

**Diplomarbeit**

**Kann man von der Qualität der Inneren Zellmasse am Tag 5  
der embryonalen Entwicklung auf das neonatale Outcome  
rückschließen?**

eingereicht von

**Katja TRITSCHER**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Humangenetik Graz**

**Kinderwunsch Zentrum Linz**

unter der Anleitung von

**ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek**

**Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas Ebner**

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht benützt und die benutzten Quellen wörtlich zitiert sowie inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Katja Tritscher, e.h.

## DANKSAGUNG

Zu allererst geht mein Dank an meine beiden Betreuer **ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek** und **Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas Ebner**, die mir nicht nur immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und mich in der Umsetzung der Arbeit unterstützt haben, sondern mich auch zum ersten Mal wissenschaftliche Luft schnuppern haben lassen.

Bei meinen **Eltern** bedanke ich mich, dass sie mir von Kindesbeinen an jegliche Chancen eröffnet haben, mir letztendlich das Humanmedizinstudium ermöglicht und mir, nicht nur im Studium sondern auch Privat stets den Rücken freihalten. Im Laufe der letzten Jahre habt ihr die eine oder andere Laune ertragen müssen, mich in schweren Momenten unterstützt und immer wieder auf den rechten Weg geführt. Ich bin sehr stolz, eure Tochter zu sein.

Danke an meine **Großeltern, Verwandten** und **Freunde**, die mich auf meinem Weg nicht nur verfolgt, sondern ihn gemeinsam mit mir gegangen sind.

Vielen Dank **Georg** für die große Hilfe und Unterstützung in den letzten Jahren.

Zu guter Letzt: Danke **Amir** für Alles. Egal ob Tipps, Tricks, Gespräche,... ohne Dich wär alles nur halb so lustig.

## KURZFASSUNG

Die folgende Diplomarbeit setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Im theoretischen Part werden wichtige Kapitel, die zum besseren Verständnis der Studie beitragen, abgehandelt.

Der praktische Teil nimmt sich der Frage an, ob man anhand der Größe der Embryonalanlage, genauer, der inneren Zellmasse, am Tag 5 der Blastozyste auf das neonatale Outcome rückschließen kann. Zur Beantwortung dieser Frage führte ich mit der Forschungsgruppe rund um Univ.- Prof. Mag. Dr. Thomas Ebner am Kinderwunsch Zentrum Linz eine prospektiven Studie durch. Hierbei wurden in einem Zeitrahmen von 18 Monaten alle frischen und aufgetauten Blastozysten, welche die Einschlusskriterien bestanden haben, auf Parameter wie unter anderem Größe der inneren Zellmasse, Trophektoderm- Zellen, Zona Pellucida- Durchmesser, berechnet und mit dem Schwangerschaftsoutcome, dem Plazentagewicht, dem Geburtsgewicht sowie dem Geschlecht des Kindes verglichen und auf Signifikanzen getestet. Dabei konnten 254 Blastozysten, 162 von ihnen frisch und 92 nach dem Prozess der Kryokonservierung wieder aufgetaut, in die Studie inkludiert werden. Vor dem Transfer wurden alle Blastozysten nach den klassischen Expansionskriterien eingeteilt. Von den Krankenhäusern wurden Plazentagewicht, Geburtsgewicht und Geschlecht übermittelt. Zusätzlich wurden auch etwaige Fehlbildungen vom Krankenhaus übermittelt. Die statistische Auswertung zeigte, dass das Geburtsgewicht ( $P=0,012$ ), nicht aber das Plazentagewicht bei kryokonservierten Blastozysten signifikant höher war, als bei frischen Blastozysten. Der Grad der Expansion sowie die Größe oder das Stadium der inneren Zellmasse, wies keinen Zusammenhang mit dem neonatalen Outcome auf. Jedoch konnte eine Verbindung mit dem Grad der Blastozysten und der Größe der ICM gefunden werden. Im Vergleich zu vollen Blastozysten ( $P>0,01$ ) und expandierten Blastozysten ( $P<0,05$ ), wiesen schlüpfende Blastozysten eine signifikant kleinere ICM auf. Weiters wurden Qualität und Zellzahl des TE mit unten genannten Parametern verglichen. Sowohl die Qualität als auch die Zellzahl des Trophektoderms konnten mit der Implantationsrate, der Schwangerschaftsrate und Lebendgeburtenrate in Verbindung gebracht werden. Jene Schwangerschaften, welche mit einer Lebendgeburt endeten, konnten, basierend auf dem Grad des Trophektoderms ( $P<0,05$ ) und der

Zellzahl ( $P < 0,001$ ) von biochemischen Schwangerschaften, Aborten und von Schwangerschaften ohne Herzaktivität des Embryos, unterschieden werden. Des Weiteren konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass männliche Blastozysten, im Vergleich zu weiblichen Blastozysten, statistisch eine 2,53 höhere Chance haben, Trophektoderm von Qualität A aufzuweisen ( $P = 0,04$ ).

**Schlüsselwörter:** Blastozysten- Expansion, innere Zellmasse, Trophektoderm, Lebendgeburt, Geburtsgewicht, Plazenta

## **ABSTRACT**

The following diploma thesis consists of two parts. The theoretical part describes chapters, which are important for a better understanding of the academic study. The practical section seeks to find out if the quantitative and qualitative blastocyst assessment on day 5 allows a prediction of neonatal outcome. A team, consisting of Univ.- Prof. Mag. Dr. Thomas Ebner and me, tried to answer the question in a prospective analysis, which was performed at the Kinderwunsch Zentrum in Linz.

In the course of 18 months all fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfers, meeting the inclusion criteria, were detected for parameters like size of inner cell mass, trophoctoderm cell number, zona pellucida diameter and were then compromised with placental weight, birth weight and sex of the newborn. In total 254 blastocysts, 162 fresh and 92 vitrified/warmed were included. Before transfer, qualitative scoring of blastocysts was performed according to the classical criteria expansion. Placental weight, birth weight and sex was provided by the maternal hospital. Also in case a malformation occurred, the hospital provided further details. Statistical analysis showed a significantly higher birth weight ( $P=0.012$ ) in warmed blastocysts compared to the fresh counterparts. Placental weight did not differ between the two groups. Degree of expansion as well as ICM grade were not related to the neonatal outcome. Hatching blastocysts had significantly smaller inner cell masses compared to full ( $P>0.01$ ) and expanding ( $P<0.05$ ) blastocysts. Moreover trophoctoderm quality and cell number were compared to implantation rate, pregnancy rate and live birth rate. Those pregnancies that went to live birth could be distinguished from pregnancies that aborted on the basis of trophoctoderm grade ( $P<0.05$ ) and cell number ( $P<0,001$ ). Furthermore, results showed, male blastocysts had a 2.53 higher chance to show trophoctoderm of quality 1 as compared to female ones ( $P=0.04$ ).

**Keywords:** Blastocyst- expansion, inner cell mass, trophoctoderm, live- birth, birth weight, placenta weight

## INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	4
2 Hormonelle Stimulation.....	7
3 In Vitro Fertilisation und intrazytoplasmatische Spermieninjektion .....	11
3.1 IVF.....	11
3.2 ICSI.....	12
4 Kryokonservierung.....	14
4.1 Slow freezing .....	14
4.2 Vitrifikation .....	15
4.2.1 Vitrifikation von Eizellen.....	16
4.2.2 Vitrifikation von Blastozysten .....	17
5 Wissenschaftliche Studie.....	18
5.1 Einleitung.....	18
5.2 Material und Methoden.....	20
5.3 Statistik.....	25
5.4 Ergebnisse.....	26
5.4.1 Expansion.....	29
5.4.2 Innere Zellmasse .....	30
5.4.3 Trophektoderm .....	32
5.5 Diskussion .....	34
Literaturverzeichnis .....	40

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ARDS	Acute respiratory distress syndrome
COC	Kumulus- Eizellkomplex
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
ICM	Innere Zellmasse
IE	Internationale Einheit
IVF	In- Vitro- Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
RI	Rundheitsindex
TE	Trophektoderm
ZP	Zona pellucida



**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abbildung</b>	<b>Quelle</b>	<b>Seite</b>
Abbildung 1: GnRH- Antagonisten-Mehrfachsdosisprotokoll	Adaptiert nach (2)	8
Abbildung 2: Langes GnRH-Agonistenprotokoll	Adaptiert nach (2)	9
Abbildung 3: ICSI mit in der Injektionspipette befindlichem immobilisiertem Spermium	Adaptiert nach (2)	13
Abbildung 4: Umrandung der ICM in CorelDraw	Eigene Darstellung	24
Abbildung 5: Gestationsalter bei Geburt in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht	Eigene Darstellung	28
Abbildung 6: Vergleich zwischen semi-automatischen ICM Quantifizierung und Flächenberechnung nach Richter et al. (35) sowie Kreis/Ellipsen- Modell	Eigene Darstellung	31
Abbildung 7: Unterschiede in den drei genannten Gruppen in Bezug auf die TE-Zellzahl	Eigene Darstellung	32

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
Tabelle 1	Lebendgeburtenrate gruppiert nach Gardner- Kriterien	26
Tabelle 2	Übersicht über Ergebnisse quantitativer und qualitativer Parameter Stadium 3	29
Tabelle 3	Übersicht über Ergebnisse quantitativer und qualitativer Parameter Stadium 4	30
Tabelle 4	Übersicht über Ergebnisse quantitativer und qualitativer Parameter Stadium 5	30

## 1 EINLEITUNG

Die assistierte Reproduktion ist ein sehr umfangreiches Kapitel der Medizin, welches von vielen Personen aus Scham noch immer hinter verschlossenen Türen besprochen wird. Wird das Thema der Kinderlosigkeit bereits im Alten Testament mit der Geschichte zwischen Abraham und Sarah aufgegriffen, versuchten im Laufe der Jahrhunderte viele interessierte Personen mit unterschiedlichen Therapieversuchen dem unerfüllten Kinderwunsch entgegenzuwirken. Mit der 1978 geborenen Louise Brown, dem ersten lebend geborenen Kind nach in vitro Fertilisation wurde ein Meilenstein in der Geschichte der Reproduktionsmedizin gelegt. Im Laufe der Zeit konnten die Raten an Lebendgeburten nach künstlicher Befruchtung immer weiter nach oben korrigiert werden.

Wenn sich ein kinderloses Paar entscheidet, ärztliche Hilfe einzuholen, steht für beide Partner eine große Anzahl an Untersuchungen an, um der Ursache für die ausbleibende Schwangerschaft auf den Grund zu gehen. Zuvor wird jedoch eruiert ob es sich bei dem vorliegenden Paar um eine primäre oder sekundäre Sterilität handelt. Der Unterschied dabei liegt darin, dass es bei einer primären Sterilität nach sexuellem Kontakt noch zu keiner Schwangerschaft kam, hingegen bei der sekundären Sterilität nach einer früheren Schwangerschaft keine neuerliche Schwangerschaft eintritt. Hierbei muss auch der Terminus der „Infertilität“ geklärt werden. Die Infertilität beschreibt die Unfähigkeit ein Kind bis zur Lebensfähigkeit auszutragen.

Neben der gynäkologischen Untersuchung einschließlich der Vaginalsonographie, der Beurteilung des Zervixschleims, dem Ausschluss von Infektionen sowie der Analyse des Hormonstatus, wird die Frau dazu angehalten, sowohl einen Menstruations-, als auch Koituskalender zu führen. Die Diagnostik der Frau kann zusätzlich noch auf eine Hysteroskopie oder eine laparoskopische Tubendurchgängigkeitsprüfung ausgeweitet werden (1). Zu den Untersuchungen des Mannes gehört die Analyse der Samenflüssigkeit. Im Sims- Huhner- Test und Kurzrock- Miller- Test wird die Verträglichkeit des Zervixschleims der Frau, mit dem Sperma des Mannes getestet.

Nach all diesen Untersuchungen liegt die Ursache der Sterilität in jeweils rund 40% bei der Frau und beim Mann. In den restlichen 20% findet man sowohl beim Mann als auch bei der Frau Gründe für die Kinderlosigkeit. In das große Kapitel der genitalen Ursachen

der Frau kann hierbei- in absteigender Häufigkeit- zwischen tubarer, ovarieller und uteriner Sterilität eingeteilt werden. Neben den genitalen Ursachen kann es auch zum Auftreten extragenitaler, psychischer oder immunologischer Ursachen kommen.

Hat man die Tests abgeschlossen, wird je nach Ursache der bisherigen Kinderlosigkeit ein unterschiedliches Therapiekonzept angestrebt. Bei organischen Gründen, wie beispielsweise bei Ovarialzysten oder Myomen wird eine Entfernung unternommen, bei Adhäsionen eine Adhäsioolyse durchgeführt und bei Verschluss einer Tube wird versucht, jene am besten laparoskopisch wieder durchgängig zu machen.

Sollte trotz allem keine Schwangerschaft eintreten, wird mit dem Paar der nächste Schritt besprochen: die assistierte Befruchtung.

