der ICSI, der intracytoplasmatischen Spermieninjektion, der Imprägnation der Eizelle. Es bleiben dem Untersucher genau 18 bis 20 Stunden bevor der weibliche und männliche Vorkern miteinander verschmolzen sind und somit per definitionem ein Embryo entstanden ist.**

**Die Entnahme der Polkörper erfolgt sechs bis acht Stunden nach der Spermieninjektion.**

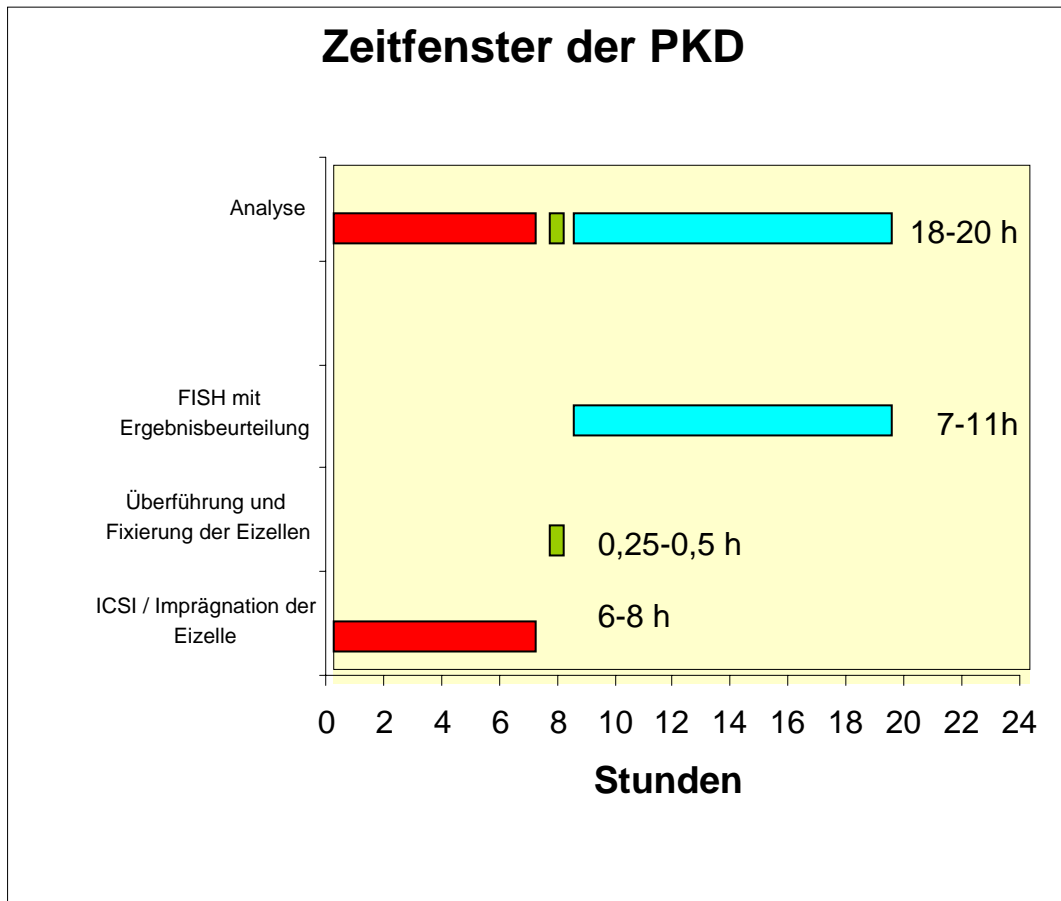
**Mit Hilfe eines Lasers wird die Zona pellucida der Eizelle eröffnet, um so die Polkörper aus dem perivitellinem Raum entnehmen zu können.**

**Die Polkörper werden mit einer stumpfen Biopsienadel (Custom-Tip 02/240, Eppendorf, Deutschland) aspiriert. Für die Fixierung und Überführung der Polkörper von 6 Eizellen auf den Objektträger benötigt ein routinierter Mitarbeiter in der Regel ca. 15 Minuten.**

**Die verbleibenden sieben bis elf Stunden des Procedere werden für die Durchführung der FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) und zur Ergebnisbeurteilung genutzt.**



Am darauffolgenden Tag (18 Stunden nach der ICSI) erfolgt die Analyse über die Verteilungsmuster im Vorkern der befruchteten Eizelle (NVK Nukleus-Vorläufer-Körperchen) und damit die Entscheidung bezüglich des geplanten Embryotransfers (Montag et al., 2004a).



**Abbildung 4:**

In oben dargestellter Grafik sind die Zeitfenster angegeben, die dem Untersucher für die einzelnen Untersuchungsschritte bei der Polkörperdiagnostik zur Verfügung stehen. Nach Eindringen des Spermiums in die Eizelle dauert es ca. 18 bis 20 Stunden bis der männliche und der weibliche Vorkern miteinander verschmolzen sind.

Die Biopsie der Polkörper erfolgt 6 bis 8 Stunden nach der Spermieninjektion. Zur Überführung von durchschnittlich 4 bis 6 Eizellen auf den Objektträger benötigt ein routinierter Untersucher rund 10 bis 15 Minuten.

Nachdem die Eizellen auf den Objektträger überführt wurden stehen dem Mitarbeiter noch 7 bis 11 Stunden für den Transport ins genetische Labor und die FISH Untersuchung inklusive Beurteilung zur Verfügung.

Das bedeutet, dass eine Polkörperuntersuchung insgesamt in einem Zeitfenster von 18 bis 20 Stunden durchgeführt werden muss, damit das Embryonenschutzgesetz nicht tangiert wird.

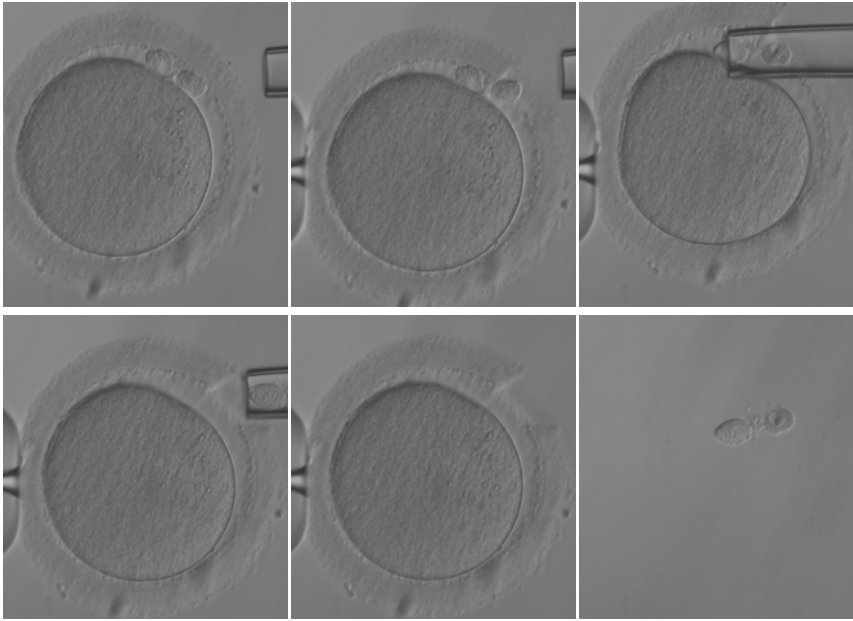
### **3.3.2 Biopsie-Methoden**

Um eine Polkörperdiagnostik vornehmen zu können muss vorher die Zona pellucida eröffnet werden, da es sonst nicht möglich ist an die Polkörper heranzukommen. Dieser Penetration zur Biopsie stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die nachstehend beschrieben werden:

#### **Laserassistierte Biopsie:**

Diese Methode erlaubt bei optimal ausgerichteter Eizell/Polkörperachse innerhalb von Millisekunden die zielgenaue Eröffnung der Zona pellucida in einem eng umrissenen Bereich (Montag et al., 1998).

Die Zona pellucida, der zuvor injizierten Eizelle, wird dazu nach optimaler Fixierung durch eine Haltepipette mit einem Diodenlaserstrahl (Fertilase oder Octax, MTG, Deutschland) gezielt über dem Polkörper beschossen (in der Uni Frauenklinik verwendete Methode). Verletzungen des Embryos, Verlust des Polkörpers (circa 1%-2 %) sowie Hybridisierungsartefakte treten äußerst selten auf.



**Abbildung 5:**

Im ersten Bild sieht man wie wichtig es ist den Laserstrahl gezielt über dem Polkörper anzusetzen, um eine Schädigung der Eizelle zu verhindern (Abb.5 A)  
 Nach dem gezielten Eröffnen der Zona pellucida (Abb. 5 B), welche die Eizelle umgibt, werden mit einer stumpfen Kapillare die Polkörper entnommen (Abb. 5 C).  
 Die Überführung der Polkörper auf einen Objektträger sollte vorsichtig und unter einem Invertmikroskop erfolgen, da es ansonsten schnell zu einem Verlust eines Polkörpers kommen kann (Abb. 5 D).  
 In der Abbildung 5 E sieht man den verbleibenden Defekt der Zona pellucida in der Eizelle. Abbildung 5 F zeigt die beiden Polkörper auf dem Objektträger, deren Position mit einem Diamantstift nach dem Auftrocknen markierte wurde.

### **Mechanische Biopsie:**

**Die Zona pellucida wird partiell mit einer spitzen Mikronadel perforiert, so dass zwei Öffnungen beziehungsweise Schlitze mit einem Winkel von 90 Grad zueinander entstehen. Diese, auf der Zona-drilling-basierenden Methode, wird vor allem von der Arbeitsgruppe Verlinsky in Chicago genutzt. Den Nachteil zur laserassistierten Methode beschreiben Montag et al. 2003 mit einem größeren Zeitaufwand und einer höheren Verletzungsgefahr der Eizelle.**

### **3.3.3 Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenfehlverteilungen**

Der Nachweis von Chromosomenfehlverteilungen (Aneuploidien) erfolgt mittels der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung. Die Farbunterschiede der markierten Chromosomensonden werden für die Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 eingesetzt. Dies sind die fünf, am häufigst betroffenen Chromosomen, die bei einer Schwangerschaft Aneuploidien vorweisen (Hassold et al., 1980, 1984).

Ein adaptiertes Vorgehen, von Montag et al. konstruiert (Zitat), ermöglicht den simultanen Nachweis von sechs markierten Sonden in einer FISH Untersuchungsrunde.

Diese Weiterentwicklung der FISH Methode zur sechs Color-In-Situ-Hybridisierung ist eine modifizierte Variante, bei der ein weiteres Chromosom, in der Regel Chromosom X, mitbeurteilt werden kann. Mit der simultanen Untersuchung von sechs Chromosomen in einer einzigen Hybridisierungsrunde im Rahmen der PKD ist ein weiterer Schritt in der Aneuploidie-Testung gemacht worden (Montag et al., 2005).

Durch die zeitliche Versetzung der Mikroinjektionen ist es möglich zwei FISH Untersuchungsrunden hintereinander durchzuführen, das heißt es kann eine Auswertung von bis zu zehn Chromosomen stattfinden.

Nach Überführung des Polkörpers auf einen Objektträger und anschließender Fixation erfolgt die FISH Hybridisierung nach dem Protokoll des Hybridisierungskits (Multivision PB, Abbott, Wiesbaden). Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können nach vier bis acht Stunden Hybridisierung im Hybridisierungssofen (Hybrite, Vysis) die Chromosomenstrukturen beurteilt werden. Das Fluoreszenzmikroskop ist mit speziell adaptierten Filtersätzen (Vysis) und einem digitalen Bildaufnahme- und Analysesystem ausgestattet (Aquacosmos, Hamamatsu, Herrsching).

Für jedes der einzelnen Chromatiden wird ein Fluoreszenzsignal sichtbar. Im Normalfall zeigen sich im ersten Polkörper für jedes untersuchte Chromosom zwei Signale und im zweiten Polkörper pro Chromatide ein Signal.

Die PKD ist ein Verfahren, welches Aneuploidien in der Eizelle indirekt sichtbar macht und die Auswahl der zu transferierenden befruchteten Eizellen erleichtert. Besonders Frauen über vierzig Jahre profitieren von dieser Methode und haben eine höhere

Wahrscheinlichkeit ein gesundes Kind zur Welt zu bringen, auch wenn die Schwangerschaftsrate in dieser Altersgruppe, trotz PKD, noch relativ niedrig ist.

Dies bestätigten Wissenschaftler in einem DIR-kompatiblen Erfassungsprogramm bei einem Vergleich von Patientinnen mit und ohne PKD. Es zeigte sich bei der Untergruppe der Frauen im Alter von 35 bis 39 Jahren, mit mindestens zwei vorausgegangenen IVF/ICSI Behandlungsversuchen, dass trotz einer geringeren Zahl transferierter Embryonen in der PKD Gruppe signifikant höhere Implantationsraten erzielt werden konnten als in der Vergleichsgruppe ohne PKD. Die Auswertung der Daten bei den Patientinnen über 39 Jahren ließ erkennen, dass nach Durchführung einer PKD bei vergleichbarer klinischer Schwangerschaftsrate die Abortrate abnahm (van der Ven K. et al., 2008).

### **3.4 Embryotransfer und Implantationserfolg**

Am zweiten oder dritten Tag nach der Follikelpunktion sowie erfolgter PKD werden die Embryonen im Kulturmedium über einen Transferkatheter in den Uterus transferiert (Montag et al., 2001). Nach dem Embryotransfer wird der Katheter mikroskopisch auf möglicherweise verbliebene Embryonen im Lumen überprüft.

In der Frauenklinik der Universität Bonn werden in der Regel zwei Embryonen transferiert, in Ausnahmefällen (vom EschG maximal drei zulässig) auch drei Embryonen. Man versucht weniger, aber dafür geeignete Embryonen zu transferieren, um die Mehrlingsschwangerschaftsrate zu reduzieren (Montag und van der Ven, 2003).

Eine klinische Schwangerschaft definiert sich durch das Vorhandensein von Minimum einer Fruchthöhle und embryonaler Herzaktivität, unter sonografischer Darstellung, vier Wochen nach transvaginalem Embryotransfer (Egbase et al., 1996).

