

Diplomarbeit

**Der Einfluss von Endometriose auf die
Morphokinetik von frühen Embryonen
- eine retrospektive Studie**

eingereicht von

Florian Maximilian Daniel Stammer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Kinderwunsch Institut Schenk GmbH

unter der Anleitung von

Dr. med. univ. Michael Schenk, MAS

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

Graz, 25.07.2016

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 25.07.2016

Florian Maximilian Daniel Stammer eh

Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mir durch Rat, Tat und Motivation bei dieser Arbeit geholfen haben.

Ein großer Dank geht dabei Herrn Dr. Schenk, der mich jederzeit geduldig und tatkräftig unterstützt hat und sich immer sehr viel Zeit für mich genommen hat.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Petek danken, dessen Unterstützung die Zusammenarbeit mit dem Kinderwunschinstitut erst ermöglicht hat.

Zudem möchte ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Kinderwunschinstituts – und dabei besonders Frau Lienhart – für den netten Kontakt, die Hilfe und die Organisation meinen Dank aussprechen.

Auch Frau Eberhart und Frau Grosej-Strele möchte ich für ihre Unterstützung bei der Erstellung meines Ethikkommissionsantrags danken.

Abschließend will ich noch meinen Eltern danken, ohne deren finanziellen und moralischen Beistand ich dieses Studium wohl nicht annähernd so gut bewältigt hätte.

Zusammenfassung

1. Einleitung

Einen der häufigsten Gründe für die weibliche Unfruchtbarkeit stellt die chronische Krankheit Endometriose dar. Sie findet sich bei bis zu 47% der sterilen Frauen und ist in ihrer Pathogenese und ihrem Einfluss auf die weibliche Fruchtbarkeit bis heute nicht vollständig verstanden. Die wirkungsvollste Therapie, trotz dieser Subfertilität schwanger zu werden, stellt die Behandlung mit einer In-vitro-Fertilisation dar.

Bei dieser assistierten Reproduktionstechnik werden der Frau einige gereifte Eizellen entnommen, befruchtet und nach einigen Tagen unter Beobachtung in einem Brutschrank in die Gebärmutter transferiert.

In den letzten Jahren haben sich an immer mehr Instituten sogenannte „Time-Lapse Inkubatoren“ durchgesetzt. Darunter versteht man Brutschränke, die in kontinuierlichen Abständen den mikroskopischen Entwicklungsstand des Embryos fotodokumentieren. Diese Methode sichert eine bessere Embryonenauswahl und damit auch eine höhere Schwangerschaftsrate.

In der vorliegenden Diplomarbeit wird der Einfluss von Endometriose auf die Zellteilungszeiten und Eihautdicke junger Embryonen von Patientinnen untersucht.

2. Methoden

Für die Studie werden die Zellteilungszeiten (t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8), die Zeiten zwischen den Teilungen (cc_2 , cc_3 , cc_4 , cc_5 , cc_6 , cc_7), sowie die Dicke der Zona pellucida (ZPT) von je 73 Embryonen von Patientinnen mit und ohne Endometriose betrachtet. Die Daten stammen aus der Datenbank des „Kinderwunsch Institut Schenk GmbH“ – einem IVF-Institut in der Nähe von Graz in Österreich.

Die Hauptzielgröße ist hierbei t_3 , der Zeitpunkt der Teilung in das 3-zellige Stadium.

Das Patientinnenkollektiv besteht aus normalgewichtigen Frauen im Alter von 25-

35 Jahren, bei denen beeinflussende Faktoren wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus, chronische Entzündungen sowie schweren Erkrankungen von Leber, Schilddrüse und Nieren ausgeschlossen wurden.

3. Ergebnisse

Eine Auswertung mittels ANOVA konnte für die Zeitparameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Auch bei der Hauptzielgröße t3 und der Eihautdicke konnte ein t-Test ebenfalls keine signifikanten Ungleichheiten zwischen der Endometriose- und der Kontrollgruppe aufzeigen.