Wie im nächsten Kapitel genau beschrieben, werden zu Beginn die Ovarien der Frau mittels unterschiedlicher Protokolle hormonell stimuliert. Bei paralleler Beobachtung der Follikelreifung wird der optimale Zeitpunkt zur geplanten Follikelpunktion abgewartet. Hierbei können unter Ultraschallkontrolle transvaginal mehrere, wenn nicht sogar alle Eizellen mit den umgebenden Granulosazellen sowie der umgebenden Follikelflüssigkeit, aus den beiden Ovarien abgesaugt werden. Der die Punktion durchführende Arzt muss besondere Sorgfalt bei dem Procedere aufbringen, um Nachbarorgane nicht zu verletzen oder Infektionen zu verursachen. Bei etwaigen Komplikationen kann eine Reimplantation im aktuellen Zyklus nicht durchgeführt werden, die befruchteten Eizellen werden kryokonserviert und in einem späteren Zyklus transferiert.

Der Cumulus- Eizell- Komplex wird sofort nach der erfolgreichen Punktion vom Embryologen unter dem Mikroskop beurteilt. Bis zu diesem Zeitpunkt werden die Frauen, mit Ausnahme in der Art des Stimulationsprotokolls gleich behandelt, nun unterscheidet die Samenqualität des Mannes das weitere Vorgehen bei der Befruchtung der Eizelle. Wenn die Qualität im Sinne der Anzahl der Spermien, ihrer Beweglichkeit und Morphologie den WHO- Referenzwerten entspricht, kann die in vitro Fertilisation zum Einsatz kommen. Im Falle einer eingeschränkten Qualität kann nur die Methode der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion, auch ICSI genannt, als letzte Alternative angewandt werden. Sind die Eizellen befruchtet, werden sie vom Embryologen je nach Stadium anhand bestimmter Kriterien bewertet. Je nach Kinderwunschinstitut, werden die Embryonen den Frauen in unterschiedlichen

Entwicklungsstadien, entweder im aktuellen Zyklus transferiert oder kryokonserviert und in einem späteren Zyklus reimplantiert.

Obwohl die künstliche Befruchtung immer mit einem Embryonentransfer endet, entwickelt sich nur bei ungefähr 30-40% eine Schwangerschaft. Viele Einflussfaktoren, wie zum Beispiel das Alter der Eltern, etwaige Grunderkrankungen, der Hormonstatus, Nikotinabusus, Adipositas oder auch Stress können den Erfolg mitbestimmen.

In den folgenden Kapiteln werden Themen genauer behandelt, welche in dem Prozess einer künstlichen Befruchtung von großer Wichtigkeit sind und zum besseren Verständnis der danach beschriebenen wissenschaftlichen Studie dienen.

## 2 HORMONELLE STIMULATION

„Das Wirkprinzip der ovariellen Stimulation beruht auf einer indirekten oder direkten Erhöhung des Serum-FSH Spiegels. Das therapeutische Ziel der ovariellen Stimulation ist entweder die Unterstützung bzw. Herbeiführung eines Eisprungs bei Störung der Follikelreifung oder die Polyovulation zur Gewinnung von mehreren Eizellen für eine extrakorporale Verwendung.“ (2)

Im Rahmen der hormonellen Stimulation bei künstlicher Befruchtung können unterschiedliche Protokolle eingesetzt werden.

- **Mehrfachsdosisprotokoll nach Diedrich et al.**

Das sogenannte Mehrfachsdosisprotokoll von Diedrich et al. (3) verwendet GnRH-Antagonisten, welche die hypophysäre LH und FSH- Ausschüttung blockieren. Wie in Abbildung 1 beschrieben, beginnt am 2. oder 3 Zyklustag die Stimulation mit FSH, ab dem 6. Stimulationstag wird zusätzlich ein GnRH- Antagonist verabreicht. Während dieser Injektionen werden die Follikel der Frau regelmäßig auf ihr Wachstum überprüft. Bei Vorhandensein von 2-3 Follikeln über 17mm wird die Ovulation mittels 5.000 IE HCG ausgelöst. Zwischen 2 Verabreichungen sowie der letzten Antagonistenverabreichung und der HCG- Injektion sollte jeweils das Zeitfenster von 30 Stunden nicht überschritten werden. Üblicherweise wird 36 Stunden nach der HCG-Gabe die Follikelpunktion durchgeführt (2).

Im Vergleich zum weiter unten beschriebenen GnRH- Agonisten- Schema ist die Hypophyse im GnRH- Antagonisten- Schema auch empfänglich auf eine Bolusgabe eines GnRH- Antagonisten zur Einleitung der Eizellreifung. Diese Alternative zur Induktion mittels HCG wird vor allem bei Patientinnen mit erhöhtem Risiko eines Überstimulationssyndrom angewandt, da in mehreren Studien (4,5) gezeigt werden konnte, dass nach Gabe von GnRH- Agonisten eine Luteolyse eintritt.

Bei der Wahl der FSH Dosis fließen mehrere Faktoren mit ein. Die meisten Patientinnen unter einem Lebensalter von 40 Jahren (unter der Voraussetzung eines regelrechten Zyklus) werden mit 150- 225 IE FSH therapiert. Je nach Alter und Zyklusanamnese,

sowie weiteren Parametern wie der Höhe des Anti- Müller- Hormons und der Antralfollikelzahl wird die FSH- Dosis angepasst (2).

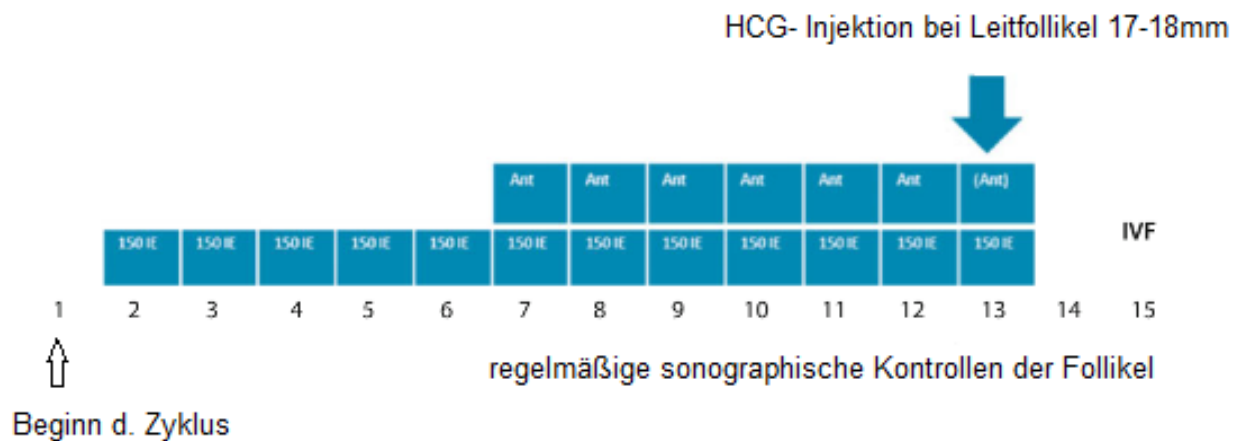


Abbildung 1: GnRH- Antagonisten- Mehrfachdosisprotokoll

Quelle: adaptiert nach (2)

- **Langes GnRH- Agonistenprotokoll**

Wie in der Abbildung 2 ersichtlich, wird bei diesem Protokoll ein GnRH- Agonist verwendet, der bereits in der Lutealphase des vorangegangenen Zyklus oder mit Beginn der Menstruation verwendet wird. Nach einer Zeitspanne von 10-14 Tagen werden sowohl eine Östradiolmessung, eine LH- Messung und ein transvaginaler Ultraschall durchgeführt. Nach Zusammenschau der Befunde wird bei regelrechten Ovarien und Hypogonadotropie die FSH Stimulation gestartet. Bei Vorhandensein von 2- 3 Follikeln von über 18mm kommt es zur HCG- Verabreichung und anschließend zur Follikelpunktion (2).

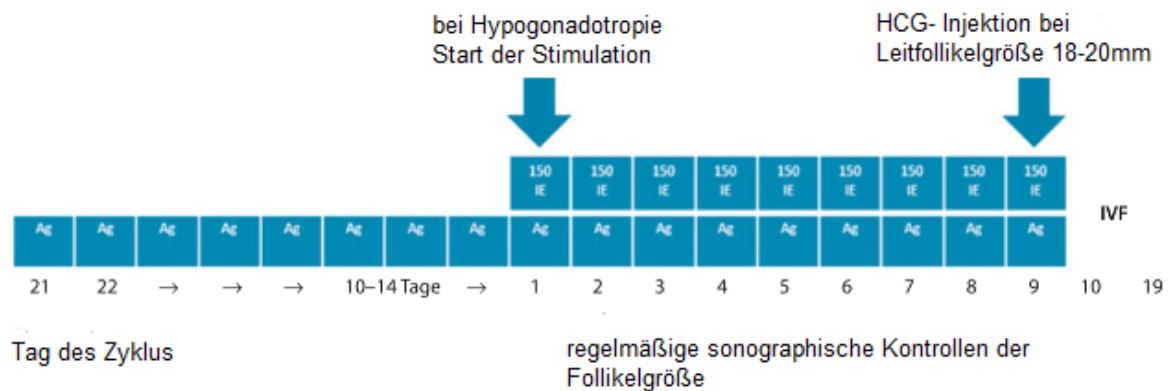


Abbildung 2: Langes GnRH- Agonistenprotokoll

Quelle: adaptiert nach (2)

Das lange GnRH- Agonistenprotokoll hat im Vergleich zum Mehrfachdosisprotokoll eine längere Stimulationsdauer, einen höheren Gonadotropinverbrauch und weist ein größeres Risiko für ein ovarielles Hyperstimulationssyndrom auf (6). Beim Überstimulationssyndrom kommt es durch die externe Zufuhr von Hormonen und dem vermehrten Heranreifen der Follikel zu klinischen Beschwerden der Frauen, die von moderaten Symptomen wie Unwohlsein, Übelkeit, dezenter Aszitesbildung begleitet werden können. Die schweren Formen des Hyperstimulationssyndroms können mit massivem Aszites, erhöhtem Hämatokrit, Dyspnoe, Leberfunktionsstörungen, ARDS oder Nierenversagen einhergehen. Bei letzterer Form ist der Stimulationszyklus sofort abubrechen.

Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten unterscheiden sich zwischen den beiden genannten Protokollen aber nur gering. Welches Stimulationsprotokoll die Patientin letztendlich erfährt, ist immer eine individuelle Entscheidung, die sowohl in Zusammenschau mit den Befunden als auch den biologischen Voraussetzungen getroffen wird (2).

Die Stimulation der Ovarien ist ein Drahtseilakt, da bis zu einer gewissen Schwelle „mehr Eizellen“ eine „höhere Schwangerschaftsrate“ nach sich ziehen. Mit der steigenden Anzahl von Follikeln steigt aber auch das Risiko für ein



Überstimulationssyndrom an (2). Ein Richtwert für die Eizellenzahl nach In- vitro-Fertilisation sind 5- 15 Eizellen (7).

Die regelmäßig durchgeführten transvaginalen Sonographien dienen einerseits der Abschätzung der Prognose der Stimulation, andererseits zur HCG- Injektion am optimalen Zeitpunkt sowie der Abschätzung auf das Entstehen eines Überstimulationssyndroms.

### **3 IN VITRO FERTILISATION UND INTRAZYTOPLASMATISCHE SPERMIENINJEKTION**

#### **3.1 IVF**

Bei der in vitro Fertilisation geht der natürliche Prozess der Interaktion der Spermien mit der Eizelle anstatt in utero, in einem Kulturschälchen vonstatten.

Wenige Stunden, in der Regel zwischen zwei und drei Stunden nach Punktion werden die gewonnenen Cumulus- Eizellen- Komplexe mit einer vorgegebenen Anzahl von Samenzellen versetzt. Dabei ist es wichtig, dass je nach Zahl der COC die Anzahl der Spermien angepasst wird. Als Richtwert werden pro Eizelle zwischen 20.000-25.000 Samenzellen angegeben (2). Je nach Literatur findet man eine unterschiedliche Anzahl von Spermien, im Allgemeinen kann man aber festhalten, dass die Konzentration in einem Bereich zwischen 50.000- 150.000/mL liegen soll (6-10).

Nach diesem Schritt werden die inseminierten COC erstmals über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden sie auf das Vorhandensein von 2 Vorkernen und 2 Polkörpern überprüft. Diese Entwicklung kann jedoch nur gesehen werden, wenn die inseminierten Cumulus- Eizellen- Komplexe vorher denudiert wurden.

Leider kommt es jedoch nicht in allen Fällen zu einer Befruchtung. In 5-10% kann ein Versagen der IVF auftreten. Sollte dieses Ereignis eintreten, muss der Zyklus abgebrochen werden und ein neuer Zyklus zu einem anderen Zeitpunkt gestartet werden, indem- auf Grund des IVF- Versagens- als Methode der Wahl eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion durchgeführt wird.

