

Diplomarbeit

**Verwendung des Ionophors Calcimycin (A23187)
bei vorangegangenem Wachstumsarrest humaner
Embryonen im Zuge einer ICSI**

eingereicht von Philipp Staples

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)

an der
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von
Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek

Graz, am 07.08.2014

1 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 07.08.2014

Philipp Staples

2 Danksagung

Danke!

3 Zusammenfassung

Die moderne Reproduktionsmedizin erreicht mit der herkömmliche IVF Befruchtungsraten um die 60%. Durch den Einsatz einer ICSI kann diese Rate auf 75-80% gesteigert werden. Dennoch kommt es in 2-3% der Fälle, trotz ICSI zu einem Befruchtungsversagen.

Dieses Fertilisationsversagen lässt sich in 80% der Fälle auf eine fehlende Aktivierung der Oozyte zurückführen. Die Aktivierung der Oozyte wird maßgeblich durch die Spermien PLC ζ initiiert. Die PLC ζ führt in der Oozyte über den „second messenger“ IP3 zu spezie-spezifischen intrazellulären Kalzium Oszillation welche das weiter Wachstum und die Embryonenentwicklung induzieren. Es gibt nun verschieden Möglichkeiten die Aktivierung der Oozyte zu induzieren. Dabei hat sich der Ca-Ionophor A23187 bei verschiedenen Fragestellungen etabliert. In dieser prospektiven Multicenter Studie wurde nun zum ersten Mal eine „ready-to-use“ Ionophorenlösung (GM508 Cult-Active, Gynemed, Lensahn, Deutschland) für Patienten mit Wachstumsproblemen ihrer Embryonen eingesetzt.

Es wurden insgesamt 95 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Als Arbeitshypothese wurde eine verbesserte Wachstumsrate mit Blastozystenbildung am Tag 5, sowie eine verbesserte Schwangerschaftsrate und Fertilisationsrate (charakterisiert durch 2 Pronuklei) gewählt. Als Kontrollgruppe diente der jeweilige Vorversuch der Patientinnen ohne Applikation der „ready to use“ Ionophorenlösung (GM508 Cult-Active, Gynemed, Lensahn, Deutschland).

Bei der statistischen Auswertung hat sich eine deutliche Signifikanz bezüglich der Blastozystenbildung am Tag 5 gezeigt. Die Gruppe welche mit dem Produkt Cult-Active behandelt wurden zeigte in 223 der Fälle eine Entwicklung zur Blastozyste wohingegen es in der Kontrollgruppe bei 64 der fertilisierten Oozyten zu einer Weiterentwicklung bis hin zur Blastozyste gekommen ist ($p < 0,001$). Bezüglich der Fertilisationrate konnte bei 583 Eizellen der Cult-Active Gruppe ein 2PN Stadium beobachtet werden. In der Kontrollgruppe fanden sich insgesamt 485 Oozyten in dem 2PN Stadium. Die statistische Analyse fand keinen signifikanten Unterschied.

Insgesamt konnte 46 Schwangerschaften in der Cult-Active Gruppe und 10 Schwangerschaften in der Kontrollgruppe detektiert werden. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Es konnte so eindeutig bewiesen werden das der Einsatz des Produkts Cult-Active einen Benefit für kinderlose Paare bezüglich der Blastozystenbildung und der Schwangerschaftsrate hat und welche schon einen vorangegangenen Fehlschlag hinsichtlich der Entwicklung ihrer Embryonen nach ICSI hinnehmen mussten.

4 Abstract

With conventional IVF assisted reproductive technologies achieve fertilization rates of approximately 60%. By using ICSI this rate can be increased to 75-80%. However, as much as 2-3% of all ICSI cases result in complete ICSI fertilization failure.

In 80% of the cases this failure can be attributed to the lack of oocyte activation. The activation of the oocyte is initiated by the sperm PLC ζ . This enzyme induces further development via the "second messenger" IP3 which leads into species-specific intracellular calcium oscillations. Several methods of oocyte activation are acknowledged with Ca²⁺-ionophore A23187 being the most established one.

In this prospective multicenter study, the product GM508 Cult-Active (Gynemed, Lensahn, Germany), manufactured under standardized and controlled conditions, contains the above mentioned Ca-ionophore. Here for the first time a ready-to-use solution containing A23187 (GM508 Cult-Active, Gynemed, Lensahn, Deutschland) has been used for patients with a history of developmental arrest/problems.

A total of 95 patients were included in the study. Primary outcome was improved growth rate with blastocyst formation on day 5. The preceding treatment cycles of the same patients were used as the control group.

For the statistical analysis, has shown a highly significant between the two groups. The group treated with the ready to use solution Cult-Active (GM508 Cult-Active, Gynemed, Lensahn, Deutschland) showed in 223 of the cases a blastocyst whereas only 64 Oocytes of the control group showed an development to the Blastocyst stage (<0.001). Concerning fertilization rate 583 oocytes of the Cult-Active Group showed the 2PN stage. In the control group, there were a total of 485 oocytes at the 2PN stage. The statistical analysis found no significant difference. Overall, 46 pregnancies in the Cult-Active group and 10 pregnancies in the placebo group have been detected. The difference is statistically significant (p <0.001).

It could be clearly demonstrated that the use of the product Cult-Active has an benefit for childless couples who have suffered from previous developmental problems after ICSI.

5 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH.....	Antidiuretische-Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
BSP	Binder of Sperm Protein
Ca,Ca ²⁺	Kalzium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COC	Cumulus-Oophoros-Komplex
DAG	Diacylglycerol
DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
EST	expressed sequence tag
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH.....	Growth Hormon
Gl.....	Glandula
GnRH	Gonadotropin releasing hormone, Gonadorelin
hCG.....	humanes Choriongonadotropin
HVL	Hypophysenvorderlappen
ICM.....	Innere Zellmasse
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IP ₃	Ionositoltriphosphat
IVF.....	In vitro Fertilisation
LH.....	Luteinisierendes Hormon
PH	Pleckstring homology
PLC _ζ	Phospholipase C zeta
PVP	Polyvinylpyrrolidon
ROS	Reactive Oxygen Species
TM	Trophoektoderm
TRPC	Transient Receptor Potential Cation Channels
TSH.....	Thyroidstimulierendes Hormon
ZP.....	Zona pellucida

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Empfehlungen der Österreichischen IVF-Gesellschaft, der maximalen Anzahl der zu transferierenden Embryonen	28
Tabelle 2 Studienergebnisse	39

7 Inhaltsverzeichnis

1	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	I
2	DANKSAGUNG	II
3	ZUSAMMENFASSUNG	III
4	ABSTRACT	V
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
6	TABELLENVERZEICHNIS	VII
7	INHALTSVERZEICHNIS	VIII
8	DAS KINDERLOSE PAAR.....	1
8.1	STERILITÄT & INFERTILITÄT.....	1
8.2	URSACHEN DES UNERFÜLLTEN KINDERWUNSCHS:	2
9	REPRODUKTIONSMEDIZIN	3
9.1	PRÄNATALE OOGENESE	3
9.2	POSTNATALE OOGENESE:	4
9.3	OVARIELLER STEUERUNG	6
9.4	ZYKLUS.....	7
9.4.1	<i>Follikelphase</i>	7
9.4.2	<i>Corpus-luteum Phase</i>	8
9.5	EINFÜHRUNG IN DIE SPERMATOGENESE	10
9.5.1	<i>Spermatogenese</i>	11
9.6	FERTILISATION	14
9.7	DIE ROLLE DES KALZIUMS BEI DER OozyTEN AKTIVIERUNG	18
9.8	BEDEUTUNG DER PHOSPHOLIPASE C ₂	21
10	ASSISTIERTER REPRODUKTION.....	22
10.1	IVF- KÜNSTLICHE BEFRUCHTUNG	22
10.1.1	<i>Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation</i>	22
10.1.2	<i>Spermien Präparations Technik</i>	25
10.1.3	<i>Embryotransfer</i>	27
10.1.4	<i>Die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)</i>	29
10.1.5	<i>Artifizielle Oozyten Aktivierung</i>	33
10.1.6	<i>Ca-Ionophor-A23187</i>	34
11	METHODE & MATERIAL	35
11.1	EINSCHLUSSKRITERIEN	35

11.2	AUSSCHLUSSKRITERIEN	35
11.3	ELIGIBILITÄT	36
11.4	TEILNEHMENDE ZENTREN.....	36
11.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	37
11.5.1	<i>Hypothese</i>	37
12	ERGEBNISSE	37
13	CONCLUSIO	39
14	DISKUSSION	40
16	LITERATURVERZEICHNIS	43

8 Das Kinderlose Paar

8.1 Sterilität & Infertilität

Grundlegend muss zwischen den Begriffen Sterilität, Infertilität und Fertilität unterschieden werden.

Bezeichnet Infertilität das Unvermögen nach erfolgreicher Konzeption die Frucht auszutragen, so ist unter Sterilität die Empfängnisunfähigkeit (bzw. Zeugungsunfähigkeit) zu verstehen (1).

Weiter wird zwischen primärer Sterilität (die Patientin war noch nie schwanger) und sekundärer Sterilität (nach vorangegangener Schwangerschaft findet trotz Kinderwunsch und regelmäßiger Kohabitation keine Konzeption statt) unterschieden (2).

Die Verwendung des Begriffs der Sterilität gibt die Realität meist falsch oder missverständlich wieder, da die meisten kinderlosen Paare nicht zu 100% steril sind, sondern eine Einschränkung der Fertilität aufweisen. Ebenso bedeutet Sterilität etwas Absolutes, streng betrachtet ist die Frau nur außerhalb der reproduktiven Phase (präpubertär und postmenopausal) und nach operativen Eingriffen (zb: beidseitige Salpingektomie od. Ovariectomie, Hysterektomie) steril.

Männer sind bei irreversibel erloschener Spermatogenese, z.B. nach einer bilateralen Orchiektomie oder einer Azoospermie anderer Genese, als steril zu bezeichnen (1).

Leider ist die Nomenklatur der Infertilität und Sterilität stark auf die Frau fokussiert. Männer finden aber in neueren Arbeiten immer mehr Berücksichtigung in der Diagnostik des kinderlosen Paares (1).

Die Anzahl der Paare die sich im reproduktionsfähigen Alter befinden und an einem unerfüllten Kinderwunsch leiden wird mit ca. 10-15% angegeben. Die Tendenz ist, aufgrund des durchschnittlich höheren Alters der Erstgebärenden steigend. Durch die längeren Ausbildungszeiten und die gesellschaftlichen Ansprüche die an die berufstätige Frau gestellt werden, kommt es fast zwangsläufig zu einem gehäuftem Auftreten von Konzeptionshindernissen (z.B. Entzündungen). Das neue Phänomen der gewollten Kinderlosigkeit kommt bei ca. 10% der Ehen vor (3).

8.2 Ursachen des unerfüllten Kinderwunschs:

Ein unerfüllter Kinderwunsch kann verschiedene Ursachen haben. Das Alter der Frau (bei Kinderwunsch) ist von großer Bedeutung, da die Chancen auf eine erfolgreiche Konzeption ab dem 35. Lebensjahr stark sinken. Bei den 30-35jährigen Frauen mit Kinderwunsch bleiben ca. 20% kinderlos. Mit zunehmendem Alter nimmt dieser Prozentsatz weiter zu. Beim Mann kann die Zeugungsfähigkeit bis ins Alter erhalten bleiben und nimmt ab dem 60. Lebensjahr ab (2).

Bei der Frau kommen mit 60 % *hypothalamisch-hypophysäre* und *ovarielle Ursachen* am Häufigsten vor. Bei den *hypothalamisch-hypophysären* Ursachen kommt es zu einer verminderten, gestörten oder desynchronisierten GnRH-Sekretion. Dadurch können ovarielle Dysfunktionen mit anovulatorischen Zyklen, eine Corpus luteum-Insuffizienz oder primäre bzw. sekundäre Amenorrhö zu einer relativen Sterilität führen (2).

Zu den hypothalamisch-hypophysären Ursachen zählen folgende Situationen (2):

- *Hyperprolaktinämie*
- *Hypophyseninsuffizienz*
- *Hypophysentumor*
- *Chronische Stresssituationen*
- *Intensivtraining beim Hochleistungssport*
- *Anorexia nervosa, anorektische Reaktion und Bulimie*
- *Idiopathische hypothalamische Insuffizienz*

Die rein *ovariellen Funktionsstörungen* machen 30% der Sterilitätsursachen aus (3), dazu zählen unter anderem (2):

- *genetische Ursachen*
- *Gonadendysgenese*
- *Climacterium praecox*
- *Zystische Veränderungen der Ovarien*
- *Polyzystische Ovarien mit Hyperandrogenämie*
- *Ovarialtumore*
- *Ovarialendometriose*

Postinfektiöse Veränderungen im Bereich der Tube zählen zu den häufigsten Ursachen einer organisch bedingten Sterilität. Der häufigste Erreger der zu einer tubaren Sterilität führen kann sind Chlamydien, in 38-54% der Fälle mit tubarer Sterilität, ging eine floride Chlamydieninfektion voraus (1, 2). Weitere häufige Erreger, entzündlicher Prozesse an den Eileitern sind Gonokokken, Streptokokken, Staphylokokken und Mykoplasmen (2). Heutzutage sind in den Industrieländern Gonorrhö, Lues oder Urogenitaltuberkulose eine seltene Ursache für eine tubare Sterilität (3).