4. Diskussion

Diese Studie zeigt, dass die Endometriose keinen schwerwiegenden Einfluss auf die Morphokinetik von jungen Embryonen ausübt, wie dies beispielsweise das hyperandrogene PCOS macht. Dies legt nahe, dass der Ursprung der von der Endometriose induzierten Infertilität nicht die Hauptursache der verminderten Embryonenqualität ist. Es scheint wahrscheinlicher, dass die Subfertilität aus mehreren fertilitätsreduzierenden Einflüssen sowie deren Zusammenspiel resultiert, welche durch die Endometriose hervorgerufen werden.

Abstract

1. Introduction

One of the main reasons for female infertility is the chronic disease endometriosis. It can be found in up to 47% of sterile women and is not yet completely understood in its pathogenesis and its influence on female fertility to date. The most efficient therapy to get pregnant despite this subfertility is an in vitro fertilization treatment. In this assisted reproduction technique several matured oocytes are taken from the patient, fertilized and after some days under observation in an incubator they are transferred into the uterus.

In recent years more and more institutes established so called “time-lapse incubators”.

Those are incubators, able to photo document the microscopic development of the embryo. This method guarantees a better embryo selection and therefore also a better pregnancy rate.

This study examines the impact of endometriosis on the cleavage times and the zona pellucida thickness of patients' early embryos.

2. Methods

For this study the cleavage times (t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8), the times between the cleavages (cc_2 , cc_3 , cc_4 , cc_5 , cc_6 , cc_7) and the zona pellucida thickness of each of 73 embryos of patients with and without endometriosis were observed.

Data are taken from the database of the „Kinderwunsch Institut Schenk GmbH“– an IVF-Institute close to Graz in Austria.

The main target size is t_3 (the cleavage time into the 3 cell stadium).

The patient collective consists of normal weight women aged between 25 and 35 years, where influential factors like nicotine abuse, diabetes mellitus, chronic inflammation as well as severe diseases of liver, thyroid and kidneys were excluded.

3. Results

Analysis with ANOVA could not detect significant differences between the groups concerning the time parameters. For the main target size t3 and the zona pellucida thickness a t-test showed no significant differences between the endometriosis group and the control group as well.

4. Discussion

This study shows, that endometriosis has no severe effect on early embryo morphokinetics, as for example, the hyperandrogenic PCOS does. This suggests that the source of endometriosis-induced infertility is not mainly the result of the reduced embryo quality. The subfertility seems more likely to be a result of several fertility-reducing factors that are caused by endometriosis.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vii
Glossar und Abkürzungen	x
Abbildungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	13
1.1 Die Unfruchtbarkeit durch Endometriose	13
1.1.1 Definition und Ursachen der Unfruchtbarkeit	13
1.1.1.1 Begriffserklärung und Epidemiologie	13
1.1.1.2 Gründe einer Unfruchtbarkeit	14
1.1.2 Das Krankheitsbild der Endometriose	16
1.1.2.1 Vorkommen.....	16
1.1.2.2 Entstehungsmechanismus.....	17
1.1.2.3 Symptome.....	18
1.1.2.4 Begleiterkrankungen	19
1.1.2.5 Diagnostik	19
1.1.3 Erklärungsversuche für die Subfertilität.....	21
1.1.3.1 Mechanische Ursachen.....	21
1.1.3.2 Immunologische Ursachen.....	21
1.1.3.3 Einfluss auf Keimzellen	22
1.1.3.4 Einfluss auf den Eileiter	23
1.1.3.5 Einfluss auf das Endometrium	23
1.1.3.6 Einfluss auf den Zyklus und die Hormonsynthese.....	24
1.1.4 Behandlung der endometriosebedingten Infertilität	25
1.1.4.1 Hormontherapien.....	25
1.1.4.2 Operationen	25
1.1.4.3 Assistierte Reproduktionstechnik (ART).....	26
1.2 Die In-vitro-Fertilisation.....	28
1.2.1 Definition.....	28
1.2.2 Die Geschichte der IVF und des TLI	29
1.2.2.1 Anfänge der Reproduktionsmedizin.....	29