Im Laufe der Jahre wurde unter anderem daran geforscht, ob eine Verlängerung der Inkubation von Spermien mit dem COC oder eine Erhöhung der Samenanzahl zu einer 100% Befruchtungsrate führen. Dies verlief jedoch ohne nennenswerten Erfolg (12,13). Ebenso wie der Ansatz die Kumulusmatrix mechanisch zu verkleinern oder den Spermien mittels Hyaluronidase den Zugang durch die Matrix zu erleichtern (14).

Nach negativem Ausgang der in vitro Fertilisation bleibt als letzte Option die Durchführung einer ICSI.

### 3.2 ICSI

Bevor der eigentliche Vorgang der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion stattfinden kann, müssen bestimmte Vorbereitungen getroffen werden. Zum einen muss die Eizelle von ihren umgebenden somatischen Zellen getrennt werden, einerseits um die Reife der Gameten kontrollieren zu können, welche injiziert werden, andererseits weil die Cumuluszellen bei der Fixierung der Eizelle mit der Pinzette stören würden (2). Außerdem würde ein gewisses Risiko bestehen mit der Nadel Fremd- DNA in die Eizelle einzuschleppen (15). Bei dem Schritt der Denudation greift man neben der mechanischen Denudation auch zu dem Enzym Hyaluronidase. Nachdem die Oozyte für die ICSI vorbereitet ist, kommt es zur Auswahl des richtigen Spermiums. Diesem Schritt kommt enorme Bedeutung zu. Fast immer finden sich im Ejakulat zumindest einige gut bewegliche Spermien, die für die Injektion eingefangen werden müssen. Der Schritt des Einfangens kann in zwei verschiedenen Medien durchgeführt werden. Einerseits in Polyvinylpyrrolidon andererseits in Hyaluronsäure, beides Substanzen, die die Motilität der Spermien stark einschränken. Zuletzt wird der männliche Gamet entweder mechanisch oder mittels Diodenlaser immobilisiert, damit das Enzym Phospholipase C  $\zeta$  Zugang zur Oozyte erhält (2).

Die Durchführung der Spermieninjektion passiert nach einem standardisierten Verfahren. Im ersten Schritt wird die Eizelle an der 9- Uhr Position mit einer Haltepipette fixiert. An der 3- Uhr Position wird die Injektionspipette vorsichtig gegen die Eimembran gedrückt, bis sich ein Einstichtrichter bildet. Diese beiden Schritte werden in Abbildung 3 ersichtlich. Nach Penetration des Oolemmas wird Ooplasma aspiriert um sicher zu gehen, dass das Spermium nicht fälschlicherweise im perivitellinen Spalt deponiert wird (2).

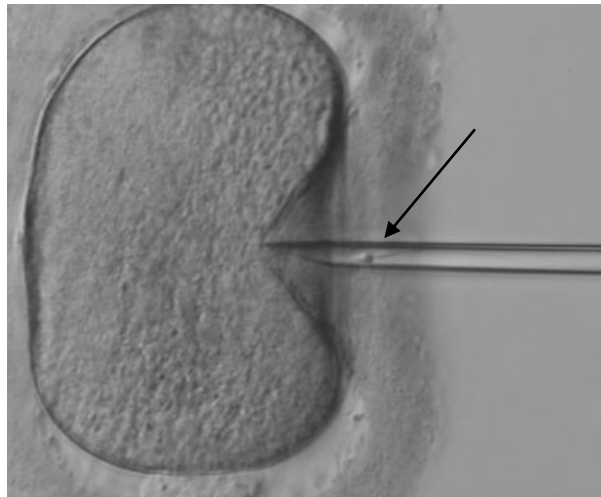


Abbildung 3: ICSI mit in der Injektionspipette befindlichem immobilisiertem Spermium (Pfeil)

Quelle: Adaptiert nach (2)

Da die ICSI eine invasive Manipulation der Oozyte darstellt, ist es nicht weiter verwunderlich, dass die Eizellen durch diese Prozedur beschädigt werden können und so keine 100%-ige Befruchtungsrate gewährleistet werden kann. Die Rate an degenerierten Eizellen soll jedoch in guten Labors nicht höher als 1-3% sein (2).

## 4 KRYOKONSERVIERUNG

Seit der ersten berichteten Schwangerschaft nach Kryokonservierung im Jahr 1983 von Trounson und Mohr (16) und dem Bericht der im Jahr darauf folgenden ersten Geburt von Zellmaker et al. (17) ist die Kryokonservierung ein weltweit anerkanntes Verfahren zur Lagerung von vitalen Zellen bei einer Temperatur von -196 Grad Celsius (2).

Auf Grund der extrem niedrigen Temperaturen, bei denen der Stoffwechsel der Zellen praktisch auf Stillstand gestellt wird, ohne die Zelle jedoch nachhaltig zu schädigen, bedarf es, um überhaupt ein Überleben des Vorganges zu ermöglichen, einerseits kryoprotektiver Lösungen und andererseits besonderer Verfahren zum Einfrieren und Auftauen.

Dabei haben sich zwei Modelle zur Kryokonservierung etabliert. Das slow freezing, auch langsames Einfrieren genannt, und die Vitrifikation. In den letzten Jahren hat die Vitrifikation an Beliebtheit gewonnen, sodass in den meisten Labors dieses Einfrierprotokoll angewandt wird. Die Ziele beider Protokolle sind den Metabolismus der Zelle zum Stillstand zu bringen, dabei jedoch die Struktur aufrechtzuerhalten sowie annehmbare Überlebensraten beim Einfrieren als auch beim Auftauen zu schaffen (2).

Vier Schritte markieren sowohl das Protokoll des langsamen Einfrierens, als auch das der Vitrifikation. Der erste Schritt ist, der Zelle, unter Zuhilfenahme eines Kryokonservierungsmittels, Wasser zu entziehen. Bei der gewünschten Temperatur von -196° Celsius werden die Zellen gelagert. Sobald die Entscheidung zur Reimplantation gefallen ist, werden sie wieder rehydriert, indem das Kryokonservierungsmittel entzogen und Wasser hinzugefügt wird. Zu guter Letzt werden die Zellen in eine physiologische Umgebung rücktransferiert (2).

### 4.1 Slow freezing

Beim Prozess des langsamen Einfrierens wird mit niedrigen Dosen der Kryoprotektiva der Austritt des intrazellulären Wassers durch langsames Senken der Temperaturen erreicht. Das Gefährliche für die Zellen ist hierbei nicht die Lagerung bei der

Endtemperatur, sondern der Temperaturbereich von  $-15^{\circ}\text{C}$  bis  $-60^{\circ}\text{C}$ , den sie sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen unbeschadet überstehen müssen (18).

Das Ziel des Einfrierprozesses ist es, die intrazelluläre Kristallisation zu verhindern, die die Zellen unwiderruflich schädigen würde. Passiert das Einfrieren in der vorgegebenen Zeit, verlässt das Wasser den Intrazellularraum schnell genug, die Zelle dehydriert, was bedeutet, dass die Eiskristallbildung verhindert wird.

Bei einer genau definierten Kühlrate von  $0,3-2^{\circ}\text{C}$  pro Minute und einer Kühlprotektiva-Konzentration von zirka 1,5 M wird der Prozess des langsamen Einfrierens vollzogen. Beim zu langsamen Kühlen kann es zur extrazellulären Eisbildung sowie zu hohen intrazellulären Elektrolytkonzentrationen kommen, werden die Zellen zu schnell eingefroren, kann es zu intrazellulärer Eisbildung kommen (2).

Die Kryoprotektiva, die zum Einfrieren nötig sind, können die Zellen jedoch auch schädigen. Dabei steigt die Toxizität mit der Konzentration sowie der Expositionszeit an (19). Ein wichtiger Faktor beim slow freezing ist die Geschwindigkeit in der das Wasser und die Kryoprotektiva durch die Zellmembran durchtreten, welche abhängig von der Membranzusammensetzung, der temperaturabhängigen Permeabilität der Zellmembran für Wasser und Kryoprotektiva (20) und dem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen (20,21) ist (2).

## 4.2 Vitrifikation

„Die Vitrifikation einer Lösung ist definiert als die »Solidifikation von Wasser ohne Eiskristallbildung bei Temperaturen weit unter  $0^{\circ}\text{C}$ , verursacht durch eine extreme Erhöhung der Viskosität der Lösung während des Abkühlens« (22,23)“ (2).

Um dieser Definition gerecht zu werden, müssen verschiedene Punkte beachtet werden. Neben hoher Kühlraten und einer hohen Konzentration an Kryokonservierungsmitteln müssen Trägersysteme eingesetzt werden, welche entweder einen niedrigen Isolierungsindex oder eine hohe Wärmeleiteigenschaft aufweisen. Auf Grund der Toxizität der Kryokonservierungsmittel, muss eine Mischung aus zwei verschiedenen Kryokonservierungsmitteln eingesetzt werden, von denen jeweils eines ein permeables (membrangängiges, mit einem Molekulargewicht unter 100) und eines ein nicht permeables (nicht membrangängiges, mit einem Molekulargewicht von 300-

400) Kryokonservierungsmittel darstellen muss. Diese Mittel dürfen nicht auf einmal, sondern müssen Schritt für Schritt hinzugefügt werden. Während die Temperatur erniedrigt wird, müssen sich die Zellen in der hochkonzentrierten Vitrifikationslösung befinden, deren Volumen jedoch im Nanoliter- Bereich liegen muss (2).

Der Prozess der Vitrifikation beginnt mit der Dehydrierung. Dabei werden die Zellen z.B. in 7,5% Ethylenglycol/Dimethylsulfoxid + 20% Protein inkubiert, wobei die Dauer der Inkubation von dem Typ der Zelle abhängt. Am Längsten werden Eizellen inkubiert, gefolgt von Zygoten und Tag 3 Embryonen. Tag 5 Blastozysten werden am Kürzesten inkubiert. Danach werden die Zelltypen für 60-70s in 15% Ethylenglycol/Dimethylsulfoxid + 0,5 M Zucker + 20% Protein inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Zellen auf das Trägersystem aufgebracht und direkt oder indirekt in flüssigen Stickstoff getaucht (2).

Bei der Rehydrierung werden die Zellen, nachdem die aus dem flüssigen Stickstoff genommen wurden, zuerst in eine 1M Zuckerlösung, anschließend in eine 0,5 M Zuckerlösung und zum Schluss in eine zuckerfreie Lösung überführt. Dieser Prozess gewährleistet den Austausch von Konservierungsmittel und Wasser, die Zelle schwillt dabei sehr langsam an, was sich auch positiv auf das Überleben nach dem Auftauen bemerkbar macht (2).

### **4.2.1 Vitrifikation von Eizellen**

Erst seit der Entwicklung der Vitrifikation hat sich das Einfrieren der Eizellen in der Klinik etabliert. Nachdem 1999 die erste Lebendgeburt gelang, liegen mittlerweile Daten von 2000 Geburten nach Vitrifikation von Eizellen vor. Durch die Unterschiede in der Zellgröße, der reduzierten Durchgängigkeit der Membran, dem geringeren Volumen/Oberflächenverhältnis im Vergleich zu Zellen in anderen Teilungsstadien, sind die Eizellen in der Aufnahme der Kryoprotektiva und Abgabe von Wasser weniger effizient, was möglicherweise den ehemals begrenzten Erfolg im Einfrierprozess erklären könnte. Diese Methode Eizellen zu konservieren ist besonders für jene Frauen von entscheidender Wichtigkeit, welche sich einer Chemotherapie aussetzen müssen oder wegen beruflicher oder privater Gründe die Familienplanung zeitlich nach hinten verschieben (2).

### **4.2.2 Vitrifikation von Blastozysten**

Ähnlich wie die Eizellen sind die Blastozysten, wegen ihres flüssigkeitsgefüllten Blastozells, sehr empfindlich gegenüber tiefen Temperaturen. In der Routine ist die Kryokonservierung von Blastozysten aber besonders beliebt. Vorteile davon sind, dass die Mehrlingsrate mit dem Transfer von einzelnen Blastozysten reduziert werden kann. Außerdem sind die Schwangerschaftsrate sowie die Implantationsrate im Vergleich zu kryokonservierten Vorkernstadien oder Teilungsstadien erhöht. Da die Zellen am Tag 5 schon zwischen 50 und 150 Zellen aufweisen, können auch etwaige Kälteschäden vom Embryo besser toleriert werden.

In einer Studie des IVF Labor River North in Chicago konnten zwischen Jänner 2004 und April 2011 13.125 Blastozysten vitrifiziert werden. Die Überlebensrate belief sich hierbei auf 96,8%, die Implantationsrate bei 30,2% und die klinische Schwangerschaftsrate bei 43,1% (2).