9 Reproduktionsmedizin

9.1 Pränatale Oogenese

Die Entwicklung der Eizelle startet in der pränatalen Phase eines genetisch weiblichen Organismus. Urkeimzellen differenzieren sich in der Gonadenanlage des Embryos zu Oogonien. Nach einer Reihe von mitotischen Teilungen entstehen am Ende des 3. Monats Zellballen, welche von einer Schicht aus flachen Epithelzellen umhüllt sind. Es wird angenommen dass alle Oogonien innerhalb eines Zellballens von einer Urkeimzelle abstammen. Die flachen Epithelzellen stellen die Vorläufer der Follikel Epithelzellen dar und gehen aus dem Oberflächenepithel der Gonadenanlage hervor. Ein großer Teil der angelegten Oogonien teilt sich weiter, während sich einige, im 3. Entwicklungsmonat zu den deutlich größeren primären Oozyten differenzieren. Diese primären Oozyten treten, nach der Replikation ihrer DNS, in die Prophase der ersten Reifeteilung ein. Die Oogonien vermehren sich indes in den nächsten Monaten weiter und erreichen im 5. Entwicklungsmonat ihr Maximum von ca. 7 Millionen Zellen. Gleichzeitig setzt eine Zelldegeneration ein und viele der Oogonien und primären Oozyten werden atretisch. Der Großteil der Oogonien ist am Ende des 7. Monats zugrunde gegangen, eine Ausnahme bilden dabei nur wenige Zellen in der Nähe der Oberfläche. Alle primären Oozyten die den Zelluntergang überlebt haben befinden sich bereits in der 1. Reifeteilung und sind

jede einzeln von einer Schicht aus flachen Epithelzellen umgeben. Diese primären Oozyten bilden mit den sie umgebenden Epithelzellen den Primordialfollikel (4).

9.2 Postnatale Oogenese:

Die Oozyten befinden sich zum Zeitpunkt der Geburt noch in der Prophase der 1. Reifeteilung und kommen, anstatt in die Metaphase einzutreten, in das Diktyotän. Dieses Ruhestadium ist durch ein fädiges Chromatinnetzwerk charakterisiert. Beendet wird die erste Reifeteilung erst nach der Pubertät. Diese Arretierung der primären Oozyten im Diktyotän wird durch den Meiose-inhibierenden Faktor der von Follikelepithelzellen gebildet wird, gesteuert (4).

Ungefähr 700 000 bis 2 Millionen primäre Oozyten sind bei der Geburt vorhanden. Mit dem Einsetzen der Menarche sinkt die Gesamtzahl der primären Oozyten auf ca. 40 000, da in den Jahren vor der Pubertät der Großteil atretisch wird. Am Beginn der Pubertät beginnen 5-15 Primordialfollikel mit jedem Ovarialzyklus zu reifen. Die Epithelzellen, die jede heranreifende primäre Oozyte umgeben, werden größer und nehmen eine kubisch Form an (4).

Diese kubischen Follikelepithelzellen charakterisieren den Primärfollikel. Schon kurz nach dessen Ausbildung entsteht auf der Oozytenoberfläche eine extrazelluläre Schicht aus Glykoproteinen. Durch das Dickerwerden dieser Schicht bildet sich langsam die Zona pellucida aus. Von den Follikelepithelzellen ziehen kleine zottenartige Fortsätze durch die Zona pellucida und wachsen bis in das Zytoplasma der Eizelle. Durch diese Fortsätze wird der Stofftransport während der Reifung gewährleistet (4).

Den nächsten Schritt der Reifung stellt der Sekundärfollikel dar und ist charakterisiert durch ein mehrschichtiges Follikelepithel. Nach der Bildung des Sekundärfolikels entstehen zwischen den Follikelepithelzellen flüssigkeitsgefüllte Räume. Diese Räume konfluieren dann zu einem gemeinsamen Hohlraum - der Follikelhöhle - die das entscheidende Merkmal des Tertiärfolikels (oder Bläschenfollikel, Graaf-Follikel) ist (4).

Kurz nachdem sich die Höhle gebildet hat erscheint sie halbmondförmig, weitet sich später aber stark aus. Die die Oozyte umgebenden Follikelepithelzellen bleiben erhalten und bilden den Cumulus oophoros. Zwei Bindegewebsschichten umgeben den reifen Follikel, die innen gelegene Gefäßreiche Theca Interna und eine äußere

fibröse Schicht, die Theca externa welche kontinuierlich in das Ovarialstroma übergeht (4).

Durch das körnige Zytoplasma werden die Follikel epithelzellen als Granulosazellen bezeichnet. Sie zählen, aufgrund der Bildung von Progesteron zu den endokrinen Zellen. Die Basalmembran liegt zwischen den bindegewebigen Thekazellen und den epithelialen Granuloszellen. Ebenfalls aus endokrinem Gewebe besteht die Theca interna, sie ist die wichtigste Quelle für Östrogene. Erst wenn die Oozyte voll ausgereift ist (kurz vor der Ovulation) verlässt die primäre Oozyte das Diptyotänstadium und setzt die 1. Reifeteilung fort. Die zwei daraus entstandenen Tochterzellen sind unterschiedlich groß und besitzen je 23 Chromosomen. Der DNS-Strang ist in jedem Chromosom bereits repliziert sodass, wie in somatischen Zellen, $2n$ -DNS vorliegt (4).

Eine der beiden Zellen, enthält das gesamte Zytoplasma und ist die sekundäre Oozyte. Die andere wird zum ersten Polkörperchen und kommt zwischen Zona pellucida und Zellmembran, im perivitellinen Spalt zu liegen. Kurz vor der Ovulation wird die 1. Reifeteilung abgeschlossen. Direkt an die 1. Reifeteilung anschließend findet, ohne DNS- Replikation die 2. Reifeteilung statt. Mit dem Ausstoßen der Eizelle aus dem Ovar während der Ovulation erscheint die Teilungspindel der 2. Reifeteilung (4).

Nur durch die Befruchtung der Oozyte kann die 2. Reifeteilung vollendet werden. Bleibt eine Fertilisation aus, degeneriert die Eizelle innerhalb von 24h nach Ovulation. Unklar ist ob das erste Polkörperchen regelmäßig eine zweite Teilung durchläuft. Die Beobachtung von befruchteten Eizellen mit drei Polkörperchen spricht aber dafür (4).

9.3 Ovarieller Steuerung

Die Steuerung des weiblichen Zyklus ist komplex und wird durch verschiedenste Funktionen des Körpers mitbeeinflusst. Die Leber und/oder diverse Stoffwechselprodukte können einen starken Einfluss auf die Zyklusfunktion haben. Bei der Diagnostik sind deshalb auch die Lebensumstände sowie die Ernährungsweise mit zu berücksichtigen (1).

Der Hypothalamus und die Hypophyse sind die übergeordneten Funktionseinheiten für die Steuerung des weiblichen Zyklus, Zielorgan ist das Ovar. Die Steuerung der Produktion der für den weiblichen Zyklus direkt relevanten Hormone LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon) aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL) erfolgt durch den Hypothalamus. TSH (Thyroidstimulierendes Hormon), ACTH (adrenokortikotropes Hormon), GH ("growth Hormon") und Prolaktin werden ebenso durch Zellen der Adenohypophyse produziert und unterliegen der Steuerung des Hypothalamus (1).

Die Adenohypophyse entwickelt sich aus einem kleinen Teil des Gaumendaches, der Rathke-Tasche und hat dadurch keine direkte Verbindung zum Hypothalamus sodass die Steuerung der Produktion und Sekretion von "releasing hormone" über den hypothalamisch-hypophysären Pfortaderkreislauf erfolgt (1).

Der Hypophysenhinterlappen (oder Neurohypophyse) ist, im Gegensatz zur Adenohypophyse (endokrine Drüse), ein Hirnabschnitt in dem Axone neuroendokriner-hypothalamischer Neurone enden. Das antidiuretische Hormon (ADH) und Oxytocin werden von Neuronen deren Axone im Hypophysenhinterlappen enden produziert. Der größte Teil des ADH wird im Ncl. supraopticus gebildet, im Ncl. paraventricularis wird Oxytocin synthetisiert. Durch einen anterograden axonalen Transport, gebunden an Neurophysin, erreichen beide Hormone die Neurohypophyse (5).

Beobachtungen des Fortpflanzungsverhaltens im Jahreszeitrhythmus und Tag-Nacht-Rhythmus geben Hinweise darauf, dass Melatonin ein indirekt zyklusmodifizierender und reproduktionsbiologischer relevanter Faktor ist, es kann auf die LH-Produktion direkt Einfluss nehmen. Ob Melatonin Bedeutung bei der Gonadotropinsekretion hat, ist aufgrund der multifaktoriellen Zusammenhänge schwer zu deuten (1).

Das Peptid Leptin, gewichtsabhängig produziert in Adipozyten, nimmt auf allen Ebenen der Hypothalamus-Hypophyse-Ovar Achse Einfluss. Es wirkt auf die Appetitregulation als auch auf die GnRH-Sekretion. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine durch Fasten supprimierte LH-Sekretion, nach Gabe von Leptin reversibel ist. Ausserdem findet sich eine direkte Wirkung von Leptin sowohl auf die Hypophyse und die Gonadotropinsekretion als auch auf das Ovar und die Steroidsynthese. Dadurch lässt sich auch erklären warum Leptin bei adipösen Frauen die Synthese der ovariellen Steroidhormone herabsetzt und somit die Ovarialfunktion hemmt (1).

9.4 Zyklus

In den 35-40 Jahren der Geschlechtsreife einer Frau entsteht unter dem zyklischen Einfluss der Gonadotropine und Sexualhormone monatlich ein befruchtungsfähiges Ei. Es werden postnatal keine neuen Oozyten gebildet, sodass der überwiegende Teil des Keimparenchyms verbraucht wird. Ein regelrechter Zyklus hat eine Dauer von 28 Tagen. Schwankungen von +/- 3 Tagen sind als normal anzusehen. Der Zyklus kann in die Follikelphase und in die Corpus-luteum-Phase eingeteilt werden (2).

9.4.1 Follikelphase

Der erste Tag der Menstruation markiert den Beginn der ersten Zyklushälfte und steht im Wesentlichen unter dem Einfluss des follikelstimulierenden Hormons (FSH). FSH wird durch eine hypothalamische, pulsatile, ca. alle 90 Minuten stattfindende Sekretion von GnRH stimuliert. Durch den Einfluss von FSH reifen im Ovar ca. 40-100 Follikel zu reifen Sekundärfollikel heran (2).

Die Stimulation der Follikel durch FSH erfolgt in wellenförmigen Schüben. Diese FSH-Schübe enden anovulatorisch und erst die sogenannte "major wave" führt zur Ovulation. Die lange gültige Theorie dass es innerhalb eines Zyklus nur eine einmalige Stimulation gibt die zur Ovulation führt, ist durch die wellenförmige Stimulation durch FSH widerlegt (1).

Durch die Aromataseaktivierung der Granulosazellen, die durch FSH aktiviert wurde, kommt es zur Bildung von Östradiol aus Androgenen. Desto größer ein

Follikel wird, desto größer wird auch seine Aromataseaktivität und bestimmt dadurch das Ausmaß der Östrogensynthese. Durch die zunehmende Synthese von Inhibin durch die Granulosazellen, wird die hypophysäre FSH-Produktion gehemmt (2).

Der durch Inhibin induzierte Abfall von FSH führt dazu, dass nur der am weitesten entwickelte Follikel mit einer autonomen Östrogenproduktion überlebt. Alle anderen Follikel werden atretisch. Der autonome Follikel reift indes über die Stadien Sekundär- und Tertiärfollikel zum sprunghaften Graaf-Follikel heran. Kurz vor der Ovulation erreicht der Östrogenspiegel einen Wert von ca. 200pg/ml und führt durch ein positives Feedback zu einem sprunghaften LH-Anstieg, der zusammen mit dem bereits ansteigenden Progesteron die Ovulation auslöst (2).

9.4.2 Corpus-luteum Phase

Der Tag der Ovulation markiert den Beginn der zweiten Zyklushälfte. Durch Proteolyse kommt es zu einem Eröffnen des Graaf-Follikel und die Eizelle wird mitsamt der Follikelflüssigkeit und den Cumulus-oophorus Zellen der Tube übergeben. Die verbleibenden Zellen des gesprungenen Follikels entwickeln sich zu einer temporären endokrinen Drüse, dem Corpus luteum. Auffällig bei dem Gelbkörper ist seine ausgeprägte Vaskularisation im Gegensatz zu den avaskulären präovulatorischen Granulosazellen, in denen Progesteron synthetisiert wird. Diese physiologische Neovaskularisation wird entscheidend durch den Wachstumsfaktor VEGF initiiert (2).

Progesteron bestimmt die Veränderungen, die sich in der zweiten Zyklushälfte vollziehen. Die Theka-interna Zellen werden durch LH zur Androgensynthese angeregt, nachdem FSH die Synthese der LH-Rezeptoren während der Follikelphase induziert hat. Durch die vollständige Entwicklung des Corpus luteum erreicht die Progesteron Konzentration im peripheren Blut Werte von ca 10-15 ng/ml. Die synergistische Wirkung von Östradiol, Progesteron und Inhibin bewirkt über ein negatives Feedback ein weiteres Absinken der FSH-Konzentration, welche erst wieder durch eine nachlassende Funktion des Corpus luteum ansteigt. Die pulsatile Sekretion von GnRH sinkt auf ca. 12 Pulse innerhalb 24h ab (2).

Kommt es zu einer erfolgreichen Befruchtung der Eizelle wird vom Trophoblasten humanes Choriongonadotropin (hCG) gebildet. Die Hauptaufgabe von hCG besteht in der Aufrechterhaltung des funktionsfähigen Corpus luteum, da die durch den

Gelbkörper synthetisierten Hormone für den Erhalt der Schwangerschaft essenziell sind. Bei einem Ausbleiben der Befruchtung wird das Corpus luteum nach genau 14 Tagen atretisch und stellt die Hormonsynthese ein. Der atretische Gelbkörper wird nun als Corpus albicans bezeichnet und verleiht dem geschlechtsreifen Ovar seine charakteristische makroskopische Morphologie (2).

9.5 Einführung in die Spermatogenese

Der Hoden übernimmt zwei wichtige Aufgaben, er produziert die männlichen Gameten und übernimmt die Testosteronbiosynthese, in geringen Mengen wird auch Östrogen synthetisiert. Somit ist der Hoden eine exokrine (Spermatogenese) und endokrine (Steroidogenese) Drüse (6).