1.2.2.2	Die Entwicklung der In-vitro Fertilisation	29
1.2.2.3	Die Weiterentwicklung der IVF	30
1.2.2.4	Die Entwicklung der Time-lapse Inkubatoren	30
1.2.2.5	Die Möglichkeiten eines TLI	31
1.2.3	Der Ablauf einer IVF	33
1.2.3.1	Ovarielle Stimulation	33
1.2.3.2	Follikelpunktion	35
1.2.3.3	Aufbereitung der Spermien	36
1.2.3.4	Fertilisierung	37
1.2.3.5	Inkubation.....	38
1.2.4	Die Embryonenauswahl bei der IVF	40
1.2.4.1	Die Bewertung der Eizelle	40
1.2.4.2	Die Bewertung der Pronukleuszelle.....	40
1.2.4.3	Die Bewertung des Embryos in der Teilungsphase	41
1.2.4.4	Die Bewertung der Blastozyste	43
1.2.4.5	Die Bewertung des Embryos mithilfe eines TLI.....	44
1.2.5	Der Embryonentransfer	46
2	Material und Methoden	47
2.1	Datenherkunft	47
2.2	Ein- und Ausschlusskriterien	49
2.3	Haupt- und Nebenzielgrößen	49
2.4	Statistik	50
2.5	Datenschutz.....	51
2.6	Votum der Ethikkommission	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Gesammelte Daten	52
3.2	Verteilung des Alters und BMI.....	52
3.3	Auswertung der Daten	53
3.3.1	Nebenzielgröße t2.....	53
3.3.2	Hauptzielgröße t3	54
3.3.3	Nebenzielgröße t4.....	55
3.3.4	Nebenzielgröße t5.....	56
3.3.5	Nebenzielgröße t6.....	57
3.3.6	Nebenzielgröße t7.....	58

3.3.7	Nebenzielgröße t8	59
3.3.8	Nebenzielgröße cc2	60
3.3.9	Nebenzielgröße cc3	61
3.3.10	Nebenzielgröße cc4	62
3.3.11	Nebenzielgröße cc5	63
3.3.12	Nebenzielgröße cc6	64
3.3.13	Nebenzielgröße cc7	65
3.3.14	Nebenzielgröße ZPT	66
4	Diskussion	67
5	Literaturverzeichnis	73

Glossar und Abkürzungen

ART	Assistierte Reproduktionstechnik
BMI	Body-Mass-Index
cc2	Zeitdifferenz zwischen t3 und t2
cc3	Zeitdifferenz zwischen t4 und t3
cc4	Zeitdifferenz zwischen t5 und t4
cc5	Zeitdifferenz zwischen t6 und t5
cc6	Zeitdifferenz zwischen t7 und t6
cc7	Zeitdifferenz zwischen t8 und t7
EM	Endometriose
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
MRT	Magnetresonanztomographie
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
SD	Standardabweichung
SET	Single Embryo-Transfer
SS	Schwangerschaft
t2	Zeitpunkt der Teilung in das 2-zellige Stadium
t3	Zeitpunkt der Teilung in das 3-zellige Stadium
t4	Zeitpunkt der Teilung in das 4-zellige Stadium
t5	Zeitpunkt der Teilung in das 5-zellige Stadium
t6	Zeitpunkt der Teilung in das 6-zellige Stadium
t7	Zeitpunkt der Teilung in das 7-zellige Stadium
t8	Zeitpunkt der Teilung in das 8-zellige Stadium
TLI	Time-lapse incubator
ZP	Zona pellucida
ZPT	Zone pellucida thickness