## 5 WISSENSCHAFTLICHE STUDIE

### 5.1 Einleitung

Seit der Erforschung und Entwicklung von Kulturmedien, die den Verhältnissen des Uterus immer weiter nachempfunden werden können, geht der Trend in der assistierten Reproduktionsmedizin streng dazu, Embryonen, nicht wie in früheren Tagen bereits an Tag 3 zu reimplantieren, sondern, sie bis zur Tag 5- Blastozyste zu kultivieren und erst dann in den Uterus der Frauen zu überführen (24). Der Vorteil dieser längeren Bebrütung liegt darin, dass sich mit der Differenzierung der verschiedenen Zellen Qualitätsmerkmale von Embryonen erkennen lassen, die zu einer höheren Implantations-, und Schwangerschaftsrate führen können (25).

Als Erstbeschreiber haben sich Gardner et al. Merkmalen angenommen und diese beschrieben. Hierbei wird die Blastozyste in 6 Entwicklungsstadien eingeteilt, additiv wird noch die Qualität der ICM und des TE in 3 mögliche Qualitätskategorien aufgeteilt. Im Stadium 1 der Blastozyste ist die Blastocoel- Höhle kleiner als die Hälfte des Volumens des Embryos. Im Stadium 2 ist die Blastocoel- Höhle zumindest halb so groß wie das Volumen des Embryos. Die Blastocoel- Höhle in Stadium 3 füllt den Embryo zur Gänze aus. Im folgenden Stadium 4, ist die Blastozystenöhle und somit der Embryo bereits größer als das ursprüngliche Volumen der Eizelle, außerdem hat sich die Zona Pellucida verdünnt. Stadium 5 Blastozysten sind wie im Stadium 4 größer als die ursprünglichen Embryos, zusätzlich bricht der TE durch die ZP durch. Das letzte Stadium 6 beinhaltet jene Blastozysten, die bereits vollständig aus der ZP geschlüpft sind (26). Stadium 1 + 2 werden zum Begriff der „frühen Blastozyste“ zusammengefasst, Stadium 3 nennt man „volle Blastozysten“, Stadium 4 werden auch „expandierte Blastozysten und 5+6 „schlüpfende Blastozysten“ genannt.

Hat die Blastozyste das Stadium 3 erreicht, können die beiden weiteren Merkmale, nämlich die innere Zellmasse einerseits, und der Trophektoderm andererseits in ihre Güte eingeteilt werden. Hierbei werden 3 Kategorien beschrieben. Die erste- und gleichzeitig beste- Kategorie der ICM; Kategorie 1, besteht aus vielen dicht gepackten Zellen, die zweitbeste, Kategorie 2, beinhaltet einige gruppierte Zellpakete und die

schlechteste, Kategorie 3, wenige einzelne Zellen. Die Einteilung der TE- Qualität erfolgt ähnlich der ICM- Einteilung. Kategorie 1 weist viele Zellen auf, welche in einer engen Gemeinschaft stehen. In der zweiten Kategorie finden sich weniger Zellen, deren Epithel nicht so kompakt geformt ist. Mit der schlechtesten Kategorie werden jene TE bewertet, die nur sehr wenige Zellen aufweisen und dadurch kein adäquates Epithel formen können (26).

Man beschäftigte sich aber nicht nur damit, Zusammenhänge zu neuen Parametern zu schaffen, um die Implantations-, und Schwangerschaftsrate zu verbessern, sondern auch, um Korrelationen mit dem neonatalen Outcome zu finden. Dabei wurden unter anderem zwei verschiedene Kulturmedien verglichen, mit dem Ergebnis, dass Embryonen in Medium A ein höheres Geburtsgewicht aufwiesen als in Medium B (27). Folgestudien zeigten, dass sich dieses postnatale Gewicht zumindest auf die ersten beiden Lebensjahren auswirkt (28). In einer weiteren Untersuchung konnten Nelissen et al. zeigen, dass bei Menschen das intrauterine Wachstum bis zum zweiten Trimester der Schwangerschaft auf bestimmte Faktoren sensibel scheint und so beeinflusst werden kann (29).

Diese und weitere Ergebnisse in der Forschung waren der Auslöser für die folgende prospektive Studie die, wie bereits erwähnt, am Kinderwunsch Zentrum in Linz durchgeführt wurde. Die Studie hat sich damit beschäftigt, ob sich die Größe oder die Qualität von innerer Zellmasse (ICM) und Trophektoderm in einer veränderten Lebendgeburtenrate, einem veränderten Geburtsgewicht und/oder Plazentagewicht sowie Geschlecht nach frischem oder aufgetautem Einzelblastozysten- Transfer bemerkbar macht.

Aufgrund der neuen Erkenntnisse, die mit der statistischen Auswertung einhergingen, ist es geplant, die Studie bei wissenschaftlichen Magazinen einzureichen und möglicherweise auch zu veröffentlichen.

## 5.2 Material und Methoden

Diese prospektive Studie inkludiert alle frischen und aufgetauten Tag 5 Blastozysten innerhalb eines 18-monatigen Zeitraumes, welche folgende Einschlusskriterien bestanden haben.

- I. Die Expansion der Blastozysten soll nach den in der Einleitung beschriebenen Gardner- Kriterien (26) zumindest das Stadium der vollen Blastozyste (25) aufweisen, um so das Vorhandensein von ausreichend Blastocoel und den unterschiedlichen Zelllinien zu gewährleisten.
- II. Die Fotodokumentation der Blastozysten muss stets vom gleichen Untersucher durchgeführt werden, um so Unterschiede in der Befundung zwischen mehreren dokumentierenden Personen zu vermeiden und äußere Einflussfaktoren so gering als möglich zu halten (30).
- III. Um eine konstante Messung durchführen zu können, müssen in dem ausgewählten Bildabschnitt sowohl ICM als auch der Trophektoderm der Blastozysten fokussiert sein.
- IV. Das maximale Alter der Frauen muss unter 40 Jahren liegen, um zusätzliche altersabhängige Einflussfaktoren so gering als möglich zu halten.

Pro Patientin wurde nur ein frischer Blastozystentransfer in die Studie inkludiert. 29 Patientinnen oder 11,4% des Gesamtpatientenguts bekamen jedoch während der Studiendauer nach dem frischen Transfer noch einen zweiten Zyklus und die Reimplantation einer aufgetauten Blastozyste. Dieser Fakt, und die oben genannten Kriterien führten zu einer Gesamtsumme von 254 Einzelblastozysten- Transfers bei einer Gesamtzahl von 229 Patientinnen.

Bei der Stimulation wurden 58% der Frauen nach dem GnRH- Antagonisten- und 42% nach dem Agonisten- Schema therapiert. Von jenen Patientinnen, die nach GnRH- Antagonist Protokoll behandelt wurden, verwendeten 68 Frauen zuerst entweder Elonva<sup>®</sup> oder Puregon<sup>®</sup> von der Firma MSD und 62 Patientinnen Menopur<sup>®</sup> der Firma Ferring, zur kontrollierten ovariellen Stimulation. Der Antagonist, der injiziert wurde, um einen vorzeitigen Anstieg des luteinisierenden Hormons zu vermeiden, war Orgalutran<sup>®</sup>.

Im zweiten Protokoll, wurden wiederum 52 Patientinnen mit dem Gonadotropin Puregon<sup>®</sup> und 43 Patientinnen mit Menopur<sup>®</sup> behandelt. Zur Downregulation wurde Suprecur<sup>®</sup> der Firma Sanofi- Aventis mit dem Gonadotropin- releasing- hormone- Agonisten Buserelin verwendet.

Die Ovulation wurde ausgelöst, indem 5.000-10.000 IU hCG mittels Pregnyl<sup>®</sup> von der Firma MSD zugeführt wurden. 36- Stunden, nachdem die Ovulation eingeleitet wurde, wurden die Eizellen mittels transvaginaler, Ultraschall- gezielter Punktion aus den Ovarien der Patientinnen entnommen.

Die mittlere Stimulationsdauer der 229 Patientinnen betrug  $10,8 \pm 2,5$  Tage, die Höhe des Estradiols lag am Tag der Induktion des Eisprungs bei  $1452 \pm 1290$ pg/mL.

Maximal 40 Stunden nach der hCG Injektion wurden die Eizellen je nach Samenqualität mittels ICSI (n=200) oder IVF (n=25) befruchtet. Um für die herkömmliche IVF eine so gut als mögliche Qualität der Spermien zu garantieren, wurden spezielle Kammern verwendet, die nur jene Spermien auswählen, welche sich schnell vorwärts bewegen. Sich langsam bewegende Spermien werden hierbei aussortiert (31). Bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion wurde als Auswahlkriterium die sogenannte swim- up- procedure angewandt.

Sechzehn bis zwanzig Stunden nach der Insemination wurden die Eizellen Kumulus- Oozyten- Komplexe das erste Mal auf eine Befruchtung kontrolliert. Der Tag 1 war insofern entscheidend, als dass nur Zygoten mit 2 Vorkernen in der Kultur mit 30µl EmbryoAssist Medium der Firma Origio belassen wurden (32). Am dritten Tag wiederum, wurden die in- vitro- kultivierten Embryonen in 30µl Tropfen des BlastAssist Mediums der Firma Origio transferiert.

Den Alpha-, und ESHRE- Richtlinien (33) zufolge, wurden die Embryonen im frühen Teilungsstadium auf die Anzahl und Größe der Blastomeren sowie auf Fragmentierung, und das Vorhandensein von mehreren Zellkernen untersucht. Nach diesen genannten

Prozessen endeten alle Kulturen in einer Tag 5- Blastozyste. Ungefähr 70% davon erfüllten die Kriterien zur möglichen Reimplantation.

Der Auftauprozess der kryokonservierten Embryonen wurde mit GM501 VitriStore, einem kommerziell erhältlichen Vitrifikationskit, durchgeführt. Dabei wurden in dem aus drei Schritten bestehenden Prozess Ethylenglycol und DMSO als Kryoprotektiva verwendet. Für das Erwärmen werden die Blastozysten in vier verschiedene Kulturmedien auf der Basis von PBS und HSA transferiert. In den 4 Medien finden sich unterschiedliche Konzentrationen an Saccharose. Beginnend bei der höchsten Konzentration werden die Embryonen Schritt für Schritt in die jeweils niedrigere überstellt. Im nächsten Schritt werden- wie die frischen Blastozysten- auch die einst kryokonservierten in das BlastAssist Medium versetzt, von dem aus der Blastozystentransfer geschieht. Auf diesen Schritt des Erwärmens wird besonderes Augenmerk gelegt, um die Erfolgsrate eines gelungenen Auftauprozesses so hoch als möglich zu halten.

Da das Labor des Kinderwunschzentrums Linz seit jeher stets Blastozysten anhand der Größe ihrer inneren Zellmasse auswählt, war für die Durchführung der aktuellen Studie laut interner Ethikkommission kein eigener Ethikantrag notwendig. Der Fakt, dass nur Embryonen mit den Qualitätskriterien ausgesucht werden, reduzierte die Gesamtzahl der zu untersuchenden Blastozysten um die Zahl 2, da jene laut den nach Gardner beschriebenen Kriterien (25) eine ICM der Klasse C aufwiesen, beziehungsweise aus zu wenigen Zellen bestanden.

Es gilt generell die Regel, dass bei der Vitrifikation weder die ICM noch der TE eine Qualität schlechter als 2 aufweisen darf. In der Studie wurde nur eine Ausnahme akzeptiert. Es wurden jene drei Blastozysten trotz TE- Qualität 3 eingeschlossen, welche einerseits die einzig verfügbaren des Elternpaares darstellten und andererseits im Gegenzug eine ICM der besten Qualität, also 1, aufwiesen. In Erinnerung sollte behalten werden, dass jedes Labor in der Routine darauf Wert legt, die Schwangerschaftsrate und demzufolge die Geburtenrate so hoch als möglich zu halten. Daher werden zum Transfer nur jene Blastozysten mit der besten ICM- Qualität und – Größe selektioniert, weshalb in der Studie die Anzahl der Gruppe, die ICM- Kategorie 3- Blastozysten enthält, gering ist.

Laut der Studie von Gardner (25) lässt dieses Vorgehen jedoch ein geringeres positives Outcome erwarten. Um diesem Outcome entgegen zu wirken, wurde in der aktuellen

Studie versucht, noch weitere mögliche Qualitätskriterien zu untersuchen und in Zusammenhang mit dem neonatalen Outcome zu bringen.

Zu diesen zusätzlichen Parametern gehörte unter anderem der maximale Blastozysten-Durchmesser von Zona Pellucida zu Zona Pellucida, gemessen wurde hierbei mit einer Software namens Octax Eyeware<sup>®</sup>. Im seltenen Fall des Auftretens einer ovalen Blastozyste (34) wurde der Mittelwert zwischen minimaler und maximaler Ausdehnung berechnet.

Der Untersucher, der die Fotoaufnahmen durchführte, hatte besonderes Augenmerk darauf zu legen, dass sowohl ICM als auch Trophektoderm immer gemeinsam im Fokus waren. Vor allem wurde Interesse darauf gelegt, dass das Bild die ICM auch im Falle einer ovalen Form in ihrer ganzen Dimension repräsentiert.

