

Diplomarbeit

**Haben Stimulationsart – und Medikament Einfluss
auf die Eizellqualität in der künstlichen Befruchtung**

eingereicht von
Julia Edelbauer
19.07.1990

Zur Erlangung des Titels
**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr^{in.} Med. univ.)**

An der
Medizinischen Universität Graz

Ausgeführt am/ an der
**Institut für Humangenetik Graz
Landes – Frauen – und Kinderklinik Linz**

Unter Anleitung von
Ao.Univ.-Prof.Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek
Univ.-Doz. Mag. Dr. Thomas Ebner

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 30.06.2014

Julia Edelbauer

Zusammenfassung

Wir leben in einer Zeit in der es möglich geworden ist für fast jede Erkrankung und jedes Symptom Medikamente in schier niemals enden wollender Bandbreite zur Verfügung zu haben. Dieses Phänomen trägt zur Erleichterung und Vereinfachung unseres Alltages bei und wir können uns glücklich schätzen in solchen Verhältnissen leben zu dürfen. Diese Tatsache muss allerdings nicht immer nur Erleichterung sein. Um auf meine Arbeit Bezug zu nehmen- es gibt ein Dutzend oder mehr Pharmafirmen die an der oralen Applikation der Gonadotropine forscht um diese in regelmässigen Abständen auf den Markt zu bringen -der Gynäkologe hat die Qual der Wahl sich für ein bestimmtes - oder eine Kombination aus mehreren Medikamenten entscheiden zu müssen. Bis dato hängt die Entscheidung für oder gegen ein Präparat meist von der Erfahrung des behandelnden Gynäkologen und nicht von wissenschaftlich hinterlegten Daten ab.

Künstliche Befruchtung - ob nun IVF oder ICSI - stellt für viele Paare eine finanziell große Herausforderung dar, natürlich sind auch die Versuche durch den in Österreich angebotenen IVF-Fond begrenzt. Die Erwartungshaltung an das IVF-Labor von Seiten dieser Paare ist also enorm hoch und hier sei noch gar nicht der psychische und physische (Stimulationen, Punktionen etc.) Stress, den vor allem Frauen im IVF Setting ausgesetzt sind, erwähnt. Ziel für ein Team im IVF Labor sollte es also sein, eine Frau so schonend -und so rasch wie möglich zu einer Schwangerschaft zu verhelfen.

Dass dies nicht immer einfach ist, wird einem schnell klar, hat man sich schon einmal genauer mit künstlicher Befruchtung befasst. Eine Herausforderung stellen oft Frauen dar, die aus organischen Gründen, sei es Endometriose oder ein PCO-Syndrom, auf natürlichem Wege nicht schwanger werden können. Hier gilt es möglichst rasch an „brauchbare“ Eizellen zu kommen da sie über die Zeit gesehen eine schlechte Prognose haben jemals schwanger zu werden.

Ich habe mich deshalb in dieser Arbeit damit beschäftigt „Licht“ in den Gonadotropin- und Aromatasehemmer- Dschungel zu bringen um herauszufinden ob die Stimulationstherapie optimierbar und eine Verkürzung der Zeitspanne von Beginn der Stimulation bis zum Eintritt der Schwangerschaft mit den sich zur Zeit am Markt befindlichen Mitteln umsetzbar ist. Dies würde eine finanzielle Erleichterung einerseits und andererseits vor allem eine physische und psychische Entlastung für die behandelten Frauen mit sich bringen. Somit haben sich für mich einige Fragen gestellt: Hat ein bestimmtes Medikament oder eine Kombination aus zwei Medikamenten ein besseres Eizelloutcome als ein anderes Präparat? Haben Dauer und Dosis der Stimulation einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl und die Qualität der Eizellen? Kann dem Gynäkologen die Wahl zwischen langem Agonistenprotokoll und Antagonistenprotokoll erleichtert werden? Zuletzt wollte ich noch wissen ob man Frauen mit eingeschränkter Ovarialfunktion, wie dem PCO-Syndrom oder sonstigen organischen Dysfunktionen die zum Beispiel durch Endometriose entstehen können, zu einem besseren Eizelloutcome verhelfen kann.

Die in dieser Arbeit ausgewertete, prospektive Studie umfasst 637 Datensätze von über 580 betreuten Paaren des Kinderwunschinstitutes der Landes-Frauen- und Kinderklinik in Linz im Jahr 2013, zur Verfügung gestellt von Univ.-Doz. Mag. Dr. Thomas Ebner.

Zusammengefasst hat die Auswertung gezeigt, dass Eizellquantität- und Qualität sehr wohl vom verabreichten Medikament abhängen kann und dass die Entscheidung ob eine Kombination oder ein Einzelpräparat verabreicht werden Auswirkungen auf die Eizelle mit sich bringt. Sowohl die Art einer verabreichten Kombination als auch Stimulationsdosis- und Dauer sind mitentscheidend um die Anzahl und Art der gewonnenen Eizellen.

Abstract

There is about a dozen pharmaceutical companies that are researching on oral applications of gonadotropin. From time to time companies bring their products on the market and the gynaecologists have to choose one or a combination of these. Until now the decision of which medication to take depends on the experience of the gynaecologist and is not based on any scientific facts.

Artificial insemination is often a big financial challenge for couples. The resources of the IVF-trust in Austria are limited. The expectations of the couples are very high and especially the women suffer from psychological and physical stress. Therefore it is important for the IVF laboratory to provide a successful insemination as fast and as gentle as possible.

The aim of this dissertation is to investigate if through the use of products that are currently available on the market, it is possible to shorten the timeframe between the beginning of the stimulation to the start of the pregnancy. This would lead to both a financial relief as well as physical and psychological relief for the medicated women. I will aim to answer the following questions: Is there a certain medicament, or a combination of two medicaments, that can achieve a better ovum outcome than another compound? Do the duration and dose have a significant influence on the number and quality of ova?

Finally I wanted to know if it is possible to help women who suffer from polycystic ovary syndrome or other physical dysfunction to have a better ovum outcome.

637 data sets of 580 couples who were under care of the Kinderwunschinstitut of the Landes-Frauen- und Kinderklinik in Linz were used for this prospective study. The data sets were provided by Univ.-Doz. Mag. Dr. Thomas Ebner.

From analysis of the data I can see that the quality and quantity of the ova may depend on the administered medication. Therefore the choice of using a combination or a single compound does have an influence on the ovum.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Weibliche Aspekte- Physiologie des Menstruationszyklus	8
1.1.1 Ein hierarchisches System: Hypothalamus- Hypophyse- Ovar	8
1.1.2. Selbststeuerung dieses Funktionskreises	9
1.1.3 Ovarieller Zyklus	11
1.1.4 Endometrialer Zyklus	12
1.1.5 Oogenese	13
1.2 Männliche Aspekte- Spermatogenese und das Spermium	16
1.2.1 Spermatogenese	16
1.2.2 Das Spermium	17
1.2.3 Das Ejakulat	18
1.2.4 Spermiogramm	18
1.2.5 Hormonelle Regulation	20
1.3 Sterilität und Infertilität	22
1.3.1 Sterilität und Infertilität- Definition	22
1.3.2 Sterilität- welches Paar ist „steril“	22
1.3.3 Sterilitäts- Infertilitätsursachen	23
1.3.4 Kinderlos-warum?	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Information zu Studiendaten, Zeitrahmen und Zielsetzung	28
2.2 Ovarielle Stimulation	28
2.3 Follikelpunktion und Eizellgewinnung	34
2.4 Evaluierung der Eizellen	34
2.5 Möglichkeiten der Zusammenführung von Ei- und Samenzelle	40
2.6 Frühentwicklung des Embryos unter In- Vitro Bedingungen	42
2.7 Embryotransfer	44

2.8 Das Ziel- eine Schwangerschaft	47
2.9 Informationen zum IVF-Fonds	48
3. Ergebnisse	50
4. Diskussion	73
Literaturverzeichnis	75

1. Einleitung

1.1 Weibliche Aspekte- Physiologie des Menstruationszyklus

1.1.1 Ein hierarchisches System: Hypothalamus- Hypophyse- Ovar

Die Ovarien gelten als Mittelpunkt der Sexualfunktion der Frau. Ihre Funktion ist im Rahmen eines Funktionskreises zu betrachten dem insgesamt drei, einem hierarchischem System zugrundeliegenden, Organe angehören:

1. Der Hypothalamus
2. Der Hypophysenvorderlappen
3. Die Ovarien

Als „Hauptdarsteller“ in diesem Kreislauf gelten Hormone welche Dienzephalon, Hypophyse und die Ovarien miteinander verlinken. Als oberster Taktgeber gilt das im Hypothalamus gebildete GnRH (Gonadotropin-Releasinghormon) gefolgt von den Gonadotropinen FSH und LH aus dem Hypophysenvorderlappen und zuletzt den Ovarialhormonen Östrogen und Gestagen. Es ergibt sich daraus ein Funktionskreis der sich in erster Linie selbst reguliert aber durch verschiedenste auch exogene Einflüsse manipulierbar ist. Dies sind zum Beispiel Stress, Umwelt oder somatische Faktoren. (vgl. Pschyrembel et al. 1990, S. 403)

1.1.2. Selbststeuerung dieses Funktionskreises

„Der Hypothalamus ist das übergeordnete Zentrum und wird insbesondere durch die ovariellen Hormone (positive und negative Rückkoppelung) aber auch durch andere Hormone (NNR, SD) und verschiedenste weitere Faktoren beeinflusst.“

(Petru 2010, S. 7)

Der Hypothalamus beginnt als erster in dieser spezialisierten Hierarchie alle ein- bis zwei Stunden GnRH an die Hypophyse abzugeben, der HVL sezerniert hierauf FSH und LH. Unter dem Einfluss der Gonadotropine reifen wiederum die Follikel heran und es kommt zur Östradiolbildung im Ovar. Durch zunehmende Sezernierung dieses Hormones kommt es zu einer auf die Hypophyse rückwirkenden Hemmung der Gonadotropinfreisetzung (insbesondere FSH), ein sogenanntes „negatives Feedback“. Überschreitet der Östradiolwert aber für längere Zeit einen gewissen Schwellenwert, kommt es zu einer abrupten Entleerung der Gonadotropinspeicher (positives Feedback). Daraus resultierend erfolgt ein Serumanstieg von FSH und insbesondere LH, welches die vollständige Reifung des sich kurz vor der Ovulation befindlichen Follikels, die Ovulation und die Bildung des Corpus luteums bewirkt. Ist die reife Eizelle aus dem Follikel „gesprungen“ werden Hypophyse und Hypothalamus durch negatives Feedback gebremst, die erniedrigte LH Sekretion bedingt für den Rest des Zyklus die Progesteronbildung im Corpus luteum. Progesteron blockiert das Wachstum anderer Follikel, mit Beginn des zerfallenden Corpus luteums wird diese Progesteronblockade aufgehoben und ein neuer Zyklus kann beginnen.

Solange die drei Glieder des Regelkreises Hypothalamus, HVL und Ovarien nach oben genanntem Ablauf funktionieren läuft der Zyklus regelrecht ab. Funktioniert jedoch ein Glied nicht nach diesem komplexen System, wird auch die Funktion der anderen Glieder in Mitleidenschaft gezogen. Das macht verständlich, dass die in der Praxis so häufigen Störungen der Ovarialfunktion sehr verschiedene Ursachen haben können, die von den verschiedenen Stellen dieses Funktionskreises ausgehen. (vgl. Pschyrembel et al. 1990, S.403-405)

Zu beachten ist, dass der Funktionskreis Hypothalamus- HVL- Ovarien mit einer Reihe weiterer Funktionskreise gekoppelt ist, das heißt auch diese Regelsysteme

1.1.3 Ovarieller Zyklus

Der ovarielle Zyklus beschreibt die während eines Zyklus ablaufenden Vorgänge im Ovar. Man unterscheidet zwei Phasen:

1.Phase: Follikelreifung

Dauer circa 1.-14. Zyklustag: Ein Follikel wächst und reift durch den Anstieg der Gonadotropine heran. Dieser bildet je nach Reifegrad stetig mehr östrogene Hormone welche wiederum eine proliferative Wirkung auf das Endometrium ausüben. Ein reif gewordener Follikel (Graaf'scher Follikel) stößt die Eizelle zwischen dem 12. und 14. Zyklustag aus. Dieses Ereignis bezeichnet die Ovulation.

2.Phase: Ausbildung des Corpus luteum

Dauer circa 14.-28. Zyklustag: Aus den Überresten des gesprungenen Follikels bildet sich eine neue, endokrine Drüse- das Corpus luteum. Dieses produziert nun Progesteron und Östrogen. Progesteron ist für die sekretorische Umwandlung am Endometrium verantwortlich während Östrogen in dieser Phase notwendig ist das transformierte Endometrium zu halten und auf eine bevorstehende Einnistung „Nidation“ vorzubereiten. Bleibt die Befruchtung der Eizelle allerdings aus bildet sich das Corpus luteum zurück und die Östrogen- und Progesteronkonzentration im Blut sinkt ab. Durch den Östrogenabfall kann das Endometrium nicht länger gehalten werden, eine Hormonentzugsblutung- die Menstruation- ist die Folge.

(vgl. Pschyrembel et al. 1990, S. 440-441)

1.1.4 Endometrialer Zyklus

Der Endometriale Zyklus beschreibt die während eines Zyklus ablaufenden Vorgänge am Endometrium- im Stratum functionale (Funktionalis). Hier unterscheidet man vier Phasen.

1. Proliferationsphase

Dauer circa 5.-14. Zyklustag: Kennzeichnend für diese Phase ist der Aufbau des Stratum functionale.

2. Sekretionsphase

Dauer circa 15.-28.Zyklustag: Hier geschieht der Umbau des Stratum functionale als Vorbereitung auf die Einnistung der befruchteten Eizelle.

3. Desquamationsphase

Dauer circa 28.-2.Zyklustag: Nimmt die Konzentration an Östrogen und Progesteron im Blut ab, so bricht der oberste Anteil der Schleimhaut (Funktionalis) zusammen. Die tiefere Schicht (Basalis) bleibt erhalten. Es kommt zu Blutungen aus den fragilen Kapillaren der Spiralgefäße und dadurch zur intraendometrialen Blutung.

4. Regenerationsphase

Diese Phase setzt circa am 3.-4. Tag nach dem Beginn des Zerfalls der Funktionalis ein. Die Wundfläche wird durch neuentstehendes Epithel gedeckt.

(vgl. ebd. S. 442-444)

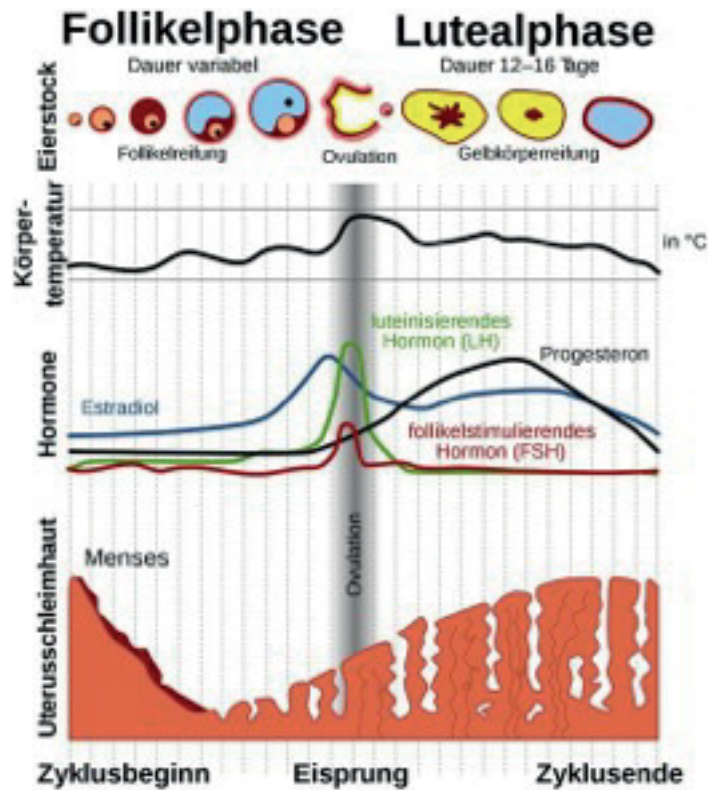


Abb. 2: weibliche Zyklusphasen, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MenstrualCycle_de.svg

1.1.5 Oogenese

Der Vorgang einer künstlichen Befruchtung stellt in Anbetracht der hormonellen Hyperstimulation der Ovarien einen massiven Eingriff in den natürlichen Ablauf des weiblichen Zyklus dar. Um zu verstehen wie dieses geregelte Management bei IVF und ICSI gezielt manipuliert wird, werden wir einen kurzen Einblick in den histologischen Werdegang einer Eizelle nehmen.

Die Oogenese gliedert sich in eine Vermehrungs- und eine Reifungsperiode. Die Vermehrungsperiode ist bereits mit Geburt abgeschlossen, die Oozyten verbleiben in der Prophase der ersten Reifeteilung für 12.-50. Jahre in einem Ruhestadium.

Die primäre Oozyte, wie sie in dieser Ruhephase genannt wird, enthält eine Hülle aus einschichtigem Epithel - den sogenannten Primordialfollikel, welcher auch bereits mit Geburt besteht. Zum Zeitpunkt der Geburt besitzen beide Ovarien zusammen circa 1.-2. Millionen Follikel.