Das Volumen des Hoden beträgt 20-25ml, er ist 40-45mm lang, der Durchmesser beläuft sich auf 30mm und ist mit Nebenhoden 30-40g schwer. (5)

Der Hoden ist von der Tunica albuginea, einer derben bindegewebigen Kapsel, umgeben. Ausgehend vom Mediastinum testis ziehen die Septa testis zur Tunica albuginea und teilen dadurch den Hoden in ca. 350-370 Läppchen (Lobus testis), welche die Hodenkanälchen enthalten, auf (7).

Die Anzahl an Hodenkanälchen nimmt von der Peripherie gegen das Innere ab. Insgesamt finden sich 600 Kanälchen im männlichen Hoden. Sie erreichen im Laufe des Lebens eine mittlere Länge von 300-350m. Die Kanälchen laufen gerade, als Tubuli seminiferi recti zum Mediastinum testis aus und bilden dort ein Netzwerk, das Rete testis. Von dem Rete testis führen 12-18 Ausführungsgänge (Ductuli efferentes) zum Ductus epididymidis (Nebenhodengang). Die Zwischenräume der benachbarten Samenkanälchen sind mit lockerem Bindegewebe aufgefüllt und ermöglichen eine leichte Isolierung der einzelnen Kanälchen. In diesem Bindegewebe finden sich auch die Leydig-Zellen. Leydig-Zellen sind rundliche mit Pigment, Fett und Kristalloiden beladene Zellen und beteiligen sich an der Biosynthese der männlichen Geschlechtshormone (Androgene, Testosteron). Der feinen Basalmembran der Tubuli seminiferi contorti liegt außen eine Lage flacher Fibrozyten auf, innen ist die Basalmembran von Keimepithel bedeckt. Das Keimepithel setzt sich aus den Keimzellen und Stützzellen (Sertoli-Zellen) zusammen (5).

Diese postmitotischen hochprismatischen Zellen, welche sich bis zum Tubuluslumen erstrecken, sind durch ihren großen ellipsoiden euchromatischen Zellkern mit tiefen Einkerbungen und an einem imposanten Nukleolus lichtmikroskopisch deutlich zu erkennen. Der Grad der Differenzierung korreliert mit dem Kernvolumen (ca. $410\mu\text{m}^3$) und der Kernoberfläche (ca. $430\mu\text{m}^3$) und ist meist bei Sertolizellen die mit einem Spermatogenesedefekt einhergehen vermindert. Der FSH und Androgen-Rezeptor wird von den Sertoli-Zellen exprimiert (6).

Sie übernehmen verschiedene Aufgaben, wie die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke, haben eine Ernährungsfunktion, sind an der Phagozytose beteiligt und üben eine endokrine Funktion aus (6).

Durch komplexe Interzellulärkontakte der Sertoli-Zellen, bestehend aus Tight junctions, Aktinfilamenten und Zisternen des endoplasmatischen Reticulums, wird das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilt und bildet dadurch die Blut-Hoden-Schranke (BHS). Als immunologischer Barriere kommt der BHS eine wichtige Bedeutung zu, da die Keimzellen ab dem Stadium der zygotänen/pachytänen Spermatozyten, Oberflächenantigene exprimieren und eine autoimmunologische Reaktion provozieren können (6).

Die Kompartimentierung führt dazu, dass eine freie Diffusion von für die Ernährung wichtigen Substanzen aus der Peripherie in das Keimepithel, abhängig vom Molekulargewicht erschwert oder teils unmöglich ist. Im adluminalen Kompartiment erfolgt die Versorgung daher entweder durch selektiven Transport, z.B. über Transferrin oder durch Eigensynthese und vektorielle Sekretion wie es z.B. beim androgenbindenden Protein der Fall ist. Die Phagozytoseaufgabe der Sertoli-Zellen besteht darin, bei der Bildung reifer Spermatozoen, die in das Zytoplasma abgeschnürten Residualkörper sowie nicht freigesetzte Spermatozoen zu phagozytieren und abzubauen (6).

9.5.1 Spermatogenese

Im Gegensatz zur Oogenese bei der die Differenzierung zu Oozyten in Uteri beginnt, setzt bei der Spermatogenese die Differenzierung der Spermatogonien erst nach der Pubertät ein (4).

Nachdem sich die Urkeimzellen im Embryo mitotisch vermehrt haben und die Keimzellen in die Gonadenanlage aufgenommen wurden, treten die Spermatogonien in eine Ruhephase ein, die bis zur Pubertät anhält (4). Des Weiteren sind die Hodenkanälchen bis zum einsetzen der Pubertät, noch keine Kanälchen sondern lumenlose Zellstränge (Keimstränge), mit den Vorstufen der Sertoli-Zellen und Prospermatogonien (8).

Eine von Sertoli-Zellen produzierte und sezernierte Flüssigkeit ist wichtige Voraussetzung für die Bildung des Tubuluslumens. In ihrer Zusammensetzung unterscheidet sich diese intratubuläre Flüssigkeit von Blutplasma nur geringfügig

durch gering erhöhte Kalium und mäßig erniedrigte Natrium Konzentrationen. Dadurch wird im adluminalen Kompartiment ein spezielles Milieu für die Entwicklung der Keimzellen geschaffen (6).

Unmittelbar vor der Pubertät liegen die Keimzellen nun als Spermatogonien vor (4).

Histologisch lassen sich die Spermatogonien in drei verschiedene Typen einteilen (6):

- **Typ A "dark"** (dunkel; $46xy, 2n$ 2C DNA): Sind Zellen mit einer ovalen Form und einem runden dunklen Kern, welcher zentral eine Aufhellung zeigt.
- **Typ A "pale"** (hell; $46 xy, 2n$ 2C DNA): Diese Zellen sind oval bis rund und besitzen einen euchromatischen Zellkern und Nukleolus und differenzieren sich weiter zu Typ B Spermatogonien.
- **Typ B** ($46xy, 2n$ 2C DNA): Spermatogonien vom Typ B sind runde Zellen und zeigen einen heterochromatischen Zellkern

Typ A Spermatogonien werden der Stammzellpopulation zugeordnet und aus Typ B gehen die primären Spermatozyten hervor. Durch mitotische Teilung entstehen beim Übergang von Typ A in Typ B Spermatogonien einige Zwischenstadien, die als Stammzellen A1 bis A4 klassifiziert werden. Die Typ B Spermatogonien gehen aus der letzten Teilung hervor und primäre Spermatozyten sind das mitotische Produkt der Typ B Spermatogonien (4).

Ein primärer Spermatozyt tritt in eine verlängerte Prophase (22 Tage) der 1. Reifeteilung ein und direkt daran angeschlossen, beginnt die Bildung sekundärer Spermatozyten, die sofort in die 2. Reifeteilung eintreten (4).

Theoretisch entstehen nach Abschluss der Meiose I, aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten und nach Beendigung der Meiose II, liegen insgesamt vier Spermatisden (mit haploiden Chromosomensatz) vor (9).

In der Realität sind es meist nur 2 Spermatisden welche pro Spermatisdenie entstehen. Dieser Keimzellverlust tritt vorwiegend in der Meiose auf. Charakteristisch für die frühen Spermatisden ist ihr runder homogener Zellkern und die vom Golgi-Apparat gebildeten Akrosombläschen. Die weitere Entwicklung zum reifen Spermatozoon ist durch drei, teilweise simultan ablaufende Prozesse gekennzeichnet (6).

1. Kondensierung des Zellkern: Durch einen Austausch nukleärer Histone, durch Protamine wird der Zellkern auf ungefähr 10% seines ursprünglichen Volumens kondensiert (6). Beim Menschen werden ca. 85% der DNA-bindenden Histone gegen Protamin ausgetauscht. Aus dieser Protamin DNA Interaktion ergeben sich zwei wichtige Konsequenzen, welche von zentraler Bedeutung für die weitere Entwicklung der Spermatiden sind. Zum einen bewirkt die Kondensation des Kernchromatins dass in elongierten Spermatiden die Genexpression zum Erliegen kommt zum anderen führt sie zu einer zeitlichen Entkoppelung von Transkription und Translation in haploiden Spermatiden (10).

Daneben ist das richtige Verhältnis von Protamin 1 und Protamin 2 für die Fertilisationskapazität der Spermatozoen von Bedeutung (6).

2. Bildung des Akrosom: Die Akrosombildung erfolgt über mehrere Phasen. Die Bildung eines akrosomalen Bläschens mit zentralem Granulum charakterisiert die *Golgi-Phase*. Das akrosomale Bläschen entsteht durch die Fusion zahlreicher durch den Golgi-Apparat abgeschnürter primärer Lysosomen. Kennzeichnend für die *Kappenphase* ist die Abflachung des akrosomalen Bläschens und anschließende kappenförmige Auflagerung auf den sich streckenden Zellkern. Anschließend bildet sich das definitive Akrosom, dieser Prozess wird als Akrosomphase definiert (6).

Das fertige Akrosom gleicht einer kappenförmigen Zisterne, deren Inhalt die für die Befruchtung wichtigen Enzyme, Hyaluronidase sowie das proteolytische Akrosin, enthält (8).

Abgeschlossen wird die Akrosombildung mit der *Reifephase*, in der die Kopfkappe ihre artspezifische Form erhält. Überschüssiges Zytoplasma wird abgeschnürt und im Normalfall als Residualkörper von den Sertoli-Zellen phagozytiert und abgebaut (6).

3. Geißelstadium: Ist ein lang andauernder Prozess und beginnt bereits in der Kappenphase. Das Axonem zeigt das typische "9+2"-Muster der

Mikrotubuli einer Eukaryotengeißel und sitzt auf einem Zentriolenpaar. Die übrigen Strukturen der Geißel, wie die fibröse Hülle und die Mantelfasern, werden im Laufe der Spermiogenese gebildet. Die Keimzellen bleiben während der Differenzierung von der Spermatogonie Typ B zunächst über Interzellularbrücken miteinander verbunden, die sich im Zuge der Spermatidenreifung auflösen. Die Zellen bilden somit Klone, die eine weitgehend synchrone Entwicklung gewährleisten (6).

Die elongierte Spermatide wird am Ende der Differenzierung in das Lumen des Keimtubulus abgegeben (Spermiation) und als Spermatozoon (Spermium) bezeichnet (6).

Die reifen Samenzellen (Spermien oder Spermatozoon) haben eine mittlere Länge von 60µm und ein stecknadelartiges Aussehen. Ein jedes Spermium besteht aus insgesamt fünf Teilen: Kopf, Hals, Mittel-, Haupt-, und Endstück. Mittel-, Haupt-, und Endstück bilden gemeinsam die Geißel. Es ist ein Flagellum und dient nur der Fortbewegung. Der Kopf stellt den männlichen Vorkern dar, der mit dem weiblichen Vorkern fusioniert und so die diploide Chromosomenzahl wieder herstellt. Zentriolen bzw. Mitochondrien der Zygote werden vom Hals und Mittelstück geliefert (8).

9.6 Fertilisation

Durch den Koitus werden 2,5 - 6 ml Ejakulat im hinteren Scheidengewölbe deponiert. Das Seminalplasma (Samenflüssigkeit), größtenteils durch Prostata und Bläschendrüse gebildet, enthält bei Normospermie ca. 60-120 Mio. Spermatozoen/ml (2). Das Seminalplasma dient der Membran Stabilisierung und ist angereichert mit Steroiden und Proteasomen. Die Proteasomen dienen den Spermien als Kalzium Speicher (11).

Die folgende Wanderung der Spermien durch die inneren weiblichen Geschlechtsorgane, zum eigentlichen Befruchtungsort, der Ampulla tuba uterinae, wird als Spermienaszension bezeichnet (5). Die Spermien durchlaufen während dem „Aufsteigen“ den Prozess der Kapazitation, eine fundamentale Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation (12).

Aus dem Ejakulationsreservoir im hinteren Scheidengewölbe gelangen einige Millionen Spermien, innerhalb von ca. 90 min in den Zervikalkanal. Das Eintreten in

diesen wird durch eine östrogenabhängige Verflüssigung des zervikalen Schleimpfropfs erleichtert (2).

Durch die Ultrastruktur des Zervixschleims werden die Spermien während ihrem Weg durch den Zervikalkanal „abgebürstet“. Bei diesem mechanischen Reinigungsprozess wird die Plasmamembran der Spermien von Steroiden und absorbierten Molekülen gereinigt. Dies hat zur Folge dass die Spermien empfindlicher auf die Wirkung von ROS („reactive oxygen species“) Molekülen werden. Die ROS werden von Leukozyten produziert, welche unmittelbar nachdem die Spermien den Zervikalkanal erreicht haben in den Zervixschleim migrieren. ROS haben einen Pro-Kapazitations Effekt auf normal funktionierende Spermien. Auf dysfunktionale Spermien besitzen ROS einen schädlichen Einfluss und erleichtern dadurch deren Entfernung aus der Spermienpopulation (11).

Die Zervix bildet auch ein Spermienreservoir, aus dem über einen Zeitraum von ca. 3 Tagen kontinuierlich Spermatozoen in das Cavum uteri abgegeben werden.

Uteruskontraktionen und Eigenbewegung der Spermien helfen den Spermien ihre Wanderung in Richtung Fundus uteri fortzusetzen, währenddessen wird die Spermienplasmamembran weiter modifiziert (2).

Durch die uterine Steroidsulfatase kommt es zu dynamischen Veränderungen von geordneten Lipid-Mikrodomains und einer weiteren Entfernung von Steroiden aus der Plasmamembran. Dadurch wird die Permeabilität für Kalziumionen gesteigert, was wiederum zur Expression von Rezeptoren führt, an denen stimulatorische Liganden wie zB das Sialic-Acid-binding Protein, binden können. Die wandernde Spermienpopulation wird durch die Prozesse während der Aszension und Kapazitation stark homogen. Bei ihrer Ankunft in der Tuba uterina, ipsilateral zu der Eizelle, wurden verfrüht kapazitierte Spermien und dysfunktionale Spermien entfernt (11).