Die Messung der ICM wurde auf 3 verschiedene Arten durchgeführt:

1. nach Richter et al. (35)
2. mit Hilfe der Kreis/Ellipsen- Berechnung
3. semiautomatisch durch Umranden der ICM- Grenzen

Die erste wurde nach den Kriterien von Richter et al. (35) durchgeführt. Hierbei wurde mittels CorelDraw Graphics Suite X4 die maximale Länge ermittelt. Zu dieser maximalen Länge wurde die im rechten Winkel stehende maximale Breite vermessen. Anschließend wurden beide Werte multipliziert. Außerdem wurde der Rundheitsindex (RI) berechnet. Indem, basierend jeweils auf den beiden erhaltenen Daten der Richter-Messung der zahlenmäßig größere Wert, sei es Länge oder Breite, durch den zahlenmäßig kleineren Wert dividiert wurde. Umso näher das Ergebnis bei der Zahl 1 liegt, umso runder ist die ICM, umso weiter sich der Wert von der Zahl 1 entfernt, umso ovaler ist die innere Zellmasse (35).

Die dritte Messung wurde semiautomatisch durchgeführt. In CorelDraw X4 wurde zuerst der Umfang der inneren Zellmasse umrandet (siehe Abbildung 4; die ICM ist weiß umrandet, der RI liegt bei 1.05, die Fläche wurde mit  $3472 \mu\text{m}^2$  berechnet.

Trophektoderm- Zellzahl liegt bei 9) und die daraus resultierende Figur als DXF- Datei in das Computerprogramm SolidWorks importiert. Dort eingefügt, war es möglich, die Fläche jener zuvor umrandeten Figur zu berechnen.

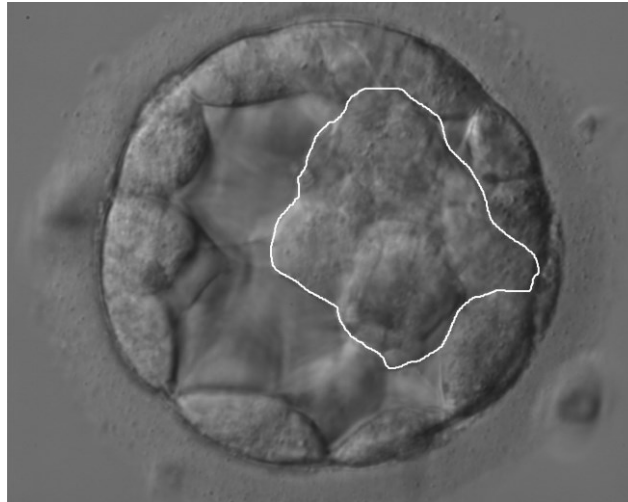


Abbildung 4: Umrandung der ICM in CorelDraw

Quelle: eigene Darstellung

Der Trophektoderm wurde quantitativ ermittelt, indem nach der Messung der ICM die Zahl der TE-Zellen am Bildausschnitt angegeben wurde (35). Da es bei ein paar Fotos Diskrepanzen zwischen der voreingestellten Größe des Bildausschnittes von Octax Eyeware und der Größe der Blastozyste gab, (dabei handelte es sich hauptsächlich um Gardner- Stadien 4 und 5) wurde in diesen speziellen Fällen die Zellzahl nicht hinterher am Foto, sondern direkt vom Untersucher unter dem Mikroskop ermittelt. Neben der Zellzahl wurde auch der TE jeder Blastozyste nach den klassischen bereits angeführten Gardner- Kriterien in ihre Qualität eingeteilt (26).

Im Gegensatz zu den frischen Blastozysten, wurden die einst kryokonservierten, nun aufgetauten Embryonen, innerhalb von zwei Stunden, nachdem sie sich vollständig reexpandiert haben, vermessen (36).

### 5.3 Statistik

Die Daten wurden mittels SPSS Version 22 ausgewertet. Geburtsgewicht sowie Plazentagewicht wurden auf das Gestationsalter durch Zuhilfenahme einer nicht-linearen- Regression korrigiert. Hierbei sollte erwähnt werden, dass die Rückmeldung über das Geburtsgewicht in den jeweiligen Krankenhäusern bei 100% lag, die Rückmeldung über das Plazentagewicht wurde nur zu 75% erbracht. Unterschiede in den Mittelwerten der 3 Gruppen (in Bezug auf Lebendgeburt, Abort und keine eingetretene Schwangerschaft) basierend auf den Normalwerten, wurden unter der Darstellung der Multivariate ANOVA (Analysis of Variance) berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Der Behandlungserfolg wurde mit Wilks Lambda untersucht. Da keine positiven, die drei Gruppen übergreifenden Auswirkungen herausgefunden werden konnten, wurde sowohl auf Folgebetrachtungen mit der Univariate ANOVA, als auch auf Posthoc- Analysen verzichtet. Dasselbe gilt für die Subpopulation „Lebendgeburten“ mit der Betrachtung auf die Gruppen „männlich“ oder „weiblich“. Mittlere Differenzen zwischen nicht normal- verteilten Variablen der drei oben genannten Gruppen wurden mittels des Median- Tests für unabhängige Stichproben ermittelt.

Im Falle von Signifikanzen wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse angewandt, um den Zusammenhang zwischen der Variable und beispielsweise der Lebendgeburt weiter untersuchen zu können. Lineare Regressionsmodelle wurden verwendet um eine mögliche Korrelation zwischen dem (korrigierten) Geburtsgewicht, dem Plazentagewicht und der Größe/Qualität der inneren Zellmasse herauszufiltern. Der Einfluss des Vitrifikationsvorganges der kryokonservierten Blastozysten auf das Geburts-, beziehungsweise Plazentagewicht wurde unter Zuhilfenahme der Multivariate ANOVA analysiert. Der Effekt wurde wie oben genannt mit Wilks Lambda untersucht. Positive Gesamtergebnisse wurden anschließend mit einer getrennten einfaktoriellen ANOVA überprüft. Der Chi- Quadrat- Test wurde für die univariate Untersuchung der Stichproben verwendet. Zu guter Letzt wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt, um Unterschiede der ICM in vollen, expandierten und schlüpfenden Blastozysten herausfiltern zu können.



## 5.4 Ergebnisse

Von den 254 Einzelblastozysten- Transfers konnte in 139 Fällen eine Schwangerschaft, mittels positivem hCG- Test, nachgewiesen werden, was einer Schwangerschaftsrate von 54,7% entspricht.

Hierbei konnte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Schwangerschaften nach frischem Blastozystentransfer (55,6%) und der Anzahl der Schwangerschaften nach Transfer von vitrifizierten/erwärmten Blastozysten (53,3%), finden lassen. Auch ohne signifikantes Ergebnis verlief die Untersuchung, ob sich die Lebendgeburtenrate in der Gruppe der frischen Blastozysten (40,7%) von der Lebendgeburtenrate der einst kryokonservierten Blastozysten (35,9) unterscheidet.

Die Lebendgeburtenrate der frischen Blastozysten, die nach den bereits oben beschriebenen Kriterien nach Gardner et al. (26) gescreent wurden, sind in Tabelle 1 ersichtlich gemacht. Jene 7 Blastozysten, welche entweder ICM-, oder TE- Qualität 3 aufwiesen, wurden in der Tabelle nicht berücksichtigt.

Expansionsgrad	ICM (1)		ICM (2)	
	TE (1)	TE (2)	TE (1)	TE (2)
3	8/16 (50,0)	5/26 (19,2)	1/2 (50,0)	1/3 (33,3)
4	25/57 (43,8)	19/43 (44,2)	2/3 (66,6)	1/9 (11,1)
5	30/65 (46,2)	7/22 (31,8)	na	0/1
Σ	63/138 (45,7)	31/91 (34,1)	3/5 (60,0)	2/13 (15,4)

Tabelle 1: Lebendgeburtenrate gruppiert nach Gardner- Kriterien

Quelle: eigene Darstellung

Aus den Schwangerschaften resultierten 99 Lebendgeburten, die berechnete Lebendgeburtenrate liegt bei 39,0%. Durch Teilung der reimplantierten Einzelblastozysten in- utero kam es zur Geburt von 3 monozygoten Zwillingen, welche für die statistische Auswertung jedoch ausgeschlossen wurden.

Das mittlere Gestationsalter, in dem die Einlinge entwickelt wurden, belief sich auf  $39 \pm 2,5$  Wochen. Das mittlere Geburtsgewicht wurde mit  $3314 \pm 703$ g berechnet. Die detaillierten Geburtsgewichte aufgetragen auf ihre Schwangerschaftswoche bei Geburt sind in Abbildung 2 ersichtlich. Die übermittelten Daten des Plazentagewichts ergaben ein mittleres Gewicht von  $589 \pm 136$ g. Die Multivariate ANOVA untersuchte einen potentiellen Effekt der Vitrifikation auf Geburtsgewicht und Plazentagewicht und konnte ein positives Ergebnis ( $P=0,013$ ) zeigen. Post- hoc Analysen ergaben, dass, verglichen mit frischen Blastozysten, zuerst kryokonservierte und vor dem Transfer aufgetaute Blastozysten, mit einem signifikant höherem Geburtsgewicht ( $P=0,012$ ), nicht jedoch mit einem höheren Plazentagewicht ( $P=0,106$ ) einhergehen. Lag das Geburtsgewicht der vitrifizierten Blastozysten bei  $3568 \pm 744$ g, brachten die Neugeborenen nach frischem Transfer nur  $3187 \pm 691$ g auf die Waage. Was die Art der Befruchtung, genauer gesagt in- vitro- Fertilisation oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion anbelangt, konnte betreffend des Geburtsgewichts kein Zusammenhang ( $P>0,05$ ) gefunden werden.

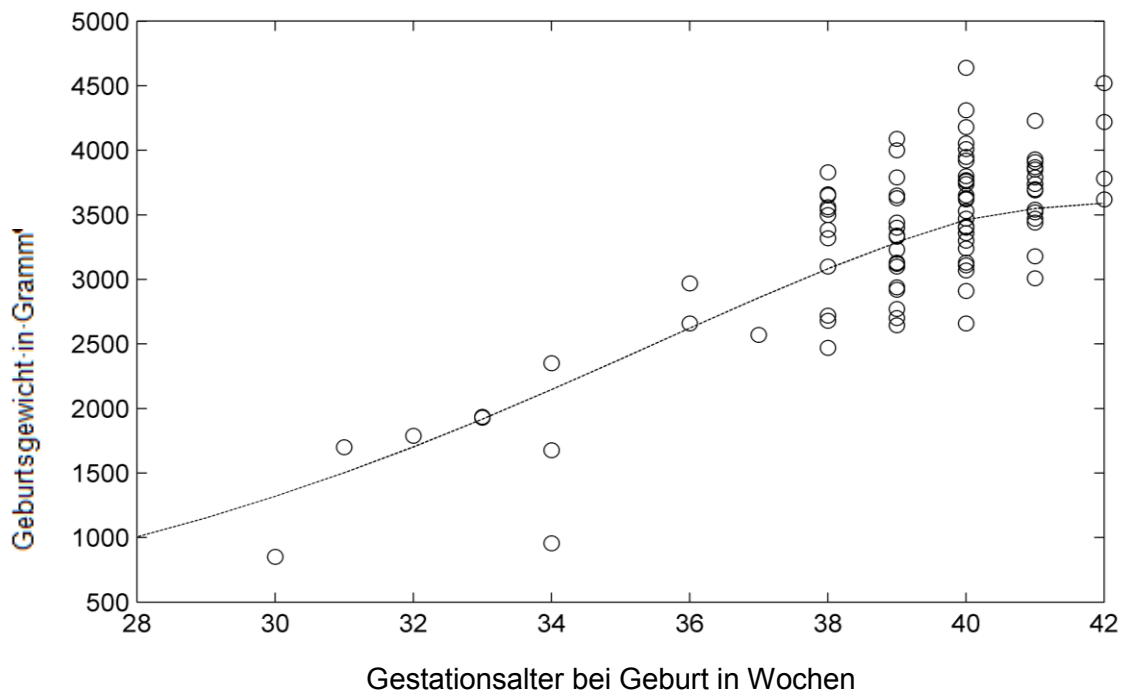


Abbildung 5: Gestationsalter bei Geburt in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht

Quelle: eigene Darstellung

Von den 66 Kindern, die nach frischem Blastozystentransfer geboren wurden, wiesen zwei Kinder Malformationen im Sinne eines großen foramen ovale und einer Duodenumaplasie auf, zudem trat ein Fall von zystischer Fibrose auf, was einer Missbildungsrate von 4,6% entspricht. In der Gruppe der aufgetauten Blastozysten (n=33) wurde ein Kind mit Trisomie 18 entwickelt, die Missbildungsrate liegt hier bei 3%. Weder qualitative noch quantitative Merkmale konnten mit den Malformationen in Verbindung gebracht werden.