Die primäre Oozyte verharrt nun so lange im Ovar, bis sie entweder samt ihrem Follikel untergeht oder irgendwann zur Ovulation kommt. Während des

Follikelwachstums- also am Weg zur Ovulation- vergrößert die Oozyte ihren Durchmesser auf 120µm. Sie bildet Zellorganellen aus und umgibt sich mit einer Hülle aus Glykoproteinen, der Zona pellucida. Kurz vor der Ovulation vollendet die Oozyte die 1. Reifeteilung. Hierbei werden die homologen Chromosomen symmetrisch, das Zytoplasma jedoch ungleich auf die Tochterzellen verteilt, es entsteht die große sekundäre Oozyte und ein kleines Polkörperchen. Während der Ovulation wird die zweite Reifeteilung begonnen. Diese bleibt wiederum auf halbem Weg stehen, diesmal in der Metaphase 2. Die zweite Reifeteilung wird nur nach Eindringen eines Spermatozoon abgeschlossen und wieder wird ein Polkörperchen abgeschnürt. Ohne Befruchtung stirbt die Oozyte nach weniger als 24 Stunden ab. (vgl. Lüllmann-Rauch 2006)

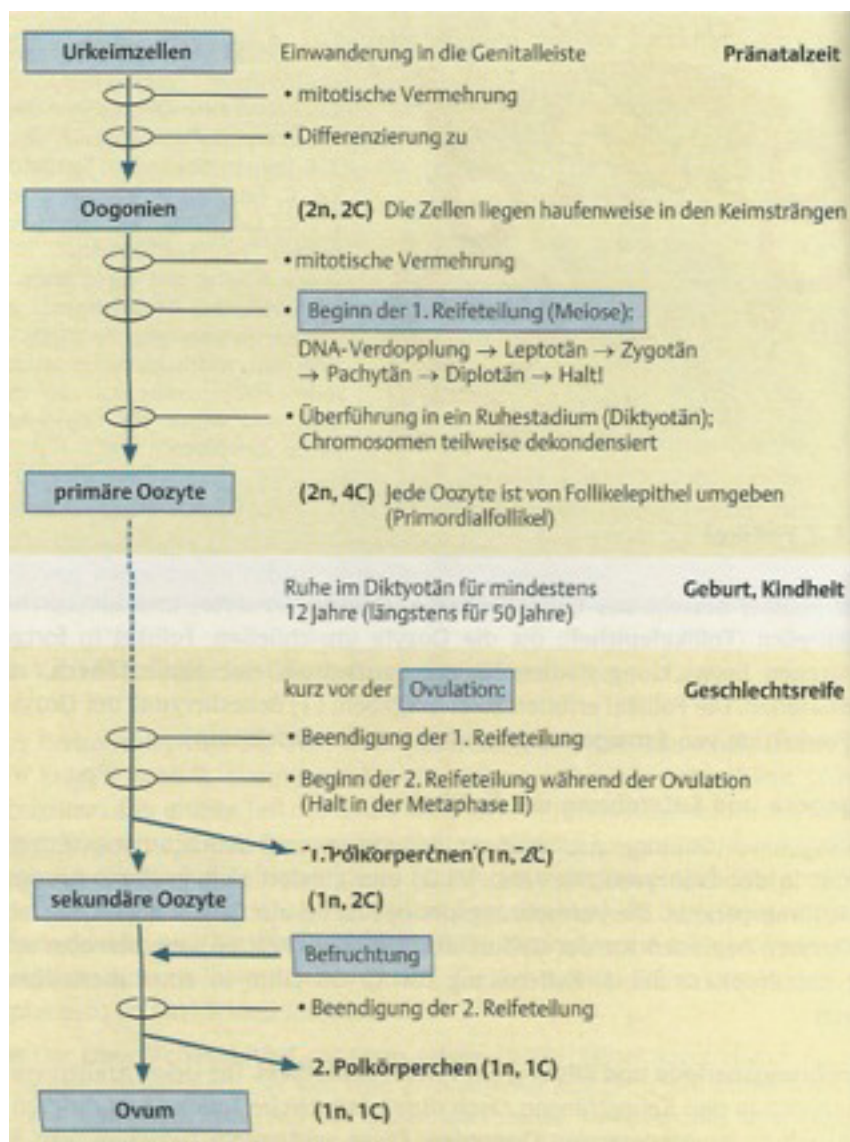


Abb. 3: die Oogenese, Lüllmann-Rauch 2006, S. 484

1.1.6 WHO- Klassifikation der Zyklusanomalien

Viele Frauen werden im Kinderwunschlabor erstmals auf ihre Zyklusstörungen aufmerksam gemacht. Unten angeführte Punkte stellen also oft ein Hindernis um schwanger zu werden, dar. Für den Gynäkologen wurde daher eine von der WHO leicht überschaubare Tabelle der wichtigsten, den weiblichen Zyklus störenden Pathologien herausgegeben.

Klassifikation der Zyklusanomalien nach WHO

Typ	Ursache	Phänotyp und Genese	Diagnostik
I	hypo-gonadotrope, normo-prolaktinämische Ovarialinsuffizienz = hypothalamische Amenorrhoe kommt vor bei: Pubertas tarda, Kallman-Syndrom, Anorexia	Amenorrhoe Zur Diagnosestellung ist die Bestimmung der basalen LH-, FSH-, Östrogen- und Prolaktinkonzentrationen häufig nicht ausreichend, sodass ein GnRH-Test, gegebenenfalls mit pulsatilem GnRH-Vorbehandlung, häufig indiziert ist.	Keine Östrogenisierung → Gestagenwert negativ, Östrogen-Gestagen-Test positiv
II	normogonadotrope normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz		
	IIa: Corpus-luteum-Ineffizienz	MIT Blutung anovulatorische Zyklen mit monophasischer Temp.-Kurve oder treppenförmigem Temp.-Anstieg	
	IIb: desynchronisierte GnRH-Sekretion (GnRH meist technisch im Normbereich, Pulsatilität aber gestört)	OHNE Blutung prim. od. sek. Amenorrhoe. Oft im Rahmen Gewichtsreduktion / Anorexia / Leistungssport	GnRH-Test
	IIb „Sonderform“: normogonadotrope hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz	OHNE Blutung prim. od. sek. Amenorrhoe. bei PCO-S, Hyperthecosis ovarii, AGS oder anderer adrener Genese	Androgene bestimmen
III	Hyper-gonadotrope Ovarialinsuffizienz = POF (Premature Ovarial Failure) POF bei ca. 1% aller Frauen unter 40y	- angeboren: 45X,Y/XX-Gonadendysgenese, Turner 45X0 → prim. Amenorrhoe - erworben: St. n. Radiatio, Chemo, autoimmun, idiopathisch → sek. Amenorrhoe	
IV	Anatomisch bedingte Amenorrhoe / Anomalie des Genitaltrakts	angeboren: Mayer-Rokitansky-Küster-Hausersyndrom iatrogen / sekundär: Asherman-Syndrom	
V	Hyperprolaktinämie mit Tumorbildung	Mikro- / Makro-prolaktinome	
VI	Hyperprolaktinämie ohne Tumorbildung	Hypothyreose, psych. u. somat. Stress, Pharmakologische Ursache Dopamin senkt Prolaktin, d.h. Ursache ist alles, was Dopamin beeinflusst (Antidepressiva, Neuroleptika, ...)	
VII	normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz mit Tumornachweis	Tumor, welcher Hypothalamus komprimiert und GnRH-Produktion supprimiert. Kraniohypophysäre, Hamartome, andere	

Abb. 4: Klassifikation der Zyklusanomalien, http://m.fsol.ch/Gyn-Merkblaetter/Merkblätter_und_Links_files/Klassifikation%20der%20Zyklusanomalien.pdf

1.2 Männliche Aspekte- Spermatogenese und das Spermium

1.2.1 Spermatogenese

Männliche Samenzellen werden im Keimgewebe des Hodens gebildet, wo sie als Gonozyten, also Urkeimzellen, während der fetalen Entwicklung angelegt werden. Aus diesen Urkeimzellen entwickeln sich Spermatogonien (indifferente Stammzellen), welche sich mitotisch teilen sowie verschiedenen Vermehrungs- Reifungs- und Differenzierungsprozessen unterliegen. (vgl. Sökeland et al. 2007, S. 30) Spermatogonien reifen zu Spermatozyten 1. Ordnung heran, diese besitzen einen diploiden Chromosomensatz und treten in die Prophase der ersten Reifeteilung ein. „Es entstehen aus einem Spermatozyt 1. Ordnung jeweils zwei nicht erbgleiche Spermatozyten 2. Ordnung (haploider Chromosomensatz [...]).“ (Hartmann et al. 2005, S.82) Anschließend an die erste Reifeteilung erfolgt die zweite Reifeteilung, jedoch ohne vorheriger Verdopplung der DNA. „Jeder Spermatozyt zweiter Ordnung teilt sich in jeweils zwei Spermatischen [...].“ (ebd., S.82) Nun ist die Differenzierung der Spermatischen zu reifen Spermien als letzte Phase der Spermio-genese möglich. (vgl. Sökeland et al. 2007, S.30) Die Spermien reifen schließlich im Nebenhoden vollständig aus und werden dort gespeichert. Die Differenzierung von der Spermatogonie zum reifen Spermium beträgt etwa 80. Tage.

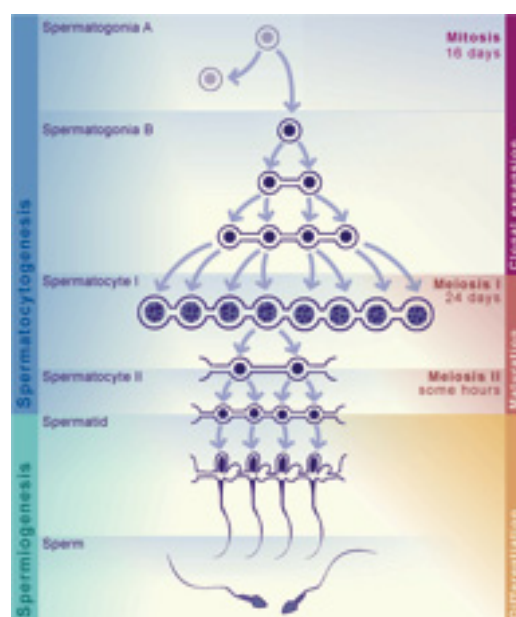


Abb. 5: Schema zur Spermatogenese, www.embryology.ch

1.2.2 Das Spermium

Ein normal entwickelter Samenfaden ist in etwa 50µm lang und besteht aus Kopf und Schwanz.

„Der Kopf besteht im Wesentlichen aus dem haploiden Zellkern, sein zugespitzter Teil trägt kappenartig das Akrosom. Die Enzyme des Akrosoms sind für die Durchdringung von Corona radiata und Zona pellucida der Eizelle von Bedeutung.“ (Sökeland et al. 2007, S.31)

Der Schwanz enthält das Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück:

Das Mittelstück, welches sich an das kurze Halsstück anschliesst, enthält die für die Fortbewegung wichtigen Mitochondrien und ist somit das Energiezentrum der Samenzelle.

Das Hauptstück besteht aus dem Achsenfaden umgeben von einer mit Faserringen verschmolzenen fibrösen Scheide. Diese „Konstruktion“ ermöglicht der Zelle ihre Eigenbewegung welche eine wesentliche Voraussetzung für die Befruchtung darstellt.

Das Endstück des Spermiums besteht nur noch aus Ausläufern des Achsenfadens und verjüngt sich nach hinten. (vgl. Sökeland et al. 2007, S.31)

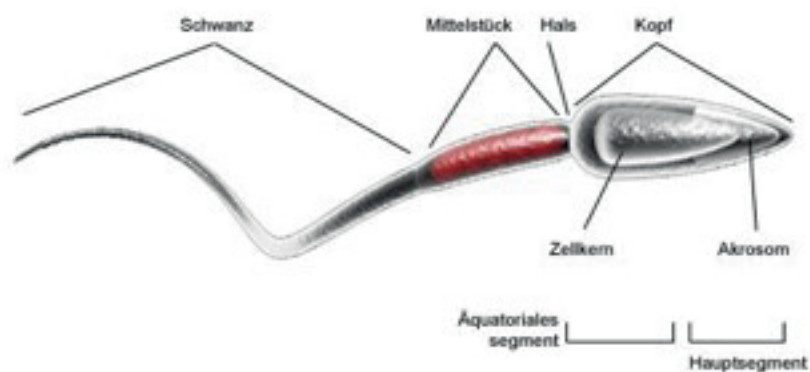


Abb. 6: Aufbau eines Spermiums, www.vitro-med.de

1.2.3 Das Ejakulat

Neben den Spermien besteht das menschliche Ejakulat aus Begleitsekreten der Samenzellen (70%), der Prostata und den periurethralen Drüsen. Aufgabe dieser Sekrete ist es die Spermien zu suspendieren und ihnen Energie für ihre Fortbewegung in Form von Fruktose bereitzustellen. Des Weiteren enthalten sie eine Reihe biologisch aktiver Fermente und Wirkstoffe welche essenziell für die Befruchtung sind. Das prostataspezifische Antigen (PSA), das ebenfalls dem Ejakulat beigemischt wird, verflüssigt dessen Konsistenz und erleichtert somit die Ausstoßung.

1.2.4 Spermogramm

Das Ejakulat sollte idealerweise 30 bis 60 Minuten vor der Untersuchung durch Masturbation in ein steriles Gefäß gewonnen werden. Es kann sowohl in der Klinik als auch zu Hause gewonnen werden. Die Zeit des Transportes zur Klinik sollte allerdings 60 Minuten nicht überschreiten, auf einen möglichst schonenden und temperaturstabilen Transport sollte geachtet werden.(vgl. Keel 1990 zit. In: Macas, Wunder 2006, S.14) Die sexuelle Abstinenz vor der Gewinnung sollte nicht kürzer als 48 Stunden und nicht länger als sieben Tage zurück liegen, andernfalls kann man von falsch- negativen sowie -positiven Werten ausgehen. Das Volumen sollte im Normalfall nicht weniger als 2 ml ergeben, weniger spricht für eine kurze sexuelle Karenz, aber auch gewisse pathologische Zustände wie retrograde Ejakulation, partielle Obstruktion der Samenkanälchen, eine Insuffizienz der Drüsen (Prostata, Samenblasen oder bulbo-urethrale Drüsen) oder hormonelle Ursachen kommen dafür in Frage. (vgl. Macas, Wunder 2006,S.13-14)

Biochemische Samenanalyse

Die biochemische Analyse der Samenflüssigkeit dient einerseits der Überprüfung der an die männlichen Geschlechtsorgane angeschlossenen Drüsen, andererseits kann durch diese Untersuchung eine obstruktive von einer nicht-obstruktiven Azoospermie unterschieden werden. Als biochemische Marker werden Fruktose, Zink, Zitronensäure und saure Phosphatase genannt. (vgl. von Eckardtstein et al. 1999; von Eckardtstein et al. 2000)

Mikroskopische Samenuntersuchung

Bestimmung der Spermienanzahl im Ejakulat

Zur Bestimmung der Spermienzahl wird die Makler`sche Zählkammer verwendet. Ein vorgegebener „Raum“ erleichtert das Auszählen vorhandener Spermien. Als durchschnittlicher Normwert werden unter 1152 untersuchten Männern im Alter von 18-50 Jahren 17 Millionen pro Milliliter angegeben. (Tang et al. 2013)

Bestimmung der Gesamtzahl der beweglichen Spermien im Ejakulat

Spermienmotilität gilt als wichtigster Faktor einer erfolgreichen Befruchtung nach IVF.

Laut WHO unterteilt man Spermienbeweglichkeit in vier Gruppen. Spermien vom Beweglichkeitstyp A bewegen sich auf einer mehr oder minder geradlinigen Bahn, der Typ B bewegt sich langsamer und in einer gebogenen Kurve. Typ C- Spermien bewegen sich so gut wie nicht vorwärts während alle unbeweglichen zu Typ D zählen. (Macas, Wunder 2006,S.14-15)

Da die Einteilung in die 4 WHO Kriterien aber oft sehr differente, subjektiv geprägte Unterschiede lieferte wird zur Identifizierung der Spermienmotilität seit einigen Jahrzehnten ein komplexes Computersystem eingesetzt, sogenannt „CASA-computer assisted semen analysis“ (Ginsburg et al. 1988)

Morphologische Spermienmerkmale

Die Einteilung abnormer Spermien erfolgt nach Lokalisation ihrer Anomalität in Kopf-Hals- Mittelstück und Geißel-(Schwanz)form. Kruger und seine Mitarbeiter konnten in einer heterogenen IVF-Population, eingeteilt nach der Häufigkeit vorkommender Spermienanomalien nachweisen, dass in der Patientengruppe mit der geringsten Anzahl morphologisch normaler Spermien eine klinische Schwangerschaft wesentlich seltener erreicht werden konnte als in der Gruppe mit einer höheren Zahl morphologisch unauffälliger Spermien.

TABELLE 1

	Normalwerte
Ejakulatvolumen	> 1,5 ml
pH	> 7,2
Samenzellanzahl (Dichte)	> 15 Millionen Spermien/ml
Beweglichkeit (Motilität)	> 40 % rasch vorwärtsbeweglich + beweglich > 32 % rasch vorwärtsbeweglich
Spermiengestalt (Morphologie)	> 4 % normale Formen
Lebende Samenzellen (Vitalität)	> 58 %
MAR-Test	< 50 %

Normales Spermogramm (WHO 2010)

Abb. 7: Spermogramm- Normwerte, WHO

1.2.5 Hormonelle Regulation

Auch beim Mann spielen Hormone in der Regulation der Sexualfunktion eine entscheidende Rolle. Wiederum beginnt der hormonelle Steuerkreis mit dem aus dem Hypothalamus pulsatil ausgeschüttetem Gonadotropin- Releasing- Hormon (GnRH). Es bewirkt im Hypophysenvorderlappen die Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) sowie des follikelstimulierenden Hormons (FSH), welche auch im weiblichem Zyklus wirksam sind. LH bewirkt im männlichen Organismus die Bildung des Sexualhormons Testosteron in den Leydig-Zellen des Hodens. Sowohl körpereigenes wie auch medikamentös zugeführtes Testosteron blockieren die LH Produktion an der Hypophyse. FSH stimuliert insbesondere die im generativen Hodengewebe vorkommenden Sertoli-Zellen zur Bildung des androgenbindenden Proteins (ABP) sowie des Hormons Inhibin. Inhibin hemmt durch

negative Rückkopplung die FSH Synthese in der Hypophyse, ABP bindet Testosteron und transportiert es aus der Sertoli-Zelle in das Tubuluslumen um dort die Spermatogenese aufrechtzuerhalten. (vgl. Sökeland et al. 2007, S.35)

1.3 Sterilität und Infertilität

1.3.1 Sterilität und Infertilität- Definition

„Der Begriff **Sterilität** beschreibt das Unvermögen schwanger zu werden, der Begriff **Infertilität** das Unvermögen, ein lebendes Kind zu gebären.“

(Diedrich et al. 2013, S.38)

Ausserdem unterscheidet man die primäre von der sekundären Sterilität. Während bei primär sterilen Frauen noch nie eine Schwangerschaft bestanden hat, lag bei einer sekundär sterilen zumindest eine Schwangerschaft vor, egal ob in Form einer Geburt, einer Fehlgeburt oder beispielsweise einer Extrauterinschwangerschaft.