Der Eileiter besteht aus drei anatomische Strukturen, der Ampulla tubae uterina, dem Isthmus tubae uterinae und der Pars uterina (UTJ), welche auch die engste Stelle der Tuba uterinae darstellt (5).

Diese drei Bereiche spielen bei der Fertilisation eine weitere wichtige Rolle. Im Speziellen ist die Migration der Spermatozoen durch den UTJ einer biologischen Kontrolle unterworfen. So sind Spermien, mit einem Mangel an bestimmten Proteinen (Clgn, Ace, Adam1a, Adam2a oder Adam3), zwar weiterhin beweglich

aber es ist ihnen nicht möglich die Pars uterina zu passieren. Der genaue Mechanismus wie diese Proteine die Passage regulieren ist derzeit noch unbekannt (12).

Nach der erfolgreichen Durchwanderung des UTJ steht den noch verbliebenen Spermatozoen ein neues Hindernis im Weg. An der Mukosaoberfläche des Isthmus tuba uterinae werden die Spermien gestoppt bzw. zurückgehalten. Die Spermien verbleiben dort bis kurz vor der Ovulation. Dieses „Gefangen nehmen“ der Spermatozoen wird durch verschiedene Proteine vermittelt. BSPs („binder of sperm protein“) an der Spermienoberfläche und Proteine der Annexin Familie im Epithel des Isthmus spielen eine tragende Rolle bei der Spermatozoenlagerung im Isthmus tubae uterinae (12).

Während des Aufenthalts der Spermien im Isthmus der Tuba uterina wird von den Epithelzellen ein Mikromilieu geschaffen, welches den Prozess der Kapazitation verlangsamt und die wartende Spermienpopulation für einen Zeitraum von maximal 24h stabilisiert. Erst kurz vor der Ovulation wird durch noch unbekannt weibliche Faktoren das Verlassen des Reservoirs getriggert und die Spermien setzen ihre Reise in Richtung Ampulla tubae uterinae fort. Unterstützt bzw. begünstigt wird diese „Flucht“ der Spermien durch eine hyperaktive Beweglichkeit sowie asymmetrische Schläge des Flagellums. Durch diese Prozesse werden die Spermatozoen allmählich in die Ampulla entlassen. Dadurch sinkt das Risiko einer Polyspermie, welche für die Embryoentwicklung fatal enden würde (12).

Angekommen in der Ampulla tuba uterinae wird der Cumulus Oophorus Komplex (COC) chemotaktisch lokalisiert und die Spermatozoen schwimmen zielstrebig darauf zu. Nach heutigem Stand der Forschung gilt es als gesichert das Progesteron, welches durch den COC sezerniert wird, einer der wichtigsten Lockstoffe für Spermien zur Auffindung des COC ist (12).

Der COC umfasst die Zona pellucida und die, in mehreren Ebenen, darüber liegenden kubischen Granulosa Zellen. Oozyte und Granulosazellen sind über Gap junctions funktionell miteinander verbunden und es wird vermutet dass diese Verbindungen wichtige Funktionen in der Oozyten Regulation übernehmen. Eine überwiegend aus Hyaluronsäure, Heparinsulfat und Chondroitinsulfat bestehende extrazelluläre Matrix verbindet die Cumulus Zellen untereinander (13).

Spezifische Proteine, sezerniert durch die Cumulus Zellen, stimulieren die Konversion von Proakrosin zu Akrosin und der Akrosom-Reaktion an sich. Die interzelluläre Matrix hat zudem eine ähnliche Filterfunktion wie sie im Zervixschleim zu finden ist (11).

Die Cumulus Zellen begünstigen durch diese Eigenschaften nur die Akrosomreaktion, da diese wichtige Reaktion auch bei Oozyten ohne Cumulus Zellen abläuft. Das Durchdringen der interzellulären Matrix wird durch eine hyperaktive Spermienbewegung unterstützt. (13)

Aller Wahrscheinlichkeit nach finden nicht mehr als 10 Spermien ihren Weg zum COC um anschließend durch den Cumulus zu penetrieren (11).

Als letzte Hürde muss nun noch die Zona pellucida (ZP) überwunden werden. Das Spermium bindet an ZP3 und löst dadurch die Akrosomenreaktion aus. ZP3 sowie ZP1 und ZP2 sind Glykoproteine und die Hauptbausteine der Zona pellucida. Diese Spermium-ZP-Bindung ist Art spezifisch, es wird davon ausgegangen das Art-spezifische-Spermien Rezeptoren an der Oberfläche der ZP exprimiert werden (13).

In vitro kann die Akrosomreaktion durch eine lösliche ZP induziert werden. Ebenso kommt es in einem IVF Medium spontan bei ca. 20-40% der Spermien zu einer Akrosomreaktion. Das Akrosom selbst ist eine, vom Golgi-Apparat abstammende, exozytotische Organelle und bedeckt die Spitze des Spermienkopfes (12).

Der Mechanismus dieser essentiellen Reaktion ist mittlerweile gut verstanden. Früh kommt es zu einem kurzzeitigen Kalzium Einstrom welcher die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Dadurch werden die second messenger IP3 und Diacylglycerol (DAG) hydrolytisch von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat abgespalten. IP3 bewirkt weiter ein Freisetzen von Kalzium aus intrazellulären Speichern und DAG vermittelt eine weitere PKC (Proteinkinase C) Aktivierung und Phosphorylierung von Substrat Proteinen. Dies sind frühe Ereignisse und wegbereitend für einen nachfolgenden Kalzium Influx über „transient receptor potential cation channels“ (TRPCs), welcher schließlich zu einer vollständigen Induktion der Akrosomenreaktion führt. Der Ionophor A23187 induziert ebenso vollständig die Akrosomenreaktion (12).

Nachdem das Spermium an ZP3 gebunden hat fusioniert die äußere akrosomale Membran mit der Spermienplasmamembran, die dadurch entstandenen

Membranbläschen entlassen im folgenden akrosomale Enzyme und es kommt zu einer punktuellen Lyse der Zona pellucida. Die innere akrosomale Membran bindet bei dieser Reaktion an ZP2 (13).

Nachdem das Spermium die Zona pellucida durchdrungen hat gelangt es in den perivitellinen Raum und löst die kortikale Reaktion der Oozyte aus. Es kommt zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen aus kortikalen Vesikeln welche ZP2 spalten, sodass ZP2 von ZP3 dissoziiert. Nach dieser Reaktion ist es für kein Spermium mehr möglich an ZP3 erfolgreich zu binden. Außerdem ist es Spermien, nach durchlaufener Akrosomenreaktion, nicht mehr möglich an ZP2 zu binden. Dies ist der prinzipielle Mechanismus zur Verhinderung einer Polyspermie (13).

9.7 Die Rolle des Kalziums bei der Oozyten Aktivierung

Die reife Oozyte ist zum Zeitpunkt der Fertilisation in der Metaphase der 2. Reifeteilung arretiert. Dieser Arrest wird hauptsächlich durch den M-Phase promoting Faktor (MPF) reguliert. MPF ist ein Heterodimer mit einer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin B, und einer katalytischen Untereinheit, der Cdc2 Kinase. Über Substrat Phosphorylierung steuert aktives Cdc2 den Eintritt in die M-Phase und führt zur Degradation der Kernmembran und der Ausbildung des Spindelapparats (14).

Durch die Fusion der Oozyte mit einem Spermium kommt es zu einer Lockerung des MII Arrest. Diese Erleichterung führt zur Fortsetzung des Zellzyklus, läutet die Zellteilung ein und mündet in der Entwicklung eines Embryos. Das Entlassen der Eizelle aus der 2.Reifeteilung wird durch eine Serie von gleichzeitig ablaufenden Ereignissen vermittelt, welche unter dem Überbegriff der Oozyten-Aktivierung zusammengefasst werden (14).

Durch die Oozyten-Aktivierung entfaltet die befruchtete Eizelle ihr Totipotentes Potential. Zu den morphologischen und biochemischen Prozessen der Eizellaktivierung zählt unter anderem die kortikale Reaktion, das Ausstoßen des zweiten Polkörperchens, die Bereitstellung maternaler RNA, die Bildung des weiblichen und männlichen Vorkerns und die Initiation und Expression embryonaler Gene. Im Tierversuch konnte schon früh nachgewiesen werden das Kalzium (Ca^{2+}) eine essentielle Rolle für die Oozyten Aktivierung besitzt (14).

Im Körper des Menschen sind 1 - 1,5 kg Kalzium zu einem großen Teil (ca. 98%), in mineralischer Form im Knochen gebunden. Kalzium übernimmt vielfältige Aufgaben im menschlichen Organismus. Neben seiner unentbehrlichen Funktion als Knochenbaustein, sind Ca^{2+} -Ionen Second messenger in Signaltransduktionswegen, lösen Muskelkontraktion und Exozytose aus. Eine überaus wichtige Rolle spielt Kalzium als Co-faktor bei der Blutgerinnung und eine Reihe von Enzymen benötigt für ihre Aktivität Ca^{2+} (15).

Seit Jahrzehnten ist bekannt das Ca^{2+} für die Oozyten Aktivierung ein wesentlicher Trigger ist (16). Es ist heute unumstritten das ein Ansteigen von im Zytosol freien Ca^{2+} bei der Oozyten Aktivierung unerlässlich ist (17).

Während der Eizellaktivierung kommt es zu einer Serie von wechselnden Ca^{2+} Konzentration in der Zelle. Diese Ca^{2+} Oszillationen sind in ihrer Natur, der Amplitude, der Frequenz und in ihrer Dauer spezies spezifisch. Allerdings triggert eine einzige Mikroinjektion von Ca^{2+} in Mäuse Oozyten ebenso die Entwicklung bis zum Stadium der Blastozyste (14).

Vier unterschiedliche Hypothesen versuchen diese Ca^{2+} Oszillationen zu erklären. Eine sehr frühe Hypothese, die sogenannte Ca^{2+} -Bombe, besagt, dass nach der Spermien-Oozyten Fusion, Ca^{2+} aus dem Zytosol des Spermiums in die Eizelle aufgenommen wird. Dieser Ca^{2+} Bolus führt dann zu einem Öffnen der Ca^{2+} sensitiven Kanäle im endoplasmatischen Retikulum. Aufgrund der geringen Ca^{2+} Menge in einem Spermium ist jedoch davon auszugehen dass diese Ca^{2+} -Bombe nicht ausreicht um Ca^{2+} Oszillationen auszulösen (17).

Ähnlich zur Ca^{2+} -Bomben Hypothese ist das Conduit- Ca^{2+} Modell. Durch die Fusion mit dem Spermienkopf und dem Oolemma, werden extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen über die Spermienplasmamembran in die Oozyte eingeschwenkt, wodurch es zu einem Überladen der Ca^{2+} Speicher in der Oozyte kommen soll. Diese Überladung bewirkt wiederum ein Leeren der Ca^{2+} Speicher und einen weiteren Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} . Dem gegenüber steht, dass es auch bei Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} zu Ca^{2+} Oszillationen kommt. Dies lässt den Schluss zu das alleiniger Ca^{2+} Influx nicht zu den, für die Eizell-Aktivierung notwendigen, Ca^{2+} Oszillationen führt (17).

Die Kontakthypothese besagt dass durch den Spermien-Eizellen Kontakt eine Rezeptor-Liganden Verbindung etabliert wird, welche zur Aktivierung von

verschiedenen intrazellulären Signatransduktionswegen führt und dies wiederum in einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum der Eizelle resultiert. Durch Versuche mit inhibitorischen $\text{G}\alpha_q$ Antikörpern konnten aber die Fertilisations induzierten Ca^{2+} Oszillationen nicht gehemmt werden (17).

Die Spermienfaktor (SF) Hypothese geht davon aus das bei der Spermien-Eizellen Fusion ein löslicher Faktor durch die Spermien bereitgestellt wird, welcher durch Initiierung der IP_3 Signalkaskade die Ca^{2+} Oszillationen auslöst. Experimente bei denen nur das Zytosol von Spermien in Säugetier Eizellen injiziert wurde und dies zu Ca^{2+} Oszillationen führte, erhärteten die Evidenz der Spermienfaktor Hypothese. Auch die Tatsache dass die in der Reproduktionsmedizin genutzte Technik der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), bei der jeglicher Membrankontakt von Spermium und Eizelle umgangen wird es aber durch Injektion eines Spermiums direkt in die Eizelle zu einer normalen Eizellaktivierung und anschließenden Embryonalentwicklung kommt, unterstützte maßgeblich die Hypothese des Spermienfaktors. Die Suche nach dem Spermienfaktor mündete in der Entdeckung der Phospholipase $\text{C}\zeta$ und ihrer Bedeutung für die Eizellaktivierung (17).

9.8 Bedeutung der Phospholipase C ζ

Bei der Phospholipase C Familie handelt es sich um cytoplasmatische Enzyme, die nach Aktivierung aus dem membranständigen Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP₂), Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolytisch abspalten. IP₃ und DAG sind regulatorisch an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt (16). Nach der enzymatischen Spaltung wandert IP₃ in das endoplasmatische Retikulum und öffnet dort Ca²⁺ Kanäle. Dadurch kommt es zu einem Einstrom von Ca²⁺ ins Cytoplasma. Die lipophile DAG bleibt hingegen in der Membran, aktiviert Proteinkinasen vom Typ C welche in der Anwesenheit von Ca²⁺ Proteine phosphorylieren und dadurch Signale modulieren und weiterleiten (15). Heutzutage ist allgemein anerkannt, dass die Ca²⁺ Oszillationen innerhalb der Oozyte eine direkte Folge der IP₃ medierte Ca²⁺ Freisetzung sind (18).