### 5.4.1 Expansion

Die Blastozysten wurden aufgrund ihrer Expansion in drei Gruppen aufgeteilt. Dabei nahmen 16% das volle Blastozystenstadium ein, 48% wiesen das expandierte Blastozystenstadium auf und 36% wurden dem Stadium der schlüpfenden Blastozyste zugeteilt. Die zugehörigen mittleren Durchmesser betragen  $174 \pm 9\mu\text{m}$ ,  $191 \pm 15\mu\text{m}$ , und  $202 \pm 14\mu\text{m}$ .

Zwischen der Implantationsrate, der Schwangerschaftsrate, der Lebendgeburtenrate sowie dem Geburtsgewicht und dem Grad der Expansion konnte keine statistische Signifikanz gefunden werden. Das gleiche Ergebnis zeigte auch die Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen den Gardner et al.- Einteilungsschema (25) und den oben genannten Parametern. Der Vergleich der Mittelwerte quantitativer und qualitativer Beurteilungsmerkmale der Blastozysten wird in den untenstehenden Tabellen 2, 3 und 4 aufgezeigt. Auch aus diesen Tabellen wurden jene sieben Blastozysten mit ICM, oder TE Qualität 3 ausgeschlossen.

Stadium 3	ICM (1)		ICM (2)	
	TE (1)	TE (2)	TE (1)	TE (2)
n	16	25	2	2
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	$176 \pm 10$	$175 \pm 7$	$174 \pm 5$	$181 \pm 5$
Größe der ICM ( $\mu\text{m}^2$ )	$3643 \pm 1142$	$4144 \pm 1229$	$3416 \pm 110$	$5105 \pm 190$
Anzahl TE- Zellen	$9 \pm 1$	$8 \pm 2$	$10 \pm 3$	$7 \pm 1$

Tabelle 2: Übersicht über Ergebnisse quantitativer und qualitativer Parameter Stadium 3

Quelle: eigene Darstellung

Stadium 4	ICM (1)		ICM (2)	
	TE (1)	TE (2)	TE (1)	TE (2)
n	59	43	3	8
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	193 $\pm$ 13	188 $\pm$ 14	210 $\pm$ 17	179 $\pm$ 16
Größe der ICM ( $\mu\text{m}^2$ )	3955 $\pm$ 1316	3765 $\pm$ 1200	4233 $\pm$ 2283	3439 $\pm$ 1213
Anzahl TE- Zellen	11 $\pm$ 3	10 $\pm$ 3	10 $\pm$ 4	9 $\pm$ 3

Tabelle 3: Übersicht über Ergebnisse quantitativer und qualitativer Parameter Stadium 4

Quelle: eigene Darstellung

Stadium 5	ICM (1)		ICM (2)	
	TE (1)	TE (2)	TE (1)	TE (2)
n	66	22	0	1
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	198 $\pm$ 15	195 $\pm$ 13	na	180
Größe der ICM ( $\mu\text{m}^2$ )	3400 $\pm$ 1111	3302 $\pm$ 790	na	3811
Anzahl TE- Zellen	12 $\pm$ 3	12 $\pm$ 4	na	13

Tabelle 4: Übersicht über Ergebnisse quantitativer und qualitativer Parameter Stadium 5

Quelle: eigene Darstellung

#### 5.4.2 Innere Zellmasse

Bei Betrachtung der inneren Zellmasse konnte gezeigt werden, dass die neue semi-automatische Variante, die Fläche der ICM zu vermessen, signifikant, sowohl mit der Messung nach Richter et al. (35) ( $P < 0,001$ ) als auch mit dem Kreis/Ellipsen-Modell ( $P < 0,0001$ ), korreliert. In der Abbildung 6 wird deutlich, dass beide Messungen jedoch zahlenmäßig höhere Werte liefern, als die exakt umrandete Messvariante.

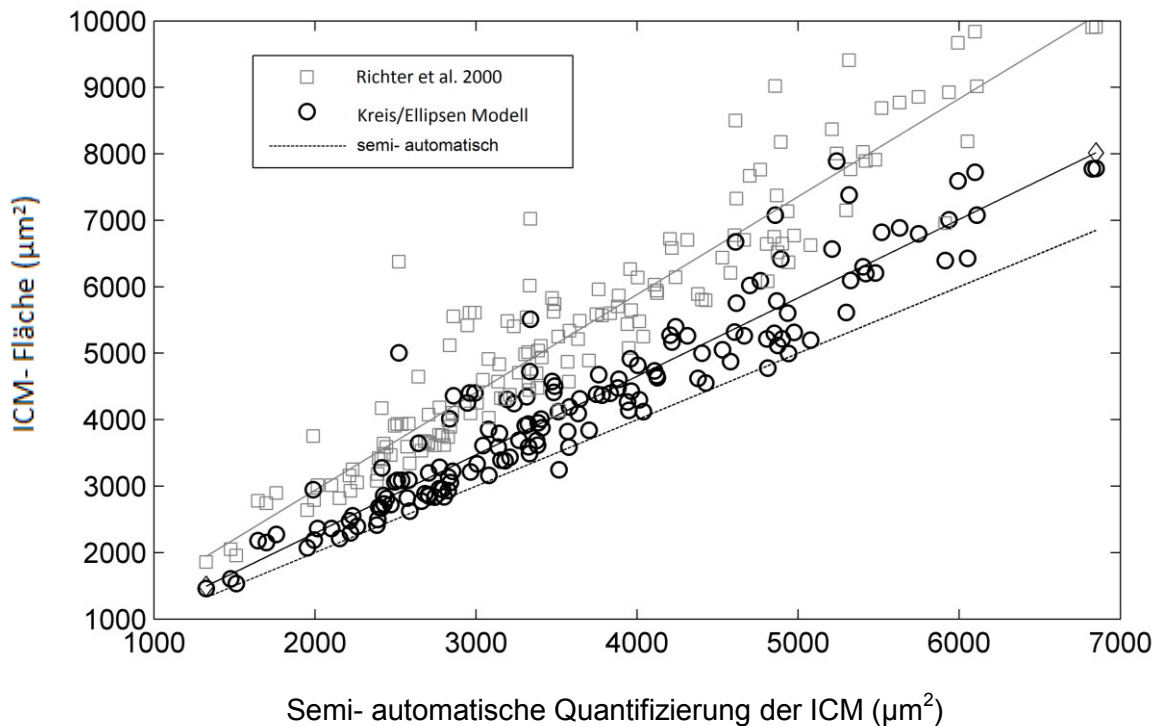


Abbildung 6: Vergleich zwischen semi- automatischen ICM Quantifizierung und Flächenberechnung nach Richter et al. (35) sowie Kreis/Ellipsen- Modell

Quelle: eigene Darstellung

Die mittlere Größe der ICM nach Messung der semi- automatischen Messvariante betrug  $3702 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 1216 \mu\text{m}^2$ ). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Größen der inneren Zellmassen von frischen Blastozysten ( $3655 \pm 1120 \mu\text{m}^2$ ) und den Größen der inneren Zellmassen von aufgetauten Blastozysten ( $3621 \pm 1286 \mu\text{m}^2$ ) entdeckt werden. Ebenso korrelierte die 2- dimensionale Größe der ICM weder mit dem Schwangerschafts- Outcome noch mit dem Geburtsgewicht, unabhängig, ob die semi- automatische Größenberechnung oder die Gardner et al.- Einteilung (25) untersucht wurde.

Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass mit der Expansion der Blastozysten die Größe ihrer inneren Zellmassen signifikant abnimmt. So zeigten schlüpfende Blastozysten ( $3380 \pm 1032 \mu\text{m}^2$ ) kleinere ICM als expandierte Blastozysten ( $4036 \pm 1180 \mu\text{m}^2$ ) ( $P < 0,01$ ) und jene wiederum kleinere innere Zellmassen als volle Blastozysten ( $3812 \pm 1309 \mu\text{m}^2$ ) ( $P < 0,05$ ).

### 5.4.3 Trophektoderm

Die Trophektoderm- Qualität ( $P=0,015$ ) und die Zellzahl ( $P=0,026$ ) waren die einzigen Parameter, welche einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Implantationsrate und der Schwangerschaftsrate zeigten. Die mittlere Trophektoderm- Zellzahl von Blastozysten, die später in einer Lebendgeburt endeten, war signifikant höher als die mittlere Zellzahl von Blastozysten die zu einer biochemischen Schwangerschaft, zu einer missed abortion oder zu einer Schwangerschaft ohne Herzaktivität des Embryos, führte ( $P<0,001$ ), was in der Abbildung 7 sichtbar wird.

Außerdem zeigt die Abbildung 7 auf, dass sich zwischen den Gruppen „Schwangerschaftsabort“ und „keine klinische Schwangerschaft“ die mittlere Zellzahl nicht wesentlich unterschied.

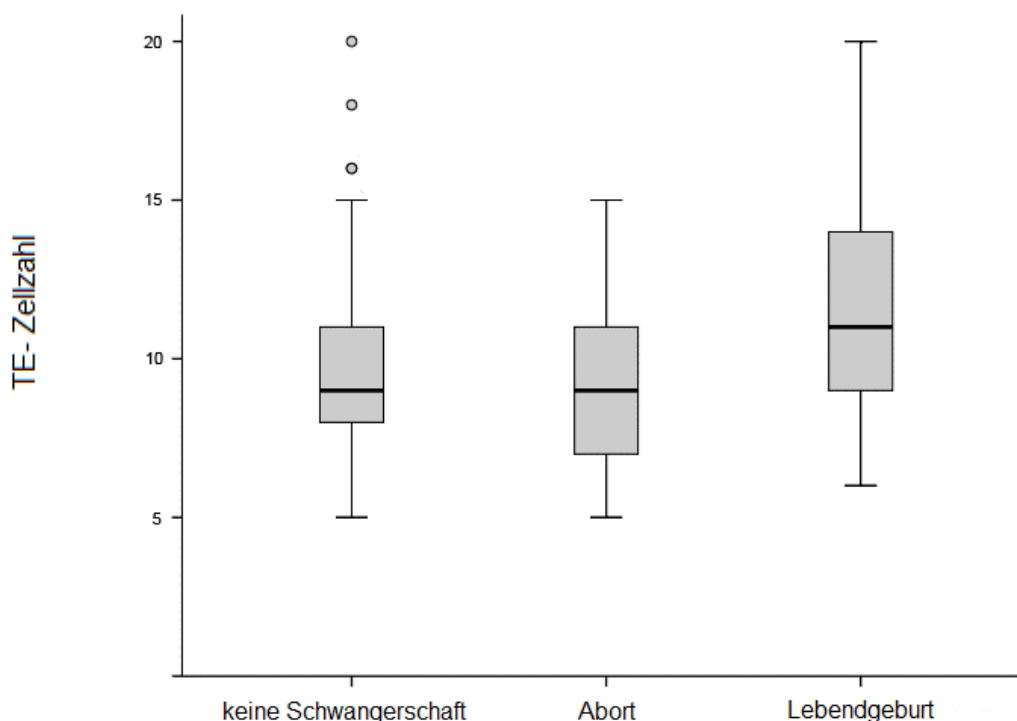


Abbildung 7: Unterschiede in den drei genannten Gruppen in Bezug auf die TE- Zellzahl

Quelle: eigene Darstellung

Die Verteilung der Lebendgeburten unterschied sich signifikant ( $P=0,039$ ) in Bezug auf die beiden unterschiedlichen Trophektoderm- Gruppen (Qualität 1 versus Qualität 2 und Qualität 3 gepooled). Unter Verwendung des binären logistischen Regressionsmodells, basierend auf der Zahl der Trophektoderm- Zellen, stellte die Odds Ratio für Lebendgeburten 1,175 dar ( $P<0,001$ ; 95% Sicherheitsintervall [1,08; 1,278]). Genauere Betrachtungen ergaben, dass, während dieselbe Odds Ratio der Blastozysten-Population mit TE- Qualität 1 nur geringfügig höher ist (OR 1,183;  $P=0,004$ ; Sicherheitsintervall [1,055; 1,326]), das Ergebnis für die Population mit schlechterer TE Qualität, nämlich 2 und 3 (OR 1,128;  $P=0,07$ ), am Rande des Signifikanzlevels liegt.

Aus diesen Ergebnissen kann man lesen, dass die Nummer der Trophektoderm- Zellen vor allem bei jenen Blastozysten in der Voraussage einer Lebendgeburt wichtig ist, die mit Qualität 1 bewertet wurden. In den Blastozysten mit TE- Qualität größer 1 scheint die Zellzahl keine so entscheidende Rolle im Outcome zu spielen.

Aber diesen Ergebnissen nicht genug, die statistische Auswertung zeigte außerdem, dass die Trophektoderm- Qualität auch einen Einfluss auf das Geschlecht des Nachwuchs zu haben scheint ( $P=0,04$ ). Odds- Ratio Analysen ergaben, dass die Chance einer männlichen Blastozyste, eine Trophektoderm- Qualität 1 aufzuweisen, 2,53 Mal höher ist, als die Chance einer weiblichen Blastozyste Trophektoderm- Qualität 1 aufzuweisen.