(vgl. Weyerstahl et al. 2003, S.409).

Während die Infertilität der Frau eine erhöhte Abortbereitschaft bedeutet, heisst Infertilität beim Mann Unfruchtbarkeit aufgrund erhobener pathologischer Befunde im Spermogramm. (vgl. ebd., S.409)

10-15% aller Paare im reproduktionsfähigen Alter sind ungewollt kinderlos. Als Grund dafür werden das erhöhte Alter der Erstgebärenden durch berufliche und private Umstände und ein damit einhergehendes Risiko für ein erhöhtes Vorkommen von Konzeptionshindernissen (verminderte Ovarreserve, Entzündungen) beschrieben.

(vgl. ebd., S.409)

1.3.2 Sterilität- welches Paar ist „steril“

Die wenigsten „sterilen“ Paare sind auch wirklich steril, betrachtet man den Zustand der nicht eintretenden Schwangerschaft bei bestehendem Kinderwunsch im eigentlichen Sinn.

Sterilität beschreibt beim Mann grundsätzlich nur den Zustand nach beidseitiger Orchiektomie oder einer vorliegenden Azoospermie mit z.B. nachgewiesenem Sertoli- cell- only- Syndrome mit irreversibel erloschener Spermatogenese.

Bei der Frau besteht eine generelle Sterilität außerhalb ihrer reproduktiven Phase sowie nach beidseitiger Salpingektomie/ Ovarektomie oder Hysterektomie.

Deutlich häufiger als die oben genannten Sterilitätskriterien kommen qualitativ eingeschränkte Spermiogrammbefunde sowie pathologische tubare Faktoren vor (ohne kompletten Tubenverschluss). So kann man sagen, dass die Ursachen unerfüllten Kinderwunsches nicht bei einem Partner liegen, wovon häufig ausgegangen wird. Es ist eher anzunehmen, dass bei Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch bei beiden Partnern sich mehr oder weniger bedeutende Ursachen für Sterilität oder Infertilität finden und nur in seltenen Fällen die Ursache bei einem Partner allein zu finden ist (20%). (vgl. Diedrich et al. 2013, S.38-39)

1.3.3 Sterilitäts- Infertilitätsursachen

Andrologische Aspekte:

Fehlbildungen	Hormonstörungen
Varikozele	Iatrogen (Vasektomie), Medikamente
Verletzungen	Immunologische Störung
Bakterielle Infektionen	Psychische Konflikte
Virusinfektionen (Mumps)	Allgemeinerkrankungen (z.B Diabetes mellitus)

(Weyerstahl et al. 2013, S.410)

Natürlich steht beim Mann aber die Untersuchung und Abklärung des Spermioogrammes im Vordergrund. (WHO-Normwerte siehe Tabelle im Kapitel 2 „Spermatogenese und das Spermium“).

Folgende Begrifflichkeiten sind laut WHO bei der Beschreibung eventueller Abnormitäten im Spermogramm in Verwendung:

Oligozoospermie: Spermienkonzentration \leq 15 Mio/ml.
Asthenozoospermie: \leq 40% Spermien mit Vorwärtsprogression
Teratozoospermie: \leq 4% Spermien mit normaler Morphologie
Oligoasthenoteratozoospermie: alle 3 bereits genannten Variablen sind gestört (OAT-Syndrom)
Azoospermie: keine Spermien im Ejakulat
Aspermie: kein Ejakulat
Parvisemie: zu geringes Ejakulatvolumen
Normozoospermie: normale Zahl, Form und Beweglichkeit

(ebd., 2003, S.411)

Psychische Ursachen männlicher Subfertilität und Infertilität können sich in Form von funktionellen Sexualstörungen äußern, die Folgen sind:

- Libidostörungen
- Erektionsstörungen
- Orgasmusstörungen und/ oder
- Ejakulationsstörungen

Die gynäkologische Ursachenfindung gestaltet sich häufig schwieriger und langwieriger als beim Mann. Die Untersuchung sollte nach einem anatomischen Schema am Ovar beginnend, und weiters die einzelnen Sterilitätsursachen systematisch abklärend, durchgeführt werden.

Relative Häufigkeit von Sterilitäts und Infertilitätsursachen bei der Frau:

ovariell: ca. 30% (Ovarialinsuffizienzen durch Stress, Climacterium praecox, Anorexia nervosa, erhöhte Prolaktinspiegel etc.)	
tubar: ca. 30%	(Adnexitiden, Endometriose)
uterin: ca. 5%	(Fehlbildungen, Myome)
zervikal: ca. 5% Störung des Zervixfaktors, Östrogenmangel)	(anatomische Ursachen,
vaginal: ca. 5%	(Fehlbildungen, Entzündungen)
psychisch: ca. 10-30% vorangegangene Fehl- oder Totgeburten etc.)	(zu hoher Leidensdruck,
Extragenital, immunologisch, ungeklärt: ca. 15%	

(Weyerstahl et al. 2003, S.414)

1.3.4 Kinderlos-warum?

„Die Endometriose gilt als typischer Faktor für die eingeschränkte Fertilität der Frau.“ (de Ziegler et al. 2010)

Bei ausgeprägten Endometrioseformen durchaus nachvollziehbar, denn Endometriose kann zu morphologischen Veränderungen der zur Reproduktion wichtigen Organe führen und somit die Fertilität herabsetzen. Bei mild verlaufenden Endometrioseformen wird eine gestörte tubare Zilienmotilität (Lyons et al. 2002) sowie eine uterine Dysperistaltik (Kunz u. Leyendecker 2002) diskutiert. Jedoch ist fraglich warum diese Einschränkungen bei manchen Frauen vorliegen und sie in ihrer Fertilität beeinträchtigen, bei anderen wiederum keine Fertilitätseinschränkung mit sich bringen. Im Tierversuch konnten minimalgenetische Auffälligkeiten für eine Herabsetzung der Fertilisierungswahrscheinlichkeit sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Partnern verantwortlich gemacht werden. Verwendet wurden dafür chemisch behandelte oder gealterte Eizellen, sowie Spermien mit einem Defekt des Proakrosins. Man geht davon aus, sollte dieser Tierversuch auf den Menschen übertragbar sein, dass ein in solcher Art verändertes Spermium normal befruchtungsfähig ist, es sei denn auf Seiten der Frau liegen ähnliche Einschränkungen der Fertilität vor (zum Beispiel genetische Variation der Eizelle) . Erst dann ist die Fertilität des Paares herabgesetzt. Ein weiterer im Tiermodell nachgewiesener Befund bewies die Annahme dass Spermien olfaktorische Rezeptoren für ihre zielgerichtete Bewegung besitzen welche man mit Hemmstoffen so irritieren konnte, dass die gerichtete Bewegung des Spermiums schwer beeinträchtigt war. Umgelegt auf den Menschen würde dies bedeuten dass ein vom weiblichen Genitaltrakt oder der Eizelle abgegebener Stoff die gezielte Bewegung der Spermien so stark beeinträchtigt, dass die Spermien nicht rechtzeitig auf die Eizelle treffen und es zu keiner Befruchtung kommen kann. Das Besondere an den oben genannten Tierversuchen ist also, dass sich minimale Veränderungen in männlichen wie auch in weiblichen Reproduktionsorganen in Form einer Subfertilität auswirken können die der heutigen Diagnostik nicht zugänglich sind. Man geht allerdings davon aus dass erst dann relevante Probleme auftreten wenn die Pathologien sowohl in der Eizelle als auch in den Spermien auftreten. Dies würde eine im Jahr 2003 angelegte Studie untermauern in der ein zumindest diskret auffälliges Spermioogramm in 40% aller Männer mit - sowie ohne nachgewiesener Fertilität nachgewiesen werden konnte. Ein nicht erfüllter Kinderwunsch ist folglich

nur dann zu erwarten, wenn auch bei der Frau ein oder mehrere Pathologien vorliegen. Das Gesamtbild der Befunde beider Partner ist relevant.
(vgl. Diedrich et al. 2013, S.39-40)

2 Material und Methoden

2.1 Information zu Studiendaten, Zeitrahmen und Zielsetzung

Diese prospektive, nicht randomisierte Studie umfasst Datensätze von 637 Kinderwunschbehandlungen an 525 Patientinnen im Alter zwischen 18 und 46 Jahren, welche von Januar bis Dezember 2013 an der Landes- Frauen und Kinderklinik Linz vorstellig wurden. Das Durchschnittsalter der behandelten Frauen beläuft sich auf 34,11 Jahre $\pm 5,03$. Unser Hauptaugenmerk richteten wir in dieser Arbeit auf die Art der Stimulation, die dabei eingesetzten Medikamente und die daraus resultierende Eizellquantität sowie -qualität und deren unmittelbar vergesellschafteter Parameter wie zum Beispiel die Teilungsraten, die Menge entstandener Blastozysten bis hin zu den Transferraten. Ausserdem ließen wir Dauer und Dosis der Stimulation in die Auswertung einfließen und gingen der Frage nach ob man Patientinnen mit Endometriose oder PCO- Syndrom eine Stimulation mit besserem Eizelloutcome anbieten kann. Ziel ist es nachzuvollziehen welche Medikamenten zur ovariellen Stimulation eingesetzt werden müssen beziehungsweise welches Protokoll im Agonisten- oder Antagonistenschema bevorzugt werden sollte um einen nachweislich signifikanten Erfolg, entsprechend einer besseren Eizellqualität, zu erzielen.

2.2 Ovarielle Stimulation

Die Stimulation der Ovarien kann mit Medikamenten unterschiedlichster Wirkweise durchgeführt werden. Das Ziel ist aber immer die Produktion von mehreren, befruchtungsfähigen Eizellen um die Chance eines Embryonentransfers zu erhöhen. Damit es zu einer Polyovulation kommen kann, bedarf es einer forcierten, sehr ausgeprägten Erhöhung des Serum-FSH Spiegels. Nur so ist es möglich gleich mehrere, also auch subordinate Follikel zur Reifung zu bringen. (vgl. Diedrich et al. 2013, S. 111)

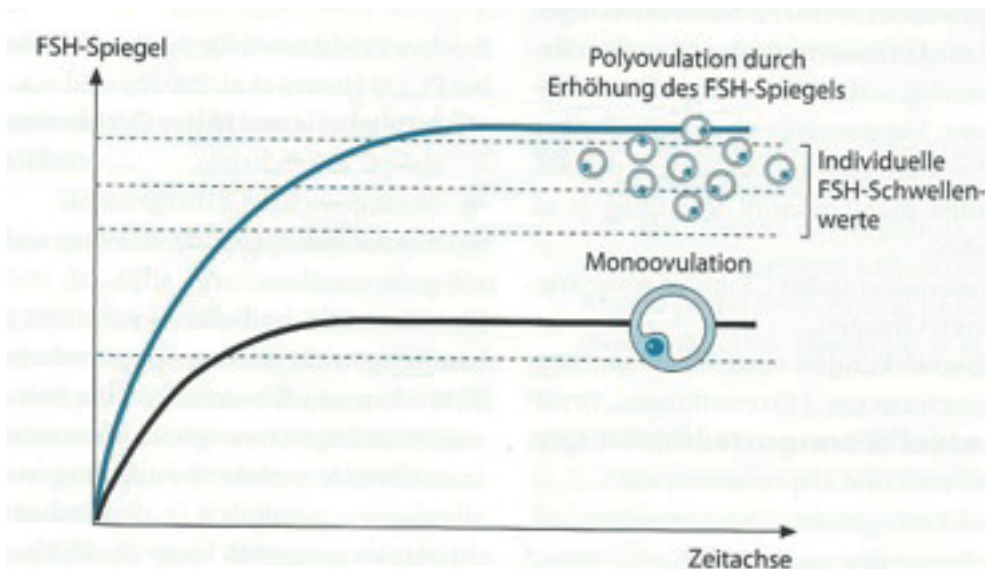


Abb. 8: FSH-Spiegel und Polyovulation, Diedrich et al. 2013, S.111

2.2.1 Clomifen

Clomifen findet Anwendung bei Frauen mit Follikelreifungsstörungen wie zum Beispiel dem polyzystischen Ovarsyndrom - (PCOS) bis hin zur Anovulation. Es wirkt über Bindung an die Steroidrezeptoren des Hypothalamus, welcher mit vermehrter GnRH Ausschüttung reagiert, FSH und LH steigen und es kommt zur Ovulationsinduktion.

Aus unserer Datenbank geht hervor, dass 8 Frauen mit Clomifen behandelt wurden, jedoch immer in Kombination mit einem Gonadotropin. Angewendet wird Clomifen in der frühen Follikelphase über 5 Tage in einer Dosis von 50mg pro Tag per os. Dosissteigerungen bis maximal 150mg in Folgezyklen sind möglich. Eine weitere Dosiserhöhung führt laut Dickey et al. 1996 zu keiner Effizienzsteigerung. Dann wird, wie in unserem Fall in Kombination mit FSH stimuliert. Zur Überwachung der Ovarialfunktion (CAVE: Clomifenresistenz) und zur Prophylaxe einer Überstimulation wurde zumindest eine mitzyklische transvaginale Sonographie durchgeführt, ab einer Follikelgröße von 18-20 mm wurde die Ovulation mit 5000 IE humanem Choriongonadotropin ausgelöst. Die Ruptur des Follikels passierte 34-46h nach HCG Verabreichung. Im Durchschnitt konnte eine gute Eizelle bei Behandlung mit Clomifen und FSH erreicht werden.

2.2.2 Gonadotropine

Das in unserem Fall am häufigsten angewendete FSH- „Step up Protokoll“ basiert auf einer täglichen, subkutanen Zufuhr von stetig steigenden FSH Dosen. Die Patientin startet mit einer Initialdosis von zumindest 75 IE FSH für maximal 14 Tage. Begonnen wird an den ersten Zyklustagen. In der transvaginalen Ultraschalluntersuchung wird eruiert ob- und mit welcher FSH Dosis das Follikelwachstum einsetzt. Die geringstmöglich wirksame Dosis wird dann unter regelmässiger Kontrolle des Follikelwachstums bis zur Ovulation beibehalten. Die Ovulation wird je nach Protokoll bei einer Follikelgröße von 18- 20mm induziert. Da es bei Polyovulation zu unphysiologisch hohen Serumöstradiolwerten kommt, welche über eine negative Rückkoppelung die LH Ausschüttung hemmen und es so zur Luteolyse führt, ist in gewissen Fällen eine Lutealphasenunterstützung notwendig. Dazu verwendet wird hochgereinigtes HMG.

Corifollitropin α

Corifollitropin α als lang wirksames FSH stellt eine noch junge aber belastungsfreiere Stimulationsalternative im Vergleich zu konventionellem rekombinanten FSH dar. Mit einer Halbwertszeit von 94,7 Stunden genügt eine am Beginn des Zyklus verabreichte Einmaldosis. Danach wird bei Notwendigkeit erst wieder am Tag 8 rekombinantes FSH verabreicht. (Devroey et al. 2009a) Den Patientinnen kann durch diesen „Wenigeraufwand“ ein Teil ihrer psychischen Belastung genommen werden. 26 Frauen wurden in der Landes- Kinder und Frauenklinik Linz im Jahr 2013 mit Corifollitropin α stimuliert, immer ab dem achten Stimulationstag in Begleitung mit rekombinantem FSH um ein zufriedenstellendes Follikelwachstum zu erzielen. Langwirksames FSH gibt es bis dato nur im Antagonistenprotokoll. Es wurden zwei minimal-effektive Dosen ermittelt: Für Frauen ≥ 60 kg KG ist eine Dosierung von 150 μ g vorgesehen, für Patientinnen ≤ 60 kg sollten 100 μ g entsprechen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Frauen ≤ 60 kg KG welche mit Corifollitropin α stimuliert wurden eine signifikant höhere Zahl an Eizellen gewonnen werden konnte als bei Frauen die mit 150IE rFSH behandelt wurden, die Schwangerschaftsrate unterschied sich jedoch nicht signifikant. (Mannaerts et al. 2010)

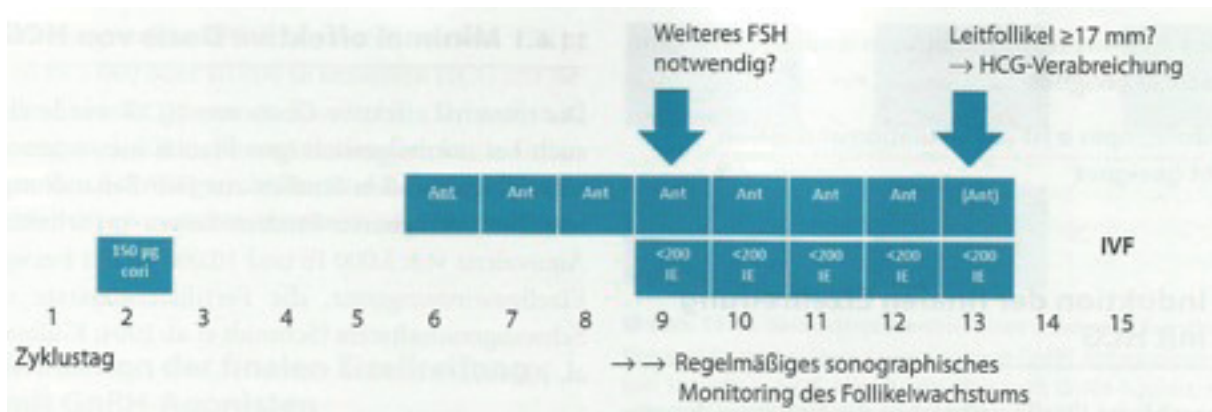


Abb. 9: Verabreichungsschema Corifollitropin, Diedrich et al. 2013

2.2.3 „Kontrollierte“ ovarielle Stimulation

Eine Begleiterscheinung der multifollikulären Stimulation ist die über zentralnervöse Rückkoppelungsmechanismen getriggerte vorzeitige Freisetzung von LH, ein sogenannter prämaturer LH-Anstieg. Durch diesen vorzeitigen LH Anstieg ergibt sich eine geringere Entwicklungspotenz der Eizelle mit herabgesetzter Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft nach Embryotransfer (Loumaye 1990). Zur Prophylaxe werden GnRH Analoga eingesetzt welche die LH Ausschüttung aus der Hypophyse unterbinden. Schließlich gibt es zwei unterschiedliche Ansätze, beide mit dem Ziel die Hypophyse in der Phase der Stimulation zu unterdrücken.