Es konnte gezeigt werden dass es durch Mikroinjektion von rekombinanten Proteinen der verschiedenen Isoformen der in Spermien vorkommenden charakteristischen PLC zu keinen Ca²⁺ Oszillationen kommt. Durch die intensive Suche in Maus „expressed sequence tag“ (EST) Datenbanken wurden potentiell neue PLC Sequenzen entdeckt. Das Verwenden einer cDNA Bibliothek und Primern die auf den neu entdeckten EST Sequenzen basierten, führte zu einem vollständigen cDNA Klon, der heute als Phospholipase C ζ bekannt ist. Mikroinjektionen von cRNA, codierend für Mäuse, Humane und Cynomolgus Affen der Phospholipase C ζ in nicht fertilisierte Oozyten führte zu exakt den gleichen Ca²⁺ Oszillationen wie sie während der Fertilisation beobachtet werden können (17).

Die Phospholipase C ζ weist die für die Phospholipase C Familie charakteristischen katalytischen X und Y Domänen, eine C2 Domäne und eine Reihe von EF Händen auf. Ein wichtiger Unterschied besteht im Fehlen einer PH („Pleckstring homology“) Domäne was die Phospholipase C ζ zum kleinsten derzeit bekannten Vertreter der Phospholipasen C macht. Aufgrund des Fehlens einer PH Domäne ist im Moment jedoch noch unklar wie die PLC ζ ihr Membran gebundenes Substrat, die PIP₂ lokalisieren kann, da die PH Domäne eigentlich als Anker für das Enzym fungiert wie es bei den Isoformen β , γ und ϵ der Fall ist. Es wird angenommen dass die regulatorisch arbeitende C2 Domäne eine unterstützende Rolle für die PLC ζ beim Auffinden ihres Substrats der PIP₂ hat (18).

Aktuelle Evidenz basierte Daten weisen den 2 EF Händen sowie der C2 Domäne eine essentielle Rolle bei der korrekten Aktivität der PLC ζ zu (17).

10 Assistierte Reproduktion

10.1 IVF- Künstliche Befruchtung

Das folgende Kapitel befasst sich mit zwei der wichtigsten Therapien in der Reproduktionsmedizin, der IVF und der ICSI.

Die Techniken der Reproduktionsmedizin haben sich in den letzten 30 Jahren ständig weiterentwickelt und bestehende Verfahren wurden verfeinert. So stehen heute Behandlungsmöglichkeiten für Kinderwunschpaare zur Verfügung, für die in den 1980er noch keine Therapie möglich war (19).

Ursprünglich wurde die IVF mit einer einzigen dominanten Eizelle, die während des normalen Zyklus produziert wurde durchgeführt. Dieses Vorgehen war ausgesprochen ineffizient und die Schwangerschaftsraten waren minimal, sodass es konsequenterweise zu der Einführung von „Superovulations“ Protokollen oder Ovarieller Hyperstimulation kam. Durch die Verwendung von Gonadotropin und die dadurch induzierte Reifung mehrerer Follikel war es möglich mehrere Oozyten zu gewinnen und im Anschluss den „besten“ Embryo zu transferieren (20).

Zu den klassischen Indikationen einer IVF/ICSI zählen die tubare Sterilität, Endometriose, männliche Subfertilität sowie die idiopathische Sterilität (19).

10.1.1 Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation

Beim natürlichen Zyklus werden durch die Wirkung von endogenen FSH und LH zyklisch Follikel im Ovar rekrutiert. Dies führt durch Selektion eines dominanten Follikels zu einer Monoovulation. Liegen nun Störungen in diesem System vor, ist es möglich durch Gabe von FSH und ggf. LH eine Follikelreifung zu forcieren und eine normale ovarielle Funktion mit Monoovulation wiederherzustellen (1).

Bei einer ovariellen Hyperstimulation mit dem Ziel der Ovulations Induktion wird die FSH Gabe so stark erhöht dass auch subordinante Follikel reifen was zur

Polyovulation führt. Es gibt verschiedene medikamentöse Möglichkeiten in den hormonellen Regelkreis einzugreifen und eine Ovulation zu induzieren. So werden zur Ovulationsinduktion Clomifen, Metformin, Kortikosteroide, Tamoxifen und Aromataseinhibitoren eingesetzt. Durch die Einführung von Gonadotropinen um eine Eizellreifung herbei zu führen wurde die Effizienz der IVF stark gesteigert. Es haben sich Analoga des nativen Gonadorelin (GnRH) zur Ovulationsinduktion als Standardmedikamente in der IVF Behandlung durchgesetzt (1).

Es gibt viele verschiedenen Basis Protokolle um eine kontrollierte ovarielle Hyperstimulation zu erreichen die alle zum gleichen Ergebnis führen, der Reifung von mehreren Oozyten. Das Fundament einer jeden kontrollierten ovariellen Hyperstimulation, wie sie auch durch die beteiligten Zentren der Studie durchgeführt wurde umfasst 3 Schritte die im Anschluss näher besprochen werden (20):

- 1. Die Gabe eines Gonadotropin releasing hormon Analogon um eine Suppression der Hypophyse zu erreichen.*
- 2. Die Gabe von rekombinantem FSH, zur Stimulation der Follikelreifung.*
- 3. Die Gabe von humanem Chorion Gonadotropin das die endogene LH Sekretion stimuliert um die finale Oozytenreifung einzuleiten (20).*

10.1.1.1 Gonadotropin releasing hormon Analoga

Um den 21. Zyklustag wird mit der subkutanen Gabe eines Gonadotropinanalogs begonnen (20). Der zugrunde liegende Wirkmechanismus von GnRH-Analoga beruht darauf, dass durch die kontinuierliche Besetzung von GnRH-I-Rezeptoren die gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens desensibilisiert werden was zu einer „down“ Regulation der GnRH-I-Rezeptoren führt. Die Folge ist, dass nach 2 -3 Wochen die Gonadotropinsekretion abnimmt und Konzentrationen wie nach einer Kastration erreicht (21). Bei der heute üblichen IVF kommt es nach ca. 10-14 Tagen zu einer Suppression der Hypophyse (20). Dies verhindert auch einen vorzeitigen LH-Anstieg der eine Nebenwirkung der Ovulationsinduktion darstellt. Ein vorzeitiger Anstieg von LH, vermittelt durch zentralnervöse Rückkoppelungsmechanismen, zeigt sich in Folge durch ein erniedrigtes Entwicklungspotential der Oozyten. Dadurch sinkt auch die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft nach erfolgreichem Embryotransfer (1).

Bei der Gabe von GnRH-Agonisten kommt es initial zu einem sogenannten „flare up“ Phänomen. Bei diesem „flare up“ handelt es sich um einen kurzfristigen Anstieg von LH und FSH (22). Dieser Effekt hält ca. 5-7 Tage an, aufgrund dessen wurden das kurze und lange Stimulationsprotokoll entwickelt (23).

Am häufigsten wird heute das lange Stimulationsprotokoll verwendet. Dabei wird entweder mit Einsetzen der Menstruationsblutung (follikuläres Protokoll) oder während der Lutealphase (luteales Protokoll) des vorangegangenen Zyklus ein GnRH-Agonist verabreicht. Das Erreichen der Hypogonadotropie wird 10-14 Tage nach GnRH Gabe durch eine transvaginale Ultraschalluntersuchung sowie durch die Bestimmung von Östradiol und LH aus dem Serum überprüft. Liegt nun ein unauffälliger Sonographischer Befund und eine Hypogonadotropie vor beginnt die Follikel Stimulation mit FSH die bis zur HCG-Gabe weiter geführt wird (1).

10.1.1.2 Die Gabe von rekombinanten FSH

Nach der Suppression der Hypophyse wird rekombinantes Follikel stimulierendes Hormon für weitere 10 bis 14 Tage mit einer Startdosis zwischen 150 und 300IU subkutan täglich injiziert. Die nachfolgende Dosierung, sowie die Frequenz des follikulären Monitoring, unter zu Hilfenahme der transvaginalen Ultraschalluntersuchung, als auch die Estradiolkonzentrationen im Serum basieren auf der individuellen ovariellen Antwort (20).

10.1.1.3 Die Gabe von humanen Chorion Gonadotropin

Sobald der dominante Follikel eine Größe zwischen 18 und 20mm erreicht hat wird einmalig subkutan Humanes Choriongonadotropin verabreicht. HCG stimuliert ein Anfluten von endogenem LH welches zur abschließenden Oozyten Reifung führt (20).

Eine wichtige und erstzunehmende Komplikation ovarieller Hyperstimulation ist das ovarielle Hyperstimulationsyndrom. Die ist ein rein iatrogenes Syndrom und kann im Einzelfall einen fulminanten Verlauf nehmen. Das Syndrom ist charakterisiert durch Volumenvermehrung der Ovarien, Aszites, Hämokonzentration sowie vereinzelt thrombembolische Ereignisse. Mittlerweile ist bekannt das die Inzidenz beim Einsatz von GnRH-Analoga steigt (24).

10.1.1.4 Oozyten Gewinnung

In den Anfängen der IVF, wurden reife Oozyten noch mittels Laparoskopie gewonnen. Seit jener Zeit wurde die Laparoskopie durch die transvaginale Ultraschall - gezielte Nadelaspiration abgelöst. Der Zeitpunkt der Punktion liegt zwischen 34 und 38 Stunden nach HCG Gabe. So ist es möglich von einer Oozyte bis zu 40 Oozyten durch eine Punktion zu gewinnen. Durchschnittlich liefert eine Punktion 10 bis 20 Oozyten (20). Unmittelbar nach der Punktion werden die Oozyten-Cumulus-Komplexe sofort unter dem Mikroskop aus der Follikelflüssigkeit entfernt. Bis alle Punktate untersucht wurden, verbleiben die COCs in einem Inkubator (feuchte Atmosphäre, mit 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ bei 37 °C) (24).

Ungefähr 100 000 bis 200 000 Spermien werden in Form kleiner Tropfen zugegeben oder ein einziges Spermium wird direkt intrazytoplasmatisch injiziert. Die Fertilisation kann normalerweise in ca. 65% der Fälle 12 – 20h später anhand eines männlichen und eines weiblichen Pronukleus, dokumentiert werden (20).

Die Spermien müssen für eine IVF und/oder ICSI Behandlung speziell aufbereitet werden.

10.1.2 Spermien Präparations Technik

Das „WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 2010“ (25) gibt Evidenz basierte Standards bei der Aufbereitung von humanen Spermien vor. Dieses Kapitel basiert daher auf diesem ausgezeichneten Werk.

Für diverse Fragestellungen wie z.B. bei diagnostisch funktionellen Tests oder im Rahmen der künstlichen Befruchtung ist es notwendig die Spermatozoen vom Seminalplasma zu trennen.

Grundsätzlich unterstützt Seminalplasma die Spermien während ihrer Penetration durch die Cervix uteri. Werden die natürlichen Barrieren, wie bei einer IVF, nun umgangen wirken einige Komponenten (z.B. Prostaglandine, Zink) als Hürden für eine Schwangerschaft. Das Ziel der Separation von Spermatozoen und Seminalplasma liegt darin einen hohen Prozentsatz an morphologisch normalen

mobilen Zellen zu erhalten, die frei von Debris sowie nicht-Keimzellen und toten Spermien sind (25).

Die Wahl der Methode richtet sich nach der Natur der Spermienprobe. So findet die direkte „swim-up“ Methode bei annähernd normalen Spermogramm Verwendung, in Fällen von Oligozoospermie, Teratozoospermie oder Asthenozoospermie wird die Dichtegradient-Zentrifugation bevorzugt. Die einfache Zentrifugation von verdünntem Samen wird aber noch immer bei Normozoospermie für eine Präparation der Spermien im Rahmen einer intrauterinen Insemination durchgeführt. Bei jeder Präparation ist eine sterile Vorgehensweise zwingend erforderlich. Drei einfache aber sehr häufige Präparationstechniken sollen in Folge kurz näher beleuchtet werden (25).

10.1.2.1 „Simple Washing“

Die „simple washing“ Technik wird bei guter Qualität des Samens verwendet und überwiegend bei einer geplanten intrauterinen Insemination angewandt. Weiters erhält der Embryologe den höchsten Ertrag an Spermatozoen, im Vergleich zu anderen Techniken. Durch Verdünnen, Zentrifugieren und Aspirieren des Überstandes wird das Ejakulat einfach gewaschen (25).

10.1.2.2 „Swim up“

Die natürliche Eigenschaft der Spermien aus dem Seminalplasma zu schwimmen wird bei der „swim up“ Methode genutzt. Die Probe soll nicht verdünnt und nicht zentrifugiert werden, da diese Maßnahmen zu einem peroxidativen Schaden der Spermienmembran führen können. Durch den Verzicht auf die Vorbehandlung spricht man von einem sogenannten direkten „swim up“. Diese Methode wird verwendet um hauptsächlich mobile Spermien zu separieren.

Durchgeführt wird ein „direct swim up“ indem entweder über oder unter das liquefizierte Ejakulat eine Schicht Kulturmedium instilliert wird. Mobile Spermien können so einfach in das Kulturmedium schwimmen. Dadurch werden nicht so viele Spermien wie bei einer einfachen Waschung separiert, es sind aber alle Spermien mobil. Diese Methode ist sinnvoll bei einer IVF oder ICSI, da bei beiden Methoden mit einem geringen Prozentsatz an mobilen Spermien gearbeitet wird (25).

10.1.2.3 Diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation

Mit der diskontinuierlichen Dichtegradienten Zentrifugation werden die besten Ergebnisse erzielt und die so getrennten Spermien sind alle von guter Qualität. Auch werden unerwünschte Bestandteile wie Debris oder andere Zellen gut von den Spermatozoen getrennt.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass diese Technik leichter, im Vergleich zu einem „direct swim up“, zu standardisieren ist. Die diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation ist bei IVF oder ICSI die Technik der ersten Wahl. Die Technik beruht darauf, dass zwei Medien unterschiedlicher Dichte in ein Reagenzglas eingebracht werden und die Spermien aktiv gegen den Gradienten schwimmen und nach Zentrifugation bildet sich am Boden ein Spermatozoen Pellet aus.