Die PKD nach einer ICSI hat keinen nachgewiesenen Nachteil auf den Verlauf der Schwangerschaft und die kindliche Entwicklung (Montag et al., 2005).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich der gesamten Altersklasse nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen hinsichtlich der Schwangerschaftsrate

In den folgenden Tabellen wurden die Auswertungen des Patientenkollektivs nach Polkörperdiagnostik bei den Frischzyklen, den Zyklen nach dem langsamen Einfrieren und nach Vitrifikation der Eizellen jeweils gegenübergestellt und diskutiert. Die Ergebnisse wurden nach dem in Punkt 2.7 angegebenen statistischen Verfahren ausgewertet.

Unser Patientenkollektiv enthielt 74 Patientinnen mit Polkörperdiagnostik, wobei 90 Frischzyklen und 101 Kryozyklen untersucht wurden. Bei der Anzahl der Zyklen mit Embryotransfers ergab sich eine Auffälligkeit von  $p=0.00207$  und damit ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen.

Die Altersspanne in dieser retrospektiven Auswertung umfasste den Bereich von 26 Jahren bis 46 Jahren. Median des Alters der Patientinnen bei den Frischzyklen war 37,76 Jahre ( $\pm 3,92$ ) und bei den (gesamten) Kryozyklen 39,25 Jahre ( $\pm 4,05$ ), nicht signifikant auffällig mit  $p=0,2016$ , wobei die Frischzyklusgruppe hier ein deutlich niedrigeres Durchschnittsalter aufwies.

Wir stellten zunächst der Frischzyklusgruppe die gemeinsame Kryokonservierungsgruppe (langsames Einfrieren und Vitrifikation) gegenüber.

Bei der Gegenüberstellung der Embryotransfers in beiden Gruppen muss man berücksichtigen, dass die Frischzyklusgruppe den Vorteil hatte, dass es bei jedem Zyklus auch zu einem Transfer von Embryonen kam; im Gegensatz dazu kam es bei den kryokonservierten Eizellen nicht nach jedem Zyklus zum Transfer, da es in einigen (13) Auftauzyklen zur Degeneration oder Arretierung von Eizellen kam.

Bei der Anzahl der transferierten Embryonen, mit der Aufteilung in ein Embryo, zwei oder drei Embryonen pro Transfer, kamen wir bei der Frischzyklusgruppe versus Kryokonservierungsgruppe zu nachstehenden Fehlerwahrscheinlichkeiten. Bei dem Transfer mit einem Embryo kam es zu einem signifikanten Ergebnis von  $p<0,05$ , welches dadurch zustande kam, dass in der Frischzyklusgruppe kein Transfer mit einem Embryo

stattfand, jedoch in der Kryokontrollgruppe die überwiegende Anzahl der Transfers mit einem Embryo vollzogen wurden.

Bei den Transfers mit zwei Embryonen fiel das Ergebnis mit  $p < 0.001$  hochsignifikant auffällig aus, welches unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass die meisten Embryotransfers mit zwei Embryonen in der Frischzyklusgruppe stattfanden.

Bei den Embryotransfers mit drei Embryonen stellte sich keine Signifikanz heraus, weil in beiden Gesamtgruppen die Minderheit an Transfers mit der maximal zulässigen Anzahl (3) Embryonen zum Transfer (EschG) durchgeführt wurden.

Bei der Schwangerschaftsrate (positives HCG), bezogen auf die Transfers, ergab sich eine eindeutige Positivrate für die Frischzyklusgruppe, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass bei „jedem“ Zyklus Embryonen transferiert und zwei Embryonen pro Transfer nicht unterschritten wurden. Hier lag das Ergebnis mit  $p = 0.085$  im Trend.

Die klinischen Schwangerschaften waren (mit  $p = 0.00198$ ) hochsignifikant auffällig, weil es bei den Embryotransfers nach Kryokonservierung der Eizellen zu keiner klinischen Schwangerschaft, bei den Frischzyklen hingegen in 11 Zyklen zu einer klinisch nachweisbaren Schwangerschaft kam.

Dies bedeutet, dass die klinischen Schwangerschaften bei den Frischzyklen mit 12 % besser ausfielen als bei den Auftauzyklen, wo bis zum Untersuchungsende keine klinische Schwangerschaft zu verzeichnen war.

Folglich war die Implantationsrate bei den Frischzyklen mit 11 Implantationen ebenfalls signifikant (mit  $p < 0.0259$ ) auffällig.

Die Gegenüberstellung dieser beiden Untersuchungsgruppen lässt in der Gesamtbetrachtung einen deutlich positiveren Trend für die Frischzyklusgruppe erkennen.

<b>alle Altersklassen 26 bis 46 Jahre</b>	<b>Polkörperdiagnostik Frischzyklen</b>	<b>Polkörperdiagnostik Auftauzyklen nach Kryokonservierung</b>	<b>p (x<sup>2</sup>-Test/2- Stichproben- t-Test)</b>
<b>Behandlungszyklen</b>	<b>90</b>	<b>101</b>	-
<b>Zyklen mit Transfer (ET)</b>	<b>90 (100%)</b>	<b>89 (88,1%)</b>	<b>p=0.00207 hoch- signifikant</b>
<b>1 Embryo/Transfer</b>	<b>0</b>	<b>56</b>	<b>p&lt;0.05 signifikant</b>
<b>2 Embryonen/Transfer</b>	<b>85</b>	<b>29</b>	<b>p&lt;0.001 hoch- signifikant</b>
<b>3 Embryonen/Transfer</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>n.s.</b>
<b>Embryonen/Transfer</b>	<b>2,05 (185/90)</b>	<b>1,41 (126/89)</b>	<b>p&lt;0.001 signifikant</b>
<b>Positives HCG (Schwangerschaften)</b>	<b>21 (SS/ET=23%)</b>	<b>11 (SS/ET=12%)</b>	<b>p=0.085 Trend</b>
<b>Klinische Schwangerschaften</b>	<b>11 (SS/ET=12%)</b>	<b>0</b>	<b>p=0.00198 signifikant</b>
<b>Implantationsrate</b>	<b>5 % (10/185)</b>	<b>0</b>	<b>p&lt;0.025 signifikant</b>
<b>Abortrate</b>	<b>3 (3/kli.SS=27,3%)</b>	<b>0</b>	-
<b>Anzahl der Eizellen</b>	<b>1155 (Frisch)</b>	<b>179 (2 PN aufgetaut)</b>	-
<b>Mittelwert der Eizellen</b>	<b>12,83 ± 4,48</b>	<b>1,99 ± 1,25</b>	-
<b>Median des Alters</b>	<b>37,76 ± 3,92</b>	<b>39,25 ± 4,05</b>	<b>p=0,2016 n.s.</b>

**Tabelle 1: Auswertung der gesamten Frischzyklus- und Kryozyklusgruppe nach PKD in der gesamten Altersklasse bezüglich der Schwangerschafts- und Implantationsrate**



#### **4.2 Vergleich der beiden Kryokonservierungsmethoden (langsames Einfrieren und Vitrifikation) nach Polkörperdiagnostik in der gesamten Altersklasse (27 bis 46 Jahre) hinsichtlich der Schwangerschaftsrate**

Es wurden insgesamt 74 Patientinnen nach Polkörperdiagnostik untersucht deren Eizellen durch zwei unterschiedliche Einfrieremethoden konserviert wurden.

Die Vorkerneizellen von 49 Patientinnen nach Polkörperdiagnostik die durch die langsame Einfrieremethode eingefroren wurden, konnten 25 Patientinnen nach Polkörperdiagnostik die mit Hilfe der Vitrifikationsmethode eingefroren wurden vergleichend gegenübergestellt werden.

Die Altersgruppe der Patientinnen der langsamen Einfrieremethode reichte von 31 bis 46 Jahren (Median  $39,37 \pm 3,89$ ) und die Altersgruppe der Vitrifikationsmethode reichte von 27 bis 43 Jahren (Median  $38,45 \pm 4,11$ ), welche bei der statistischen Gegenüberstellung keine großen Unterschiede aufwiesen ( $p=0,1742$ ), aber einen niedrigeren Altersdurchschnitt zugunsten der Vitrifikationsgruppe zeigte.

Die Gruppe des langsamen Einfrierens enthielt deutlich mehr Patientinnen und mehr Zyklen mit Transfers (62,37 %) als die Vitrifikationsgruppe (37,62 %). Es wurden jedoch zahlenmäßig mehr Embryonen nach der Vitrifikationsmethode transferiert.

Die Kryokonservierung allgemein schien sich negativ auf die Implantationsrate auszuwirken, denn bei keiner der beiden Kryogruppen kam es zu einer klinischen Schwangerschaft und damit zu einer Implantation.

Bei der serologischen Schwangerschaftsrate schnitt die Vitrifikationsgruppe mit 15,15 % besser ab als die Gruppe der langsamen Einfrieremethode mit 10,71 %.

Bezogen auf die Auftauzyklen waren es bei der Vitrifikationsgruppe 13,15 % und bei der herkömmlichen langsamen Einfrieremethode nur 9,52 %. Von den 107 (59,77 % von den gesamt kryokonservierten Eizellen) eingefrorenen Eizellen der langsamen Einfrieremethode wurden 105 Eizellen aufgetaut (98,13 %) und von den 72 vitrifizierten Eizellen (40,22 % von den gesamt eingefrorenen Eizellen) wurden 69 Eizellen aufgetaut (95,83 %). Das Ergebnis  $p=0,3876$  war somit nicht signifikant.

Bei der Anzahl der überlebenden Eizellen nach dem Auftauprozess schnitt die Vitrifikationsgruppe mit 85,50 % (59 Eizellen) besser ab als die Gruppe der langsamen

Einfriermethode mit 77,14 % (81 Eizellen), aber statistisch gesehen mit  $p < 0.244$  nicht signifikant besser. Bei der Degeneration der Eizellen nach dem Auftauen ergab sich ebenfalls ein Vorteil für die Vitrifikationsgruppe mit 14,49 % (10 degenerierte Eizellen) als bei der langsamen Einfriermethode mit 22,85 % (24 degenerierte Eizellen). Das Ergebnis lag auch hier nicht im signifikanten Bereich bei  $p < 0.25$ .

Die Arretierung der Eizellen nach dem Auftauen und vor dem Transfer fiel mit 6,17 % (5 arretierten Eizellen) zugunsten der langsamen Einfriermethode aus.

Im Gegensatz dazu konnten wir bei den vitrifizierten Eizellen mit 15,25 % (9 arretierten Eizellen) einen zahlenmäßig höheren Anteil an Eizellen mit einem Entwicklungsstopp feststellen, was aber statistisch gesehen mit  $p < 0,25$  als nicht auffällig beschrieben werden konnte.

Die Anzahl der Embryonen pro Transfer, bezogen auf die aufgetauten Eizellen, ergaben keine großen Schwankungen. Es waren 72,38 % durch die langsame Einfriermethode konservierte Eizellen und 72,46 % vitrifizierte Eizellen. Die Anzahl des Stichprobenumfangs lag bei der langsamen Einfriergruppe mit 76 Embryonen zum Transfer deutlich höher als bei der Vitrifikationsgruppe mit 50 Embryonen zum Transfer. Die statistische Auswertung ergab mit  $p < 0.25$  kein signifikantes Ergebnis.

Da bei einem Transfer bis zu drei Embryonen transferiert werden dürfen (EschG), gab es bei der Anzahl der Embryonen zum Transfer ebenfalls in jeder Gruppe unterschiedliche Verteilungsmuster.

Bei den Embryotransfers mit einem Embryo führte die Gruppe mit der langsamen Einfriermethode mit 66,07 % (37 Transfers mit 1 Embryo) verglichen mit 57,57 % (19 Transfers mit 1 Embryo) in der Vitrifikationsgruppe. Bei der Vitrifikationsgruppe wurden wiederum bei zwei Embryonen pro Transfer mehr Versuche mit 33,33 % (11 Transfers mit 2 Embryonen) als bei den Versuchen der langsamen Einfriermethode mit 32,14 % (18 Transfers mit zwei Embryonen) gezählt. Als letztes ergab sich ein Unterschied beim Transfer mit drei Embryonen.

**Bei der Vitrifikation waren es 9,09 % (3 Transfers mit 3 Embryonen) im Vergleich zu der langsamen Einfrierung, wo wir bei nur 1 % (1 Transfer mit drei Embryonen) der Patientinnen einen Transfer mit 3 Embryonen nachweisen konnten.**

**Einen Unterschied in der Embryoanzahl pro Transfer ergab sich zugunsten der Polkörpergruppe mit Vitrifikation, die mit 1,52 Embryonen pro Transfer höher lag als die langsame Einfriergruppe mit 1,36 Embryonen pro Transfer. Bei allen Embryotransfers ergab sich trotz kleiner Schwankungen keine statistische Signifikanz.**

**Nachstehende Tabelle 2 verdeutlicht die Anschauung**

Alterskategorie alle Altersklassen 27 bis 46 Jahre	Polkörperdiagnostik beim Slow Verfahren	Polkörperdiagnostik beim Vitrifikations- verfahren	p (x <sup>2</sup> - Test/2- Stichprobe n-t-Test)
Behandlungszyklen	n=63 Zyklen	n=38 Zyklen	-
Anzahl der Patientinnen	49	25	-
Anzahl der kryokonservierten Eizellen, Mittelwert	107 1,98 ± 1,30	72 2,00 ± 1,18	p=0,9449 n.s.
Anzahl der aufgetauten Eizellen, Mittelwert	105 (98,13 %) 1,67 ± 0,78	69 (95,83 %) 1,82 ± 0,85	p=0,3876 n.s.
Anzahl der überlebenden Eizellen, Mittelwert	81 (77,14 %) 1,40 ± 0,56	59 (85,50%) 1,74 ± 0,88	p=0.244 n.s.
Anzahl der degenerierten Eizellen, Mittelwert	24 (22,85 %) 1,20± 0,40	10 (14,49 %) 1,11 ± 0,31	p<0.25 n.s.
Anzahl der arretierten Eizellen, Mittelwert	5 (6,17 %) 0,08 ± 0,27	9 (15,25 %) 0,24 ± 0,53	p<0.25 n.s.
Zyklen mit Transfer (ET Anzahl)	56	33	-
Anzahl der Embryonen zum Transfer	76 93,82 % v. d. überlebenden. EZ	50 84,74 % von den überlebenden EZ	p<0.25 n.s.
1 Embryo/Transfer	37 66,07 %	19 57,57 %	p=0.212 Trendtest n.s.
2 Embryonen/Transfer	18 32,14 %	11 33,33,%	n.s.
3 Embryonen/Transfer	1 1,0 %	3 9,09 %	p<0.25 n.s.
Embryonen pro Transfer	1,36 (76/56)	1,52 (50/33)	n.s.
Serologische Schwangerschaftsrate	6 10,71 % (6/56)	5 15,15 % (5/33)	-
Median des Alters	39,37 ± 3,89	38,45 ± 4,11	p=0,1742 n.s.