2.2.3.1 GnRH Analoga

235 Patientinnen wurden im Vorjahr in der Linzer Landesfrauen- und Kinderklinik mit einem sogenannten „Agonistenprotokoll“ stimuliert. Die GnRH Agonisten binden mit hoher Affinität an den GnRH Rezeptor und blockieren somit die FSH und LH Ausschüttung. Es kommt zur Entleerung der Gonadotropinspeicher aus der Hypophyse, ein sogenannter „flare-up effect“ tritt ein. Erst nach mindestens 10 Tagen werden keine körpereigenen Gonadotropine mehr ausgeschüttet. Dieses Schema erwartet also eine 10-14 tägige Agonistenverabreichung bevor mit der Stimulation begonnen werden kann. Man unterscheidet ein langes von einem kurzen Agonistenprotokoll, wobei das kurze vor allem bei erwartetem, schlechten

Ansprechen auf die Stimulation eingesetzt wird um den Gonadotropinverbrauch zu senken und den „flair up effect“ zu nützen.

2.2.3.2 GnRH Antagonisten

GnRH Antagonisten binden an den GnRH Rezeptor und verdrängen dort das native GnRH (=kompetitiver Hemmer). Somit wird innerhalb weniger Stunden kein FSH und LH mehr aus der Hypophyse freigesetzt was die Anwendung auf die späte Follikelphase begrenzt.

Cetrorelix

Ein Großteil unserer Patientinnen erhielten ein Cetrorelix- Einzeldosisprotokoll. 3mg Cetrorelix supprimieren die Hypophyse für 96 Stunden. Bis dahin sollte die HCG Gabe erfolgen. Ist dies nicht der Fall kann eine Dosis von 0,25mg pro Tag angeschlossen werden.

Ganirelix

Die subkutane Applikation des GnRH Antagonisten startet am Tag 6. des Zyklus in einer Dosierung von 0,25mg. Verabreicht wird so lange, bis punktierbare Follikel vorliegen, besser noch bis zur endgültigen Ovulationsinduktion. Zu beachten ist die kurze Halbwertszeit. Alle 30 Stunden muss eine Applikation erfolgen um den körpereigenen LH- Anstieg zu vermeiden.

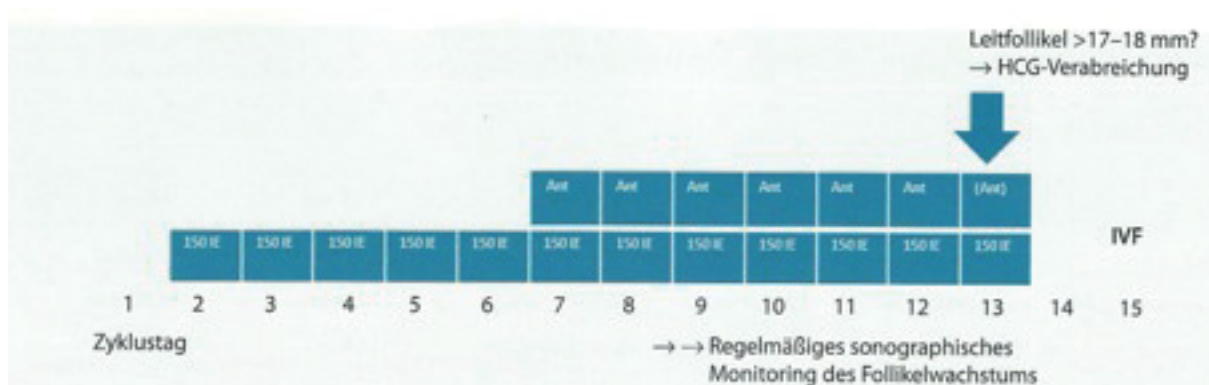


Abb. 10: Verabreichungsschema GnRH Antagonist, Diedrich et al. 2013, S. 124

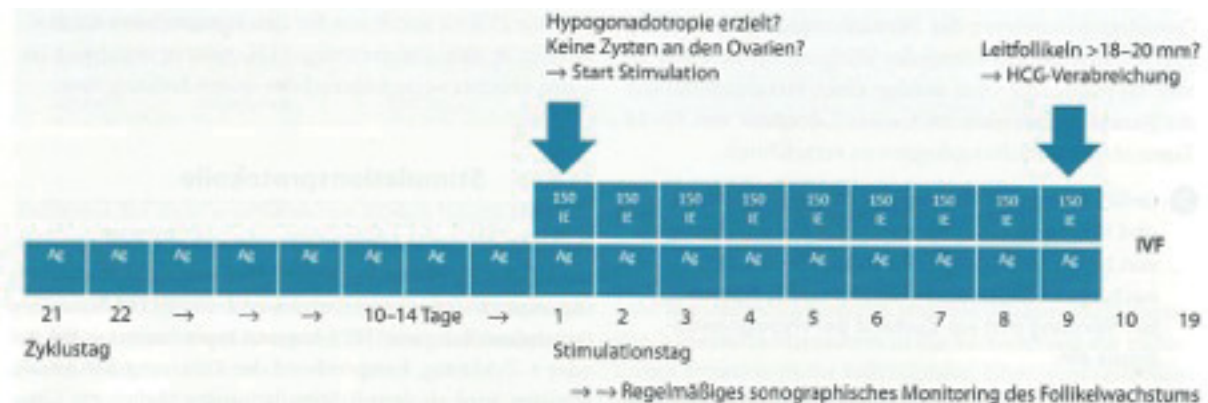


Abb. 11: Verabreichungsschema GnRH Agonist- langes Protokoll, Diedrich et al. 2013, S. 124

2.2.4 Ovulationsinduktion mit HCG

HCG, rekombinant hergestellt oder urinären Ursprunges, als Strukturanalogon des LH wird aufgrund seiner relativ langen Halbwertszeit (24-36 Stunden) zur Terminisierung des Eisprunges eingesetzt. Der bestmögliche Applikationszeitpunkt ist aber weder im Antagonisten noch im langen Agonistenprotokoll ausreichend erforscht. (Tan et al. 1992; Clark et al. 1991). Empirische Daten raten im Agonistenprotokoll zur HCG Verabreichung bei Vorliegen von 2-3 Follikeln mit einer Größe von 17-20mm Durchmesser, im Antagonistenprotokoll wird HCG üblicherweise bei zwei bis drei Follikeln mit 17-18mm Durchmesser verabreicht. (Kolibianakis et al. 2004; Devroey et al. 2009). Verfügbare Studien zeigen ein Zeitfenster von 34-40 Stunden zwischen HCG-Gabe und transvaginaler Eizellentnahme.

(Nargund et al. 2001; Thornton et al. 1990)

2.3 Follikelpunktion und Eizellgewinnung

Konnte die Stimulation der Ovarien abgeschlossen, das Endometrium aufgebaut und die finale Eizellreifung induziert werden, steht die Patientin vor der Abpunktion der reifen Follikel. Je nach Wunsch kann der Eingriff in Vollnarkose oder mit nur leichter Sedierung durchgeführt werden. Auf die Analgesie sollte jedoch in keinem Fall verzichtet werden da sich der Eingriff als schmerzhaft erweist. Gelagert wird die Patientin in Steinschnittlage. Der Punktion sollte eine Sonographie des Endometriums zum Ausschluss einer möglicher Serometra, also einer pathologischen Flüssigkeitsansammlung im Uterus, vorausgehen. Das Vorliegen einer Serometra würde die Kryokonservierung aller Eizellen und den Embryotransfer in einem Folgezyklus mit sich bringen. Nach Einführung der Vaginalsonde und Verifizierung der anatomischer Strukturen wird die Nadel durch die Vaginalwand in das Ovar geschoben, die Follikel werden punktiert und die Eizelle mit den umgebenden Granulosazellen mit Hilfe einer Vakuumpumpe eingesaugt. Punktiert sollen all jene Follikel mit einem Durchmesser $\geq 10\text{mm}$ werden. Wird das Ovar transvaginal nicht erreicht, kann die Punktion durch das Myometrium erfolgen ohne sich negativ auf die eintretende Schwangerschaft auszuwirken (Davis; Ginsburgh 2004). Hat die Ovulation bereits stattgefunden kann versucht werden Metaphase 2-Eizellen aus dem Douglas-Raum zu punktieren.

(vgl. Diedrich et al. 2013, S. 210-211)

2.4 Evaluierung der Eizellen

Eizellen können nach Stimulation immer morphologisch auffällig sein. (Van Blerkom et al. 2004) Durch die Stimulation reifen auch solche Follikel heran, welche unter normalen Bedingungen atretisch geworden wären. Dementsprechend schlecht können sich die Qualitäten der gewonnenen Eier darstellen. (Ebner et al. 2006)

Seit einem im Jahr 2010 stattgefundenem Treffen international anerkannter Embryologen unter der Schirmherrschaft der europäischen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (ESHRE) existieren Minimalstandards für die Bewertung von Eizellen und Embryonen (Alpha Scientists in Reproductive Medicine und ESHRE Special Interest Group Embryology 2011).

Bei der Evaluierung der Eizelle geht es darum die Zellen mit dem höchsten Entwicklungspotenzial zu identifizieren und zu selektionieren um eine Schwangerschaft mit hoher Sicherheit erzielen zu können. Die lichtmikroskopische, morphologische Beurteilung der Eizelle stellt heutzutage die Routine dar. Andere, genauere Verfahren stecken noch in den Kinderschuhen. (vgl. Greuner et al. 2012) Keefer stellte 1987 einen einfachen Score vor, nachdem der Reifegrad der frisch punktierten Eizelle nach den morphologischen Eigenschaften des Cumulus oophorus und der Corona radiata geschätzt werden kann. Eine reife Eizelle, also eine Eizelle die sich in Metaphase 2 befindet, ist demnach von einem 0,5-0,8 cm großen Cumulus oophorus umgeben, die Corona radiata- Zellen ragen strahlenförmig in alle Richtungen und die übrigen Zellen des Cumulus sind locker und gleichmässig verstreut. 95% dieser nach dem Score mit +++ gekennzeichneten Eizellen haben ein ausgeschleustes Polkörperchen. Eine halbreife Eizelle ++ besitzt einen kleineren Cumulus, die Zellen der Corona radiata liegen dichter aneinander und macht die Zellmembran somit weniger klar sichtbar. Nur etwa 50% haben ein ausgeschleustes Polkörperchen. Bei unreifen Eizellen + findet man kein Polkörperchen, es liegen nur 2-3 kompakte Schichten dunkler Corona radiata Zellen vor und im Zytoplasma ist nur ein Keimbläschen anwesend. Die atretische Eizelle – ist geschrumpft, mit dunklem Zytoplasma ohne Cumulus oophorus und ohne Corona radiata-Zellen. Solche Eizellen sollten wegen ihres geringen Entwicklungspotenzial nie in das IVF-Verfahren einbezogen werden. (vgl. Macas et al. 2006, S. 42-43)

Nach Meinung aller versammelter Embryologen 2010 sollte eine Eizelle von sphärischer Form sein, umgeben von einer gleichmässig angeordneten Zona pellucida, das Zytoplasma hell und homogen, frei von Einschlüssen (refraktile Körper, Vakuolen etc.). Ausserdem sollte ein Polkörperchen abgeschnürt sein, was über eine abgeschlossene Kernreifung sowie über das Vorliegen des haploiden Chromosomensatzes Aufschluss gibt. (vgl. Ebner et al. 2006)

Hat man aber eine Eizelle, welche morphologisch nicht den oben beschriebenen Optimalstandards entspricht-- in mehr als der Hälfte der Fälle treten Anomalien auf- (Ebner et al. 2003) ist es ratsam die Anomalien in intra- und/oder extrazytoplasmatisch einzuteilen. Es gibt wesentliche Unterschiede in der Befruchtungsrate. Oozyten ohne Anomalien sind zu 77% befruchtungsfähig, extrazytoplasmatische Anomalien zu 72,3% und intrazytoplasmatische zu 67,3% (Greuner et al. 2012)

Auffälligkeit (Oozyten)	Befruchtungsrate	Degenerationsrate	Embryoscore am Tag 2 > 10
Keine 11,6 % (552)	77,0 % ^{a, b, c} (425)	2,9 % ^{a, f} (16)	69,8 % ^{a, b, c} (132)
Intrazytoplasmatisch 12,6 % (603)	67,3 % ^{a, d} (408)	2,3 % ^{a, g} (14)	64,9 % ^a (96)
Extrazytoplasmatisch 30,7 % (1463)	72,3 % ^{b, d} (1058)	5,6 % ^{c, e} (82)	67,8 % ^c (259)
Intra- und Extrazytoplasmatisch 45,1 % (2151)	67,5 % ^e (1452)	7,9 % ^d (170)	60,2 % ^d (257)

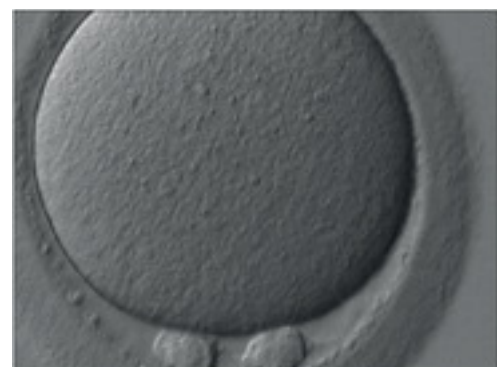
Tabelle: Greuner et al. 2012

Morphologische Anomalien

Rieseneizellen

Die hormonelle Stimulation begünstigt das Auftreten von Riesenoozyten, das Produkt eines Zytokinesefehlers oder zwei verschmolzener Oogonien. Rieseneizellen haben immer einen diploiden Chromosomensatz. Wird eine solche Zelle befruchtet, hat der Embryo einen triploiden Chromosomensatz und muss unbedingt verworfen werden.

(Ebner et al. 2006)



Ebner T et al. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie - Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology 2006; 3 (7): 17-23

Abb. 12 Rieseneizelle

Ovale Verformung

Sind Eizelle und Zona pellucida oval verformt, läuft der daraus entstehende Embryo Gefahr eines Entwicklungsdefizits. Je nach Ausprägung kann ein länglicher Embryo entstehen, fehlende Zell- Zell- Kontakte, die für eine normgerechte Entwicklung ausschlaggebend sind, gehen verloren. (vgl. Shen et al. 2005)

Extrazytoplasmatische Anomalien

Zona pellucida

Farbe und Dicke sind hier die entscheidenden Parameter. Eine zu dunkle ZP ist mit schlechterer Befruchtungsrate vergesellschaftet. (Ebner et al. 2006)

Perivitelliner Spalt

Außerordentlich große PVS sowie Einschlüsse in Selbigem können zu einem schlechteren Outcome führen. (ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011)

Polkörperchen

Da das erste Polkörperchen nur eine „Halbwertszeit“ von 8-10 Stunden hat ehe es zerfällt, kann dessen Form als Indikator für das postovulatorische Alter der Eizelle gesehen werden. Die beste Prognose hat ein Ei, hat das ihm zugehörige Polkörperchen eine ovale Form. Ein unvollständiges Abschnüren des ersten Polkörpers weist auf eine vergleichsweise unreife Eizelle hin, die Befruchtungswahrscheinlichkeit ist verringert. Auch übergroße Polkörper haben eine eher schlechte Prognose, eine Fragmentation des Polkörperchens kann bei überreifen Eizellen vorkommen. Auch hier liegt eine schlechte Prognose vor. (Macas et al. 2006)

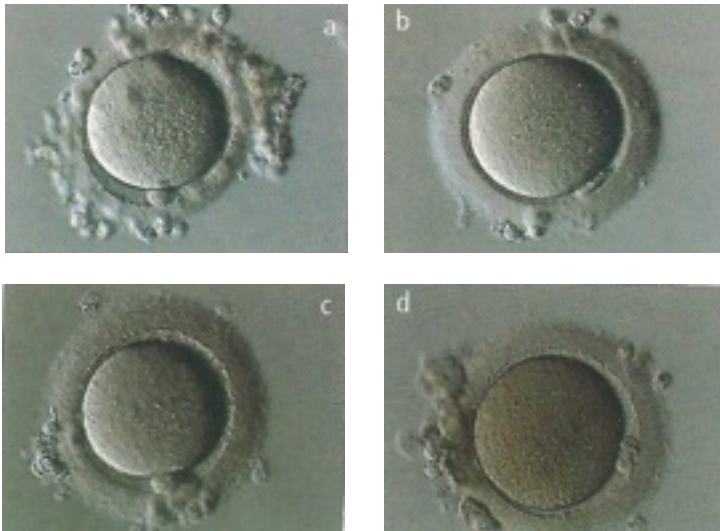
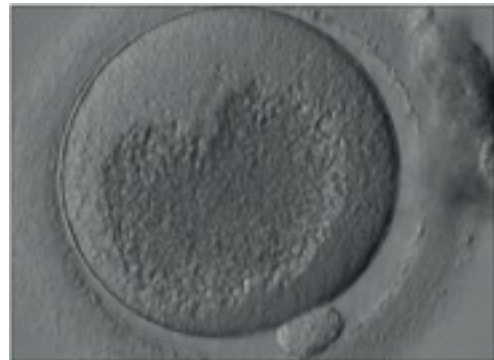


Abb. 13: Polkörperchenmorphologien, Macas et al. 2006, S. 44

Intrazytoplasmatische Anomalien

Zellgranulierung

Zellgranulierungen bringen eine erhöhte Rate an chromosomalen Auffälligkeiten sowie eine erniedrigte Schwangerschaftsrate mit sich (Kahraman et al. 2000; Meriano et al. 2001)



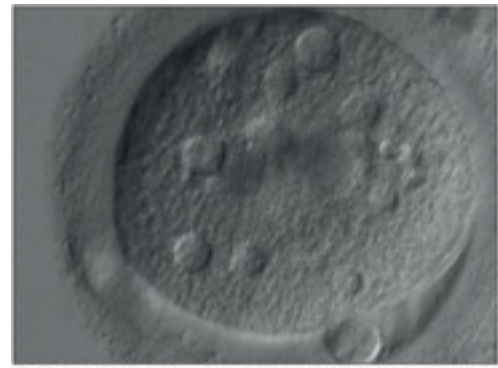
Khanal T et al. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie - Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology 2008; 3 (1): 17-23

Abb. 14: Zellgranulierung

Vakuolisierung

Kleine (5-10µm), mit transparenter Flüssigkeit gefüllte Vakuolen scheinen keine negative Konsequenz in der Eizellqualität zu haben, während größere Vakuolen

($\geq 14\mu\text{m}$) mit einer schlechteren Befruchtungsrate vergesellschaftet sind. (ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011). Größere Vakuolen bergen die Gefahr einer Spindelverschiebung was häufig zu Teilungsanomalien und genetischen Aberrationen führen kann. (Nayudu et al. 1989; Van Blerkom 1990)



Ebner T et al. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie - Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology 2006, 3 (2): 17-23

Abb. 15: Vakuolisierung

Aggregation des glatten endoplasmatischen Retikulums
Eizellen mit glattem endoplasmatischen Retikulum weisen akzeptable Befruchtungsraten auf sofern die Strukturen nicht penetriert wurden. Allerdings ist die weitere Entwicklung oft stark eingeschränkt und der Schwangerschaftsausgang bei vorliegendem sER fatal. Das einzig je geborene Baby das nachgewiesen aus einer solchen dysmorphen Eizelle entstanden ist, leidet an einem schweren Imprintingdefekt, einem Beckwith-Wiedemann- Syndrom. (Ebner et al. 2006).