Heutzutage üblich ist eine 2-stufige Präparation um den Dichtegradienten herzustellen. Dabei wird ein Medium mit einer Dichte von 40% als „top layer“ benutzt und ein Medium mit einer Dichte von 80% als „lower layer“ eingesetzt, im Anschluss daran wird das Sperma über dem „top layer“ aufgebracht. Wichtig bei der Vorgehensweise ist, dass die Grenzschichten nicht miteinander vermischt werden (diskontinuierlich). Im Anschluss wird die Präparation für ca. 15-30minuten zentrifugiert und der Überstand von dem sich gebildeten Spermienpellet vorsichtig getrennt (25).

10.1.3 Embryotransfer

Der Embryotransfer stellt den finalen Schritt im Rahmen einer IVF Behandlung dar. Entscheidend für einen erfolgreichen Transfer ist dass der Untersucher die Technik des Embryotransfers gut und sicher beherrscht. An sich ist ein Embryotransfer ein kleiner Eingriff der von den meisten Patientinnen gut toleriert wird und keiner Analgesie bedarf. Bei Patientinnen die einen vorangegangenen schwierigen Transfer erlebt oder große Angst vor dem Eingriff haben, soll eine orale Anxiolyse, 30-60min vor dem Transfer, mit Benzodiazepinen angeboten werden. Das erklärte Ziel eines jeden Embryotransfers ist das Deponieren des Embryos im mittleren Uterinsegment um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Implantation zu erhöhen (26).

Da eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl der transferierten Embryonen und einer Mehrlingsschwangerschaft besteht ist eine quantitative Beschränkung notwendig. Diese Beschränkung wird in vielen Staaten durch den Gesetzgeber geregelt (1). In Tabelle 1 sind die Empfehlungen der Österreichischen IVF-Gesellschaft, der maximalen Anzahl der zu transferierenden Embryonen angeführt.

Tabelle 1: Empfehlung der Österreichischen IVF-Gesellschaft, der maximalen Anzahl der zu transferierenden Embryonen

Alter	< 35 Jahre		35-37 Jahre		38-40 Jahre		> 40 Jahren	
	Gut	Schlecht	Gut	Schlecht	Gut	Schlecht	Gut	Schlecht
Tag 2/3 Embryotransfer								
1. Versuch	2	2	2	2	2	2	3	3
2. Versuch	2	2	2	2	2	2	3	3
≥ 3 Versuche	2	2	2	2	2	3	3	3
Tag 4-6 Embryotransfer								
1. Versuch	1	2	1	2	2	2	2	2
2. Versuch	1	2	1	2	2	2	2	2
≥ 3 Versuche	2	2	2	2	2	3	2	3

„1 gute Prognose = gute Embryonen-Qualität (Tag 2/3: 4-8-Zeller A1 bis B2; Tag 5/6: 2 AB oder 2 BA bis 4 AB oder 4 BA), mehrere Embryonen zur Kryokonservierung, bereits 1 Kind

2 schlechte Prognose = schlechte Embryonenqualität (mindestens 1 Embryo für den Transfer mit Qualität C). In diesen Fällen kann eine genetische Abklärung (Polkörperdiagnostik) erwogen werden.“ (Österreichische IVF-Gesellschaft, Überarbeitete Empfehlung zur maximalen Anzahl zu transferierender Embryonen) (27)

Vor der Durchführung des Transfers ist es wichtig die anatomischen Gegebenheiten der Patientin zu kennen. So kann es bei einer Retroflexio und/oder Retroversio uteri oder einem stark gestreckten Uterus zu einem traumatischen Transfer kommen.

Es kann auch eine Zervixstenose oder insuffiziente Endometriumrezeptivität einen erfolgreichen Embryotransfer verhindern. In jedem Fall ist es notwendig eine Zervixstenose vor dem Eingriff chirurgisch-operativ zu sanieren (1).

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Embryotransfers stellt die Auswahl des Transferkatheters dar. Da es bei der Verwendung von starren Kathetern häufig zu traumatischen Ereignissen kommt werden heute vorwiegend nur mehr weiche, flexible Katheter verwendet. Traditionell wurde in der Nachbetreuung der Patientin 24h Bettruhe verordnet. Es konnte aber gezeigt werden dass es keinen Zusammenhang zwischen langer Ruhezeit und Implantationsrate bzw. „baby take home rate“ gibt (26).

Für die Patientin wirkt die Bettruhe aber psychologisch stabilisierend, ohne dass dies einen Vorteil auf die Schwangerschaftsrate hat. Praktisch hat sich heute eine 30 minütige Ruhephase nach Transfer bevor die Patientin nach Hause gehen darf etabliert (1).

10.1.4 Die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

1992 wurde durch den italienischen Arzt Gianpiero Palermo zum ersten Mal über Schwangerschaftsraten und Geburten, welche durch eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion herbeigeführt wurden, berichtet (24).

Seit dieser Zeit wurde in verschiedensten Arbeiten die Überlegenheit der ICSI gegenüber jeder anderen Form der assistierten Fertilisation gezeigt. Beim kritischen Vergleich mit der herkömmlichen IVF konnte in prospektiv randomisierten Studien, in Fällen tubarer Sterilität jedoch kein Vorteil einer ICSI gegenüber einer IVF Behandlung gezeigt werden. Es fanden sich bezüglich Fertilisationsraten, Entwicklungsmöglichkeiten der Embryonen oder deren Qualität und Implantationsraten keine Vorteile. Bei immunologisch bedingten Sterilitätsformen, dem Ausbleiben einer Fertilisierung oder bei sehr niedrigen Fertilisationsraten nach einer IVF und normalem Spermioogramm ist die ICSI aber von Vorteil (24).

Zwei wichtige Vorbedingungen müssen gewährleistet sein damit eine ICSI von Erfolg gekrönt ist (28).

Zu allererst muss sichergestellt werden dass während des gesamten Arbeitsprozesses (Oozytensammlung, Denudation und Injektion) die Temperatur konstant auf einem physiologischen Niveau (zwischen 35-37,5 °C) gehalten wird. Zu diesem Zweck ist es notwendig dass alle benutzten Laborgeräte (z.B. Transportcontainer, Inkubator) eine leicht erhöhte Temperatur aufweisen. Die erforderliche Temperaturdifferenz, um eine physiologische Temperatur zu halten, muss von Labor zu Labor individuell festgestellt und getestet werden (28).

Der zweite wichtige Punkt ist auf ein exaktes Zeitmanagement zu achten. Auf keinen Fall darf zwischen der Bereitstellung der Oozyten und der Injektion eine Zeitspanne von mehr als 6h vergehen. Dadurch kann eine in vitro Alterung der Oozyten vermieden werden. Dabei ist es aber irrelevant ob eine Denudation der Oozyten sofort nach der Oozyten Gewinnung durchgeführt wird und anschließend, bis zur

ICSI, im Kulturmedium verbleibt oder ob die Manipulation direkt vor der ICSI stattfindet (28).

Die Cumulus-Oozyten-Komplexe werden nach ihrem Erscheinungsbild und der Expansion der Corona radiata evaluiert. So werden Oozyten innerhalb der Cumulus Matrix entweder in reif (Metaphase II) oder unreif (Prophase I und Metaphase I) eingeteilt. So weist ein expandierter lutenisierter COC und eine radiale Corona radiata auf eine abgeschlossene nukleäre Reifung hin. Das Fehlen dieser Merkmale deutet auf Unreife hin (28).

Um eine erfolgreiche ICSI zu sichern ist es ausgesprochen wichtig die Cumulus Zellen adäquat von der Oozyte zu entfernen (=Oozyten Denudation). Bei fehlender Entfernung des COC kann es zu technischen Problemen bei der ICSI kommen. So kann es vorkommen dass die Oozyte mit der Pipette nicht in der 9 Uhr Position gehalten werden kann, auch besteht die Möglichkeit dass somatische DNA durch die Injektion in die Eizelle eingebracht wird (28).

Die Denudation einer Eizelle besteht aus zwei Schritten, eine initiale enzymatische Digestion gefolgt von einer mechanischen Entfernung der Cumulus Zellen. Bei der enzymatischen Verdauung wird kommerziell erhältliche Hyaluronidase verwendet. Durch die Hyaluronidase kommt es zu einer Degradierung von Hyaluronsäure welche die Hauptkomponente der extrazellulären Oozyten Matrix ist (28).

Die mechanische Entfernung wird nach der enzymatischen Digestion angewandt. Dabei wird durch wiederholtes vorsichtiges Aspirieren mit Glaskapillaren unterschiedlichen Durchmessers die Oozyte von den umgebenden Cumulus Zellen befreit (24). Seitdem gezeigt wurde das es bei unsachgemäßer mechanischer Denudation (z.B. Pipetten mit unzureichend kleinem Durchmesser $<140\mu\text{m}$) zu einer Dislokation zwischen dem erstem Polarkörperchen und dem meiotischen Spindelapparat kommen kann, soll die enzymatische Denudation hinausgezögert werden (28).

Das Ejakulat wird zur gleichen Zeit mit den üblichen Methoden aufbereitet um mobile von immobilen Spermien zu trennen (24).

Die so vorbereiteten Spermien und die Eizellen werden anschließend in eine Petrischale verbracht. Klassischerweise werden in einem zentral gelegenen Mediumtropfen die Spermien eingebracht und die Oozyte in einem einzigen peripher gelegenen Mediumtropfen gelagert. Zum Schutz vor Verdunstung und zur

Aufrechterhaltung des pH-Wertes werden die Mediumtropfen mit einer Ölschicht überlagert. Um die Viskosität und das „Einfangen“ sowie die Manipulation mit den Pipetten eines einzigen Spermiums zu erleichtern wird in den Spermatozoen enthaltenden Mediumtropfen Polyvinylpyrrolidon hinzugegeben (24).

Sobald ein Spermium gefangen wurde sollte es immobilisiert werden. Dies ist aus zwei verschiedenen Gründen sinnvoll. Zum einen kann es theoretisch durch mobile Spermien zu einem Schaden am Zytoskelett der Oozyte kommen, was aber vernachlässigt werden kann, zum anderen wird durch Permeabilitätsänderungen der Spermienmembran sichergestellt dass der lösliche Oozyten aktivierende Faktor (Phospholipase C_z) sofort in das Ooplasma freigesetzt wird. Eine Immobilisierung wird üblicherweise an der Geißel des Spermiums durchgeführt, da auch in vivo die Geißel nie in die Eizelle eindringt (28).

Die Immobilisierung motiler Spermien wird herkömmlicherweise mechanisch erreicht. So kann durch Pressen der Geißel gegen den Pipettenboden oder durch wiederholtes Aspirieren am Spermienmittelstück eine Unbeweglichkeit der Spermien herbeigeführt werden. Es ist auch möglich mittels eines Diodenlasers oder durch piezoelektrische Manipulation eine Immobilisierung der Spermien zu erreichen. Vor ganz anderen Problemen steht der Embryologe wenn er es mit bereits immobilen Spermien, z.B. bei kryokonservierten oder testikulär extrahierten Spermien, zu tun hat. In diesem Fall ist von entscheidender Bedeutung zwischen immobilen aber befruchtungsfähigen und immobilen und befruchtungsunfähigen Spermien zu unterscheiden (1).

Die hyperosmotische Testung ist dabei eine häufig verwendete Technik. Es ist auch möglich mithilfe eines Diodenlasers dieses Dilemma zu lösen. So zeigen immobile aber vitale Spermien nach Laserbeschuss ein „Einrollen“ des Geißelendes. Heutzutage steht durch Phosphodiesterasehemmer, die durch eine Akkumulation von ATP im Spermium einer eingeschränkten Spermienmotilität entgegenwirken, eine elegante Möglichkeit zwischen immobil vitalen und immobil avitalen Spermien zu unterscheiden, zur Verfügung. (28).

Unabhängig vom verwendeten Spermium, ob immobil oder motil ist es wichtig bei der ICSI eine standardisierte Prozedur durchzuführen (1).

Die Eizelle wird mit einer Haltepipette an der 9-Uhr-Position fixiert. Der erste Polkörper liegt dann in 6- oder 12-Uhr-Position. Anschließend wird die

Injektionspipette sanft an 3-Uhr-Position gegen das Oolemma gedrückt, um sicher zu stellen dass sich ein Einstichtrichter bildet welcher die Äquatorialebene anzeigt. Nach einer erfolgreichen Penetration, wird eine kleine Menge Ooplasma aspiriert (28). So kann sichergestellt werden dass das Spermium in die Eizelle eingebracht wird und nicht versehentlich im perivitellinen Spalt deponiert wird (1).

Es ist nicht überraschend dass es aufgrund der invasiven ICSI-Technik immer wieder dazu kommt, dass nach erfolgreicher Injektion die Eizelle lysiert und irreversibel geschädigt wird. Die Rate an lysierten Oozyten darf in guten Labors 1-3% nicht überschreiten. Von großer Bedeutung ist dies bei Patientinnen mit nur wenigen Eizellen, da die Möglichkeit besteht durch den angerichteten Schaden den ganzen Behandlungszyklus abbrechen zu müssen. Durch das teilweise Abtragen der Zona pellucida, unter zu Hilfenahme eines Laserpulses ist es möglich den Injektionsprozess schonender zu gestalten. Dies stellt den Embryologen vor das Problem das durch diese partielle Öffnung eine assistierte Schlüpfhilfe („assited Hatching“) verhindert. Denn zwei künstlich generierte Öffnungen wirken sich auf das Schlüpfen negativ aus und können unter Umständen sogar zu nekrotisierenden Prozessen führen (1).

Immer wieder kommt es aber trotz optimaler Behandlung von Oozyten, Spermien und erfolgreicher Injektion zu einem Befruchtungsversagen nach einer ICSI. Natürlich ist es möglich eine weitere ICSI zu starten, dies stellt aber eine suboptimale Therapie dar. Daher wurden unterschiedliche erfolgversprechende Techniken der artifiziellen Eizellaktivierung entwickelt (1).