**Tabelle 2: Vergleichsdaten der beiden Prüfgrößen: Langsame Einfrierung und Vitrifizierung der Eizellen bezüglich Überlebensrate und Schwangerschaftsrate**

### **4.3 Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung in der gesamten Altersklasse (26 bis 46 Jahre)**

**Im Folgenden wurden Prüfgrößen über die Entwicklung der Embryonen, die Qualität der Embryonen und dem daraus resultierenden Score, vor und nach Kryokonservierung der Eizellen erhoben.**

**Wenn wir über die Entwicklung einer Eizelle berichten handelt es sich um eine befruchtete Eizelle und deren weiteres Wachstum, bevor diese als Mehrzellstadium (Embryo) in die Gebärmutter transferiert wird. In unserem Fall bedeutete dies, dass wir für maximal drei bis fünf Tage lang das Wachstum und damit die Teilungsfähigkeit der befruchteten Eizelle beobachteten und dokumentierten in welchem Eizellstadium sie sich nach vorgegebener Zeit befand, nachdem sie aus dem menschlichen Ovar entnommen und durch männlich humane Spermien befruchtet worden war.**

**Bei der Entwicklung werden die Symmetrie und die Intaktheit der zellulären Strukturen bewertet. Hinzu kommt die Bewertung der Teilungsrate; prognostisch günstig ist eine zeitgerechte kontinuierliche Weiterentwicklung der Zygote (Montag und van der Ven, 2003).**

**Bei der Qualität einer Eizelle handelt es sich darum wie gut die Qualität dieses Eizellstadium unter dem Mikroskop vom Untersucher beurteilt werden konnte um dann, nach entsprechender Eingruppierung (durch Punkteverteilung) mit einer vorab guten Prognose im menschlichen Mutterleib zu einer klinischen Schwangerschaft und damit zu einer Implantation führen zu können.**

**Analog der Beurteilung der Eizellen im Vorkernstadium ist der Transfer potenter Embryonen, die weder morphologische noch zeitlich entwicklungsbedingte Auffälligkeiten zeigen, für eine Erhöhung der Schwangerschaftsrate relevant.**

**Die Scoreberechnung spiegelt die Morphologie der Embryonen als eine Art „Punktesystem“ wieder, in dem optische Kriterien am Tag zwei und drei beurteilt wurden.**

Bewertet werden bei diesem Punktesystem die Anzahl der Blastomeren und das Ausmaß der Fragmentation (unregelmäßige Abschnürungen oder zu Grunde gegangene Bestandteile die sich während des Teilungsprozesses ergeben haben) in einem Embryo (Steer, et al., 1992).

In nachstehender Ergebnispräsentation wurden die Eizellstadien nach Polkörperbiopsie und frischer Follikelpunktion sowie die Eizellstadien nach dem Auftauen bei Kryokonservierung gegenübergestellt.

In der gesamten Alterskategorie von 26 bis 46 Jahren in 89 Zyklen betrug der Median bei den Frischzyklen  $37,76 \pm 3,92$  und bei den 89 Auftauzyklen  $39,25 \pm 4,05$ , mit einem nicht signifikanten Unterschied ( $p=0,2016$ ), aber einem niedrigeren Altersdurchschnitt für die Frischzyklusgruppe.

Bei der Entwicklung am Tag zwei für Embryo 1/2/3 in 89 Zyklen ergaben sich sowohl bei der Blastomerenentwicklung, bei der Qualität der Embryonen und bei der Scoreentwicklung hochsignifikante Auffälligkeiten für alle Datensätze. Im Vorteil waren bei dieser Beobachtung in allen Prüfgrößen die Frischzyklen.

Am Tag drei der Embryoentwicklung zeigten sich bei 67 Frischzyklen und 77 Kryozyklen ebenfalls hochsignifikante statistische Auffälligkeiten in allen drei Untersuchungsgrößen. Auch hier erzielte die Frischzyklusgruppe im Gesamtbild eine positivere Bewertung.

Weiterhin stellte sich nun die Frage wie der Entwicklungssprung vom zweiten Tag zum dritten Tag sein ausfallen würde.

Bei der Blastomerenentwicklung, der Qualität und der Scoreberechnung konnten in 67 Frischzyklen und 77 Kryozyklen nach Polkörperdiagnostik bei der Gegenüberstellung keine statistischen Varianzen verzeichnet werden was besagt, dass in keiner der beiden Methoden ein inkonstanter Wachstumsverlauf festgestellt werden konnte.

Die einzelnen Ergebnisse sind zur besseren Übersicht noch einmal in Tabelle 3 dargestellt.

Altersklassen von 26 bis 46 Jahren	Frischzyklen gesamt	Kryozyklen gesamt	p (x <sup>2</sup> -Test/2-Stichproben-t-Test)
Blastomeren Entwicklung Tag 2 Mittelwert	(n=89 Zyklen Embryonen) 3,59 ± 1,06	(n=89 Zyklen Embryonen) 2,64 ± 1,35	p=5,35x10 <sup>-07</sup> hochsignifikant
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2 Mittelwert	3,69 ± 0,47	3,07 ± 0,94	p=1.32x10 <sup>-07</sup> hochsignifikant
Score der Entwicklung Tag 2 Mittelwert	13,37 ± 4,34	9,22 ± 4,84	p=1.24x10 <sup>-08</sup> hochsignifikant
Blastomeren Entwicklung Tag 3 Mittelwert	(n=67 Zyklen Embryonen) (74,44 %) (67/90) 6,80 ± 1,90	(n=77 Zyklen Embryonen) (76,23 %) (77/101) 4,79 ± 2,13	p=1.35x10 <sup>-08</sup> hochsignifikant
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3 Mittelwert	67 3,62 ± 0,54	77 2,96 ± 0,91	p=4.00x10 <sup>-07</sup> hochsignifikant
Score der Entwicklung Tag 3 Mittelwert	67 25,07 ± 8,40	77 16,61 ± 8,30	p=1.46x10 <sup>-08</sup> hochsignifikant
Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	67 1,98 ± 0,45	77 2,00 ± 0,68	p=0.87 n.s.
Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	67 0,98 ± 0,14	77 0,99 ± 0,13	p=0.93 n.s.
Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	67 1,96 ± 0,56	77 1,97 ± 0,74	p=0.94 n.s.
Median des Alters	37,76 ± 3,92	39,25 ± 4,05	p=0,2016 n.s.

**Tabelle 3: Vergleich der Embryoentwicklung im Frisch- und Kryozyklus nach Polkörperdiagnostik in der gesamten Altersklasse**

#### **4.4 Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen unterteilt in Altersstufen**

Die jüngste Gruppe der Frischzyklen und Kryozyklen reichte von 26 bis 34 Jahren. Der Altersmedian der Frischzyklusgruppe betrug  $32,28 \pm 2,24$  mit 20 Zyklen in dieser Gruppe (22,47 %). Die Kryogruppe zeigte einen Altersmedian von  $31,82 \pm 2,01$  in 17 Zyklen (19,10 %) mit einer nicht signifikanten Varianz.

Am Tag zwei gab es nur in der Blastomerenentwicklung eine im Trend liegende mit  $p=0,0748$  Auffälligkeit bei der Qualitätsentwicklung und bei der Scoreberechnung kam es zu keinen Signifikanzen der Untersuchungsgrößen (Qualität  $p=0,1149$  und Score  $p=0,1227$ ). Auch in dieser Runde schloss die Frischzyklusgruppe in allen drei Bereichen besser ab. Ab dem dritten Tag sank die Zahl der Frischzyklen auf 15 (16,85 %) und die der Kryozyklen auf 14 (15,73 %) ab. Der Tag drei verhielt sich ähnlich wie Tag zwei, alle Ergebnisse der Prüfgrößen fielen zugunsten der Frischzyklen aus. Dabei ergab sich eine im Trend liegende Blastomerenentwicklung von  $p=0,0699$ , die Qualitätsentwicklung und der Score ergaben keine Besonderheiten.

Der Sprung der Entwicklung von Tag zwei auf Tag drei fiel im Gesamtbild wiederholt besser für die Frischzyklusgruppe aus. Es gab hier keine Signifikanz in der statistischen Berechnung.

Die Daten über beide Vergleichsgruppen sind in Tabelle 4 einzusehen.



Altersklassen von 26 bis 34 Jahren	Frischzyklen gesamt	Kryokonservierungszyklen gesamt	p (x <sup>2</sup> -Test/2-Stichprobent-Test)
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 2 Mittelwert</b>	(n=20 Frischzyklen Embryonen) (22,47 %) (20/89) 3,73 ± 0,86	(n=17 Kryozyklen Embryonen) (19,10 %) (17/89) 2,97 ± 1,42	p=0.0748  Trend
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2 Mittelwert</b>	20  3,58 ± 0,69	17  3,04 ± 1,14	p=0.1149  n.s.
<b>Score der Entwicklung Tag 2 Mittelwert</b>	20  13,80 ± 3,83	17  11,04 ± 5,97	p=0.1227  n.s.
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 3 Mittelwert</b>	(n=15 Frischzyklen Embryonen) (16,85 %) (15/89) 7,07 ± 1,87	(n=14 Kryozyklen Embryonen) (15,73 %) (14/89) 5,52 ± 2,32	p=0.0699  Trend
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3 Mittelwert</b>	15  3,53 ± 0,74	14  3,05 ± 0,91	p=0.1465  n.s.
<b>Score der Entwicklung Tag 3 Mittelwert</b>	15  26,37 ± 8,40	14  20,50 ± 9,63	p=0.1045  n.s.
<b>Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert</b>	15  1,98 ± 0,45	14  1,93 ± 0,36	p=0.7665  n.s.
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert</b>	15  1,01 ± 0,19	14  1,02 ± 0,15	p=0.8977  n.s.
<b>Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert</b>	15  2,03 ± 0,68	14  1,99 ± 0,58	p=0.8793  n.s.
<b>Median des Alters</b>	32,28 ± 2,24	31,82 ± 2,01	p=0,8560  n.s.

**Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse der Embryoentwicklung in der Alterskategorie der 26 bis 34-jährigen bei der Frischzyklusgruppe versus Kryogruppe**

**Mittlere Altersstufe:**

Im ersten Schritt war die Berechnung des Alters bei den Frischzyklen mit einem Median von  $37,31 \pm 1,45$  bei 40 Zyklen (44,94 %) und  $37,48 \pm 1,36$  bei 30 Zyklen (33,70 %) nicht signifikant ( $p=0,9249$ ).

Beim Vergleich der Daten am Tag zwei waren alle drei Untersuchungspunkte hoch signifikant auffällig mit  $p=0,00093$  bei den Blastomeren, mit  $p=0,000610$  bei der Qualitätsentwicklung und mit  $p=0,0002$  bei der Scoreauswertung. Die ausgerechneten Werte fielen bei den Frischzyklen deutlich besser aus als bei den Kryozyklen.

Am Tag drei waren alle Prüfgrößen bei 31 Frischzyklen (34,83 %) und 27 Kryozyklen (30,33 %) hochsignifikant auffällig zugunsten der Frischzyklen. Die Varianz bei der Blastomerenentwicklung betrug  $p=0,0014$ , für die Qualitätsentwicklung  $p=0,0013$  und für den Score  $p=0,0014$ .

Für die Entwicklungsbeobachtung von Tag zwei auf Tag drei bei 31 Frischzyklen und 27 Kryozyklen waren keine der untersuchten Parameter auffällig (Blastomerenentwicklung mit  $p=0,1708$ , Qualität  $p=0,6968$  und der Score mit  $p=0,1841$ ).

Bei dieser heterogenen Verteilung der letzten Ergebnisse ließ sich in keiner der beiden Gruppen ein Vorteil erkennen.

In der Tabelle 5 ist eine Übersicht über die erwähnten Daten einzusehen. Alterskategorie der 35 bis 39 jährigen Patientinnen im Frischzyklus versus Kryozyklus.

Altersklassen von 35 bis 39 Jahren	Frischzyklen gesamt	Kryokonservierungszyklen gesamt	p (x <sup>2</sup> -Test/2-Stichproben-t-Test)
Blastomeren Entwicklung Tag 2 Mittelwert	(n=40 Frischzyklen Embryonen) (44,94 %) (40/89) 3,58 ± 1,15	(n=30 Kryozyklen Embryonen) (33,70 %) (30/89) 2,51 ± 1,31	p=0.0009  hochsignifikant
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2 Mittelwert	40  3,73 ± 0,40	30  3,08 ± 0,86	p=0.0006  hochsignifikant
Score der Entwicklung Tag 2 Mittelwert	40  13,35 ± 4,78	30  8,54 ± 3,97	p=0.0002  hochsignifikant
Blastomeren Entwicklung Tag 3 Mittelwert	(n=31 Frischzyklen Embryonen) (34,83 %) (31/89) 6,82 ± 2,11	(n=27 Kryozyklen Embryonen) (30,33 %) (27/89) 4,95 ± 2,05	p=0.0014  signifikant
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3 Mittelwert	31  3,66 ± 0,43	27  3,00 ± 0,89	p=0.0013  signifikant
Score der Entwicklung Tag 3 Mittelwert	31  25,23 ± 9,36	27  17,43 ± 8,01	p=0.0014  signifikant
Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	31  2,00 ± 0,49	27  2,26 ± 0,83	p=0.1708  n.s.
Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	31  0,98 ± 0,12	27  0,99 ± 0,15	p=0.6968  n.s.
Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	31  1,96 ± 0,55	27  2,23 ± 0,90	p=0.1841  n.s.
Median des Alters	37,31 ± 1,45	37,48 ± 1,36	p=0.9249 n.s.