Ebner T et al. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie - Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology 2006, 3 (2): 17-23

Abb. 16: sER

2.5 Möglichkeiten der Zusammenführung von Ei- und Samenzelle

2.5.1 Aufbereitung der Spermien

Nachdem die Eizellen gewonnen und evaluiert wurden stellt die Spermienaufbereitung den nächsten Schritt dar. Die Qualität der Spermien ist es nämlich, welche die Entscheidung - ob IVF oder ICSI - maßgeblich beeinflusst. Nach Gewinnung der Spermien wird das sich verflüssigte Ejakulat abzentrifugiert und die verbliebenen Spermien nach WHO-Kriterien analysiert, ein Spermogramm wird erstellt. Je nach Morphologie, Beweglichkeit und Anzahl muss abgeschätzt werden ob eine IVF möglich ist.

Liegt im untersuchten Ejakulat eine Azoospermie vor, ist es möglich Spermien aus dem Nebenhoden zu aspirieren. MESA (Microsurgical epididymal sperm aspiration) ist ein mikrochirurgischer Eingriff welcher zahlenmässig eine gute Ausbeute bringt jedoch ist die Motilität oft stark eingeschränkt.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Gewinnung von Spermien aus dem Hoden dar- TESE (Testicular sperm extraction). Dabei werden kleine Gewebsstanzen aus dem Hoden entnommen und im Labor so aufbereitet, dass bewegliche Spermien relativ leicht gewonnen und zur IVF/ICSI herangezogen werden können. Enzymatische Verdauung der Biopsate durch Kollagenase ist ebenfalls möglich. Die Spermien können nach Zentrifugation und Auswaschung für die ICSI bereitgestellt werden. Da die Samenqualität im Hoden oft besser als nach Eintritt in den Nebenhoden ist kann eine TESE im Speziellen bei ausgeprägter Oligoasthenoteratozoospermie oder Kryptozoospermie einer MESA vorgezogen werden.

(Ollero et al. 2001; Greco et al. 2005)

2.5.2 In- Vitro- Fertilisation

2-3 Stunden nach Punktion werden mehrere Cumulus- Oozyten- Komplexe in einem Kulturschälchen mit einer definierten Zahl an Spermien versetzt. Dies passiert unter Zuhilfenahme eines Inseminationsmedium, ein der Tubenflüssigkeit ähnliches Substrat welches zusätzlich EDTA, Penizillin und Phenolrot enthält. EDTA verhindert Oxidationsprozesse in der Zelle welche die Embryonalentwicklung in vitro durch

Freigabe von Sauerstoffradikalen negativ beeinflussen. (Abramczuk et al. 1977) Es existiert eine je nach Autor unterschiedliche Zahlenangabe über die benötigte Spermienkonzentration. Aus allen veröffentlichten Arbeiten geht aber eine Soll-Endkonzentration von 50.- 150.000 Spermien pro Milliliter hervor (Plachot et al. 2002; Tomsu et al. 2002; Hwang et al. 2005; Bungum et al. 2006). Die Eizellzahl sollte so gewählt werden, dass 20.-25.000 Samenzellen pro Eizelle garantiert sind. Die inseminierten COC werden normalerweise über Nacht inkubiert allerdings fördert auch eine zu lange Inkubationszeit das Auftreten freier Sauerstoffradikale. Dieses Risiko kann minimiert werden indem man die Inkubationszeit auf 2 Stunden zu verkürzen versucht. So wird bei gleicher Befruchtungsrate eine bessere Embryoqualität beschrieben.

In circa 5-10% der Fälle kommt es aus immunologischen, genetischen oder andrologischen Gründen zu einem völligen Befruchtungsversagen.

(vgl. Diedrich et al. 2013)

2.5.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

Nach Befruchtungsversagen bei IVF oder aufgrund der schlechten Spermienqualität stellt ICSI die Ultima ratio im Befruchtungsvorgang dar.

Die Mikroinsemination durch das ICSI- Verfahren erfolgt nach der Denudation- dem Befreien der Oozyte von den sie umgebenden, somatischen Zellen. Dies ist nötig um das Eindringen von Fremd-DNA in die Eizelle zu verhindern sowie für den erleichterten Umgang mit Eizelle und Haltepipette.

Die Mikroinsemination der Eizelle wird mit einem Invertmikroskop, das mit einer auf 37°C aufgeheizten Heizplatte, einer Hoffmannoptik, einem Mikroinjektor und zwei Mikromanipulatoren ausgestattet ist, durchgeführt. Man benötigt eine Kulturschale mit darin eingebrachten Tropfen des Inseminationsmediums. In diese Tropfen wird nun eine (oder mehrere) Eizelle(n) eingebracht. Aus dem aufbereiteten Ejakulat wird ein Spermium entnommen und in eine sogenannte PVP (Polyvinylpyrrolidon) - Lösung gebettet um seine Motilität zu reduzieren. Danach berührt man das Flagellum mit der Mikroinjektionspipette um das Spermium zu immobilisieren, es wird aspiriert und in die Eizelle, welche in 9-Uhr Position mit der Haltepipette gehalten wird, nach

vorsichtigem Durchstechen der Zona pellucida und dem Oolemma, eingebracht. Das Polkörperchen und somit der Spindelapparat sollten in 6- oder 12 Uhr- Position gehalten werden. Die Pipette wird dann in der Mitte der Eizelle belassen um das Spermium langsam im Zytoplasma zu entlassen.

Die „beimpfte“ Eizelle wird danach in eine Petrischale umgebettet und die nächsten 16 bis 18 Stunden im Brutschrank belassen. 16-18 Stunden post ICSI/IVF wird die Befruchtung überprüft.

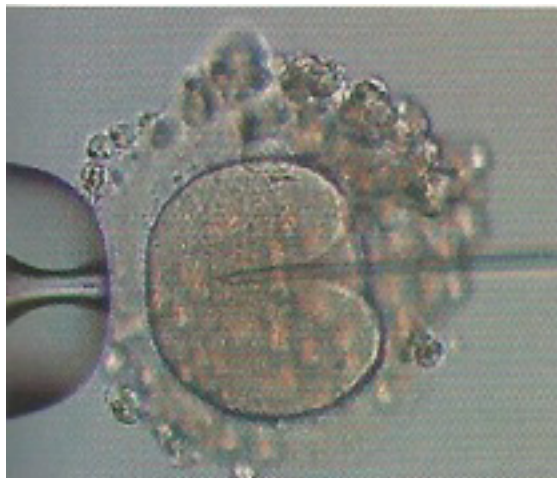


Abb. 17: Das ICSI- Verfahren, Macas et al. 2006, S. 49

2.6 Frühentwicklung des Embryos unter In- Vitro Bedingungen

2.6.1 Das Vorkernstadium

Nach Einbringen des Spermiums in die Eizelle passiert eine Aneinanderlagerung des weiblichen und männlichen Vorkerns mit Migration zum Zellzentrum hin. Die morphologische, mikroskopische Beurteilung der Vorkernstadien ist nach 16-18 Stunden möglich.

Neben Morphologie, Anzahl und Größe der Vorkerne werden vor allem das Zytoplasma und die Nukleoli begutachtet. Aufgrund dieser morphologischen Begutachtung der Eizelle kann die Qualität des künftigen Embryos relativ sicher vorhergesehen werden (Macas et al. 2006) Scott und Smith, sowie Tesarik und Greco entwarfen in den späten 90er Jahren zwei Scores die es ermöglichen Morphologie und Verteilung der Kernkörperchen nach objektiven Gesichtspunkten zu bewerten und demnach eine größere Chance auf Implantation zu gewähren.

2.6.2 Die erste mitotische Teilung

Ein weiterer prädiktiver Faktor stellt der Zeitpunkt der ersten Zellteilung dar. Eine frühe Teilung geht meist mit einer guten Qualität des Embryos einher und korreliert mit erhöhter Implantationsrate (Lawler et al. 2007; Lundin et al. 2001)

Die Größe der Blastomeren, nach erfolgter erster und zweiter Teilung spielt ebenso eine Rolle in der Embryonalentwicklung. Studien zeigten, dass das gleichmäßige Wachstum der Blastomeren ein wichtiges Kriterium für eine physiologische Entwicklung des Embryos darstellt. (Pickering et al. 1995)

Der 1992 von Steer et al. herausgegebene kumulative Embryoscore (CES) bewertet die Embryonenqualität anhand von 4 lichtmikroskopisch ausgewerteten Gütekriterien:

- Blastomeren mit $\geq 50\%$ Fragmentation oder Vorkernstadien
- Blastomeren mit 10-50% Fragmentation
- Ungleich große Blastomeren mit $\leq 10\%$ Fragmentation
- Gleich große, symmetrische Blastomeren

Durch Multiplikation der Graduierung des Embryos mit der Blastomerenanzahl und Addierung aller übertragenen Embryonenwerte errechnet sich dieser Score. Er kann als Index verstanden werden der den embryonalen Anteil an der entstandenen Schwangerschaft angibt. (vgl. Diedrich et al. 2013)

Prinzipiell wird der Embryo in dieser Phase der Reifeteilung in einem Medium für Embryonalentwicklung bis zum Transfer im Inkubator belassen. 42-44 Stunden nach Insemination kann die Teilung kontrolliert und beurteilt werden.

2.6.3 Die Blastozyste

Das Stadium der Blastozyste sollte bei einem sich regelrecht entwickelnden Embryo etwa am Tag 5 nach IVF/ICSI erreicht sein. In diesem Stadium sollte spätestens der Embryotransfer stattfinden. Die physiologische Nidation beginnt circa am sechsten Tag nach Befruchtung. Um einer Dysbalance zwischen Embryonalentwicklung und Gebärmutter Schleimhaut vorzubeugen ist es ratsam den Transfer so nah wie möglich an den physiologischen Ablauf anzunähern. Studien belegen höhere Schwangerschaftsraten nach Blastozystentransfer als ein Transfer am Tag 2.- oder 3. (Bavister; Boatman, 1997) Eine Ausnahme des Embryonentransfers im Blastozystenstadium stellen Frauen mit eingeschränkter ovarieller Reserve dar. In diesem Fall kommt es nur in den seltensten Fällen zur in- vitro Entwicklung einer Blastozyste, was einen Transfer zu einem früheren Zeitpunkt nötig macht. Die Embryo- Gebärmutter- Dysbalance ist hier also vernachlässigbar, der Transfer sollte nach Möglichkeit am Tag 2.-3. stattfinden. (Tsirigotis, 1998)

2.7 Embryotransfer

Nachdem der Embryologe den Embryo mit dem höchsten Entwicklungspotenzial ausgewählt hat, wird dieser in die Gebärmutter eingesetzt. Es gilt als der letzte und wichtigste Schritt in dem langen Procedere einer künstlichen Befruchtung.

2.7.1 Zahl der zu transferierenden Embryonen

„Die Häufigkeit von Mehrlingen in der assistierten Reproduktion ist von mehreren Faktoren abhängig, einer davon ist die Anzahl der transferierten Embryonen. Da bereits eine Zwillingschwangerschaft mit einem deutlich höheren geburtshilflichen und perinatalen Risiko behaftet ist, sollte das Ziel jeder reproduktionsmedizinischen Maßnahme die Einlingsschwangerschaft sein. In jedem Fall muss aber versucht werden, die Entstehung von Mehrlingen zu verhindern. Diese Schwangerschaften sind mit einer massiven psychischen Belastung für die betroffenen Paare, einem hohen volkswirtschaftlichen Einsatz und einem enormen Risiko für die Kinder, an

einem Handicap zu leiden, gebunden.“ (Empfehlung der Österreichischen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, 2009)

Prinzipiell kann man bei Frauen unter 37. Jahren davon ausgehen, gute SSR nach Single-Embryo-Transfer zu erzielen. Laut Österreichischer Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie sollten 2 Embryonen nur bei schlechter Prognose und nach dem dritten, bisher erfolglosen Versuch, transferiert werden. Nach dem 38. Lebensjahr ist der primäre Transfer von zwei Embryonen akzeptiert, nach dem 40. Lebensjahr wird er empfohlen. Nur in Ausnahmefällen ist der Transfer von 3. Embryonen gerechtfertigt.

2.7.2 Technik des Embryotransfers

Die Patientin ist in der Regel nicht narkotisiert, gelagert wird sie in Steinschnittlage. Nachdem der Gynäkologe sich über die anatomische Lage des Uterus informiert hat, kann er zwischen ultraschallgezieltem Transfer oder Transfer ohne Ultraschallkontrolle frei entscheiden, allerdings wird meist die ultraschallgestützte Variante gewählt da sie in Studien signifikant bessere Resultate erzielen konnte. (Lass 2003; Kan et al. 2002) Der flexible Embryonentransferkatheter besteht aus einer Hülse durch die ein Teflon- oder Silikonkatheter geschoben werden kann. An der Spitze des Katheters oder seitlich befindet sich eine Öffnung, durch die der Embryo unter dem Mikroskop aspiriert wird. Die Aspiration und Einbettung des Embryos in diesen Katheter kann in verschiedenen Varianten durchgeführt werden, zum Beispiel wird der Embryo zwischen zwei Luftblasen gelagert um ihn nicht zu verletzen oder zu verlieren. Der Katheter wird also nach Aspiration des Embryos bis an den inneren Muttermund vorgeschoben, danach wird nur noch die elastische Katheterspitze in die Gebärmutterhöhle eingebracht. Dies sollte geschehen ohne den Fundus zu berühren da es ein erhöhtes Kontraktionsrisiko mit sich bringt und natürlich um das Endometrium zu schonen. Die Positionierung der Embryonen im Cavum gilt als umstritten, verschiedene Autoren geben verschiedene Werte an die zwischen 5mm (Diedrich et al. 1989) - 20mm (Coroleu et al. 2002) unter dem Fundus schwanken.

Nach Positionierung des Embryos wird der Katheter zurückgezogen und gespült um etwaige zurückgebliebene Embryonen zu identifizieren.

2.8 Das Ziel- eine Schwangerschaft

Zur Überprüfung des positiv abgeschlossenen Transfers wird die Patientin etwa nach 12 Tagen wieder vorstellig. Diesmal um beta-hCG im Blut nachzuweisen, ein Hormon welches von der sich einnistenden Blastozyste gebildet wird um die Abstoßung des Endometriums zu verhindern, was eine bestehende Schwangerschaft beweist. Ist dies der Fall besteht eine **biochemische Schwangerschaft**. Die Frucht ist in dieser frühen Phase noch nicht im Ultraschall erkennbar. Erst ab der 5.- 6. SSW ist es möglich den Embryo per Ultraschall darzustellen, was einer **klinischen Schwangerschaft** entspricht. Wichtig ist die Definition dieser Begriffe vor allem in der Kostenfrage. In Österreich sieht die Gesetzeslage eine Kostenerstattung bis zu 70% durch den IVF-Fond in bis zu vier Zyklen vor. Kommt es bis zur klinischen SS, werden erneut bis zu vier Zyklen vom Fond übernommen.

2.9 Informationen zum IVF-Fonds

Das IVF-Fonds-Gesetz

Seit 1. Jänner 2000 ist das Bundesgesetz, mit dem ein Fonds zur Finanzierung der In-vitro-Fertilisation eingerichtet wird (.....), in Kraft. Der IVF-Fonds besteht beim Bundesministerium für Gesundheit.

Die Mittel des IVF-Fonds werden aufgebracht durch Überweisungen aus dem Ausgleichsfonds für Familienbeihilfen, der gesetzlichen Krankenversicherungsträger, der Krankenfürsorgeeinrichtungen und der privaten Versicherungsunternehmen.

Vom Fonds werden bei Vorliegen der entsprechenden Voraussetzungen 70 % der Kosten für Maßnahmen der In-vitro-Fertilisation (IVF) grundsätzlich für höchstens vier IVF-Versuche getragen. Dies führt zu einer finanziellen Entlastung von betroffenen Kinderwunschaaren, da nur mehr ein Selbstbehalt in der Höhe von 30% der Kosten vom betroffenen Paar zu übernehmen ist.

Anspruch auf Kostentragung besteht für ein Paar bei Vorliegen folgender Voraussetzungen:

Anforderungen an das Paar:

Das Paar muss in aufrechter Ehe oder in eheähnlicher Lebensgemeinschaft leben.

Vorliegen einer medizinischen Indikation:

Es muss entweder Sterilität der Frau tubaren (eileiterbedingten), durch Endometriose bedingten oder durch polyzystisches Ovarsyndrom bedingten Ursprungs und/oder Sterilität beim Mann vorliegen. Weiters müssen alle anderen Möglichkeiten zur Herbeiführung einer Schwangerschaft bereits ausgeschöpft worden sein. Die Einschränkung auf die angeführten Indikationen ergibt sich aus dem aktuellen Stand der Wissenschaft.