10.1.5 Artificielle Oozyten Aktivierung

Assistierte reproduktionsmedizinische Techniken sind heute in den westlichen Industrieländern für 7% der Geburten verantwortlich. Die In vitro Fertilisation ist eine ausgezeichnete Technik für die meisten infertilen Paare. Besteht jedoch eine „severe male factor infertility“ ist eine IVF nicht effektiv. Bei diesen Patienten ist es dem Spermium nicht möglich die Zona pellucida zu penetrieren. Diese Problematik kann mit dem Einsatz einer ICSI umgangen werden. Die ICSI ist daher die bevorzugte Technik beim Bestehen einer „severe male factor infertility“ (29).

Durchschnittlich werden durch den Einsatz der ICSI Fertilisationraten von 70% erreicht. Es kommt aber in 2-3% zu einem Versagen nach einem ICSI Zyklus. Verschiedene Gründe kommen für den Fehlschlag einer ICSI in Frage. So sind neben der Unreife der Oocyte, vererbte genetische Defekte oder eine Expulsion des injizierten Spermiums ursächlich für ca. 20% einer ausbleibenden Fertilisation nach ICSI. Die Funktionsfähigkeit des Spermiums sowie ein abnormaler Chromatin Status, die Unfähigkeit des Spermiums den Nukleus zu decondensieren oder das Unvermögen des Spermiums eine Eizelle zu aktivieren stellen Spermien spezifische Defekte und weitere Ursachen für ein ICSI Versagen dar. Durch Analysen hat sich gezeigt dass bei ausbleibender Fertilisation einer Oocyte nach ICSI 80% der unfertilisierten Eizellen in der Metaphase II arretiert sind, was auf ein Ausbleiben der Oozyten-Aktivierung zurück zu führen ist (29).

Es wurden verschiedene Möglichkeiten entwickelt um eine Oozyten-Aktivierung zu initiieren. So ist es möglich durch wiederholtes dislozieren des Ooplasmata eine Aktivierung herbeizuführen. Dies ist unabhängig ob das vorige Befruchtungsversagen auf den männlichen oder weiblichen Gameten zurückzuführen ist. Sanfter und mit geringeren Degenerationsraten gelingt eine Aktivierung der Oocyte indem stoffwechselaktive Mitochondrien von der Peripherie in das Zentrum der Oocyte verlagert werden (1).

Eine künstliche Induktion der Eizellaktivierung gelingt jedoch auch piezoelektrisch (30).

Die oben erwähnten Techniken haben aber den Nachteil dass sie invasive Eingriffe darstellen und/oder für die Durchführung ein technisch kompetenter Embryologe notwendig ist (1).

Verschiedene chemische Verbindungen können ebenso eine Aktivierung der Eizelle induzieren. So ist es möglich mit Ionomycin, Puromycin, Strontium Chlorid, Phorbol ester, Thiomersal und der Kalzium-Ionophor A23187 eine Eizelle zu aktivieren (29).

Allen Methoden gemeinsam ist, dass sie die Rolle des Kalziums - das Schlüsselement bei der Oozyten Aktivierung - nutzen. So wird die mechanische Manipulation der Eizelle dadurch erklärt dass es zu einem gesteigerten Kalzium Einstrom in die Zelle kommt. Die elektrische Stimulation führt zu einem Ca^{2+} Influx welcher durch Porenformationen lokalisiert in der Plasmamembran ausgelöst wird. Die Effizienz der elektrischen Stimulation ist dabei stark von der Porengröße, dem Ionengehalt des verwendeten Mediums und des Zelltyps abhängig (29).

In diesem Zusammenhang darf ein möglicher therapeutischer Nutzen der Phospholipase C_ζ nicht unerwähnt bleiben. So ist es möglich durch die Injektion von rekombinanter humaner PLC_ζ in Oozyten die für die embryonale Entwicklung notwendigen Ca^{2+} -Oszillationen zu induzieren. Diese Tatsache gewinnt immer mehr an Bedeutung da Fälle von männlicher Infertilität auf eine defekte Expression des PLC_ζ Proteins zurückzuführen sind und die Injektion eine neue therapeutische Strategie darstellt (31).

Da in dieser Studie der Kalzium-Ionophor A23187 eingesetzt wurde soll dieser kurz vorgestellt werden.

10.1.6 Ca-Ionophor-A23187

A23187 ist seit 1972 bekannt und chemisch eine antibiotische Carboxylsäure. Die freie Säure besitzt ein Molekulargewicht von 523 und die Konstitutionsformel lautet $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ (32). Sehr bald wurde das mitogene Potential erkannt und dass A23187 selektiv Kalzium, Magnesium und andere divalente Kationen durch biologische Membranen transportiert. Weiters wurde früh erkannt dass die Effekte von A23187 eine starke Abhängigkeit von der Anwesenheit extrazellulären Kalziums aufweisen (33). Diverse Arbeiten und Reviews wurden seit dieser Zeit publiziert und untermauerten die Wirksamkeit von A23187 als Kalzium-Ionophor und seine Potenz in der Oozyten Aktivierung (18, 34–36). Diese Nachweise sind als exemplarisch anzusehen, da eine einfache Pubmed suche nach A23187 z.B. 16614 Treffer liefert.

In der vorliegenden Studie wurde mit dem nach höchsten industriellen Standards gefertigten Produkt GM508 Cult-Active der Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG (Lensahn, Deutschland) gearbeitet.

11 Methode & Material

Unmittelbar nach der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion wird ein 15-minütiges Bad mit 30-50 µl des Fertigprodukt GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) welches den Kalzium-ionophor A23187 enthält durchgeführt. Das Fertigprodukt GM508 wird unter einer sterilen Mineralölschicht gelagert um es vor einer Verdunstung zu schützen.

Dies ist auch der einzige Unterschied zu der Standardprozedur:

- kontrollierte ovarielle Überstimulation,
- vaginalsonographisch unterstützte Ovarpunktion,
- Befruchtung der Eizellen mittels ICSI,
- in vitro Kultur zur Blastozyste (Tag 5), Embryotransfer.

Das verwendete Stimulationsprotokoll und die verabreichten Medikamente wurden durch die Studie nicht vorgegeben. Als Kontrollgruppe wurde der letzte Vorversuch der jeweiligen Patientin verwendet.

11.1 Einschlusskriterien

1. Völliger Wachstumsstop (kein Transfer)
2. Blastozystenbildung <15% (Rest arretiert)
3. normale Fertilisationrate im Vorversuch
4. Am Transfertag alle Embryonen mindestens 1 Tag zu langsam

11.2 Ausschlusskriterien

1. gleichzeitiges Befruchtungsversagen (<30% 2Pn) im Vorversuch
2. schlechte Fertilisationsrate im Vorversuch
3. schlechteste Embryonenqualität (Qualität C)
4. Verweigerung

11.3 Eligibilität

In allen teilnehmenden Zentren wurde die Studienteilnahme jeder Frau zwischen 18 und 42 Jahren, die im Vorversuch eine Auffälligkeit im Embryonenwachstum gezeigt haben, prospektiv angeboten. Es werden nur Frauen in die Studie aufgenommen, die zuvor nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung ihre Einwilligung zur Studienteilnahme schriftlich dokumentiert haben.

Diese Dokumente werden aufgrund Datenschutzrechtlicher Bestimmungen nicht veröffentlicht und können bei dem auf Nachfrage eingesehen werden.

11.4 Teilnehmende Zentren

- **Landesfrauen- und Kinderklinik Linz**
Leitung: Prof. Dr. Peter Oppelt
Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Kinderwunsch Zentrum
Krankenhausstr. 26-30
4020 Linz
- **Babywunsch-Klinik Dr. Zajc**
Leitung: Dr. Michael Zajc
Ludwig Bieringerplatz 1
A-5071, Wals-Himmelreich
- **Kinderwunschambulanz im Landeskrankenhaus St. Pölten**
Leitung: Univ. Prof. Dr. Matthias Klein
Propst Führer-Straße 4
A-3100, St. Pölten
- **Kinderwunschzentrum Goldenes Kreuz**
Leitung: Univ. Prof. Dr. Andreas Obruca, Univ. Prof. Dr. Heinz Strohmayer
Lazarettgasse 16-18
A-1090, Wien
- **Sterignost - Institut für Kinderwunschbehandlung**
Leitung: Dr. Alexander Stadler

11.5 Statistische Auswertung

Die sich daraus ergebenden statistischen Aussagen sind als rein deskriptiv zu verstehen.

11.5.1 Hypothese

Die H_0 Hypothese sagt aus dass es keinen Unterschied zwischen der Studiengruppe und der Kontrollgruppe bezüglich Fertilisationrate, Schwangerschaftsrate, Blastozystenbildung gibt.

Die H_1 Hypothese geht davon aus dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der Studiengruppe und der Kontrollgruppe bezüglich Fertilisationsrate, Schwangerschaftsrate und Blastozystenbildung gibt.

Es wird von einem Studienerfolg gesprochen wenn sich in mindestens einem Kriterium ein signifikanter Unterschied zeigt.

Die statistische Prüfung auf Signifikanz wurde mit dem T-Test und dem χ^2 Test durchgeführt. In Tabelle 2 sind die Studienergebnisse sowie die durchgeführten statistischen Tests angeführt. Ein p-Wert von $<0,05$ (KI 95%) gilt als statistisch signifikant.

12 Ergebnisse

Insgesamt wurden 95 Patientinnen mit jeweils zwei Behandlungszyklen ($n=190$) erfasst. Alle 95 Patientinnen erfüllten die Einschlusskriterien und wurden mit GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) behandelt (=Studiengruppe). Die in der Studiengruppe erhobenen Daten wurden mit den direkt vorangegangenen Zyklen derselben Patientin (=Kotrollgruppe) verglichen.

Die Patientinnen hatten ein durchschnittliches Alter von 33 Jahren wobei die jüngste Patientin 20 Jahre alt und die älteste 45 Jahre alt war. Die Mehrheit der

Studienzyklen wurde mit einem Antagonisten Protokoll (61,3% Studiengruppe) stimuliert, der Rest mit einem langen Protokoll (38,7% Studiengruppe).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (unmittelbarer Vorversuch) wurde in 21 Fällen das ovarielle Hyperstimulationsprotokoll von Antagonisten auf Agonisten oder vice versa umgeändert. Es konnte durch eine Multivarianz Analyse gezeigt werden dass die Umstellung des Protokolls keinen Einfluss auf die Blastozystenbildung, Fertilisationrate und die Schwangerschaftsrate hat ($p < 0,001$), somit scheint ausschließlich GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH & Co. KG; Lensahn, Deutschland) für die beobachteten verbesserten Ergebnisse verantwortlich zu sein.

Es wurden in der Studiengruppe insgesamt 1002 Cumulus-Oozyten-Komplexe gesammelt und bei der Kontrollgruppe konnten insgesamt 950 COCs gewonnen werden. Ein signifikanter Unterschied bei diesen beiden Gruppen wurde nicht gefunden.

In der Studiengruppe konnte bei 583 Oozyten eine Fertilisation (2 Vorkerne oder 2PN) beobachtet werden. Bei der Kontrollgruppe fand in 485 Eizellen eine Befruchtung statt. Bei der statistischen Auswertung fand sich kein signifikanter Unterschied.

In der Studiengruppe entwickelten sich 223 Zygoten zu Blastozysten während dies im Vorversuch nur in 64 Fällen der Fall war. Die statistische Prüfung ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen diesen beiden Gruppen.

Eine klinische Schwangerschaft konnte in 46 Fällen in der Studiengruppe und bei 10 Patientinnen in der Kontrollgruppe detektiert werden. Mithilfe eines χ^2 Test konnte ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) festgestellt werden.

Insgesamt wurden 36 Kinder in der Studiengruppe und 7 Kinder in der Kontrollgruppe lebend geboren.

Tabelle 2 Studienergebnisse

	Cult-Active Gruppe	Kontrollgruppe	p Wert	Test
COC	1002 (10,77) ^a	950 (10,44) ^a	NS	T-Test
Fertilisationsrate	583 (6,27) ^a	485 (5,64) ^a	NS	T-Test
Blastozystenformation	223 (3,43) ^a	64 (1,64) ^a	<0,001	T-Test
Schwangerschaftsrate	46	10	<0,001	Chi2
Geborene Kinder	36	7		

^a Mittelwert; NS = nicht signifikant

13 Conclusio

Es konnte kein Unterschied in der Fertilisationsrate bei den zwei Gruppen gezeigt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erwartungshaltung, da in der Studie nur Patientinnen mit einem problematischem Wachstum aber normalen Fertilisationsraten im Vorversuch in die Studie aufgenommen wurden.

Es zeigte sich aber eine verbesserte Entwicklung zur Blastozyste in der Studiengruppe. Dies lässt den Schluss zu das die Behandlung der Oozyte mit GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) diese nicht nur aktiviert sondern auch in einer regelrechten Entwicklung mündet. Ausserdem konnten deutliche Unterschiede bei der Schwangerschaftsrate gezeigt werden, was eine logische Konsequenz ist, waren doch die Vorversuche in dieser schwierigen Patientengruppe von Wachstumsstop etc. geprägt. Dies lässt auch den Rückschluss auf eine vollständig aktivierte Oozyte zu.

Durch die durchgeführte Multivarianzanalyse konnte auch gezeigt werden, dass allein das Fertigprodukt GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) einen signifikanten Einfluss auf die Wachstumsrate sowie die Schwangerschaftsrate hat und nicht der Wechsel des Protokolls.

14 Diskussion

In humanen Zellen ist das Kalzium-Ion einer der universellsten Signalgeber. Auf zellulärer Ebene gibt es zwei Ca^{2+} -Quellen, eine interne und eine externe. Entweder wird Kalzium durch die internen Speicher im Endoplasmatischen Retikulum rekrutiert oder es wird über Kalzium sensitive Kanäle, lokalisiert im Oolemma in die Zelle eingeschleust. Dabei ist die Verfügbarkeit von Kalzium begrenzt. Sobald die internen Speicher leer sind und/oder einen Defekt aufweisen ist die Oozyte/der Embryo auf einen externen Kalzium-Influx angewiesen (37, 38).