**Tabelle 5: Vergleich der Embryoentwicklung bei den 35 bis 39-jährigen Patientinnen im Frischzyklus versus Kryozyklus**

**Höchste Altersgruppe:**

Im letzten Durchgang wurde die höchste Alterskategorie der 40 bis 46 jährigen Patientinnen miteinander verglichen. Hierbei standen 29 (32,58 %) Frischzyklen und 42 (47,19 %) Kryozyklen zur Verfügung.

In dieser Altersgruppe fiel die Bewertung der Frischzyklusgruppe in ihren einzelnen Positionen besser aus als die Kryogruppe. Der Median des Alters war bei den Patientinnen mit den frischen Embryotransfers mit  $40,92 \pm 1,48$  nicht signifikant niedriger als bei den Kryozykluspatientinnen mit einem Altersmedian von  $41,07 \pm 1,63$  ( $p=0,8303$ ).

Am Tag zwei der Studie fielen die Blastomerenentwicklung, die Qualität und der Score hochsignifikant unterschiedlich im Vergleich beider Untersuchungsgruppen aus.

Ähnlich gestaltete sich das Ergebnis am Tag drei, an dem bei 36 Kryozyklen (40,44 %) und bei 21 Frischzyklen (23,59 %) die Blastomerenentwicklung, die Qualität und der Score ebenfalls hochsignifikant ausfielen.

Der Entwicklungsverlauf von Tag zwei auf Tag drei ergab folgende Werte: Bei der Entwicklung der Blastomeren  $p=0,3033$ , der Qualitätsbeobachtung  $p=0,8589$  und des Scores  $p=0,2732$ , was bedeutet, dass sich die Ergebnisse als nicht signifikant abweichend zeigten.

Die gesamte Untersuchungsreihe schnitt erfolgreicher für die Frischzyklen ab, so dass der Embryotransfer im frischen Zustand immer noch einen Vorteil gegenüber den Transfers nach einer Kryokonservierung hat. Immer wieder fiel auf, dass das jüngere Alter der Frischzyklusgruppe einen positiven Einfluss auf die Ergebnisse nahm.

In der Tabelle 6 stehen die Daten der beiden Vergleichsgruppen der 40 bis 46 jährigen Patientinnen.

<b>Altersklassen von 40 bis 46 Jahren</b>	<b>Frischzyklen</b>	<b>Kryokonservierungszyklen gesamt</b>	<b>p (x<sup>2</sup>-Test/2-Stichproben-t-Test)</b>
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 2 Mittelwert</b>	(n=29 Frischzyklen Embryonen) (32,58 %) (29/89) 3,53 ± 1,06	(n=42 Kryozyklen Embryonen) (47,19 %) (42/89) 2,60 ± 1,33	p=0.0018  hochsignifikant
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2 Mittelwert</b>	29  3,73 ± 0,31	42  3,07 ± 0,90	p=6.86x10 <sup>-05</sup>  hochsignifikant
<b>Score der Entwicklung Tag 2 Mittelwert</b>	29  13,09 ± 4,01	42  8,97 ± 4,71	p=0.0002  hochsignifikant
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 3 Mittelwert</b>	(n=21 Frischzyklen Embryonen) (23,59 %) (21/89) 6,57 ± 1,53	(n=36 Kryozyklen Embryonen) (40,44 %) (36/89) 4,39 ± 2,02	p=3,87x10 <sup>-05</sup>  hochsignifikant
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3 Mittelwert</b>	21  3,63 ± 0,52	36  2,90 ± 0,92	p=0.0003  hochsignifikant
<b>Score der Entwicklung Tag 3 Mittelwert</b>	21  23,90 ± 6,53	36  14,48 ± 7,23	p=1.07x10 <sup>-05</sup>  hochsignifikant
<b>Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert</b>	21  1,96 ± 0,39	36  1,83 ± 0,57	p=0.3033  n.s.
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert</b>	21  0,97 ± 0,11	36  0,97 ± 0,09	p=0.8589  n.s.
<b>Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert</b>	21  1,92 ± 0,46	36  1,77 ± 0,58	p=0.2732  n.s.
<b>Median des Alters</b>	40,92 ± 1,48	41,07 ± 1,63	p=0,8303 n.s.

**Tabelle 6: Vergleich der Entwicklungsbeobachtungen in der Gruppe der 40 bis 46 jährigen PKD Patientinnen beim Frischzyklus und nach Kryokonservierung**

#### **4.5 Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik beim langsamen Einfrieren und bei der Vitrifikation in der gesamten Altersklasse (27 bis 46 Jahre)**

Wir untersuchten weiterhin die Zyklen bei denen, nach der Polkörperdiagnostik im Anschluss an einen frischen Embryotransfer, die überzählig chromosomal unauffälligen Eizellen durch die langsame Einfrieremethode und die Vitrifikation kryokonserviert wurden.

Beim langsamen Einfrieren konnten am zweiten Tag 56 Zyklen, also entschieden mehr Zyklen untersucht werden, als bei der Vitrifikation mit 33 Zyklen. Der dritte Tag und die Entwicklung von Tag zwei auf Tag drei zeigten einen noch größeren zahlenmäßigen Unterschied der Zyklen von 52 Zyklen beim langsamen Einfrieren und 25 Zyklen bei der Vitrifikation.

Der Altersunterschied bei den Untersuchungen der zwei Einfrieremethoden lag im Trendbereich mit einem  $p=0.076$ . Der Median des Alters der Vitrifikationsgruppe war mit  $38,23 \pm 4,20$  jünger als beim herkömmlichen langsamen Einfrieren mit  $39,49 \pm 3,82$  Jahren. Bei der Entwicklung der Blastomeren am Tag zwei lag das Ergebnis mit  $p=0,0953$  im Trend, bei den Qualitätsunterschieden und dem Score des Tag zwei der beiden Gruppen kamen wir zu keinem statistisch nennenswertem Unterschied.

Am Tag drei ergaben sich in allen drei Prüfgrößen keine Signifikanzen. Bei der Zusammenfassung der Entwicklungsdaten von Tag zwei auf Tag drei konnte rechnerisch das gleiche Ergebnis wie am Tag drei, ohne Signifikanzen, ermittelt werden.

Der Tag zwei gestaltete sich in der Gesamtansicht besser für die Gruppe des langsamen Einfrierens. Am Tag drei und bei der Beobachtung von Tag zwei auf Tag drei überwogen die Vorteile in der Vitrifikationsgruppe.

Die Übersicht der Daten sind in nachstehender Tabelle 7 zu sehen.

Altersklassen von 27 bis 46 Jahren	Slow Zyklen	Vitrifikationszyklen	p (x <sup>2</sup> -Test/2-Stichproben-t-Test)
Blastomeren Entwicklung Tag 2 Mittelwert	(n=56 Zyklen Embryonen) 2,82 ± 1,41	(n=33 Zyklen Embryonen) 2,34 ± 1,18	p=0,095 Trend
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2 Mittelwert	56 3,02 ± 0,92	33 3,16 ± 0,96	p=0,498 n.s.
Score der Entwicklung Tag 2 Mittelwert	56 9,54 ± 5,01	33 8,69 ± 4,49	p=0,417 n.s.
Blastomeren Entwicklung Tag 3 Mittelwert	(n=52 Zyklen Embryonen) 4,88 ± 2,16	(n=25 Zyklen Embryonen) 4,61 ± 2,07	p=0,612 n.s.
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3 Mittelwert	52 2,92 ± 0,92	25 3,04 ± 0,88	p=0,592 n.s.
Score der Entwicklung Tag 3 Mittelwert	52 16,57 ± 8,30	25 16,67 ± 8,30	p=0,961 n.s.
Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	52 1,79 ± 0,82	25 2,14 ± 0,65	p=0,212 n.s.
Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	52 0,92 ± 0,28	25 0,97 ± 0,12	p=0,528 n.s.
Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	52 1,79 ± 0,91	25 2,06 ± 0,59	p=0,432 n.s.
Median des Alters	39,49 ± 3,82	38,23 ± 4,20	p=0,076 Trend

**Tabelle 7: Vergleich der Embryoentwicklung nach dem Auftauen bei der langsamen Einfrieremethode und bei der Vitrifikationsmethode**

#### **4.6 Vergleichsdaten der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik beim langsamen Einfrieren und bei der Vitrifikation unterteilt in Altersklassen**

##### **Jüngste Altersgruppe:**

In diesem Abschnitt der Auswertung wird über die beiden unterschiedlichen Kryoverfahren berichtet, die in drei verschiedenen aufsteigende Altersgruppen aufgeteilt wurden. Die erste Altersgruppe bestand aus den jüngsten Patientinnen unserer Untersuchungsreihe, den 27 bis 34 jährigen Patientinnen. In der Gruppe der langsamen Einfrieremethode betrug das Durchschnittsalter (Median)  $31,82 \pm 0,99$  mit einer Gruppe von 9 Zyklen (16,07 %) bei insgesamt 56 Entwicklungszyklen. Die Vitrifikationsgruppe enthielt einen Altersdurchschnitt von  $31,16 \pm 2,59$  und 8 Zyklen (24,24 %) bei insgesamt 33 Entwicklungszyklen, wo es zu keinen Auffälligkeiten kam.

Somit hat die langsame Einfriergruppe den zahlenmäßig höheren Anteil und die Vitrifikationsgruppe das jüngere Durchschnittsalter. Die Entwicklung der Blastomeren, der Qualität und des Scores am Tag zwei ließ in beiden Kryoverfahren unter 35 Jahren keine Auffälligkeiten erkennen, wobei die Blastomeren und der Score geringfügig zu Gunsten der Vitrifikationsgruppe ausfiel, stattdessen sich aber die Qualität der Embryoentwicklung bei der langsamen Einfriergruppe besser darstellte.

Ähnlich sah es wiederum am darauffolgenden Entwicklungstag aus.

Am Tag drei zeigten sich bei 8 Zyklen (14,28%) der langsamen Einfrieremethode und bei 6 Vitrifikationszyklen (18,18 %) die Blastomerenentwicklung, die Qualitätsentwicklung und der Score als unauffällige Beobachtungen der beiden Prüfgrößen. Alle drei Messgrößen fielen positiver für die Vitrifikationsmethode aus.

Ebenfalls, wie am Tag drei, fielen die Messungen von Tag zwei auf Tag drei aus. Keine Besonderheiten im statistischen Sinne .

In dieser Messreihe konnte die Vitrifikationsmethode bessere Ergebnisse in der Qualität erreichen, wobei aber das Blastomerenwachstum und die zusammenfassende Scoreberechnung einen Vorteil in der langsamen Einfriergruppe zeigten.

Eine bessere Übersicht ist in nachgestellter Tabelle 8 zu sehen.



Altersklassen von 27 bis 34 Jahren	Slow Zyklen	Vitrifikationszyklen	p ( $\chi^2$ -Test/2-Stichprobent-Test)
Blastomeren Entwicklung Tag 2 Mittelwert	(n=9 Kryozyklen Embryonen) (16,07 %) (9/56) 2,94 ± 1,55	(n=8 Kryozyklen Embryonen) (24,24 %) (8/33) 3,00,± 1,25	p=0,9398 n.s.
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2 Mittelwert	9 2,94 ± 1,55	8 3,02 ± 1,21	p=0,9418 n.s.
Score der Entwicklung Tag 2 Mittelwert	9 11,35 ± 6,51	8 10,69 ± 5,26	p=0,8301 n.s.
Blastomeren Entwicklung Tag 3 Mittelwert	(n=8 Kryozyklen Embryonen) (14,28%) (8/56) 5,04 ± 2,40	(n=6 Kryozyklen Embryonen) (18,18 %) (6/33) 6,17 ± 2,03	p=0,3988 n.s.
Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3 Mittelwert	8 2,84 ± 0,96	6 3,33 ± 0,75	p=0,3399 n.s.
Score der Entwicklung Tag 3 Mittelwert	8 19,00 ± 10,25	6 22,50 ± 8,32	p=0,5269 n.s.
Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	8 2,00 ± 0,42	6 1,83 ± 0,24	p=0,3926 n.s.
Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	8 0,99 ± 0,16	6 1,06 ± 0,12	p=0,4511 n.s.
Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3 Mittelwert	8 2,03 ± 0,69	6 1,94 ± 0,39	p=0,7873 n.s.
Median des Alters	31,82 ± 0,99	31,16 ± 2,59	p=0,2911 n.s.

**Tabelle 8: Vergleich der Entwicklung von Blastomeren, Qualität und Score der unter 35 jährigen Patientinnen bei der langsamen Einfrieremethode und bei der Vitrifikation**

**Mittlere Altersgruppe:**

Als nächstes betrachteten wir die 35 bis 39 jährigen Polkörperpatientinnen.

In der Gruppe der langsamen Einfriermethode hatten wir am Tag zwei 19 Zyklen (33,92 %) mit Transfers, bei der Vitrifikationsgruppe 11 Zyklen (33,33 %) mit Transfers, was nicht signifikant niedriger war. Das Durchschnittsalter (Median) betrug bei der Gruppe der langsamen Einfriermethode  $38,01 \pm 1,45$  Jahre und bei der Vitrifikationsgruppe  $37,06 \pm 1,12$ , ebenfalls nicht auffällig geringer ( $p=0,3067$ ). Der Vergleich bezüglich der Blastomeren, der Qualität und des Scores vom Tag zwei war unauffällig.

Im Detail betrachtet erbrachte das Ergebnis eine bessere Blastomerenentwicklung für die Gruppe der langsamen Einfriermethode, in der Qualität und Scorebeurteilung schnitt die Vitrifikationsgruppe besser ab.