Vor Beginn der Behandlung, die unter die Kostentragung des IVF-Fonds fällt, muss die entsprechende Diagnose entweder bei der Frau und/oder beim Mann durch eine Fachärztin/einen Facharzt gestellt werden.

Altersgrenzen:

Zum Zeitpunkt des Beginns des Versuches einer In- vitro- Fertilisation darf die Frau das 40. Lebensjahr (40. Geburtstag) und der Mann das 50. Lebensjahr (50. Geburtstag) noch nicht vollendet haben. Wenn während eines Versuches von einem der beiden Partner die Altersgrenze erreicht wird, kann die laufende Behandlung noch auf Fondskosten abgeschlossen werden; ein weiterer Versuch mit Unterstützung aus öffentlichen Mitteln ist jedoch im Anschluss nicht mehr möglich.

Welche Kosten fallen an?

Entsprechend den Tarifvereinbarungen betragen die Tarife einschließlich Arzneimittelkosten für die Behandlung im Rahmen eines Versuches einer In-vitro-Fertilisation in einer öffentlichen Krankenanstalt derzeit:

	IVF	ICSI
Frauen unter 35 Jahren	€ 2.522,19	€ 2.799,51
Frauen über 35	€ 2.691,83	€ 2.969,14

Wie viele Versuche werden mitfinanziert?

Es werden grundsätzlich höchstens vier Versuche pro Paar mitfinanziert.

(Bundesministerium für Gesundheit- <http://bmg.gv.at>, 2014)

3. Ergebnisse

Für die Entstehung dieser Arbeit und ihrer Resultate wurden 637 Datensätze künstlicher Befruchtungen, alle im Jahr 2013 im Kinderwunschinstitut des Landes-Frauen- und Kinderklinikums Linz durchgeführt, untersucht. Es wurden nur die Patientinnen in die Studie miteinbezogen, bei denen eine Befruchtung im ICSI-Verfahren stattfand was 505 Fällen entspricht. Die jüngste im Jahr 2013 am Linzer Klinikum behandelte Frau war 18 Jahre alt, die Älteste 46.

Zum besseren Verständnis der einzelnen Tabellen sei erwähnt, dass alle unserer Hypothesen auf die selben Parameter bezogen wurden. Das heisst auf die durch Punktion gewonnenen Eizellen (COC), die davon reifen Eizellen (Anteil MII) -alle Eizellen die sich in MII befanden wurden nochmals in gute und schlechte, also Eizellen ohne und mit Dismorphismen, eingeteilt. Wir schlossen die Anzahl der Guten in die Auswertung ein was einen wichtigen Parameter für die Eizellqualität darstellt (gut_Anteil). Des Weiteren ließen wir die Anzahl der der Befruchtung zugeführten Eizellen (Befruchtung_Anteil), der sich geteilten Eizellen (Teilung_Anteil_ICSI) sowie der Anzahl der befruchteten Eizellen, die schliesslich am Tag 5 zur Blastozyste wurden, miteinfließen (Blasto_Anteil_ICSI).

3.1 Zuerst eine deskriptive Auswertung darüber, in wievielen Fällen man sich für ein langes Agonisten bzw. für ein Antagonistenprotokoll entschied. Es wurden nur die langen Agonistenprotokolle berücksichtigt da das kurze Protokoll in nur äußerst seltenen Fällen angewendet wurde.

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Antagonist	385	59,5	61,8	61,8
	langes Protokoll	238	36,8	38,2	100,0
	Total	623	96,3	100,0	
Missing	System	24	3,7		
Total		647	100,0		

Das Antagonistenprotokoll wurde 385 mal angewendet, das lange Agonistenprotokoll 238 mal. In 24 Fällen wurde keine Information über das angewendete Protokoll dokumentiert.

Überprüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test ANTAGONIST

		COC	Anteil MII	gut_Anteil I	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI
N		385	379	371	371	311
Normal Parameters(a,b)	Mean	9,24	,8102	,4722	,6519	1,0375
	Std. Deviation	6,740	,35184	,39655	,38628	,24937
Most Extreme Differences	Absolute	,124	,287	,204	,159	,444
	Positive	,124	,287	,204	,159	,444
	Negative	-,095	-,128	-,138	-,115	-,325
Kolmogorov-Smirnov Z		2,425	5,584	3,927	3,072	7,829
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000	,000

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test LONG

		COC	Anteil MII	gut_Anteil I	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI
N		238	235	234	234	202
Normal Parameters(a,b)	Mean	8,92	,7979	,4377	,6565	1,1094
	Std. Deviation	5,808	,20866	,38937	,39019	,42913
Most Extreme Differences	Absolute	,121	,162	,216	,172	,413
	Positive	,121	,162	,216	,172	,413
	Negative	-,074	-,157	-,130	-,126	-,276
Kolmogorov-Smirnov Z		1,860	2,484	3,299	2,635	5,863
Asymp. Sig. (2-tailed)		,002	,000	,000	,000	,000

Alle Variablen sind nicht normalverteilt!

Ant/s/lo		COC	Anteil MII	gut_Anteil	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI
Antagonist	N	385	379	371	371	311	142
	Median	8,00	,8571	,5000	,7143	1,0000	,5714
langes Protokoll	N	238	235	234	234	202	77
	Median	8,00	,8333	,4464	,7171	1,0000	,6000
Total	N	623	614	605	605	513	219
	Median	8,00	,8481	,5000	,7143	1,0000	,5714

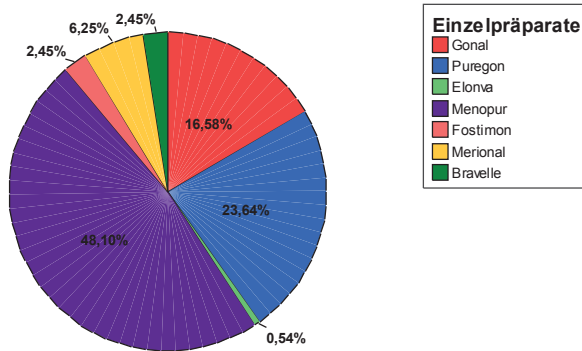
Da wir Mediane vergleichen, kommt der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung:

	COC	Anteil MII	ICSI(2Pn)	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI
Mann-Whitney U	45350,000	43537,500	45038,500	42938,500	29649,000	5221,500
Wilcoxon W	119655,000	71267,500	118574,500	70433,500	78165,000	15374,500
Z	-,213	-,475	-,249	-,226	-1,387	-,550
Asymp. Sig. (2-tailed)	,831	,635	,803	,821	,165	,583

Es besteht keine signifikante Einwirkung des verwendeten Protokolls (Ant, long) auf die untersuchten Variablen (COC...)

3.2 Die nächste Hypothese war es die Verteilung der Einzelpräparate zu untersuchen und jedes Präparat auf die früher genannten Faktoren zu beziehen (COC, Anteil MII, gut_Anteil, Befruchtung_Anteil, Teilung_Anteil_ICSI, Blasto_Anteil_ICSI)

Verteilung der Einzelpräparate



		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Gonal	61	16,6	16,6	16,6
	Puregon	87	23,6	23,6	40,2
	Elonva	2	,5	,5	40,8
	Menopur	177	48,1	48,1	88,9
	Fostimon	9	2,4	2,4	91,3
	Merional	23	6,3	6,3	97,6
	Bravelle	9	2,4	2,4	100,0
	Total	368	100,0	100,0	

Wirkung der Einzelpräparate auf die untersuchten Variablen (COC, etc.)

Einzelpräparate		COC	Anteil MII	gut_Anteil	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI
Gonal	N	61	61	61	61	45	27
	Median	12,00	,8571	,5000	,6000	1,0000	,6667
Puregon	N	87	87	87	87	76	40
	Median	11,00	,8571	,5000	,6667	1,0000	,5227
Elonva	N	2	2	2	2	2	1
	Median	16,50	,2457	,5000	1,3889	1,0000	,2857
Menopur	N	177	172	169	169	144	51
	Median	7,00	,8000	,5000	,7778	1,0000	,5714
Fostimon	N	9	9	9	9	8	2
	Median	9,00	,8000	,5714	,7143	1,0000	1,1250
Merional	N	23	23	23	23	19	12
	Median	8,00	,8889	,3750	,7500	1,0000	,4688
Bravelle	N	9	9	9	9	9	2
	Median	3,00	1,0000	1,0000	,6667	1,0000	1,4167
Total	N	368	363	360	360	303	135
	Median	9,00	,8333	,5000	,7500	1,0000	,5714

a Kruskal Wallis Test b Grouping Variable: Einzelpräparate

	COC	Anteil MII	gut_Anteil	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI
Chi-Square	60,477	13,842	8,014	13,553	1,774	12,195
df	6	6	6	6	6	6
Asymp. Sig.	,000	,031	,237	,035	,939	,058

Signifikant bei Asymp. Signifikanz <0,05

In Bezug auf die Anzahl der gewonnenen Eizellen (COC), den Anteil an reifen Eizellen, sowie den Anteil an der der Befruchtung zugeführten Eizellen ist das Ergebnis signifikant.

3.3 Hat die Entscheidung über Verabreichung eines Einzelpräparates gegenüber einer Kombination aus zwei Medikamenten Einfluss auf das Eizelloutcome?

Kombination		COC	Anteil MII	gut_Anteil	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI
nein	N	366	361	358	358	301	134
	Median	9,00	,8333	,5000	,7500	1,0000	,5714
ja	N	254	250	244	244	210	82
	Median	7,00	,8619	,4000	,6667	1,0000	,5857
Total	N	620	611	602	602	511	216
	Median	8,00	,8500	,5000	,7143	1,0000	,5714

Kombination ja bedeutet 2 verabreichte Gonadotropine (Aromatasehemmer), Kombination nein bedeutet die Patientin wurde mit einem einzelnen Präparat stimuliert.

	COC	Anteil MII	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI	gut_Anteil
Mann-Whitney U	39056,500	41159,500	42522,500	31462,000	5491,000	39809,500
Wilcoxon W	71441,500	106500,500	72412,500	53617,000	14536,000	69699,500
Z	-3,391	-1,886	-,555	-,113	-,007	-1,889
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,059	,579	,910	,995	,059

Wie in den obigen Tabellen ersichtlich, ist das Ergebnis für die gewonnen Eizellen (COC) signifikant. Das heißt nach Stimulation mit einem Einzelpräparat gewinnt man im Durchschnitt 2 Eizellen mehr als nach Stimulation mit einer Kombination aus 2 Präparaten. Über die Art und Reife dieser Eizellen kann statistisch keine signifikante Aussage getroffen werden.

3.4 Hat die Art der verabreichten Kombination einen Einfluss auf die Eizellen?

Art der Kombination		COC	Anteil MII	gut_Anteil	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI
Puregon +Fostimon	N	11	11	11	11	11	7
	Median	8,00	,8182	1,0000	,8333	1,0000	,2857
Fostimon +Merional	N	112	110	107	107	93	30
	Median	7,00	,8481	,4000	,6667	1,0000	,5982
Fostimon +Gonal-f	N	5	5	5	5	2	
	Median	4,00	1,0000	,2143	,0000	1,0000	
Fostimon +Menopur	N	26	26	25	25	23	9
	Median	6,00	,8333	,1429	,6667	1,0000	,5714
Elonva+Gonal-f	N	2	2	2	2	2	1
	Median	15,00	,8200	,8333	,8571	1,0000	,7500
Puregon +Merional	N	5	5	5	5	4	1
	Median	8,00	,8000	,5000	,6667	1,0000	,5000
Elonva +Merional	N	1	1	1	1		
	Median	16,00	,1875	,0000	,0000		
Menopur +Merional	N	2	2	2	2	2	
	Median	4,50	,4167	1,0000	,8333	1,5000	
Gonal-f +Menopur	N	6	5	5	5	4	1
	Median	6,50	1,0000	,2500	,6000	1,0000	1,0000
Elonva +Puregon	N	19	19	19	19	16	12
	Median	11,00	,8235	,4286	,7778	1,0000	,6000
Clomiphen +Merional	N	7	6	5	5	4	1
	Median	1,00	1,0000	1,0000	,5000	1,0000	,7500
Bravelle +Puregon	N	2	2	1	1	1	
	Median	4,00	,4167	,0000	,0000	1,0000	
Puregon +Menopur	N	11	11	11	11	10	7
	Median	12,00	1,0000	,5000	,6667	1,0000	,5714
Bravelle +Menopur	N	24	24	24	24	20	6

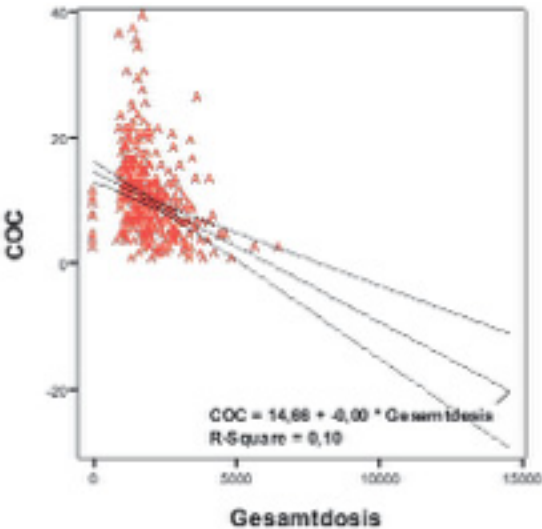
Menopur	Medi an	6,50	,9667	,0000	,7500	1,0000	,5577
	N	5	5	5	5	5	3
Elonva +Menopur	Medi an	15,00	,7895	,4000	,7778	1,0000	,5000
	N	2	2	2	2	2	1
Puregon +Gonal-f	Medi an	6,50	1,0000	,6750	,9000	1,0000	,5000
	N	10	10	10	10	8	3
Bravelle +Menopur	Medi an	4,50	,9545	,3750	,6875	1,0000	1,0000
	N	1	1	1	1	1	
Clomiphen +Menopur	Medi an	1,00	1,0000	,0000	1,0000	1,0000	
	N	3	3	3	3	2	
Menopur +Menopur	Medi an	6,00	,5000	,5000	,5556	1,0000	
	N	254	250	244	244	210	82
Total	Medi an	7,00	,8619	,4000	,6667	1,0000	,5857

Wir unterscheiden zwischen 19 verschiedenen Medikamentenkombinationen.

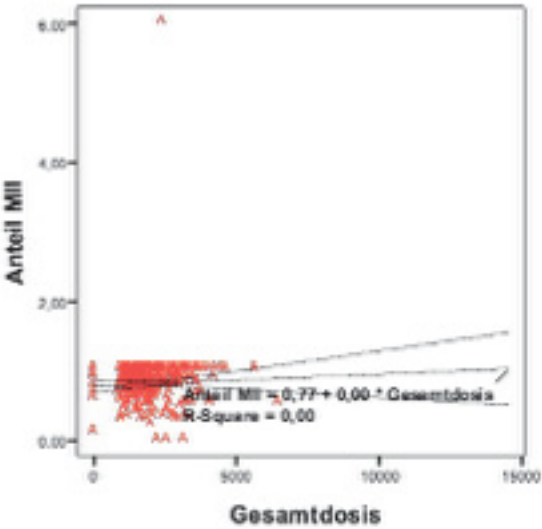
	COC	Anteil MII	gut_Anteil	Befruchtung_A nteil	Teilung_Anteil_I CSI	Blasto_Anteil_I CSI
Chi-Square	46,329	29,002	22,131	18,338	4,394	9,311
df	18	18	18	18	17	12
Asymp. Sig.	,000	,048	,226	,434	,999	,676

Die Art der Kombination zweier Präparate hat einen signifikanten Einfluss auf die gewonnenen Eizellen (COC), sowie auf den Anteil der reifen Eizellen (MII) bezogen auf die gewonnenen Eizellen.

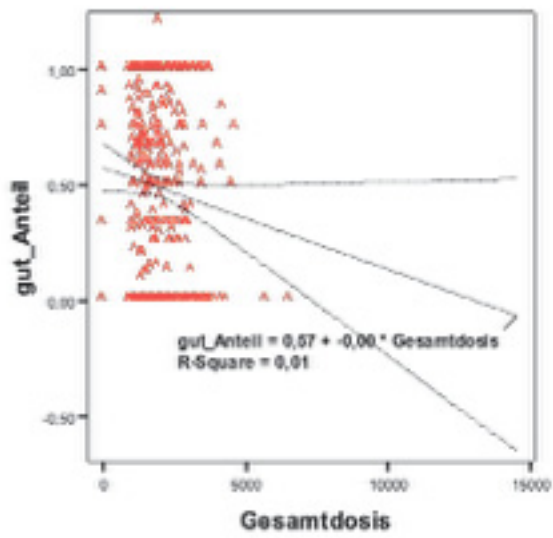
3.5 Hat die vom Gynäkologen bestimmte Dosierung eines Einzelpräparates signifikanten Einfluss auf die von uns festgelegten Parametern (COC, Anteil MII etc.)?