## 5.5 Diskussion

Die aktuellen Ergebnisse zeigten, dass das Geburtsgewicht der Neugeborenen nach dem Transfer von aufgetauten Blastozysten signifikant höher ist, als das Gewicht von Neugeborenen nach dem Transfer von frischen Tag 5 Blastozysten. Dieser Ausgang kann somit Studien unterstützen, in denen diese Aussage bereits gemacht wurde. Im Durchschnitt wiesen Kinder, die sich aus aufgetauten Blastozysten entwickelt haben, ein 85 bis 145g höheres Geburtsgewicht auf, als jene die aus frischen Blastozysten entstammten. Zusätzlich zeigte die Untersuchung, dass kryokonservierte Embryonen ein 33% niedrigeres Risiko aufwiesen, bei Geburt ein Gewicht von unter 2.500g auf die Waage zu bringen (37). Mehrere Forschungsgruppen haben sich in verschiedenen Studien damit beschäftigt, dass sowohl veränderte Kulturmedien als auch die Verlängerung der Kultivierung der Embryonen zu der Erhöhung des Geburtsgewichts beigetragen haben könnten (38,39,40). Obwohl in einem geringeren Ausmaß, konnte auch im Plazentagewicht eine kulturabhängige Veränderung, im Sinne einer Erhöhung des Gewichts, festgestellt werden (38). In der aktuellen Studie konnten Unterschiede im Plazentagewicht zwischen frischen und kryokonservierten Blastozysten jedoch nicht nachgewiesen werden. Das leicht erniedrigte mittlere Plazentagewicht könnte damit erklärt werden, dass in der Studie die verschiedenen Altersstufen nicht berücksichtigt wurden und daher Väter (41) und/oder Mütter (42) unterschiedlichen Alters inkludiert wurden.

Laut einer Forschungsgruppe rund um Nelissen kann das intrauterine Wachstum von Embryonen der assistierten Reproduktionstechnik bis zum zweiten Trimester der Schwangerschaft beeinflusst werden (43). Zusätzlich konnte er in einer anderen Arbeit hypomethylierte Gene in der Plazenta von Kindern nach IVF/ICSI darstellen (44). Dass also ein Unterschied im Outcome zwischen spontanen Schwangerschaften und nach künstlicher Befruchtung herrscht, wird seit längerem durch Studien bestätigt. Bisher fehlten aber noch die genauen morphologischen Kriterien der Blastozysten, die diese Korrelation schon früher, wie aktuell untersucht, am Tag 5 der Blastozyste durch die beiden Zelllinien der ICM oder des TE darstellen lässt.

Eine Schwierigkeit in der morphologischen Bewertung liegt auch darin, dass die Beurteilung der Qualität der Blastozysten immer auch vom subjektiven Empfinden der befundenden Personen abhängt. Dies konnte die Gruppe um Bendus et al. bei Tag 3 Embryonen zeigen (30). Vor allem der fließende Übergang von vollen zu expandierten Blastozysten sorgt für Probleme. Beide Zelllinien weisen die gleichen visuellen Merkmale auf und es liegt in der Hand des Embryologen die Zellzahl und die Kohäsion des TE anzugeben (45).

Richter et al. (35) waren die Ersten, die von der Gardner- Klassifizierung (25) Abstand genommen haben und ihre eigene Bewertungsskala für Blastozysten vorstellten. Dabei haben sie neben dem mittleren Blastozysten- Durchmesser (von ZP zu ZP) auch die Fläche der inneren Zellmasse berechnet, indem sie wie bereits oben erwähnt, die längste Länge mit der darauf längsten normalstehenden Breite multipliziert haben. Das Ergebnis wurde in  $\mu\text{m}^2$  berechnet. Zusätzlich haben sie die Form der ICM noch durch den sogenannten Rundheitsindex angegeben. Hierbei wurde die Länge durch die Breite dividiert, je näher das Ergebnis bei 1 lag, umso eher näherte sich die Form der ICM eines Kreises.

Die aktuellen Daten zeigen, dass die Größe der ICM durch die Messung nach Richter zu groß eingeschätzt wird. Die Ergebnisse nach Anwendung des Kreis/Ellipsen- Modells für die Berechnung der Fläche liefert zwar weniger hohe Zahlenwerte, ist jedoch trotzdem weit davon entfernt, sich als Goldstandard zu entwickeln.

Außerdem muss in Bezug auf die Ergebnisse der Untersuchung aufgezeigt werden, dass zweidimensionale Messungen, auch in ihrer exaktesten Durchführung, dreidimensionale Formen nicht zur Gänze widerspiegeln können.

Einen Schritt hin zur optimalen Messmethode konnten Santos Filho et al. (45) in ihrer Publikation erwirken. In ihrer Arbeit stellten sie eine semi- automatische Grading- Technik vor, die durch die Darstellung des Umrisses der ICM, eine genauere Messung der Fläche ermöglicht. Obwohl die Herangehensweise an die Messung in der aktuellen Studie nicht so komplex war, wie die von Santos Filho, ist es erfreulich, dass die Ergebnisse die gleiche Effizienz in Bezug auf die optimale Vermessung der ICM zeigen.

Folgende zwei Erklärungen sind mögliche Ursachen dafür, dass die Korrelation zwischen Fläche der inneren Zellmasse und dem Geburtsgewicht nicht aufgezeigt werden konnte. Der erste Erklärungsansatz ist, dass die ICM als drei- dimensionales- Gebilde auch durch die genaueste zwei- dimensionale- Messung nicht in ihrer exakten

Fläche dargestellt werden. Daher kann ein möglicher Zusammenhang zwischen Fläche und Geburtsgewicht somit nur durch eine Volumsberechnung der inneren Zellmasse bestätigt oder zur Gänze ausgeschlossen werden. Der zweite Punkt ist, dass der Zeitpunkt für die Messung der Fläche möglicherweise falsch gewählt war. In einer Studie wurde herausgefunden, dass die Zellen der ICM sich zwischen Tagen 5 und 6 verdoppeln, also nachdem die Fläche vermessen wurde, wohingegen die Anzahl der Trophektoderm- Zellen nahezu unverändert bleibt (46).

Daher könnte eine Messung am Tag 6 eher Aufschluss über einen Zusammenhang geben, was jedoch lediglich eine Vermutung bleiben wird, da die Blastozysten am Tag 5 transferiert werden.

Die Gruppe rund um Ebner konnte in einer Arbeit zeigen, dass mit steigender Blastozysten- Expansion und Zellzahl, die Fläche der ICM aufgrund von höherer Kohäsion geringer wird (47). Auch die aktuellen Daten zeigen, dass schlüpfende Blastozysten eine signifikant kleinere ICM aufweisen als volle oder expandierte Blastozysten. Jedoch konnte nach Einteilung der Blastozysten in ihren Expansionsgrad das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Gesamtzahl in den drei Untergruppen der Gardner- Scores 3, 4 und 5 der vollen Blastozysten, expandierten Blastozysten und schlüpfenden Blastozysten zu gering für eine statistische Aussage war.

Interessanterweise konnten andere Autoren zeigen, dass Embryonen mit ICM- Qualität 1 ein höheres Geburtsgewicht aufweisen als Embryonen mit ICM- Qualität 2. Dieser Zusammenhang gilt jedoch nicht zwischen ICM- Qualität 1 und ICM- Qualität 3, hier konnte keine statistische Signifikanz erzielt werden (48). Diese Diskrepanz zu der aktuellen Studie kann möglicherweise auf den retrospektiven Charakter der Studie und/oder auf die unterschiedlichen Befunde der Embryologen zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zur ICM wird der Trophektoderm weniger durch seine Beschaffenheit beschrieben. Die perfekte Methode um den TE zu quantifizieren, wäre seine Dicke als auch seine Regelmäßigkeit zu messen und zu beschreiben (45). In der von Santos Filho et al. durchgeführten Untersuchung, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Zellzahl des TE und seiner Regelmäßigkeit. Leider sind diese Daten in der Routine des Blastozysten- Einteilungsschemas nicht erhebbar. Aber der aktuelle Zugang von Richter et al. (35) um den TE zu quantifizieren, indem die Anzahl von Trophektoderm- Zellen in einer ausgewählten Ebene erhoben werden, ist auch für den Routinebetrieb eine

technisch durchführbare Variante und wurde daher in der aktuellen Untersuchung angewandt.

Die Plazenta als Verbindung zwischen Mutter und Kind ist unverzichtbar für die Schwangerschaft und das kindliche Wachstum. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei spontanen Schwangerschaften das Plazentagewicht eng mit dem Geburtsgewicht des Kindes korreliert (49). Eine Forschungsgruppe maß nach spontan entstandenen Schwangerschaften im ersten Trimester das Volumen der Plazenta dreidimensional, mit dem Ergebnis, dass das Auftreten von Kindern, die zu groß für ihr Reifealter sind, und Makrosomie der Neugeborenen, statistisch mit frühem placentarem Wachstum korreliert (50). Aber die Tendenz geht dazu, dass Missverhältnisse zwischen Plazentagewicht und Geburtsgewicht in der assistierten Reproduktionsmedizin häufiger sind (51).

In den aktuellen IVF und ICSI- Schwangerschaften konnte aus der Qualität des Trophektoderms, aus dem sich später die Plazenta differenziert, eine solche Vorhersage auf das Geburtsgewicht nicht getroffen werden. Auch die Trophektoderm-Zellzahl und die Einstufung nach Gardner- Kriterien (25) konnten keinen Zusammenhang zum Plazentagewicht herstellen. Dieses Ergebnis steht jedoch im Gegensatz zu einer erst kürzlich veröffentlichten retrospektiven japanischen Studie, die besagt, dass die Erscheinung des Trophektoderms mit dem Plazentagewicht korreliert (52).

Andererseits konnte die durchgeführte Studie das erste Mal zeigen, dass Implantationsrate und das weitere Schicksal des Embryos auf der Basis von der Trophektoderm- Qualität und der Trophektoderm- Zellzahl am Tag 5 vorhergesagt werden kann. Anhand dieser Parameter konnten Lebendgeburten von biochemischen Schwangerschaften, Aborten und Schwangerschaften ohne Herzaktivität des Embryos signifikant unterschieden werden. Der Stand der Wissenschaft lag bisweilen dabei, dass nur der Grad der inneren Zellmasse in Zusammenhang mit einem positivem Schwangerschaftstest sowie einer positiven Herzaktivität gesehen werden konnte (53). Obwohl diese Korrelation erst der erste Beweis für einen Zusammenhang zwischen Trophektoderm und Geburtenrate (unter der Bedingung, dass zuvor eine Schwangerschaft belegt wurde) ist, stimmt dieses Ergebnis mit den Meinungen überein, die die Wichtigkeit der Bewertung des Trophektoderms über die der inneren Zellmasse, in Bezug auf eine Lebendgeburt, sehen. Ahlström et al. haben diese Aussage in

mehreren Studien bekräftigt, indem sie die bei der Auswahl der geeignetsten frischen und aufgetauten Blastozysten die TE- Qualität über die ICM- Qualität stellten (54,55).

In den gleichen Tenor stimmten sowohl Hill et al. (56) und Thompson et al. (57), die sich ausschließlich mit frischen Blastozysten beschäftigten, als auch Chen et al. (58) ein, die in ihren Untersuchungen nur kryokonservierte Blastozysten analysierten.

Eine weitere Erstbeobachtung ist die mögliche Korrelation zwischen Trophektoderm- Qualität und dem Geschlecht des Neugeborenen. Männliche Blastozysten schnitten in den Untersuchungen besser ab als ihre weiblichen Gegenstücke. Der Hintergrund könnte das Ergebnis einer schnelleren Zellteilung in männlichen Embryonen sein (59). Gardner und Wale konnten in ihrer Untersuchung zwar zeigen, dass weibliche Blastozysten einen signifikant höheren Glukoseverbrauch aufweisen als männliche Blastozysten (60). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die weiblichen Embryonen, auf Kosten einer geringeren Mitoserate, die Energie für die Deaktivierung ihres zweiten X-Chromosoms aufwenden (61). Diese geschlechterspezifischen Unterschiede in der Physiologie stimmen mit bereits erbrachten Abweichungen in der Genexpression überein (62,63). Andererseits wird vermutet, dass weibliche Blastozysten eine frühzeitigen X-Chromosom- Inaktivierung zusammen mit einer ICSI induzierten Erniedrigung der Trophektoderm- Zellen erfahren (64).