Der Tag drei bestand bei der langsamen Einfriermethode nur noch aus 17 Zyklen (30,35 %) und bei der Vitrifikationsmethode aus 10 Zyklen (30,30 %), was auch hier zu keinen signifikanten Unterschieden führte. Weiterhin gestaltete sich das Ergebnis in allen drei weiteren Prüfgrößen (Embryoentwicklung, Qualität und Score) nicht auffällig. Die Blastomeren entwickelten sich tendenziell bei der Gruppe der langsamen Einfriermethode besser und ebenfalls die Scoreberechnung fiel in dieser Gruppe besser aus. Die Qualität hingegen zeigte eine leicht bessere Tendenz der ausgewerteten Ergebnisse bei der Vitrifikationsmethode.

In der Gesamtfassung sah nun die Entwicklung von Tag zwei auf Tag drei folgendermaßen aus:

Bei der Blastomerenentwicklung, der Qualitätsentwicklung und der Scoreberechnung zeigten sich keine Signifikanzen. In dieser Altersklasse schnitt bei der Punkteverteilung die langsame Einfriermethode in allen drei Untersuchungsgrößen am besten ab.

Die Tabelle 9 verdeutlicht die Zusammenhänge.

Altersklassen von 35 bis 39 Jahren	Slow Zyklen	Vitrifikationszyklen	p (x <sup>2</sup> -Test/2- Stichproben-t- Test)
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 2</b>	(n=19 Slowzyklen Embryonen) (33,92 %) (19/56)	(n=11 Vitrifikationszyklen Embryonen) (33,33 %) (11/33)	p=0,7085  n.s.
<b>Mittelwert</b>	<b>2,58 ± 1,39</b>	<b>3,31 ± 0,80</b>	
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	p=0,2771
<b>Mittelwert</b>	<b>2,95 ± 0,87</b>	<b>2,39 ± 1,15</b>	n.s.
<b>Score der Entwicklung Tag 2</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	p=0,6452
<b>Mittelwert</b>	<b>8,26 ± 3,68</b>	<b>9,03 ± 4,40</b>	n.s.
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 3</b>	(n=17 Slowzyklen Embryonen) (30,35 %) (17/56)	(n=10 Vitrifikationszyklen Embryonen) (30,30 %) (10/33)	p=0,2253  n.s.
<b>Mittelwert</b>	<b>5,30 ± 2,20</b>	<b>4,35 ± 1,59</b>	
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	p=0,6698
<b>Mittelwert</b>	<b>2,94 ± 0,95</b>	<b>3,09 ± 0,76</b>	n.s.
<b>Score der Entwicklung Tag 3</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	p=0,3994
<b>Mittelwert</b>	<b>18,41 ± 8,51</b>	<b>15,75 ± 6,75</b>	n.s.
<b>Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	p=0,4585  n.s.
<b>Mittelwert</b>	<b>2,35 ± 0,88</b>	<b>2,11 ± 0,71</b>	
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	p=0,3047
<b>Mittelwert</b>	<b>1,01 ± 0,17</b>	<b>0,96 ± 0,08</b>	n.s.
<b>Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	p=0,1866
<b>Mittelwert</b>	<b>2,38 ± 1,05</b>	<b>1,97 ± 0,46</b>	n.s.
<b>Median des Alters</b>	<b>38,01 ± 1,45</b>	<b>37,06 ± 1,12</b>	p=0,3067  n.s.

**Tabelle 9: Vergleich der 35 bis 39- jährigen Patientinnen nach Vitrifikation versus langsames Einfrieren der Eizellen bezüglich der Embryoentwicklung**

### **Älteste Gruppe:**

Die letzte Alterskategorie, in der wir den Verlauf der Embryoentwicklung beobachtet haben, bestand aus den 40 bis 46 jährigen Patientinnen. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der Anzahl der Zyklen, die bei der langsamen Einfrieremethode mit 28 Zyklen (50 %) doppelt so groß war wie bei der Vitrifikationskontrollgruppe mit 14 (42,42 %) Zyklen.

Das Alter war statistisch gesehen mit  $p=0,0357$  auffällig, wobei wir in der Vitrifikationsgruppe ( $40,49\pm 1,02$ ) die Patientinnen mit dem jüngeren Altersdurchschnitt verzeichnen konnten.

Bei der Entwicklung der Blastomeren ( $p=0,0101$ ) und des Scores ( $p=0,0710$ ) am Tag zwei, gab es signifikante Unterschiede zugunsten der langsamen Einfrieremethode. Anders sah es bei der Qualität ( $p=0,8143$ ) der Embryonen aus, diese war nicht signifikant auffällig. Das Ergebnis in der Gesamtbetrachtung fiel zugunsten der langsamen Einfrieremethode aus.

Tag drei der Untersuchungen fiel etwas anders aus. Hierbei ergaben sich bei der Blastomerenentwicklung, der Qualitätsentwicklung und der Scoreberechnung keine Besonderheiten. Es ist zu erwähnen, dass alle drei Prüfgrößen bei der langsamen Kryomethode besser ausfielen als bei der Vitrifikationsgruppe, wobei der zahlenmäßige Anteil am Tag drei noch stärker als am Vortag differierte (27 Zyklen des langsamen Einfrierens und 9 Vitrifikationszyklen).

Bei der Verfolgung der Prüfgrößen von Tag zwei auf Tag drei waren die Resultate signifikant, bei der Blastomerenentwicklung mit  $p=0,0157$  und im Trend liegend beim Score mit  $p=0,0553$ , jedoch nicht auffällig in der Qualitätsentwicklung. Hier gab es bei der Blastomerenentwicklung und der Scoreberechnung einen Vorteil für die Vitrifikationsgruppe und die Qualität schnitt geringfügig besser in der langsamen Einfrierkontrollgruppe ab.

In der Tabelle 10 werden die ermittelten Daten der höchsten Altersgruppe (40 bis 46 jährigen) dargestellt.

Altersklassen von 40 bis 46 Jahren	Slow Zyklen	Vitrifikationszyklen	p (x <sup>2</sup> -Test/2- Stichproben- t-Test)
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 2</b>	(n=28 Slowzyklen Embryonen) (50 %) (28/56)	(n=14 Vitrifikationszyklen Embryonen) (42, 42 %) (14/33)	<b>p=0.0101</b>  signifikant
<b>Mittelwert</b>	<b>2,93 ± 1,35</b>	<b>1,92 ± 0,97</b>	
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 2</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>p=0.8143</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>3,05 ± 0,91</b>	<b>3,12 ± 0,88</b>	<b>n.s.</b>
<b>Score der Entwicklung Tag 2</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>p=0.0710</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>9,82 ± 5,01</b>	<b>7,27 ± 3,48</b>	<b>Trend</b>
<b>Blastomeren Entwicklung Tag 3</b>	(n=27 Slowzyklen Embryonen) (48,21 %) (27/56)	(n=9 Vitrifikationszyklen Embryonen) (27,27 %) (9/33)	<b>p=0.4096</b>  n.s.
<b>Mittelwert</b>	<b>4,56 ± 2,00</b>	<b>3,87 ± 2,01</b>	
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen Tag 3</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>p=0.7246</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>2,94 ± 0,89</b>	<b>2,80 ± 1,00</b>	<b>n.s.</b>
<b>Score der Entwicklung Tag 3</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>p=0.7821</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>14,70 ± 6,96</b>	<b>13,81 ± 7,94</b>	<b>n.s.</b>
<b>Blastomeren Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>p=0.0157</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>1,64 ± 0,38</b>	<b>2,37 ± 0,68</b>	<b>signifikant</b>
<b>Qualitätsentwicklung der Embryonen von Tag 2 auf Tag 3</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>p=0.3706</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>0,98 ± 0,06</b>	<b>0,93 ± 0,14</b>	<b>n.s.</b>
<b>Score der Entwicklung von Tag 2 auf Tag 3</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>p=0.0553</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>1,61 ± 0,40</b>	<b>2,23 ± 0,76</b>	<b>Trend</b>
<b>Median des Alters</b>	<b>41,22 ± 1,77</b>	<b>40,49 ± 1,02</b>	<b>p=0.0357</b> signifikant

**Tabelle 10: Statistischer Vergleich der 40 bis 46- jährigen Patientinnen nach PKD beim langsamen Einfrieren und bei der Vitrifikation bezüglich der Embryoentwicklung**

## **5 Diskussion**

### **5.1 Polkörperdiagnostik Methode zur genetischen Frühdiagnostik**

Heutzutage gibt es durch die Polkörperdiagnostik eine sichere Methode um besonders für ältere Paare, nach mehreren fehlgeschlagenen Implantationsversuchen, im Rahmen der künstlichen Befruchtung die Eizellen vor dem Transfer in die Gebärmutter auf chromosomale Veränderungen bestimmter Chromosomen zu untersuchen.

Eine Einschränkung ist bei älteren Patientinnen die zur Verfügung stehende Anzahl an entwicklungsfähigen Eizellen. Für den Transfer von einem bis zwei euploiden Embryonen werden durchschnittlich sechs bis acht Eizellen benötigt (Montag und van der Ven, 2003).

Durch die PKD können numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen diagnostiziert werden, die aufgrund einer mütterlichen Fehlverteilung verursacht worden sind.

Im Rahmen der assistierten Reproduktion stellt die PKD in Deutschland die einzige Möglichkeit zu einer indirekten Untersuchung der Eizellen dar (Montag et al., 2002).

Voraussetzungen zur Durchführung einer Polkörperdiagnostik ist eine intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) mit anschließendem Embryotransfer.

Die PID ist in Deutschland nicht zulässig (Montag et al., 2002).

Die Methode der Polkörperbiopsie wurde erstmals 1990 in Chicago durchgeführt (Verlinsky et al., 1990) und seit 1997 in Bonn wissenschaftlich adaptiert und seit 2001 klinisch eingesetzt (van der Ven et al., 2002).

Zunächst sei erwähnt, dass bei der Polkörperdiagnostik eine Penetration der Zona pellucida in der Eizelle notwendig ist, um an die Polkörper zu gelangen. Damit führt diese Untersuchung zu einem permanenten Defekt in dieser Schicht. Das bedeutet, dass ab dem Zeitpunkt der Polkörperdiagnostik ein ständiger Defekt in der Zona pellucida verbleiben wird und es somit unerlässlich ist exakt zu arbeiten, um jegliche Art von Kontamination zu vermeiden.

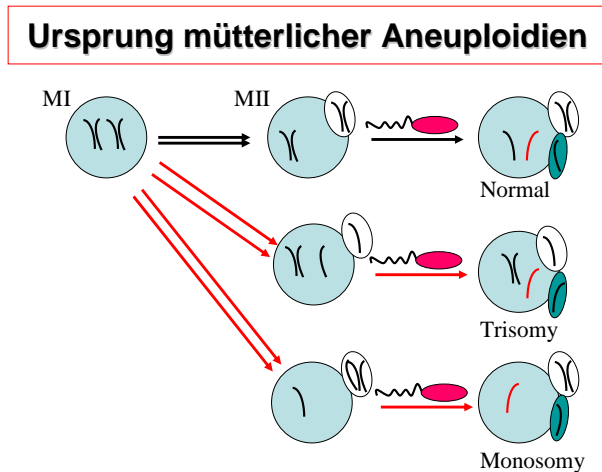
Die Eröffnung der Zona pellucida geschieht derzeit durch die mechanische oder die laserassistierte Methode. Die laserassistierte Methode mit ihrer schnellen und atraumatischen Entnahme der Polkörper wurde in der Bonner Universitäts-Frauenklinik entwickelt (Montag et al., 1998) im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe aus Chicago, die die mechanische Zona-dissektion mittels einer Kapillare bevorzugt (Zona-drilling basierende Methode). Die Bonner Erfahrungen belegen, dass die laserassistierte Biopsie die Verletzungsgefahr der Eizellen und den Verlust der Polkörper senken (Montag et al., 2003, 2004b). Daher wird die Lasermethode wegen ihrer besseren Steuerbarkeit an immer mehr Zentren eingesetzt. Die chemische Variante (enzymatische Ausdünnung der Zona pellucida) kann bei Eizellen nicht durchgeführt werden, da dies zu Schädigungen führt die ein weiteres Wachstum der Eizellen verhindern.

Durch die FISH Untersuchung mit herkömmlichen Sonden (5-color-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) können die Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 im Polkörper dargestellt und beurteilt werden (Montag et al., 2005). Die zeitliche Spanne bis zur Verschmelzung der Vorkernmembranen (EschG, 1990) bedingt ein optimiertes Vorgehen, auch bezüglich der zur Verfügung stehenden Chromosomensonden, so dass von der Bonner Arbeitsgruppe eine Modifikation, die 6-color-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung, entwickelt wurde (Montag et al., 2005). Somit besteht die Möglichkeit in einer Hybridisierungsrunde sechs Chromosomen (13, 16, 18, 21, 22 und z. B. das X-Chromosom) zu beurteilen.

Ein im Moment noch nicht gängiges Verfahren ist die vergleichende „genomische Hybridisierung“ (comparative genomic hybridisation, CGH). Sie hat den Vorteil, dass sie beim Screening die Möglichkeit bietet, im Rahmen einer Polkörperdiagnostik, alle Chromosomen des Genoms darzustellen und zu beurteilen (Wells et al., 1999). Auch diese Technik wurde in Bonn an deutsche Verhältnisse adaptiert (Landwehr et al., 2007). Weil es sich bei der CGH durch die DNA Extraktion, Amplifikation und Hybridisierung um eine zeitlich sehr aufwendige Methode handelt, wird diese erst nach weiterer Optimierung in Zukunft für die PKD zur Verfügung stehen.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Vorteile der PKD darin liegen, dass es sich bei der Biopsie um extraembryonale Zellen handelt, somit die Zellmasse des Embryos geschont wird und die Durchführung konform mit dem Embryonenschutzgesetz ist.

Die PKD ist auf maternale Indikationen beschränkt was bedeutet, dass nur das mütterliche Genom auf numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen untersucht werden kann und nur bedingt auf monogene Erbkrankheiten (Montag et al., 2003).



### Abbildung 6:

In Abbildung 6 sieht man den noch vorhandenen diploiden Chromosomensatz, der vor der Ovulation und nach der Reifeteilung 1 auf einen haploiden (einfachen) Chromosomensatz reduziert wird.