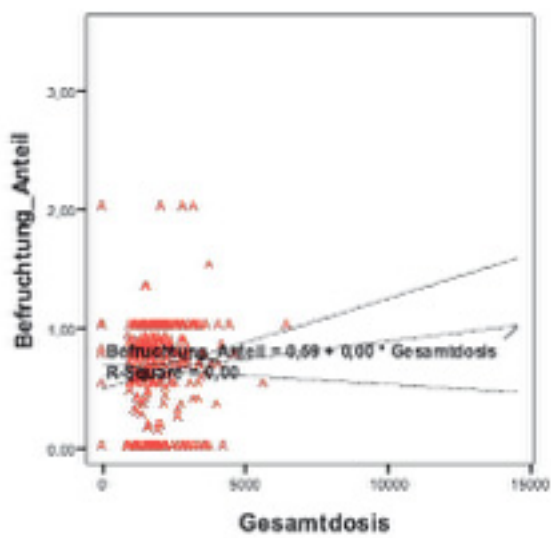
Linear Regression with
95,00% Mean Prediction Interval



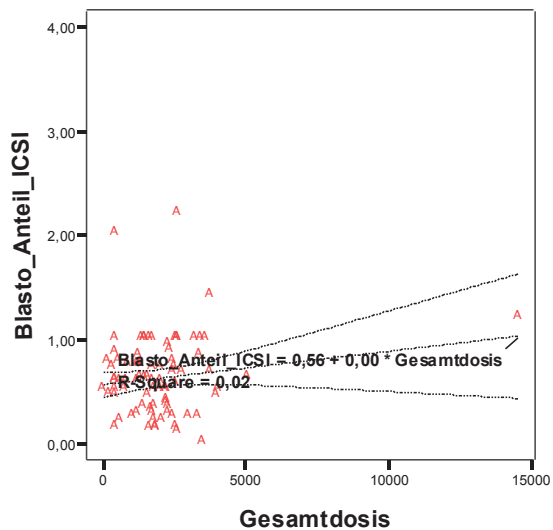
Linear Regression with
95,00% Mean Prediction Interval



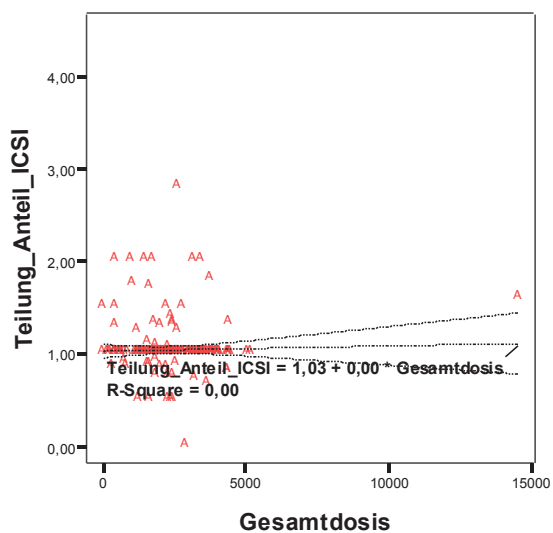
Linear Regression with
95,00% Mean Prediction Interval



Linear Regression with
95,00% Mean Prediction Interval



Linear Regression with
95,00% Mean Prediction Interval



Linear Regression with
95,00% Mean Prediction Interval

Correlations

			COC	Anteil MI	gut_Anteil	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI	Gesamtdosis
Spearman's rho	COC	Correlation Coefficient	1,000	-.077	-.000	-.180**	-.000	-.008	-.389**
		Sig. (2-tailed)	.	.145	.209	.000	.384	.262	.000
		N	366	361	358	358	301	134	366
	Anteil MI	Correlation Coefficient	-.077	1,000	-.049	-.203**	-.081	-.038	.077
		Sig. (2-tailed)	.145	.	.351	.000	.381	.859	.143
		N	361	361	358	358	301	134	361
	gut_Anteil	Correlation Coefficient	-.000	-.049	1,000	.300**	-.110**	.002	-.087
		Sig. (2-tailed)	.299	.301	.	.000	.009	.978	.209
		N	358	358	358	358	301	134	358
	Befruchtung_Anteil	Correlation Coefficient	-.180**	-.223**	.320**	1,000	-.289**	.000	.125*
		Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.	.000	.999	.018
		N	358	358	358	358	301	134	358
	Teilung_Anteil_ICSI	Correlation Coefficient	-.000	-.081	-.110**	-.289**	1,000	.388**	-.020
		Sig. (2-tailed)	.384	.381	.009	.000	.	.000	.728
		N	301	301	301	301	301	134	301
	Blasto_Anteil_ICSI	Correlation Coefficient	-.008	-.038	.002	.000	.388**	1,000	-.104
		Sig. (2-tailed)	.262	.859	.978	.999	.000	.	.009
		N	134	134	134	134	134	134	134
	Gesamtdosis	Correlation Coefficient	-.389**	.077	-.087	.125*	-.020	-.164	1,000
		Sig. (2-tailed)	.000	.143	.209	.018	.728	.859	.
		N	366	361	358	358	301	134	366

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Es wurde der Spearman rho Test verwendet um die Korrelation zu berechnen.

Die Wahl der Dosierung der Einzelpräparate hat einen signifikanten Einfluss auf COC und die Befruchtungsrage. Es besteht eine negative Korrelation zwischen verabreichter Dosis und gewonnenen Eizellen, aber eine positive Korrelation zwischen der Dosis und den der Befruchtung zugeführten Eizellen.

3.6 Hat die gewählte Dosierung einer Kombination aus zwei Präparaten Einfluss auf die von uns festgelegten Parameter?

Correlations

			COC	Anteil MI	gut_Anteil	Befruchtung_Anteil	Teilung_Anteil_ICSI	Blasto_Anteil_ICSI	Gesamtdosis
Spearman's rho	COC	Correlation Coefficient	1,000	-.121	.077	-.058	.046	-.201	-.288**
		Sig. (2-tailed)	.	.058	.209	.369	.507	.070	.000
		N	254	250	244	244	210	82	254
	Anteil MI	Correlation Coefficient	-.121	1,000	-.027	-.233**	.103*	.079	.039
		Sig. (2-tailed)	.056	.	.577	.000	.026	.482	.539
		N	250	250	244	244	210	82	250
	gut_Anteil	Correlation Coefficient	.077	-.027	1,000	.298**	.039	-.041	-.188**
		Sig. (2-tailed)	.209	.877	.	.000	.877	.716	.008
		N	244	244	244	244	207	82	244
	Befruchtung_Anteil	Correlation Coefficient	-.058	-.233**	.298**	1,000	-.292**	-.190	-.052
		Sig. (2-tailed)	.369	.000	.000	.	.000	.087	.416
		N	244	244	244	244	207	82	244
	Teilung_Anteil_ICSI	Correlation Coefficient	.046	.103*	.039	-.292**	1,000	.273*	-.040
		Sig. (2-tailed)	.507	.026	.577	.000	.	.013	.566
		N	210	210	207	207	210	82	210
	Blasto_Anteil_ICSI	Correlation Coefficient	-.201	.079	-.041	-.190	.273*	1,000	.040
		Sig. (2-tailed)	.070	.482	.716	.087	.013	.	.718
		N	82	82	82	82	82	82	82
	Gesamtdosis	Correlation Coefficient	-.288**	.039	-.188**	-.052	-.040	.040	1,000
		Sig. (2-tailed)	.000	.539	.008	.416	.566	.718	.
		N	254	250	244	244	210	82	254

Die Gesamtdosis bei Medikamentenkombination hat einen signifikanten Einfluss auf COC und den Anteil guter Eizellen. Wiederum besteht eine negative Korrelation zwischen Dosis und COC sowie der Dosis und den guten Eizellen.

3.7 Hat die Dauer der Stimulation Einfluss auf die festgelegten Parameter?

			COC	Anteil MI	gut Anteil	Befruchtung Anteil	Teilung Anteil ICSI	Blacto Anteil ICSI	d 95m
Spearman's rho	COC	Correlation Coefficient	1,000	-,108**	,019	-,119**	-,020	-,149*	,127**
		Sig. (2-tailed)	.	,008	,834	,003	,842	,028	,001
		N	637	627	618	618	525	223	621
Anteil MI	Correlation Coefficient	-,108**	1,000	-,048	-,221**	,030	,019	,074	
	Sig. (2-tailed)	,008	.	,232	,000	,499	,774	,068	
	N	627	627	618	618	525	223	612	
gut Anteil	Correlation Coefficient	,019	-,048	1,000	,313**	-,081	-,001	-,080*	
	Sig. (2-tailed)	,834	,232	.	,000	,088	,982	,038	
	N	618	618	618	618	522	223	603	
Befruchtung Anteil	Correlation Coefficient	-,119**	-,221**	,313**	1,000	-,288**	-,098	-,019	
	Sig. (2-tailed)	,003	,000	,000	.	,000	,155	,894	
	N	618	618	618	618	522	223	603	
Teilung Anteil ICSI	Correlation Coefficient	-,020	,030	-,081	-,288**	1,000	,356**	,003	
	Sig. (2-tailed)	,642	,499	,066	,000	.	,000	,950	
	N	525	525	522	522	522	223	511	
Blacto Anteil ICSI	Correlation Coefficient	-,149*	,019	-,001	-,098	,356**	1,000	-,093	
	Sig. (2-tailed)	,028	,774	,982	,155	,000	.	,189	
	N	223	223	223	223	223	223	218	
d 95m	Correlation Coefficient	,127**	,074	-,080*	-,010	,003	-,093	1,000	
	Sig. (2-tailed)	,001	,068	,038	,804	,950	,189	.	
	N	621	612	603	603	511	218	621	

Die Stimulationsdauer hat signifikanten Einfluss auf COC und den Anteil guter Eizellen.

Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Stimulationsdauer und den gewonnenen Eizellen, aber eine negative Korrelation zwischen der Dauer und dem Anteil guter Eizellen.

3.8 Begünstigt eine Stimulationsart, ein Medikament, Dosis und Dauer der Stimulation das Vorkommen blutiger Cumuli?

Kombination	N	Median
nein	359	,0526
ja	249	,0000
Total	608	,0000

	blutig_anteil
Mann-Whitney U	41315,000
Wilcoxon W	72440,000
Z	-1,709
Asymp. Sig. (2-tailed)	,087

Die Anwendung eines Einzelpräparates gegen eine Kombination aus zwei Präparaten ergibt keinen signifikanten Unterschied im Vorkommen von blutigen Cumuli.

Einzelpräparate	N	Median
Gonal	61	,0714
Puregon	86	,1056
Elonva	2	,0717
Menopur	171	,0000
Fostimon	9	,0909
Merional	23	,0000
Bravelle	9	,0000
Total	361	,0476

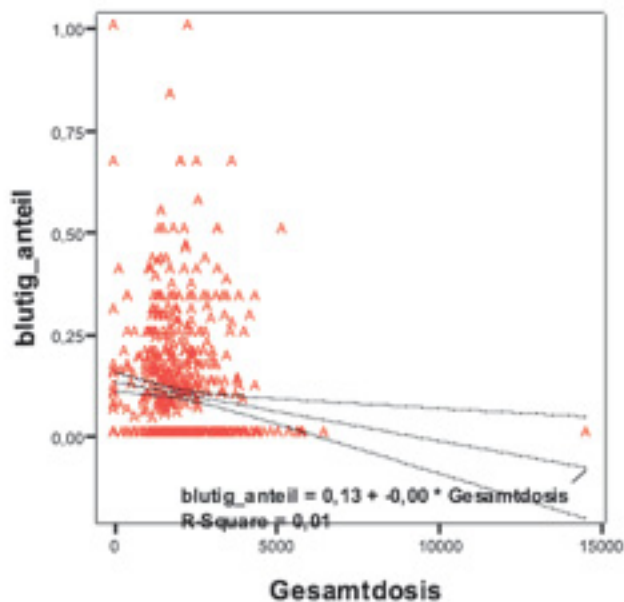
	blutig_anteil
Chi-Square	12,969
df	6
Asymp. Sig.	,044

Die Einzelpräparate verglichen miteinander ergaben einen statistisch signifikanten Unterschied. Ins Auge fallend ist dabei ein 0-Median bei Menopur (n=171!).

Ant/s/lo	N	Median
Antagonist	378	,0526
langes Protokoll	233	,0000
Total	611	,0000

	blutig_anteil
Mann-Whitney U	40220,500
Wilcoxon W	67481,500
Z	-1,942
Asymp. Sig. (2-tailed)	,052

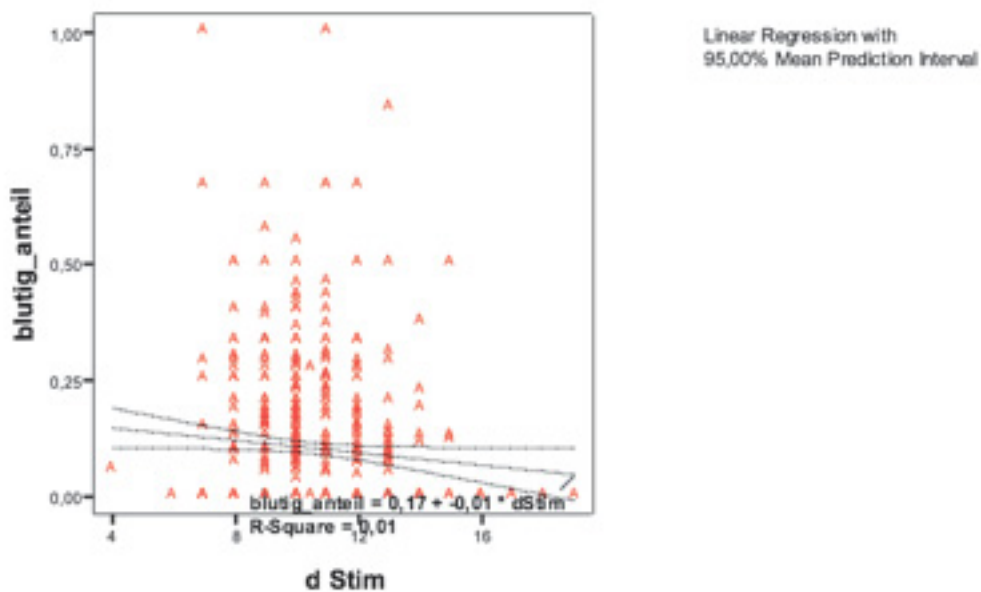
Im Vergleich von Agonisten und Antagonistenprotokoll kann keine signifikante Aussage im Bezug auf Vorkommen blutiger Cumuli getroffen werden.



Linear Regression with
95,00% Mean Prediction Interval

			blutig_anteil	Gesamtdosis
Spearman's rho	blutig_anteil	Correlation Coefficient	1,000	-,167(**)
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	624	624
	Gesamtdosis	Correlation Coefficient	-,167(**)	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	624	647

Die verabreichte Dosis hat jedoch signifikante Aussage. Es besteht eine negative Korrelation zwischen der Dosis und dem Auftreten blutiger Cumuli.



			blutig_anteil	d Stim
Spearman's rho	blutig_anteil	Correlation Coefficient	1,000	-,074
		Sig. (2-tailed)	.	,067
		N	624	609
	d Stim	Correlation Coefficient	-,074	1,000
		Sig. (2-tailed)	,067	.
		N	609	621

Die Stimulationsdauer hat keinen nachweislich signifikanten Einfluss auf das Vorkommen blutiger Cumuli.

3.9 Begünstigt Stimulations- art, -Medikament, -Dosierung und -Dauer das Auftreten bestimmter Eizelldysmorphismen?

Ant/s/lo	N	Median
Antagonist	369	,3158
langes Protokoll	233	,4000
Total	602	,3333

	schlecht_anteil
Mann-Whitney U	37584,000
Wilcoxon W	105849,000
Z	-2,663
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008

Die Stimulationsart ergibt ein signifikantes Ergebnis- das Antagonistenprotokoll liefert weniger morphologisch auffällige Eizellen als das lange Agonistenprotokoll.

Auch bei der Dosierung erhält man signifikante Ergebnisse. Je höher die Dosis gewählt wurde, desto mehr Eizelldysmorphismen traten auf.

			Gesamtdosis	schlecht_anteil
Spearman's rho	Gesamtdosis	Correlation Coefficient	1,000	,188(**)
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	647	615
schlecht_anteil	schlecht_anteil	Correlation Coefficient	,188(**)	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	615	615

Signifikanzen auch bei der Dauer der Stimulation. Auch hier ergibt sich eine positive Korrelation zwischen der Stimulationsdauer und dem Auftreten morphologisch schlechter Eizellen.

			schlecht_anteil	d Stim
Spearman's rho	schlecht_anteil	Correlation Coefficient	1,000	,113(**)
		Sig. (2-tailed)	.	,006
		N	615	600
d Stim	d Stim	Correlation Coefficient	,113(**)	1,000
		Sig. (2-tailed)	,006	.
		N	600	621

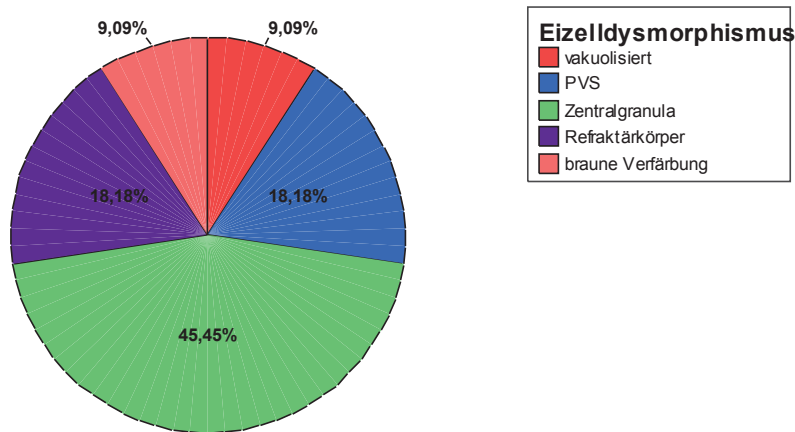
Einzelpräparate	N	Median
Gonal	61	,1000
Puregon	87	,3929
Elonva	2	,0000
Menopur	168	,3333
Fostimon	9	,4286
Merional	23	,4615
Bravelle	9	,0000
Total	359	,3125

	schlecht_anteil
Chi-Square	14,055
df	6
Asymp. Sig.	,029

Auch das ausgewählte Präparat hat signifikanten Einfluss auf die Entstehung schlechter Eizellen. Gonal mit einer Fallzahl von n= 61 produziert im Durchschnitt 10% schlechte Eizellen.

Besondere Aufmerksamkeit gilt der Kombination von Elonva und Puregon, die Kombination aus diesen Präparaten bringt vermehrt Eizellen mit Zentralgranula hervor.

Verteilung des Eizeldysmorphismus für die Kombination von Elonva und Puregon



3.10 Sollte für Patientinnen mit Endometriose/PCO- Syndrom ein Stimulationsschema bevorzugt werden?

Endometriose:

Ant/s/lo	N	Median
Antagonist	42	9,50
langes Protokoll	42	8,00
Total	84	8,00

	COC
Mann-Whitney U	705,500
Wilcoxon W	1608,500
Z	-1,582
Asymp. Sig. (2-tailed)	,114

PCO:

Ant/s/lo	N	Median
Antagonist	39	15,00
langes Protokoll	6	16,50
Total	45	15,00

	COC
Mann-Whitney U	97,000
Wilcoxon W	877,000
Z	-,670
Asymp. Sig. (2-tailed)	,503
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,525(a)

Weder für Endometriose noch für PCO-Syndrom ergeben sich signifikante Ergebnisse.