Diese geschlechterspezifische Erkenntnis würde jedoch bedeuten, dass, sollten Blastozysten in Zukunft nach Trophektoderm- Grad oder –Expansion ausgewählt werden, sich der Trend in Richtung einer höheren Anzahl an männlichen Kindern verlagern kann. All jene, die die Blastozysten weiterhin nach der Größe der ICM und Qualität aussuchen, was bis dato noch die Mehrheit darstellt, würde nicht Gefahr laufen, eine solche Verlagerung zu provozieren. Dieses geschlechterspezifische Resultat würde auch die unterschiedlichen Studienergebnisse der Geschlechtsrate nach Blastozystentransfer erklären (65,66,67,68,69).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das neonatale Outcome auf der Basis der aktuellen Daten nicht mit der Tag 5 Morphologie der Blastozyste korreliert, da weder qualitative noch quantitative Parameter der Zelllinien Zusammenhänge mit dem Plazentagewicht oder dem (korrigierten) Geburtsgewicht gezeigt haben.

Der Ausgang der Untersuchungen im Bereich der TE- Qualität mit dem Schwangerschaftsoutcome, genauer, dem Geschlecht und der Implantationsrate sowie der Abortrate zeigt jedoch auf, dass in Zukunft ein Umdenkprozess für die Auswahl der geeignetsten Blastozysten stattfinden muss, der die Wichtigkeit der Klassifizierung des TE über die Wichtigkeit der Klassifizierung der ICM stellt.

Gleichzeitig würde dies einen totalen Prozess des Umdenkens im Bereich der Blastozysten- Auswahl sowie der Kryokonservierung verlangen.

## LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Petru E, Urdl W, Moinfar F, Regitnig P, Bjelic- Radisic V, Tamussino K, et al. Gynäkologie: Pathologie und Humangenetik. 8. Auflage. Graz: Servicebetrieb ÖH Uni Graz; 2008.
- (2) Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G. Reproduktionsmedizin. Berlin Heidelberg: Springer- Verlag; 2013.
- (3) Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, al-Hasani S, Reissmann T, et al. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. Hum Reprod. 1994 May; 9 (5): 788–91.
- (4) Fauser BC, de Jong D, Olivennes F, Wramsby H, Tay C, Itskovitz-Eldor J, et al. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Feb; 87 (2): 709-715.
- (5) Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Ludwig M, Felberbaum RE, Diedrich K, et al. Nonsupplemented luteal phase characteristics after the administration of recombinant human chorionic gonadotropin, recombinant luteinizing hormone, or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce final oocyte maturation in in vitro fertilization patients after ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone and GnRH antagonist cotreatment. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Sep; 88 (9): 4186-4192.
- (6) Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2006; 12 (6): 651-671.
- (7) Popovic-Todorovic B, Loft A, Bredkjaer HE, Bangsboll S, Nielsen IK, Andersen AN. A prospective randomized clinical trial comparing an individual dose of recombinant FSH based on predictive factors versus a ‘standard’ dose of 150 IU/day in ‘standard’ patients undergoing IVF/ICSI treatment. Hum Reprod. 2003 Nov; 18 (11): 2275-2282.

- (8) Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier L, Serkine AM. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod.* 2002; 17: 362-369.
- (9) Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod.* 2002; 17: 1856-1862.
- (10) Hwang JL, Seow KM, Lin YH, Hsieh BC, Huang LW, Chen HJ, et al. IVF versus ICSI in sibling oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2005; 20: 1261-1265.
- (11) Bungum M, Bungum L, Humaidan P. A prospective study, using sibling oocytes, examining the effect of 30 seconds versus 90 minutes gamete co-incubation in IVF. *Hum Reprod.* 2003; 21: 518-523.
- (12) Gianaroli L, Fiorentino A, Magli MC, Ferraretti AP, Montanaro N. Prolonged sperm oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. *Hum Reprod.* 1996; 11: 2505-2511.
- (13) Kastrop PM, Weima SM, Van Kooij RJ, Te Velde ER. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. *Hum Reprod.* 1999; 14: 61-69.
- (14) Ebner T, Moser M, Shebl O, Mayer R, Tews G. Assisting in vitro fertilization by manipulating cumulus-oocyte-complexes either mechanically or enzymatically does not prevent IVF failure. *J Turkish-German Gynecol Assoc.* 2011; 12: 135-139.
- (15) Stanger JD, Stevenson K, Lakmaker A, Woolcott R. Pregnancy following fertilization of zona free, coronal cell intact human ova. *Hum Reprod.* 2001; 16: 164-167.
- (16) Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983; 305: 707-709.
- (17) Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozenthawed embryos. *Fertil Steril.* 1984; 42: 293-296.



- (18) Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.* 1963; 47: 347-369.
- (19) Vajta G, Kuwayama M, Vanderzwalmen P. Disadvantages and benefits of vitrification. In: Tucker MJ, Liebermann J. *Vitrification in assisted reproduction A user's manual and troubleshooting guide.* Informa UK. 2007; 33-44.
- (20) Mazur P, Schneider U. Osmotic response of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys.* 1986; 8: 259-285.
- (21) Leibo SP. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Membr Biol.* 1980; 53: 179-188.
- (22) Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HAT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology.* 1984; 21: 407-426.
- (23) Fahy GM. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. In: Merryman HT. *Transplantation: approaches to graft rejection.* New York: Alan R Liss. 1986; 305-335.
- (24) Van Langendonck A, Demylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J. G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *FertilSteril.* 2001; 76: 1023-31.
- (25) Gardner DK, Lane M., Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil. Steril.* 2000; 73: 1155-1158.
- (26) Hardason T, Van Landuyt L, Jones G. The blastocyst. *Hum Reprod.* 2012 July; 1-20.
- (27) Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG et al. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *HumReprod.* 2010; 25: 605-612.
- (28) Kleijkers SH, Van Montfoort AP, Smits LJ, Viechtbauer W, Roseboom TJ, Nelissen EC, et al. IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life. *Hum Reprod.* 2014; 29: 661-669.

- (29) Nelissen EC, Van Montfoort AP, Smits LJ, Menheere PP, Evers JL, Coonen E, et al. IVF culture medium affects human intrauterine growth as early as the second trimester of pregnancy. *Hum Reprod.* 2013; 28: 2067-2074.
- (30) Bendus AEB, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *FertilSteril.* 2006; 86: 1608-1615.
- (31) Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G. Easy sperm processing technique allowing exclusive accumulation and later usage of DNA-strandbreak-free spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2011; 22: 37-43.
- (32) Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G. Groupculture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reprod Biomed Online.* 2010; 21: 762-768.
- (33) Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011; 26: 1270-1283.
- (34) Ebner T, Shebl O, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Developmental fate of ovoid oocytes. *Hum Reprod.* 2008; 23: 62-66.
- (35) Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and Sterility.* 2001 Dec; 76 (6): 1157-1167.
- (36) Ebner T, Vanderzwalmen P, Shebl O, Urdl W, Moser M, Zech NH, et al. Morphology of vitrified/warmed day-5 embryos predicts rates of implantation, pregnancy and live birth. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19: 72-78.
- (37) Kato O, Kawasaki N, Bodri D, Kuroda T, Kawachiya S, Kato K, et al. Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 161: 46-50.
- (38) Eskild A, Monkerud L, Tanbo T. Birthweight and placental weight; do changes in culture media used for IVF matter?: Comparisons with spontaneous pregnancies in the corresponding time periods. *Hum Reprod.* 2013; 28: 3207-3214.
- (39) Zhu J, Lin S, Li M, Chen L, Lian Y, Liu P, et al. Effect of in vitro culture period on birthweight of singleton newborns. *Hum Reprod.* 2014; 29: 448-454.

- (40) Zhu J, Li M, Chen L, Liu P, Qiao J. The protein source in embryo culture media influences birthweight: a comparative study between G1 v5 and G1-PLUS v5. *Hum Reprod.* 2014; 29: 1387-1392.
- (41) Strøm-Roum EM, Haavaldsen C, Tanbo TG, Eskild A. Paternal age, placental weight and placental to birthweight ratio: a population-based study of 590,835 pregnancies. *Hum Reprod.* 2013; 28: 3126-3133.
- (42) Haavaldsen C, Samuelsen SO, Eskild A. The association of maternal age with placental weight: a population-based study of 536,954 pregnancies. *BJOG.* 2011; 118: 1470-1476.
- (43) Nelissen EC, Van Montfoort AP, Smits LJ, Menheere PP, Evers JL, Coonen E, et al. IVF culture medium affects human intrauterine growth as early as the second trimester of pregnancy. *Hum Reprod* 2013; 28: 2067-2074.
- (44) Nelissen EC, Dumoulin JCM, Daunay A, Evers JLH, Tost J, van Montfoort APA. Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions. *Hum Reprod* 2013; 28: 1117-1126.
- (45) Santos Filho E, Noble JA, Poli M, Griffiths T, Emerson G, Wells D. A method for semi-automatic grading of human blastocyst microscope images. *Hum Reprod* 2012; 27: 2641-2648.
- (46) Hardy K, Handyside AH, Winston RM. The human blastocyst: cell number, death, and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development* 1989; 107: 597-604.
- (47) Ebner T, Vanderzwalmen P, Shebl O, Mayer RB, Moser M, Tews G. Morphology aspects of human blastocysts and the impact of vitrification. *J ReprodmedEndokrinol* 2011; 8: 13-20.
- (48) Licciardi F, McCaffrey C, Oh C, Schmidt-Sarosi C, McCulloh DH. Birth weight is associated with inner cell mass grade of blastocysts. *Fertil Steril.* 2014; 10-39.
- (49) Salafia CM, Zhang J, Charles AK, Bresnahan M, Shrout P, Sun W, et al. Placental characteristics and birthweight. *PaediatrPerinatEpidemiol* 2008; 22: 229-239.
- (50) Schwartz N, Quant HS, Sammel MD, Parry S. Macrosomia has its roots in early placental development. *Placenta.* 2014; 35: 684-690.

- (51) Haavaldsen C, Samuelsen SO, Eskild A. The association of maternal age with placental weight: a population-based study of 536,954 pregnancies. *BJOG*. 2011; 118: 1470-1476.
- (52) Iwasa Y, Kikuchi H, Suzuki A, Yamada K, Kanno H, Murakawa H, et al. Comparison of blastocyst grade and the new-born baby's body weight. *Fertil Steril*. 2014; 102 (3): 333.
- (53) Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJ, Klein BM, et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online*. 2013; 27: 353-361.
- (54) Ahlström A, Westin C, Reisner E, Wikland M, Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod*. 2011; 26: 3289-3296.
- (55) Ahlström A, Westin C, Wikland M, Hardarson T. Prediction of live birth in frozen-thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw morphology. *Hum Reprod*. 2013; 28: 1199-1209.
- (56) Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, et al. Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril*. 2013; 99: 1283-1289.
- (57) Thompson SM, Onwubalili N, Brown K, Jindal SK, McGovern PG. Blastocyst expansion score and trophectoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): a national study. *J Assist Reprod Genetics*. 2013; 30: 1577-1581.
- (58) Chen X, Zhang J, Wu X, Cao S, Zhou L, Wang Y, et al. Trophectoderm morphology predicts outcomes of pregnancy in vitrified-warmed single-blastocyst transfer cycle in a Chinese population. *J Assist Reprod Genetics*. 2014; 31: 1475-1481.
- (59) Ménézoz YJ, Chouteau J, Torelló J, Girard A, Veiga A. Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. *FertilSteril*. 1999; 72: 221-224.
- (60) Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *FertilSteril*. 2013; 99: 1062-1072.

- (61) Epstein CJ, Smith S, Travis B, Tucker G. Both X chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature*. 1978; 274: 500-503.
- (62) Kobayashi S, Isotani A, Mise N, Yamamoto M, Fujihara Y, Kaseda K, et al. Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. *CurrBiol*. 2006; 16: 166-172.
- (63) Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *ProcNatlAcadSci USA*. 2010; 23: 3394-3399.
- (64) Tarín JJ, García-Pérez MA, Hermenegildo C, Cano A. Changes in sex ratio from fertilization to birth in assisted-reproductive-treatment cycles. *ReprodBiolEndocrinol*. 2014; 12: 56.
- (65) Ménézo YJ, Chouteau J, Torelló J, Girard A, Veiga A. Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. *FertilSteril*. 1999; 72: 221-224.
- (66) Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Westphal LW, Giudice LC, Behr B. Comparison of the sex ratio with blastocyst transfer and cleavage stage transfer. *J Assist Reprod Genetics*. 2003; 20: 323-326.
- (67) Csokmay JM, Hill MJ, Cioppettini FV, Miller KA, Scott RT Jr, Frattarelli JL. Live birth sex ratios are not influenced by blastocyst-stage embryo transfer. *FertilSteril*. 2009; 92: 913-917.
- (68) Bu Z, Chen ZJ, Huang G, Zhang H, Wu Q, Ma Y, et al. Live birth sex ratio after in vitro fertilization and embryo transfer in china - an analysis of 121,247 babies from 18 centers. *PloS One*. 2014; 9: e113522.
- (69) Maalouf WE, Mincheva MN, Campbell BK, Hardy IC. Effects of assisted reproductive technologies on human sex ratio at birth. *FertilSteril*. 2014; 101: 1321-1325.