Der haploide Chromosomensatz verbleibt in der Zelle, während die andere Hälfte (unter Bildung des ersten Polkörpers) aus dem Zytoplasma geschleust wird.

Nach Eindringen des Spermiums in die Eizelle erfolgt eine Aufspaltung der Chromosomen in zwei Chromatiden (wobei eine Chromatide unter Bildung des zweiten Polkörpers ausgeschleust wird).

Bei einer Fehlverteilung in der Meiose 1 kann es somit zu fehlenden oder überzähligen Chromatiden in der Eizelle kommen (Monosomie oder Trisomie).

Werden beispielsweise drei Chromatiden im Polkörper (als Spiegelbild der Eizelle) erkannt, dann weist die Eizelle nur noch ein Chromatid auf und der sich daraus entwickelnde Embryo würde an einer Monosomie erkranken.

**Die Methoden der künstlichen Befruchtung mit einem chromosomal gesunden Embryo werden auch weiterhin noch erforscht und in der Methodik verbessert.**

**Weiterhin besteht die Möglichkeit Eizellen im Vorkernstadium nach einem bestimmten vorgegebenen Schema (in unserer Studie langsames Einfrieren, Vitrifikation) einzufrieren**



und aufzutauen. Da die Empfindlichkeit des Zellmaterials nach dem Auftauen zur Degeneration und Arretierung führen kann und ein geplanter Embryotransfer somit nicht mehr möglich wäre, ist es unumgänglich dem vorgegebenen Schema des Einfrierens und des Auftauens Folge zu leisten.

Mit der Kryokonservierung von Vorkerneizellen wird den Patientinnen ein wiederholter Embryotransfer zu einem späteren Zeitpunkt, ohne eine erneute hormonelle Vorbehandlung, ermöglicht.

Der Hintergrund unserer Studie war die Beobachtung der Weiterentwicklung und die Implantation von Eizellen nach Polkörperdiagnostik.

Einerseits betrachteten wir das Verhalten der Eizellen nach der Polkörperdiagnostik vor und nach dem Einfrieren.

Andererseits verglichen wir die beiden unterschiedlichen Einfrieremethoden (langsames Einfrieren und Vitrifikation) die wir zur Kryokonservierung von Vorkerneizellen nach der Polkörperdiagnostik benutzen.

Zielgrößen unserer Studie waren die Weiterentwicklung der Eizellen bezüglich Altersabhängigkeit, Schwangerschaftsrate, Degeneration und Arretierung.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Vergleich der Patientinnen nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen in der gesamten Altersklasse (26 Jahre bis 46 Jahre)**

**Der Vergleich des gesamten Polkörperdiagnostik Patientenkollektivs vor und nach Kryokonservierung der Eizellen zeigte eine heterogene Altersverteilung, die durch die jüngste Patientin mit 26 Jahren und die älteste Patientin mit 46 Jahren begrenzt war.**

**Wir konnten bei der Polkörpergruppe ohne Kryokonservierung der Eizellen mit einem jüngeren Durchschnittsalter, sowohl eine höhere serologische Schwangerschaftsrate als auch eine höhere klinische Schwangerschaftsrate nachweisen.**

**Hier vermuten wir als Gründe der erhöhten Schwangerschaftsraten das jüngere Durchschnittsalter der PKD Gruppe ohne Kryokonservierung und die Differenz bei der Anzahl der Embryonen, die pro Transfer übertragen wurden.**

**In den Frischzyklen wurden bei keiner Patientin pro Zyklus weniger als zwei Embryonen transferiert, im Vergleich dazu wurde in der Kryokontrollgruppe die überwiegende Anzahl der Transfers mit nur einem Embryo vorgenommen.**

**Demzufolge erhärten sich unsere oben genannten Vermutungen und die daraus resultierende erhöhte Chance auf eine Schwangerschaft bei einem Transfer mit zwei und mehr Embryonen.**

**Eine Arbeitsgruppe aus Helsinki kam in einer Studie, bei der auf Embryoebene der qualitativ beste Embryo zum Transfer ausgesucht wurde, dem so genannten „elektive single embryo transfer“, zu anderen Ergebnissen. Diese Studiengruppe verglich zwei Gruppen mit Embryotransfers nach Kryokonservierung, wobei der ersten Gruppe nur ein Embryo pro Behandlungszyklus transferiert wurde und der Kontrollgruppe zwei Embryonen pro Transfer übertragen wurden. Die allgemeine Schwangerschaftsrate fiel bei den Transfers mit einem Embryo nicht geringer aus als bei den Transfers mit zwei Embryonen. Ein weiterer Vorteil bei den Transfers mit nur einem Embryo ist die Vermeidung von Mehrlingsschwangerschaften (Hyden-Granskog C. et al., 2005). In Deutschland ist dieses Vorgehen durch die Einschränkungen des Embryonenschutzgesetzes nicht möglich, aber schon die Polkörperuntersuchung führt zu einer Selektion der qualitativ besseren Eizellen und damit zu einer besseren Embryoqualität.**

Dies ist sicher eine Besonderheit des Patientenkollektives, welches einer Polkörperdiagnostik zugeführt wird und somit nicht mit den Daten aus Finnland zu vergleichen.

Weiterhin konnten wir herausfinden, dass nach Kryokonservierung von biopsierten Eizellen im Vorkernstadium mit nachfolgendem Auftauen und Transfer in einigen Zyklen die Einnistung eines Embryos zunächst ganz normal stattfand, es aber in keinem Fall unserer untersuchten Zyklen zu einer beständigen und damit überlebensfähigen Implantation eines Embryos in die Gebärmutterschleimhaut kam.

Generell kam es bei den PKD Zyklen mit nachfolgendem Einfrieren der Vorkerneizellen durch die Vitrifikation und die herkömmliche langsame Einfrieremethode in unserer Untersuchungsreihe bis zum Abschluss dieser Studie bei keinem Auftauzyklus mit anschließendem Embryotransfer zu einer klinischen Schwangerschaft und damit zur Geburt eines Kindes.

Die Gründe mangelnder Implantation des Embryos nach dem Einfrierprocedere sind derzeit noch nicht ausreichend wissenschaftlich belegt.

Erwartungsgemäß ist das Alter bei der Gesamtbetrachtung der Patientinnen in der Kryokonservierungsgruppe höher als das Alter der Patientinnen bei den Frischzyklen, da die kryokonservierten Eizellen aus dem Bestand der chromosomal unauffälligen und überzähligen Vorkerneizellstadien der Frischzyklen stammen, die im frischen Zustand nicht transferiert wurden und dann zu einem späteren Zeitpunkt, nach dem Auftauen, bei einem weiteren Versuch transferiert werden konnten.

Wir vermuten, dass bei der Kryokonservierung von Eizellen ebenfalls Energieträger und Zellorganellen der Zelle durch den Dehydrierungsprozess in Mitleidenschaft gezogen werden und dadurch die Einnistung in die Gebärmutterschleimhaut erschwert wird.

Eine Arbeitsgruppe von Naether et al. erprobte bei Patientinnen im fortgeschrittenem Alter ein anderes Vitrifikationsprotokoll bei dem ebenfalls überzählige euploide Eizellen zunächst eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt, nach dem Auftauen, transferiert wurden. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, bei den Patientinnen mit frischem Embryotransfer, konnte in der Kryokonservierungsgruppe von einer Schwangerschaft mit gesunder fortschreitender Entwicklung des Feten (Stand der Studienergebnisse 09/07 Beobachtungen bis zur 22. Schwangerschaftswoche) berichtet werden (Naether et al., 2008).

### **5.2.2 Vergleichsdaten der langsamen Einfriermethode und der Vitrifikation nach Polkörperdiagnostik in der gesamten Altersklasse (27 Jahre bis 46 Jahre)**

Ferner betrachteten wir im zweiten Schritt unserer Auswertungen die Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Einfriermethoden.

Unseren Ergebnissen zufolge erlangte die Vitrifikationsmethode mit einer höheren Anzahl an überlebenden Eizellen nach dem Auftauen und einer höheren serologischen Schwangerschaftsrate einen Vorteil gegenüber der langsamen Einfriermethode.

Als mögliche Ursache der besseren Ergebnisse für die Vitrifikationsmethode nehmen wir wiederum die höhere Anzahl der Embryonen pro Transfer, das geringere Durchschnittsalter und die Art und Weise der Einfriertechnik an.

Eine Vergleichsstudie der Überlebensrate von biopsierten Embryonen nach dem Auftauen bei vier verschiedenen Kryokonservierungsmethoden wurde von einer Forschungsgruppe der Sun Yat-Sen Universität in China durchgeführt.

Der Hintergrund dieser Studie war zu eruieren, welche von den vier verschiedenen Kryokonservierungsmethoden die höchste Überlebensrate der eingefrorenen biopsierten Embryonen aufwies.

Verglichen wurden die Standard Einfriermethode, die modifizierte Einfriermethode, die modifizierte Auftaumethode und die Vitrifikationsmethode.

Als Resultat protokollierte die Arbeitsgruppe, dass das Verhältnis der Embryonen mit einer über 50% Blastomeren Überlebensrate beziehungsweise einer kompletten Blastomeren Überlebensrate bei der Vitrifikationsgruppe signifikant höher ausfiel als bei den anderen drei Einfrierverfahren (Zengh W.T. et al., 2005).

Auch wenn in der chinesischen Arbeitsgruppe über kryokonservierte Embryonen und in unseren Datenreihen über eingefrorene Vorkernstadien berichtet wird, können wir trotzdem die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe als Bestätigung unserer Ergebnisreihe sehen. Bei den Auswertungen unserer Daten über die beiden Kryoverfahren

(Vitrifikation und langsames Einfrieren) konnten wir ebenso einen Vorteil der Überlebensrate von Eizellen bei der Vitrifikation ermitteln.

Es zeigten sich jedoch beim Entwicklungsprozess der Eizellen nach dem Auftauen Unterschiede bezüglich der Degenerationsrate.

Beim Einfrieren der Eizellen durch die langsame Einfrieremethode kam es nach dem Auftauen häufiger zur Degeneration der Eizellen als bei der Vitrifikationsmethode.

Entgegengesetzt verhielt sich das Bild der arretierten Eizellen, die nach dem Auftauen zahlenmäßig vermehrt bei der Vitrifikation zu beobachten waren.

Die ersten Vermutungen dieser unterschiedlichen Ergebnisse lenken uns in die Richtung der verschiedenen Einfriertechniken und der unterschiedlichen Zusammensetzungen der Einfriermedien.

Um eine belegbare Ursache der Degenerationsrate nach dem Einfrieren zu verifizieren wäre eine gesonderte Studie mit höheren Fallzahlen notwendig.

Dass es Unterschiede bezüglich der Schwangerschafts- und Überlebensraten von Eizellen aufgrund verschiedener Zusammensetzungen der Kryokonservierungslösungen gibt beobachteten Wissenschaftler aus Indianapolis.

Der Hintergrund dieser wissenschaftlichen Datenauswertung lag darin festzustellen, wie die Eizellen auf unterschiedliche Zusammensetzungen der Einfrierlösungen reagieren, ob sie Auswirkungen auf das Überleben einer Eizelle haben und ob eine Implantation und damit auch Schwangerschaft durch die unterschiedlichen Konzentrationen beeinflusst werden konnte. Verglichen wurden zwei, in ihrer Zusammensetzung unterschiedliche Einfrierlösungen mit einem Natriumzusatz bezüglich der Propandiol- und Sucrosekonzentration.

Die erste Natriumlösung enthielt einen Zusatz von einer 1,5 molaren Propandiol- und einer 0,1 molaren Sucroslösung. Die zweite Natriumlösung enthielt einen 1,5 molaren Propandiol- und einen 0,2 molaren Sucrosezusatz.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass bei Patientinnen deren Eizellen mit einer Kryokonservierungsflüssigkeit die aus einer Natriumlösung bestand, welche eine höhere Konzentration an Sucrose enthielt, eine bessere Schwangerschafts- und Überlebensrate der Eizellen erzielt werden konnte als bei der Kontrollgruppe, bei der die Natriumlösung eine geringere Konzentration an Sucrose enthielt (Boldt J. et al., 2003).

### **5.2.3 Vergleich der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik vor und nach Kryokonservierung der Eizellen in der gesamten Altersklasse (26 Jahre bis 46 Jahre)**

Bei diesen Beobachtungen kam es zu hochsignifikanten Auffälligkeiten beim Vergleich der beiden PKD Gruppen vor und nach Kryokonservierung der Eizellen.

In der Frischzyklusgruppe kam es bei fast allen Auswertungen zu positiveren Aspekten als in der Kryokontrollgruppe, wobei wir wieder annehmen, dass dies mit dem niedrigeren Durchschnittsalter zusammenhängen könnte.

Bei Patientinnen bis zum 34sten Lebensjahrs stellten wir allerdings keine Beeinflussung der Ergebnislage durch geringe Altersschwankungen fest.

Keine statistischen Auffälligkeiten waren bei der Betrachtung der Embryoqualität und der Scoreberechnung vom zweiten zum dritten Entwicklungstag zu erkennen.

Die zusammenfassende rückblickende Betrachtung der Entwicklung einer Eizelle vom zweiten auf den dritten Tag sagt uns etwas über die Quantität des Zellstadiums (Anzahl der Zellen/ Teilungsrate) und über die Qualität (Wertigkeit) einer Eizelle aus.

Wenn es an einem der beiden Untersuchungstage (zweiter und dritter Tag) zu einer Entwicklungsverzögerung der Eizelle in der Kryogruppe kam, so konnte diese zeitliche Entwicklungsverzögerung durch eine forcierte Weiterentwicklung der Eizelle an einem der anderen beiden Tage (meistens am dritten Tag) wieder aufgeholt werden.

Zusammenfassend können wir behaupten, dass die kryokonservierten Vorkerneizellen nach dem Auftauen mit einer zeitlichen Verzögerung ihrer Weiterentwicklung reagierten, diese Wachstumsverzögerung aber nach einer Erholungsphase von den Vorkerneizellen wieder aufgeholt wurde.