3.11 Hat die Wahl eines Einzelpräparates gegen eine Kombination aus zwei Medikamenten Einfluss auf die Anzahl entstehender Schwangerschaften?

		Kombination		Total
		nein	ja	nein
HA	nein	56	42	98
	ja	110	66	176
Total		166	108	274

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HA * Kombination	274	96,8%	9	3,2%	283	100,0%

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,757(b)	1	,384		
Continuity Correction(a)	,549	1	,459		
Likelihood Ratio	,754	1	,385		
Fisher's Exact Test				,439	,229
Linear-by-Linear Association	,754	1	,385		
N of Valid Cases	274				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 38,63.

Es besteht kein Zusammenhang zwischen Kombination ja/nein und der Anzahl an nachgewiesenen Schwangerschaften.

3.12 Besteht ein Unterschied zwischen den Präparaten bezüglich der Anzahl an Schwangerschaften?

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HA * Einzelpräparate	168	59,4%	115	40,6%	283	100,0%

		Einzelpräparate						Total
		Gonal	Puregon	Menopur	Fostimon	Merional	Bravelle	Gonal
HA	nein	5	16	32	1	2	0	56
	ja	22	29	50	2	4	5	112
Total		27	45	82	3	6	5	168

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,462(a)	5	,264
Likelihood Ratio	8,270	5	,142
Linear-by-Linear Association	,329	1	,566
N of Valid Cases	168		

a 6 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,00.

Es besteht kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Präparaten und der Wahrscheinlichkeit für eine Schwangerschaft.

3.13 Besteht ein Unterschied zwischen den Präparatkombinationen und der Anzahl an Schwangerschaften?

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HA * Art der Kombination	108	38,2%	175	61,8%	283	100,0%

	Art der Kombination																Total
	Pur ego n +Fo sti mo n	Fos tim on +M erio nal	Fos tim on +G ona l-f	Fos tim on +M eno pur	Elo nva +G ona l-f	Pur ego n +M erio nal	Me nop ur +M erio nal	Go nal- f +M eno pur	Elo nva +Pu reg on	Clo mip hen +M erio nal	Bra vell e +Pu reg on	Pur ego n +M eno pur	Bra vell e +M eno pur	Elo nva +M eno pur	Bra vell e +M eno pur	Me nop ur +M eno pur	
H n A ei n	0	19	2	5	1	0	0	2	2	3	1	1	3	1	1	1	4
ja	2	27	1	6	1	3	1	2	6	0	0	6	8	1	2	0	6
Tot al	2	46	3	11	2	3	1	4	8	3	1	7	11	2	3	1	108

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	16,473(a)	15	,351
Likelihood Ratio	20,454	15	,155
Linear-by-Linear Association	,144	1	,704
N of Valid Cases	108		

a 28 cells (87,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,39.

Es besteht kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Kombinationspräparaten und der Wahrscheinlichkeit für eine Schwangerschaft.

4. Diskussion

Die an der Studie beteiligten Patientinnen wurden weder nach ihrem Alter noch nach Indikationsart in Gruppen zusammengefasst. Dies sollte eine unabhängige Aussage über Wirkung der einzelnen Stimulationsmedikamente auf jede beliebige Frau die sich einer Kinderwunschbehandlung unterzieht, zulassen. Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist die Entscheidung über die Stimulationsart (Antagonistenprotokoll versus langes Agonistenprotokoll) statistisch nicht signifikant. Sehr wohl aber gibt es Vor- und Nachteile in der Wahl der Einzelpräparate.

Interessant ist dabei eine 2004 veröffentlichte Studie der European-Israeli Study Group, die unter über 700 Patientinnen die Gonadotropine Menopur und Gonal F miteinander verglich. Ihr Ergebnis zeigt, dass in den 233 Frauen bei denen eine IVF Befruchtung durchgeführt wurde, eine signifikant höhere Schwangerschaftsrate für Menopur (31%) im Vergleich zu Gonal F (20%) vorliegt. Das Ergebnis meiner Studie kann diese Beobachtung nicht oder nur teilweise untermauern. Gonal F (n=61) bringt im Schnitt 12 Cumulus- Oophorus- Komplexe hervor, was im Vergleich mit allen anderen Präparaten das beste Ergebnis ausmacht, Menopur (n=171) dagegen nur 7. Statistische Signifikanz besteht auch beim Anteil der gewonnenen, reifen Eizellen. Hier beträgt der Anteil für Gonal F 85%, für Menopur 80%. Einzig im Anteil der befruchtete Eizellen hinkt Gonal F Menopur nach. 77% der gewonnenen reifen Eizellen wurden nach Menopurstimulation befruchtet, bei Gonal F waren es nur 60%. Die Eizellen dieser Studie wurden allesamt durch eine ICSI befruchtet, was einen Unterschied zur 2004 veröffentlichten Studie darstellt. Trotzdem den Schluss zu ziehen dass Menopur eine doch deutlich höhere Schwangerschaftsrate mit sich zieht würde diese Arbeit nicht zulassen, beachtet man die Anzahl dysmorpher Eizellen nach Stimulation mit Gonal F welches durchschnittlich 10% morphologisch auffällige Eizelle produziert, Menopur liegt bei 33%.

Bei Corifollitropin alpha (Elonva), ein langwirksames Gonadotropin, ergibt sich das Problem einer noch sehr geringen Fallzahl (n=2), diese Werte sind noch nicht vergleichbar. Selbiges gilt für Fostimon und Bravelle (n=9). Man wird hier noch einige Daten sammeln müssen um auch diese Präparate vergleichbar machen zu können. Für die Kombination aus zwei Medikamenten gilt Ähnliches. Aufgrund der großen Anzahl an Medikamentenkombinationen ergeben sich sehr geringe Fallzahlen, gute Ergebnisse gibt es hier nach Stimulation mit Kombination aus Fostimon und Merional

(n=112). Es konnten 7 Eizellen gewonnen werden, wovon nahezu 85% das MII-Stadium erreichten.

Beim Vorkommen blutiger Cumuli- also Bluteinschlüssen in den Eizellen und/oder in deren umgebenden Cumuluszellen- fällt auf, dass es nach Stimulation mit Menopur (n=171) keinen einzigen blutigen CO- Complex gibt. Auch Merional (n=23) bringt keine blutigen Eizellkomplexe hervor, Puregon jedoch (n=86) bis zu 10%.

Diesbezüglich gibt es keine verwertbaren Vergleichsstudien.

Von allen gewonnenen Eizellen wurden die morphologisch unauffälligen von den auffälligen getrennt dokumentiert. Auffällig ist hier eine Rate von 40% schlechter Eizellen für Puregon, auch Menopur mit 33% sowie Merional mit 46% haben sehr hohe negativ-Werte. Einzig Gonol mit einer Rate von 10% schlechten Eizellen liefert hier ein akzeptables Ergebnis.

Dass die Anwendung von Puregon dennoch sehr beliebt ist, belegt Devroy et al. durch eine von 2006- 2008 durchgeführte Studie in der 1506 Patientinnen im Antagonistenprotokoll entweder mit Corifollitropin alpha oder mit Puregon stimuliert wurden. Die Puregon- Gruppe schaffte eine Schwangerschaftsrate von 38,1% mit 2,6% unvorhersehbaren Zwischenfällen wie dem OHSS.

Keine verwertbaren Ergebnisse brachte die Analyse für Stimulationsart bei Endometriose und PCO- Syndrom. Obwohl Bungart 2009 statistisch belegen konnte dass Endometriosepatientinnen ein alternierendes Stimulationssetting (höhere Dosis, längere Stimulationsdauer) benötigen, konnten keine Signifikanzen für die Bevorzugung eines Stimulationsschema herausgefunden werden. Es bleibt zu hoffen dass in Zukunft Frauen mit organischen Dysfunktionen ein besserer Support im Bereich der künstlichen Befruchtung angeboten werden wird.

Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel, Willibald; Strauss, Günter; Petri, Eckhardt: Praktische Gynäkologie. 5. Auflage, Berlin- New York: Walter de Gruyter 1991.
2. Petru, Edgar: Gynäkologie, 8. Auflage
3. Lüllmann- Rauch, Renate: Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage, Kiel: Thieme 2006.
4. Sökeland, Jürgen; Rüben, Herbert: Taschenlehrbuch Urologie. 14. Auflage, Stuttgart: Thieme 2007.
5. Hartmann, Michaele; Pabst, Maria Anna; Schmied, Rudolf; Caluba, Christian; Dohr, Gottfried: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas. 3. Auflage, Graz: facultas wuv universitätsverlag 2005.
6. Macas, Erwin; Wunder, Dorothea: Assistierte Reproduktionsmedizin. Techniken im IVF-Labor. Bern: Verlag Hans Huber, Hogrefe AG 2006.
7. Eckardstein, S. von; Cooper, T.; Rutsch, K.; Meschede, D.; Horst, J.; Nieschlag, E: Seminar plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azospermia. Fert steril 2000.
8. Eckardstein S. von; Simoni, M.; Bergmann, M.; Weinbauer, G.F.; Gassner, P.; Schepers, A.G.; Nieschlag, E: Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of spermin testicular tissue sample. J Clin Endocrinol Metab 1999.
9. Tang, LX.; Wang, QL.; Tang, YG.; Jiang, F.; Wang, LL.; Huang, JT: Semen quality of normal fertile men. 2013.
10. Ginsburg, K.A.; Moghissi, K.S.; Abel, E. L: Computer-assisted sperm analysis. Sampling errors and reproducibility. J Androl 1988.
11. Diedrich, Klaus; Ludwig, Michael; Griesinger, Georg: Reproduktionsmedizin. Heidelberg: Springer 2013.
12. Weyerstahl, Thomas; Stauber, Manfred: Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. Auflage, München: Thieme 2013.
13. de Ziegler, D.; Borghese, B.; Chapron, C: Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. Lancet 2010.

14. Lyons, RA.; Djahanbakhch, O.; Saridogan, E.; Naftalin, AA.; Mahmood, T.; Weekes, A.; Chenoy, R: Peritoneal fluid, endometriosis, and ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Lancet* 2002.
15. Kunz, G.; Leyendecker, G: Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization, regulation, function and dysfunction. *Reprod Biomed Online* 4 Suppl 2002.
16. Devroey, P.; Boostanfar, R.; Koper N.P.; Mannaerts, B.M.; Ijzerman-Boon, P.C.; Fauser, B.C: A double-blind, non- inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Human Reprod* 24 2009a.
17. Mannaerts, B.M.; Rombout, F.; Out, H.J.; Coelingh Bennink, H: Clinical profiling of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon): relationship between serum FSH ans efficacy. *Hum Reprod Update* Mar-Apr; 1996.
18. Loumaye, E.; The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone against during ovarian hyper stimulation for in- vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* May 1990.
19. Tan, S.L.; Balen, A.; el Hussein, E.; Mills, C.; Campbell, S.; Yovich, J.; Jacobs, H.S: A prospective randomized study of the optimum timing of human chorionic gonadotropin administration after pituitary desensitization in in vitro fertilisation. *Fertil Steril* Jun 1992.
20. Clark, L.; Stanger, J.; Brinsmead, M: Prolonged follicle stimulation decreases pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* Jun 1991.
21. Kolibianakis, E.M.; Albano, C.; Camus, M.; Tournaye, H.; Van Steirteghem, A.C.; Devroey, P: Prolongation of the follicular phase in vitro fertilization results in a lower ongoing pregnancy rate in cycles stimulated with recombinant follivle-stimulating hormone and gonadotropine- releasing hormone antagonists. *Fertil Steril* Jul 2004.
22. Devroy, P.; Aboulghar, M.; Garcia-Velasco, J.; Griesinger, G.; Humaidan, P.; Kolibianakis, E.; Ledger, W.; Tomás, C.; Fauser, B.C: Improving the patience experience of IVF/ICSI: a proposal for an ovarian stimulation protocol with GnRH antagonist co-treatment. *Hum Reprod* Apr 2009.
23. Nargrund, G.; Reid, F.; Parsons, J: Human chorionic gonadotropin- to- oocyte collection interval in a superovulation IVF programe. A prospective study. *J Assist Reprod Genet* 2001.
24. Thornton, S.J.; Pantos, C.; Speirs, A.; Johnston, I: Human chorionic gonadotropin to oocyte retrieval interval in in vitro fertilization- how critical is it? *Fertil Steril* Jan 1990.
25. Davis, L.B.; Ginsburg, E.S: Transmyometrial oocyte retrieval and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2004.

26. Blerkom, J. van; Henry, G: Oocytes dimorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. Hum Reprod 1992.
27. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod 2011.
28. Ebner, T.; Moser, M.; Tews, G: The Importance of Oocyte Morphology with Regard to Further Developmental Capacity. J Reprod Endocrin 2006.
29. Greuner, M.; Winkler, S.; Maxrath, B.; Montag, M.; Schmiady, H: Characterization of the Morphological Development Capacity from the Oocyte to the Embryo. J Reprod endocrine 2012.
30. Keefer, C.L: Foundations of in vitro fertilization. Hemisphere Publishing Corporation, Washington 1987.
31. Ebner, T.; Moser, M.; Sommergruber, M.; Gaiswinkler, U.; Wiesinger, R.; Puchner, M.; Tews, G: Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. Hum Reprod. 2003.
Shen, Y.; Staf, T.; Mehnert, C.; Eichenlaub-Ritter, U.; Tinneberg, H.R: High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. Hum Reprod 2005.
32. Kahraman, S.; Yakin, K.; Dönmez, E.; Samli, H.; Bahce, M.; Cengiz, G.; Sertyel, S.; Samli, M.; Imirzalioglu, N: Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracyto- plasmic sperm injection. Hum Reprod 2000.
33. Meriano, J.S.; Alexis, J.; Visram- Zaver, S.; Cruz, M.; Casper, R.F: Tracking of oocyte dysmorphism for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. Hum Reprod 2001.
34. Van Blerkom, J: Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogeneous ovarian hyperstimulation. J Electron Microscop Tech 1990.
35. Nayudu, P.L.; Lopata, A.; Jones, G.M.; Gook, D.A.; Bourne, H.M.; Sheather, S.J.; Brown, T.C.; Johnston, W:l: An analysis of human oocytes and fol- licles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics. Hum Reprod 1989.
36. Ollero, M.; Gil-Guzman, E.; Lopez, M.C.; Sharma, R.K.; Agarwal, A.; Larson, K.; Evenson, D.; Thomas, AJJr; Alvarez, J.G: Characterisation of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Hum Reprod 2001.
37. Greco, E.; Scarselli, F.; Iacobelli, M.; Rienzi, L.; Ubaldi, F.; Ferrero, S.; Franco, G.; Anniballo, N.; Mendoza, C.; Tesarik, J: Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005

38. Abramczuk, J.; Solter, D.; Koprowski, H: The beneficial effect of EDTA on the development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977
39. Plachot, M.; Belaisch-Allart, J.; Mayenga, J.M.; Chouraqui, A.; Tesquier, L.; Serkine, A.M: Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod* 2002
40. Tomsu, M.; Sharma, V.; Miller, D: Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 2002
41. Hwang, J.L.; Seow, K.M.; Lin, Y.H.; Hsieh, B.C.; Huang, L.W.; Chen, H.J.; Huang, S.C.; Chen, C.Y.; Chen, P.H.; Tzeng, C.R: IVF versus ICSI in sibling oocyte from patients with polycystic ovarian syndrome. A randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005
42. Bungum, M.; Bungum, L.; Humaidan, P: A prospective study, using sibling oocytes, examining the effect of 30 seconds versus 90 minutes gamete co-incubation in IVF. *Hum Reprod* 2006.
43. Lawler, C.; Baker, H.W.; Edgar, D.H: Relationship between timing of syngamy, female age and implantation potential in human in- vitro fertilized oocytes. *Reprod Fertil* 2007.
44. Lundin, K.; Bergh, C.; Hardarson, T: Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001
45. Pickering, S.J.; Taylor, A.; Johnson, M.H.; Braude, P.R: An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Hum Reprod* 1995
46. Tesarik, J.; Greco, E: The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999
47. Steer, C.V.; Mills, C.L.; Tan, S.L.; Campbell, S.; Edwards, R.G: The cumulative Embryo Score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in- vitro fertilisation and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992.
48. Bavister, B.D.; Boatman, D.E: The neglected human blastocyst revisited. *Hum Reprod* 1997
49. Tsigotis, M: Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. *Hum Reprod* 1998
50. Lass, A: Monitoring of in- vitro fertilization- embryo transfer cycles by ultrasound versus by ultrasound and hormone levels: a prospective, multicenter, randomised study. *Fertil Steril* 2003
51. Kan, M.T.; Lin, P.C.; Thyer, A.C.; Morris, J.L.; Soules, M.R: Transvaginal ultrasound guided embryo transfer. American society for Reproductive Medicine, Seattle, USA 2002.
52. Coroleu, B.; Barri, P.N.; Carreras, O.; Marinez, F.; Parriego, M.; Hereter, L.; Parera, N.; Veiga, A.; Balasch, J: The influence of the death of embryo replacement into the uterine cavity on implantation rates after IVF. A controlled, ultrasound-guided study. *Hum Reprod* 2002
53. Diedrich, K.; Van der Hen H.; Al-Hasani, S.; Krebs, D: Establishment of pregnancy related to embryo transfer techniques after in- vitro fertilization. *Hum Reprod* 1989.

54. Bundesministerium für Gesundheit (2000): Das IVF- Fonds- Gesetz. Letzte Aktualisierung: 2010.
URL:http://bmg.gv.at/cms/home/attachments/3/5/5/CH1094/CMS1340806672582/informationivf_-_fonds.pdf
55. Andersen, A.N.; Devroey, P.; Arce, J.C: Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. Hum Reprod 2006
56. Devroey, P.; Boostanfar, R.; [...], and B.C.J.M. Fauser: A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. 2008
57. Gemeinsame Empfehlungen der Österreichischen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, der Österreichischen IVF-Gesellschaft und der Österreichischen Gesellschaft für Sterilität, Fertilität und Endokrinologie. Empfehlungen zur maximalen Anzahl zu transferierender Embryonen. J Reproduktionsmed Endokrinol 2010.