Kalzium-Ionophoren begünstigen den externen Kalzium Einstrom in die Zelle.

In den letzten 20 Jahren wurden Ca^{2+} -Ionophoren erfolgreich im Rahmen der Infertilitätstherapie bei Globozoospermie und bei isolierten Formen von Teratozoospermie eingesetzt. Zusätzlich werden Ca^{2+} -Ionophoren bei der Behandlung einer bestehenden „male factor infertility“ eingesetzt (29, 39).

Jedoch ist auch bei Normozoospermie die ICSI keine Garantie für eine erfolgreiche Fertilisation. Studien in der Vergangenheit zeigten dass der Einsatz von A23187 den größten Erfolg bei Fertilisationsraten von weniger als 30% verspricht (40).

A23187 ist aber keine universelle Lösung bei jeder Form der fehlenden oder unzureichenden Oozytenaktivierung (41). Nicht jede Patientin mit einem frustanen ICSI Vorversuch profitiert von der Anwendung des Kalzium-Ionophor A23187 (42). Aufgrund der Ausschlusskriterien (z.B. fehlende Befruchtung nach ICSI) konnte wie erwartet kein Unterschied in der Fertilisationsrate gefunden werden.

Es konnte aber erstmals eindeutig nachgewiesen werden dass auch Patientinnen mit normaler Fertilisationsrate aber Wachstumsproblemen von der Behandlung mit GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) profitieren.

Dies lässt sich durch die Wirkung von A23187 auf die Oozyte erklären. Sowohl für die Fertilisation als auch für das weitere Wachstum sind die spezie-spezifischen Kalzium Oszillationen innerhalb der Oozyte von essentieller Bedeutung (18) und diese werden durch GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) induziert.

Wieso konnten in vergangenen Studien nun vorwiegend nur signifikante Unterschiede bezüglich der Fertilisationrate aber nicht der Wachstumsrate beschrieben werden? Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass in allen bisherigen Studien stark unterschiedliche Lösungen des Kalzium-Ionophors A23187 Verwendung fanden. Ob diese unterschiedlichen Lösungen tatsächlich für diesen Unterschied (Benefit für die Fertilisationrate aber kein bis geringer Einfluss auf die Wachstumsrate) verantwortlich ist, könnte eventuell eine zukünftige Metaanalyse klären.

Es lässt sich festhalten dass bei der artifiziellen Oozytenaktivierung mit dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 die Rate an Blastozyten (=Wachstumsrate) gesteigert wird. Dies sollte aber nicht automatisch mit einer gesteigerten Schwangerschaftsrate gleichgesetzt werden, auch wenn in der vorliegenden Studie eine gesteigerte Schwangerschaftsrate im Vergleich zu der Kontrollgruppe gezeigt werden konnte. Aufgrund der komplexen Prozesse innerhalb der Embryonalentwicklung sollte von einer vorschnell generalisiert getroffenen Aussage über eine gesteigerte Schwangerschaftsrate bei einer Behandlung mit GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) Abstand genommen werden.

So spielt unter anderem das Alter, bestehende anatomische Variationen der inneren weiblichen Geschlechtsorgane, genetische sowie epigenetische Faktoren eine wesentliche Rolle bei dem Erhalt einer Schwangerschaft (1, 3, 23, 24).

Durch die vorliegenden Studienergebnisse kann aber nun der Indikationsbereich von GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) auf Patientinnen mit Wachstumsproblemen im Vorversuch aber mit normalen Fertilisationsraten erweitert werden. Wichtig dabei ist das diese Indikationserweiterung nur auf das Fertigprodukt GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH &Co. KG; Lensahn, Deutschland) bezogen ist, nicht aber auf jede „home made“ Lösung von A23187 angewendet werden kann.

In vivo konnte in der Vergangenheit die Spermium-spezifische Phospholipase C_ζ als physiologisches Agens der Oozytenaktivierung identifiziert werden (17, 31, 43).

Die PLC_ζ löst die spezie-spezifischen Kalziumoszillationen aus und wird von reifen Spermatozoen exprimiert und in löslicher Form in das Ooplasma freigesetzt. (14,

17, 43). Dieser Prozess läuft aber nicht passiv ab, sondern ist abhängig von der Anwesenheit und Interaktion mit Faktoren innerhalb des Ooplasmas (44). Von großem wissenschaftlichen Interesse ist im Moment inwieweit sich die PLC ζ für Prognosen, Diagnostik und Therapie der männlichen Infertilität eignet. So könnte es möglich sein Männer mit einer defizienten PLC ζ zu identifizieren und mithilfe einer voll funktionsfähigen rekombinanten humanen PLC ζ , im Rahmen der assistierten Reproduktion, die Oozyten Aktivierung zu initiieren (43).

Das Produkt GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH & Co. KG; Lensahn, Deutschland) hat mittlerweile in den reproduktionsmedizinischen Labors dieser Welt breiten Einzug gefunden, es wird sich aber erst zeigen ob durch den Einsatz von rekombinater PLC ζ GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH & Co. KG; Lensahn, Deutschland) verdrängt wird oder ob sich eventuell eine Kombinationstherapie etablieren wird. Zusätzlich werden bei der Beantwortung dieser Frage rein ökonomische Gründe eine Rolle spielen.

Es stellt sich die Frage wie mit Patientinnen verfahren werden soll, bei denen trotz Ionophoren Behandlung es zu einer mangelhaften Fertilisation und/oder Wachstumsproblemen kommt.

Eine mögliche Lösung liegt eventuell darin auf ein zweiseitiges Verfahren zu wechseln oder verschiedene Oozyten aktivierende Substanzen zu verwenden (45, 46). Es muss aber kritisch angemerkt werden dass der Ca²⁺-Ionophor A23187 sowie andere auf dem Markt verfügbaren Ca²⁺-Ionophoren künstliche Agenzien sind und die genaue Wirkung auf die Oozyte bis jetzt nicht restlos verstanden ist (1, 29, 34, 36). Es lässt sich eindeutig festhalten, dass der Einsatz von A23187 oder des Fertigprodukts GM508 Cult-Active (Firma Gynemed Medizinprodukte GmbH & Co. KG; Lensahn, Deutschland) im Moment rein experimenteller Natur ist (40) und es dadurch unablässig ist, dass Patientinnen vor dessen Verwendung und nach einer gründlichen Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis geben müssen. Darüber hinaus ist eine sorgfältige Prüfung der Indikation vor der A23187 Applikation erforderlich.

16 Literaturverzeichnis

1. Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G. Reproduktionsmedizin. Berlin: Springer; 2013.
2. Martius G. Gynäkologie und Geburtshilfe: 117 Tabellen. 5., aktualisierte und überarb. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme; 2008.
3. Stauber M, Weyerstahl T. Gynäkologie und Geburtshilfe. 3., aktual. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007. (Duale Reihe).
4. Sadler TW, Langman J. Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 10., korrigierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003.
5. Anderhuber F, Pera F, Streicher J, Waldeyer A. Waldeyer - Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in Einem Band. 19th ed. Boston: Walter De Gruyter Incorporated; 2012. (De Gruyter Studium Ser).
6. M. Bergmann. Spermatogenese. In: Krause W, Altinkilic B, editors. Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. 4., vollständig überarb. und erweiterte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011. p. 9–13 .
7. Schünke M, Schumacher U, Schulte E, Rude J. Prometheus Lernatlas der Anatomie: Hals und Innere Organe. Stuttgart [etc.]: Georg Thieme; 2005.
8. Bucher O, Wartenberg H. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12., vollst. überarb. Aufl. Bern [u.a.]: Huber; 1997.
9. Murken J. Taschenlehrbuch Humangenetik: 96 Tabellen. 7., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2006.
10. Steger K, Diemer T, Hauck EW, Weidner W. Protamin als Prognosefaktor für den Erfolg einer testikulären Spermienextraktion (TESE). J. Reproduktionsmed. Endokrinol. 2005; 2(1):13–7.
11. Jonge C de. Biological basis for human capacitation. Human Reproduction Update 2005; 11(3):205–14.
12. Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. J. Clin. Invest. 2010; 120(4):984–94.

13. Falcone T, Hurd WW. Clinical reproductive medicine and surgery: A practical guide. 2nd ed. New York: Springer; 2013.
14. Ramadan WM, Kashir J, Jones C, Coward K. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Commun Signal* 2012; 10(1):0–20.
15. Koolman J, Röhm K, Wirth J. Taschenatlas der Biochemie. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2003.
16. Parrington J, Davis LC, Galione A, Wessel G. Flipping the switch: How a sperm activates the egg at fertilization. *Dev. Dyn.* 2007; 236(8):2027–38.
17. Nomikos M, Swann K, Lai FA. Starting a new life: Sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development. *Bioessays* 2012; 34(2):126–34.
18. Kashir J, Heindryckx B, Jones C, Sutter P de, Parrington J, Coward K. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Human Reproduction Update* 2010; 16(6):690–703.
19. Kolodziej FB, Hüppe P, Katzorke T. Techniken der assistierten Reproduktion. *Urologe* 2011; 50(1):47–52.
20. Goldberg JM, Falcone T, Attaran M. In vitro fertilization update. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2007; 74(5):329–38.
21. Aktories K, Forth W, Allgaier C. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker : mit 305 Tabellen. 10., überarb. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009.
22. Gardner DK. Textbook of assisted reproductive techniques: Volume 2: Clinical Perspectives. 4th ed. London: Informa Healthcare; 2012.
23. Wolff Mv, Stute P. Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin: Das Praxisbuch; mit 95 Tab. Stuttgart: Schattauer; 2013.
24. Kaufmann M, Costa S, Scharl A. Die Gynäkologie. 3rd ed. Dordrecht: Springer; 2012.

25. Organization WH. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization; 2010. (Nonserial Publications).
26. Ginsburg ES, Racowsky C. In Vitro Fertilization: A comprehensive guide. New York, NY: Springer New York; 2012.
27. Österreichische IVF-Gesellschaft. Überarbeitete Empfehlung zur maximalen Anzahl zu transferierender Embryonen. Available from: URL:http://www.ivf-gesellschaft.at/uploads/media/Korrigierte_Empfehlung_Embryonentransfer_24.03.2011.doc.
28. Nagy ZP, Agarwal A, Varghese AC. Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices. New York, NY: Springer New York; 2012.
29. Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalae M. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 2010; 94(2):520–6.
30. Baltacı V, Ayvaz ÖÜ, Ünsal E, Aktaş Y, Baltacı A, Turhan F et al. The effectiveness of intracytoplasmic sperm injection combined with piezoelectric stimulation in infertile couples with total fertilization failure. *Fertility and Sterility* 2010; 94(3):900–4.
31. Nomikos M, Yu Y, Elgmati K, Theodoridou M, Campbell K, Vassilakopoulou V et al. Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertility and Sterility* 2013; 99(1):76–85.
32. Peter W. Reed and Henry A. Landry. A23187: A Divalent Cation Ionophore. *The Journal of Biological Chemistry* 1972; (Vol. 247):6970–7.
33. John R. Luckasen, James G. White, and John H. Kersey. Mitogenic Properties of a Calcium Ionophore, A23187. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* December 1974; Vol. 71(12):5088–90.
34. Lu Q, Zhao Y, Gao X, Li Y, Ma S, Mullen S et al. Combination of calcium ionophore A23187 with puromycin salvages human unfertilized oocytes after ICSI. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006; 126(1):72–6.

35. Ebner T, Köster M, Shebl O, Moser M, Van der Ven, Hans, Tews G et al. Application of a ready-to-use calcium ionophore increases rates of fertilization and pregnancy in severe male factor infertility. *Fertility and Sterility* 2012; 98(6):1432–7.
36. Liu Y, Han X, Liu M, Wang S, Jia C, Yu L et al. Three-day-old human unfertilized oocytes after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection can be activated by calcium ionophore a23187 or strontium chloride and develop to blastocysts. *Cell Reprogram* 2014; 16(4):276–80.
37. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium—a life and death signal. *Nature* 1998; 395(6703):645–8.
38. Arnoult C, Grunwald D, Villaz M. Novel postfertilization inward Ca²⁺ current in ascidian eggs ensuring a calcium entry throughout meiosis. *Dev. Biol.* 1996; 174(2):322–34.
39. Borges Jr. E, de Almeida Ferreira Braga, Daniela Paes, de Sousa Bonetti, Tatiana Carvalho, Iaconelli Jr. A, Franco Jr., José Gonçalves. Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa. *Fertility and Sterility* 2009; 92(1):131–6.
40. Montag M, Köster M, van der Ven, Katrin, Bohlen U, Van der Ven, Hans. The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle. *Reprod. Biomed. Online* 2012; 24(5):521–6.
41. Check JH, Levito MC, Summers-Chase D, Marmar J, Barci H. A comparison of the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using ejaculated sperm selected by high magnification versus ICSI with testicular sperm both followed by oocyte activation with calcium ionophore. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007; 34(2):111–2.
42. Kuentz P, Vanden Meerschaut F, Ellnati E, Nasr-Esfahani MH, Gurgan T, Iqbal N et al. Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. *Human Reproduction* 2013; 28(4):1054–61.
43. Amdani SN, Jones C, Coward K. Phospholipase C zeta (PLCζ): Oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Advances in Biological Regulation* 2013; 53(3):292–308.

44. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, Sutter P de, Dhont M. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum. Reprod.* 1997; 12(12):2792–6.
45. Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T. Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 2001; 76(1):148–52.
46. Nakasaka H, Yamano S, Hinokio K, Nakagawa K, Yoshizawa M, Aono T. Effective activation method with A23187 and puromycin to produce haploid parthenogenones from freshly ovulated mouse oocytes. *Zygote* 2000; 8(3):203–8.

()