Ein weiterer Grund dieser Wachstumsverzögerung könnte möglicherweise mit der Dehydrierung der Eizellen vor dem Einfrieren und dem Hydrieren der Eizellen nach dem Auftauen zusammenhängen. Wir konnten beim Vergleich der beiden Einfriermethoden feststellen, dass diese temporäre Wachstumsverzögerung der Eizellen im Wesentlichen durch die Vitrifikation hervorgerufen wurde.

**F. Nawroth et al. konnten in ihrer Studie über optimierte diagnostische und therapeutische Konzepte bezüglich der Langzeitüberlebensrate nach Tumorerkrankungen feststellen, dass bei der langsamen Kryokonservierung als wichtigster Faktor der Zellschädigung die intrazelluläre Kristallisation im Vordergrund steht. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Vitrifikation zu keiner Äquilibration. Die hohen Einfriergeschwindigkeiten führen anstelle der Kristallisation zu einem glasförmigen Zustand der Eizellstadien. Der Nachteil der Vitrifikation besteht darin, dass den Zellen in kürzester Zeit viel Wasser entzogen werden muss und aus diesem Grund die Konzentrationen der Kryoprotektiva wesentlich höher gewählt werden müssen als beim langsamen Einfrierverfahren, was wiederum ein größeres toxisches Risiko der zu vitrifizierenden Proben mit sich zieht (Nawroth et al., 2004).**

**Unberücksichtigt bei der Berechnung dieser Daten blieben biologische Störfaktoren, ein höheres Alter der Kryokonservierungsgruppe sowie eine im Verlauf verminderte Anzahl an Zyklen bei den frischen Transfers.**

**Schlussfolgernd bedeutet dies, dass in der gesamten Altersklasse unseres Patientenkollektivs ein Embryotransfer nach einer frischen Entnahme der Eizellen bei einem jüngeren Durchschnittsalter (Ausnahme ist die Alterskategorie bis zum 34.sten Lebensjahr) eine konstantere Weiterentwicklung der Eizellen zeigte.**

**Eine qualitativ und quantitativ gute Eizellentwicklung nach PKD führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass sich der Embryo in die Gebärmutterschleimhaut einnistet und es somit zu einer klinischen Schwangerschaft und zur Geburt eines Kindes kommt.**

**Wir dürfen auch weiterhin nicht in Vergessenheit geraten lassen, dass ursächlich für das schlechtere Ergebnis der jüngeren Kryokonservierungsgruppe unbeeinflussbare anderweitige idiopathische Störfaktoren mitverantwortlich sein können.**

#### **5.2.4 Vergleich der Embryoentwicklung nach Polkörperdiagnostik bei der langsamen Einfrieremethode und bei der Vitrifikation der Eizellen in der gesamten Altersklasse (27 Jahre bis 46 Jahre)**

Beim Vergleich der beiden unterschiedlichen Kryokonservierungsmethoden bezüglich der Entwicklungsbetrachtung der Eizellen nach dem Auftauen bei den Polkörperdiagnostik Patientinnen in der gesamten Altersgruppe können wir zusammenfassend berichten, dass es in dieser Untersuchungsreihe zu keinen rechnerisch signifikanten Besonderheiten kam.

Die Eizellen der langsamen Einfrieremethode wiesen durchgehend eine konstantere Entwicklung und ein konstanteres Wachstum der Eizellen nach dem Auftauen auf als die Vitrifikationsgruppe.

Bei der Vitrifikation stellten wir zunächst nach der Auftauphase eine leichte Wachstums- und Entwicklungsverzögerung der Eizellen fest. Nach einigen Stunden Erholungsphase zeigten diese Eizellen jedoch ein beschleunigteres Wachstum als die Eizellen der langsamen Einfrierkontrollgruppe, so dass sich demzufolge rückblickend dieser Wachstumsschub auf den Entwicklungssprung vom zweiten auf den dritten Tag auswirkte, welcher bei der Vitrifikationsmethode zu besseren Ergebnissen führte.

Wir gehen davon aus, dass diese temporäre Wachstumsverzögerung zum einen durch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Einfrierlösungen und zum anderen durch die schnelle Temperaturabsenkung beim schnellen Schockgefrieren zustande kam.

Eine Ausnahme machte auch hier wieder die jüngste Altersgruppenbetrachtung bei der wir feststellten, dass die vitrifikationsbehandelten Eizellen nicht, wie bei den anderen Altersgruppenbetrachtungen, zunächst eine gewisse Wachstumsverzögerung und im Anschluss einen Wachstumsschub einlegten, sondern durchgehend ein konstantes Wachstum zeigten. Hervorzuheben sei in der jüngsten Gruppe ebenfalls der dritte Tag der vitrifizierten Eizellen an dem ein gutes Eizellwachstum mit einer ebenso guten Qualitätsentwicklung beobachtet werden konnte.

In der mittleren Altersgruppe, der bis 39-jährigen Patientinnen, zeigten sogar die durch die langsame Einfrieremethode konservierten Eizellen, trotz eines leicht höheren Altersdurchschnitts, einen besseren Entwicklungssprung vom zweiten auf den dritten Tag. Obwohl in der ältesten Gruppe die Patientinnen der Vitrifikationsmethode ein statistisch signifikant jüngeres Alter und einen signifikant besseren Entwicklungssprung präsentierten als die Patientinnen der langsamen Kryokonservierungsmethode, konnten wir hier



tendenziell in den restlichen Positionen einen kleinen Vorteil für die langsam eingefrorenen Eizellen feststellen.

Dies widerspricht zwar einerseits unserer oben erwähnten These, dass ein jüngeres Alter zu besseren Entwicklungsergebnissen führt, wobei wir aber andererseits berücksichtigen müssen, dass unsere Patientinnen in der ältesten Subgruppe ohnehin bereits über vierzig Jahre alt waren und eine Altersdifferenz in dieser Untersuchungsreihe wiederum gesondert betrachtet werden sollte.

Hinzufügen möchten wir noch, dass die Empfindlichkeit der älteren Eizellen auf schädigende Einflüsse und Temperaturschwankungen durch das Einfrierprocedere größer ist als bei den jüngeren Eizellen.

Die drei Gruppen zusammenfassend betrachtet, ergab eine sehr heterogene Verteilung der Ergebnisse.

In einer Studie von Vanderzwalmen et al. wurde der Einfluss auf das Entwicklungsstadium, die weitere Entwicklung der befruchteten Eizelle sowie die Implantation nach dem Auftauen bei der Vitrifikationsmethode verfolgt.

Hier fanden Wissenschaftler heraus, dass die höchste Schwangerschaftsrate bei Eizellen nach Vitrifikation im frühen Blastozystenstadium erzielt werden konnte (Vanderzwalmen P. et al., 1998).

Wir können abschließend sagen, dass es bei der gesamten Prüfgruppe vor dem Einfrieren der Eizellen, verglichen mit der gesamten Prüfgruppe nach dem Einfrieren der Eizellen, zu einem konstanterem Wachstum und zu einer höheren Implantationsrate der frischen Eizellen kam.

Die eingefrorenen Eizellen, besonders die vitrifizierten Eizellen, benötigten nach dem Auftauen eine gewisse Latenzzeit zur Erholung um sich wieder konstant weiterentwickeln zu können; das bedeutet, dass es hier zu einer temporären Entwicklungsverzögerung nach dem Auftauen bei der Kryokonservierung von Eizellen kam.

**Bis zum Ende dieser Studie wurde keine klinische Schwangerschaft und damit Geburt eines Kindes bei einer Polkörperdiagnostikpatientin nach den beiden oben genannten Kryokonservierungsmethoden der Vorkerneizellen in der Universitäts-Frauenklinik in Bonn herbeigeführt.**

**Im Rahmen unserer Studie betrachteten wir neben den beiden oben genannten Kryoverfahren drei weitere Zyklen, in denen sechs Eizellen mit der sogenannten „modifizierten langsamen“ Einfriermethode (m-slow Methode) eingefroren wurden.**

**In diesen drei Zyklen mit sechs Embryotransfers kam es in einem Fall zur Implantation von zwei Eizellen wovon eine implantierte Eizelle eine Herzaktion aufwies. Wir verzeichneten bereits im Jahr 2007 die erste klinische Schwangerschaft bei der modifizierten langsamen Einfriermethode mit anschließender Geburt eines gesunden Kindes in der Uniklinik Bonn.**

**Es kam in einem Hamburger Zentrum für Pränataldiagnostik mit Hilfe einer modifizierten Vitrifikationsmethode (eine etwas andere Methode als wir sie in der Uniklinik Bonn einsetzen) im Jahr 2007 zu zwei klinischen Schwangerschaften.**

**In Anbetracht der Überlebensrate von Eizellen nach Polkörperdiagnostik mit anschließender Kryokonservierung raten wir in Bonn zur modifizierten-langsamen Einfriermethode, denn in unserer Datenreihe kam es nach der Polkörperdiagnostik mit anschließender Einfrierung der Eizellen nur in diesem Verfahren zur Geburt eines Kindes.**

**Um eine derzeit genauer belegbare Datenlage erheben zu können sollte aufgrund der geringen Fallzahlen in einer gesonderten Studie mit höheren Fallzahlen das m-slow Verfahren bezüglich unserer oben genannten Kriterien erneut beobachtet und verifiziert werden.**

## **6 ZUSAMMENFASSUNG:**

Bei der Polkörperdiagnostik handelt es sich um ein Verfahren, welches im Rahmen einer assistierten Reproduktion einen indirekten Nachweis auf eine mütterliche Chromosomenfehlverteilung in der menschlichen Eizelle erbringt.

Mit Hilfe einer laserassistierten Biopsie und anschließender Untersuchung der Chromosomen und Chromatiden der Polkörper im FISH Verfahren (Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung) lassen sich bei dieser Untersuchung Rückschlüsse auf die chromosomale Beschaffenheit der Eizelle ziehen (Bild und Spiegelbild). Es gibt bisher keine Nachweise über einen negativen Entwicklungsverlauf der befruchteten Eizellen durch diese Untersuchungsmethode.

Als Grundlage unserer Studie diente der Vergleich eines Patientenkollektivs der Frauenklinik der Universität Bonn, bei dem in 191 Behandlungszyklen an 74 Patientinnen nach Polkörperdiagnostik die Eizellen vor und nach Kryokonservierung auf die weitere Entwicklung und nach dem Embryotransfer auf die Schwangerschaftsrate, in Abhängigkeit des Alters und der Kryokonservierungsmethode, beobachtet wurden.

Im ersten Teil der Studie konnten wir im Rahmen unserer Untersuchungen hochsignifikant auffällige Ergebnisse bei der Gegenüberstellung der beiden Kryokonservierungsmethoden (Slowverfahren und Vitrifikation) mit dem Frischzyklusverfahren bezüglich des Embryotransfers und der Schwangerschaftsrate zugunsten der Frischzyklusgruppe verzeichnen.

Ein Grund dieser statistischen Auffälligkeiten war die unterschiedliche Anzahl der transferierten Embryonen pro Zyklus. Im Frischzyklus wurden grundsätzlich zwei Embryonen pro Transfer (in 85 von 90 Zyklen  $p < 0.001$ ) beim Kryoverfahren vorwiegend nur ein Embryo pro Transfer (in 56 von 89 Zyklen  $p < 0.05$ ) übertragen.

Die serologische Schwangerschaftsrate lag zwar im Trend ( $p = 0,085$ ), aber positive klinische Schwangerschaftsergebnisse konnten ausschließlich in der Frischzyklusgruppe verzeichnet werden (11 klinische Schwangerschaften  $p = 0,00198$ ). Die Altersverteilung zeigte in den Vergleichsgruppen keine Signifikanzen, wobei die Kryokonservierungsgruppe einen etwas höheren Altersdurchschnitt aufwies als die Frischzyklusgruppe.

Hinsichtlich der statistischen Auswertungen bezüglich der Degeneration und Arretierung von Eizellen nach Kryokonservierung konnten wir beim Vergleich beider Einfriermethoden keine statistischen Auffälligkeiten feststellen. Zahlenmäßig zeigten sich jedoch bei der Vitrifikation weniger degenerierte Eizellen (10 von 59 überlebenden Eizellen), aber dafür mehr arretierte Eizellen (9 von 59 überlebenden Eizellen) als bei dem vergleichenden Slowverfahren (degenerierte Eizellen: 24 von 81 überlebenden Eizellen, arretierte Eizellen: 5 von 81 überlebenden Eizellen).

Bei den PKD Patientinnen mit anschließender Kryokonservierung (Vitrifikation/Slowverfahren) der Eizellen kam es bis zum Ende des Untersuchungszeitraums zu keiner klinischen Schwangerschaft und damit zu keiner Geburt eines Kindes.

Im Anschluss beobachteten wir im zweiten Teil unserer Studie die Blastomerenqualität- und Scoreentwicklung in drei Alterskategorien unterteilt.

Die Gesamtauswertung erbrachte in allen untersuchten Prüfgrößen, in der mittleren und in der höchsten Alterskategorie, ein hochsignifikant auffälliges Ergebnis zugunsten der Frischzyklusgruppe, wobei die jüngste Gruppe keine Signifikanzen zeigte.

Im Detail stellten wir beim Vergleich der beiden Kryokonservierungsverfahren (Vitrifikation/Slowverfahren) fest, dass bei den Eizellen die mit Hilfe des Slowverfahrens kryokonserviert worden waren, das Wachstum der Eizellen einen konstanteren Verlauf nahm als bei der Vitrifikation.

Die zunächst leicht wachstumsverzögerten Eizellstadien nach dem Auftauen, bei vorheriger Vitrifikation, wiesen jedoch nach spätestens 48 Stunden ein leicht gesteigertes Wachstumsverhalten auf, so dass sie sogar am Ende der Entwicklungsbeobachtung bessere Resultate beim Entwicklungssprung (Beobachtung von Tag 2 auf Tag 3) als die Slow-Vergleichsgruppe zeigten.

Somit ergibt sich laut Datenlage, dass die besten Erfolgsaussichten auf Implantation eines Embryos in die Gebärmutterschleimhaut bei der jüngsten Altersgruppe den unter 35 jährigen Patientinnen, deren Eizellen zuvor nicht kryokonserviert waren, beobachtet werden konnte.

Zum Schluss sei noch erwähnt, dass sechs Eizellen in drei Zyklen mit Hilfe des „modifizierten Slowverfahrens“ kryokonserviert wurden, aber aufgrund zu geringer Fallzahlen zurzeit keine generelle Bewertung möglich ist.

**Auch wenn aus der Kombination der Ergebnisse ein frischer Embryotransfer weiterhin noch bessere Chancen auf Erfolg einer Schwangerschaft hat als ein Embryotransfer nach Kryokonservierung der Eizellen, so macht es doch Sinn die überzähligen zur Verfügung stehenden Eizellen, nach unseren derzeitigen Auswertungen, durch die „modifizierte langsame Einfrieremethode“ (m-Slowverfahren) einzufrieren (6 kryokonservierte Eizellen führten zu zwei Fruchthöhlen und einer Herzaktion und letztendlich zur Geburt eines Kindes), um zu einem späteren Zeitpunkt ohne hormonelle Vorbehandlung und ohne aufwendiges Procedere einen weiteren Transfer vorzunehmen zu können.**

**Die Chancen auf eine Schwangerschaft mit einem chromosomal gesunden Kind steigen. Der Stressfaktor der Vorbehandlung entfällt und die Gewissheit, einen vor Implantation chromosomal untersuchten, mit großer Wahrscheinlichkeit, gesunden Embryo transferiert zu bekommen, wird für viele Patientinnen eine weitere Entlastung darstellen.**

**7            Abbildungsverzeichnis:**

<b>Abbildung 1: Biologie der Polkörper.....</b>	<b>9</b>
<b>Abbildung 2: Korrelation der Alter – Aneuploidierate.....</b>	<b>11</b>
<b>Abbildung 3: Polkörper „Spiegel der Eizelle“.....</b>	<b>19</b>
<b>Abbildung 4: Zeitfenster der Polkörperdiagnostik.....</b>	<b>33</b>
<b>Abbildung 5: Laserassistierte Biopsie.....</b>	<b>35</b>
<b>Abbildung 6: Ursprung mütterlicher Aneuploidien.....</b>	<b>64</b>

## 8 Tabellenverzeichnis:

<b>Tabelle 1:</b>	<b>Auswertung der gesamten Frischzyklus- und Kryozyklusgruppe nach PKD in der gesamten Altersklasse bezüglich der Schwangerschafts- und Implantationsrate.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 2:</b>	<b>Vergleichsdaten der beiden Prüfgrößen: Langsame Einfrierung und Vitrifizierung der Eizellen bezüglich Überlebensrate und Schwangerschaftsrate.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabelle 3:</b>	<b>Vergleich der Embryoentwicklung im Frisch- und Kryozyklus nach Polkörperdiagnostik in der gesamten Altersklasse.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 4:</b>	<b>Vergleich der Ergebnisse der Embryoentwicklung in der Alterskategorie der 26 bis 34-jährigen bei der Frischzyklusgruppe versus Kryogruppe.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabelle 5:</b>	<b>Vergleich der Embryoentwicklung bei den 35 bis 39-jährigen Patientinnen im Frischzyklus versus Kryozyklus.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 6:</b>	<b>Vergleich der Entwicklungsbeobachtungen in der Gruppe der 40 bis 46-jährigen PKD Patientinnen beim Frischzyklus und nach Kryokonservierung.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 7:</b>	<b>Vergleich der Embryoentwicklung nach dem Auftauen bei der langsamen Einfrieremethode und bei der Vitrifikationsmethode.....</b>	<b>55</b>
<b>Tabelle 8:</b>	<b>Vergleich der Entwicklung von Blastomeren, Qualität und Score der unter 35-jährigen Patientinnen bei der langsamen Einfrieremethode und bei der Vitrifikation.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabelle 9:</b>	<b>Vergleich der 35 bis 39-jährigen Patientinnen nach Vitrifikation versus langsames Einfrieren der Eizellen bezüglich der Embryoentwicklung.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabelle 10:</b>	<b>Statistischer Vergleich der 40 bis 46-jährigen Patientinnen nach PKD beim langsamen Einfrieren und bei der Vitrifikation bezüglich der Embryoentwicklung.....</b>	<b>61</b>

## 9            **Literaturverzeichnis:**

1.    **Boldt J, Cline D, Mc Laughlin D. Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. Hum Reprod 2003; 18: 1250-1255**
2.    **Breckwoldt M, Keck C. Störungen der Fruchtbarkeit. In: Pfeleiderer A, Breckwoldt M, Martius G, Hrsg. Gynäkologie und Geburtshilfe: Sicher durch Studium und Praxis Stuttgart – New-York: Thieme, 2001: 78-82**
3.    **Hepp H, Diedrich K. Polkörperdiagnostik. In: IVF Register 1996-2006 Bühler K, Felberbaum RE, van der Ven H, Hrsg. IVF Register 1996-2006 Heidelberg-Deutschland: Springer, 2007: 28**
4.    **Cohen J, Grifo JA. Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the New England Journal of Medicine: an in depth look at the findings. Reprod Biomed Online 2007; 15: 365-366**
5.    **Diedrich K. Stand der Reproduktionsmedizin in Deutschland. gpk, Reprod Med 2003; 3: 3-4**
6.    **Ebgase PE, Al-Sharan M, Al-Mutawa M, Al-Othman S, Grudzinskas JG. Mimicking the high levels of activity of a large in-vitro fertilization unit leads to early success at the commencement of an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. Hum Reprod 1996; 11: 2127-2129**
7.    **Felberbaum RE. Behandlung der ungewollten Kinderlosigkeit in Deutschland: Gute Erfolge, aber noch Optimierungspotential. gpk, Reprod Med 2003; 3: 11-14**
8.    **Frommel M. Ethische, verfassungsrechtliche und strafrechtliche Problematik: Das Recht der Fortpflanzungsmedizin im 21. Jahrhundert. gpk, Reprod Med 2002; 18: 158-182**
9.    **Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz–EschG) 1990; BGBl I.S: 2746**
10.    **Gianaroli L, Munne S, Magli MC, Ferraretti AP. Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and male infertility. Int J of Andrology 1997; 20: 31-34**
11.    **Gloning KP, Brusis E. Invasive prenatal diagnosis: methods, perspectives, limits. Gynäkol Rundsch 1989; 29: 241-247**
12.    **Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Diedrich K. Polkörperdiagnostik aus reproduktionsmedizinischer Sicht. Med Genet 2004; 4: 393-397**



13. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-770
  14. Hardy K, Handyside AH. Biopsy of cleavage stage human embryos and diagnosis of single gene defects by DNA amplification. *Arch pathol Lab Med* 1992; 116: 388-392
  15. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980; 44: 151-178
  16. Hassold T, Warburton D, Kline J, Stein Z. The relationship of maternal age and trisomy among trisomic spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 1349-1356
  17. Hüppe H. Mensch von Anfang an: Menschenwürde wird nicht vom Staat verliehen. *gpk, Reprod Med* 2003; 3: 5-7
  18. Hyden-Granskog C, Unkila-Kallio L, Halttunen M, Tiitinen A. Single embryo transfer is an option in frozen embryo transfer. *Hum Reprod* 2005; 20: 2935-2938
  19. Koch HG. Rechtlicher Status des In-vitro-Embryos: Maßnahmen zur Effizienzsteigerung bei medizinisch unterstützter Fortpflanzung aus rechtlicher und rechtsvergleichender Sicht. *gpk, Reprod Med* 2003; 3: 27-32
  20. Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 54-59
  21. Kupka MS, Dorn C, Montag M, Felberbaum RE, van der Ven H, Kulczycki A, Friese K. Previous miscarriages influence IVF and intracytoplasmic sperm injection pregnancy outcome. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 349-357
  22. Ludwig M, Diedrich K, Schwinger E. Preimplantation genetic diagnosis: the german situation. *Trends Genet* 2001; 17: 473-474
  23. Landwehr C, Montag M, van der Ven K, Weber RG. Rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnosis and its application to aneuploidy screening of human polar bodies. *Fertil Steril* 2007; PMID 18023437
- in Druck

24. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel Niels EA, Arts Eus GJM, de Vries JWA, Bossuyt PM, Buys Charles HCM, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. **In-Vitro-Fertilization with Preimplantation Genetic Screening.** *N Engl J Med* 2007; 357: 9-17
25. Montag M, van der Ven H. **Grundlagen der In-Vitro-Fertilisation und Embryonenkultivierung: Das Recht der Fortpflanzungsmedizin im 21. Jahrhundert.** *Reprod Med* 2002; 18: 147-153
26. Montag M, van der Ven H. **Mit „weniger“ mehr erreichen: Möglichkeiten der assistierten Reproduktion zur Erhöhung der Schwangerschaftsrate und Verminderung der Mehrlingsrate.** *gpk, Reprod Med* 2003; 3: 15-17
27. Montag M, van der Ven K, Ved S, Schmutzler A, Prietl G, Krebs D, Peschka B, Schwanitz G, Albers P, Haidl G, van der Ven H. **Success of intracytoplasmatic sperm injection in couples with male and/or female chromosome aberrations.** *Hum Reprod* 1997; 2: 2635-2640
28. Montag M, van der Ven K, Delacretaz G, Rink K, van der Ven H. **Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy.** *Fertil Steril* 1998; 69: 539-542
29. Montag M, van der Ven H, German Pronuclear Morphology Study Group. **Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study.** *Hum Reprod* 2001; 16: 2384-2389
30. Montag M, van der Ven K, van der Ven H. **Erste klinische Erfahrungen mit der Polkörperdiagnostik in Deutschland.** *J Fertil Reprod* 2002; 4: 7-12
31. Montag M, van der Ven K, Dorn C, Rösing B, Kariger A, van der Ven H. **Polkörperdiagnostik: Indikationen und Ergebnisse.** *Gynäkologische Endokrinologie* 2003; 1: 159-163
32. Montag M, Isachenko E, van der Ven K, Dorn C, Isachenko V, van der Ven H. **Technischer und zeitlicher Verlauf der Polkörperpräparation mit anschließender Aneuploidiediagnostik .** *Med Gen* 2004a; 4: 404-407
33. Montag M, van der Ven K, Dorn C, van der Ven H. **Outcome of laser-assisted polar body biopsy and aneuploidy testing.** *Reprod Biomed Online* 2004b; 9: 425-429

34. Montag M, Limbach N, Sabarstinski M, van der Ven K, Dorn C, van der Ven H. Polar body biopsy and aneuploidy testing by simultaneous FISH detection of 6 chromosomes using commercial probes. *Prenatal Diag* 2005; 25: 867-871
35. Montag M, van der Ven H. Preimplantation Genetic Screening (PGS) als Altersindikation in der IVF-Therapie für Patientinnen im Alter von 35 Jahren und darüber. *Stellungnahme Mastenbroek: J Reprod Med Endokrinol* 2007; 3: 145-147
36. Munne` S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 1995; 10: 1014-1020
37. Munne` S, Gianaroli L, Tur-Kaspa I, Magli C, Sandalinas M, Grifo J, Cram D, Kahraman S, Verlinsky Y, Simpson JL. Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertil Steril* 2007; 88: 781-784
38. Naether OGJ, Rudolf K, Fischer R, Baukloh V, Schmidt C, Held K. Pregnancy after vitrification of pronuclear stage oocytes biopsied for polar body aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2007, 2: 268-270
39. Nawroth F, Kupka M, Markus S, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P. Möglichkeiten der Kryokonservierung zur Erhaltung der weiblichen Fertilität. *Dtsch Ärztebl* 2004; 101: A-268/ B-228 /C-219 Medizin
40. Schröder AK, Diedrich K, Ludwig M. Wie geht es Kindern nach assistierter Reproduktion. *Gynäkologische Endokrinologie* 2003a; 1: 170-175
41. Schröder AK, Diedrich K, Ludwig M. Qualitätssichernde Maßnahmen und Präimplantations Diagnostik: Eine kritische Auseinandersetzung. *gpk, Reprod Med* 2003b; 3: 18-21
42. Schwinger E. Polkörperdiagnostik aus humangenetischer Sicht. *Med Gen* 2004; 4: 391-392
43. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro-fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992; 7: 117-119
44. Strowitzki T. Möglichkeiten und Grenzen der Präimplantationsdiagnostik. *Gynäkologische Endokrinologie* 2003; 1: 164-169

45. van der Ven H, van der Ven K, Montag M. Schwangerschaft nach Polkörperbiopsie und Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22. *Geb Fra* 2002; 62: 585-588
46. van der Ven K, Montag M, van der Ven H. Polkörperdiagnostik: Ein Schritt in die richtige Richtung? *Dtsch Ärztebl* 2008; 105: 190-196
47. Vanderzwalmen P, Riedler I, Stecher A, Zech H, Zech N. Vitrifikation von humanen Embryonen in einem fortgeschrittenem Entwicklungsstadium. *Fertil Reprod* 1998; Ausgabe für Österreich 2: 20-26
48. Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santalo J, Barri PN, Menezo Y. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 1997; 5: 351-354
49. Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation Polar Body Diagnosis. *Biochem Mol Med* 1996; 58: 13-17
50. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990; 5: 826-829
51. Verlinsky Y, Kuliev A, Dyban A. Preconception diagnosis of single gene and chromosomal disorders. *Hum Reprod* 1994; 9: 182
52. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline J, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Liefchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 157-162
53. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Liefchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsber N, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second polar body FISH analysis. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 285-289
54. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 1214-1218
55. Zeng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, Fang C, Qu JP, Li T, Zhang MF, Liang XY. Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non transferable embryos. *Hum Reprod* 2005; 20: 1615-1618

## **10 Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Markus Montag für die kompetente Unterstützung und geduldige Begleitung während der gesamten Erstellung der Promotionsarbeit. Er hatte für alle Fragen stets ein offenes Ohr und stand mir jederzeit sofort mit Rat und Tat zur Seite.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. van der Ven, danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas.

Für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen, danke ich Herrn Prof. Dr. Klingmüller.

Des Weiteren möchte ich meinen Eltern und meiner kleinen Tochter für ihre Geduld danken.