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2: Endometriom ¹	16
Abbildung 1: Oberflächliche Peritonealendometriose ¹	16
Abbildung 3: Ablauf einer IVF ⁷⁶	28
Abbildung 4: EmbryoScope® time-lapse system ⁸⁵	31
Abbildung 5: Langes Protokoll ⁴	34
Abbildung 6: Kurzes Protokoll ⁴	34
Abbildung 7: Antagonisten-Protokolle ⁴	35
Abbildung 8: ICSI ⁴	37
Abbildung 9: Zellteilung bei natürlicher Empfängnis ²	38
Abbildung 10: Scoring nach Scott und Tesarik ⁴	41
Abbildung 11: Morphologische Kriterien ⁴	42
Abbildung 12: Blastozystenbewertung nach Gardner et al. ⁹⁹	43
Abbildung 13: Beispiel für einen Auswahlalgorithmus ¹¹⁰	45
Abbildung 14: EmbryoViewer® Software ¹¹⁵	48
Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung von t2 der Endometriosegruppe	53
Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung von t2 der Kontrollgruppe	53
Abbildung 17: Boxplots von t2	53
Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung von t3 der Endometriosegruppe	54
Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung von t3 der Kontrollgruppe	54
Abbildung 20: Boxplots von t3	54
Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung von t4 der Endometriosegruppe	55
Abbildung 21: Häufigkeitsverteilung von t4 der Kontrollgruppe	55
Abbildung 23: Boxplots von t4	55
Abbildung 25: Häufigkeitsverteilung von t5 der Endometriosegruppe	56
Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung von t5 der Kontrollgruppe	56
Abbildung 26: Boxplots von t5	56
Abbildung 29: Häufigkeitsverteilung von t6 der Endometriosegruppe	57
Abbildung 28: Häufigkeitsverteilung von t6 der Kontrollgruppe	57
Abbildung 27: Boxplots von t6	57
Abbildung 31: Häufigkeitsverteilung von t7 der Endometriosegruppe	58
Abbildung 30: Häufigkeitsverteilung von t7 der Kontrollgruppe	58
Abbildung 32: Boxplots von t7	58

Abbildung 33: Häufigkeitsverteilung von t8 der Endometriosegruppe	59
Abbildung 34: Häufigkeitsverteilung von t8 der Kontrollgruppe	59
Abbildung 35: Boxplots von t8	59
Abbildung 36: Häufigkeitsverteilung von cc2 der Endometriosegruppe	60
Abbildung 37: Häufigkeitsverteilung von cc2 der Kontrollgruppe.....	60
Abbildung 38: Boxplots von cc2	60
Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung von cc3 der Endometriosegruppe	61
Abbildung 40: Häufigkeitsverteilung von cc3 der Kontrollgruppe.....	61
Abbildung 41: Boxplots von cc3	61
Abbildung 42: Häufigkeitsverteilung von cc4 der Endometriosegruppe	62
Abbildung 44: Häufigkeitsverteilung von cc4 der Kontrollgruppe.....	62
Abbildung 43: Boxplots von cc4	62
Abbildung 47: Häufigkeitsverteilung von cc5 der Endometriosegruppe	63
Abbildung 46: Häufigkeitsverteilung von cc5 der Kontrollgruppe.....	63
Abbildung 45: Boxplots von cc5	63
Abbildung 48: Häufigkeitsverteilung von cc6 der Endometriosegruppe	64
Abbildung 50: Häufigkeitsverteilung von cc6 der Kontrollgruppe.....	64
Abbildung 49: Boxplots von cc6	64
Abbildung 51: Häufigkeitsverteilung von cc7 der Endometriosegruppe	65
Abbildung 52: Häufigkeitsverteilung von cc7 der Kontrollgruppe.....	65
Abbildung 53: Boxplots von cc7	65
Abbildung 54: Häufigkeitsverteilung der ZPT der Endometriosegruppe.....	66
Abbildung 55: Häufigkeitsverteilung der ZPT der Kontrollgruppe.....	66
Abbildung 56: Boxplots der ZPT.....	66

1 Einleitung

1.1 Die Unfruchtbarkeit durch Endometriose

1.1.1 Definition und Ursachen der Unfruchtbarkeit

1.1.1.1 Begriffserklärung und Epidemiologie

Der Begriff der Unfruchtbarkeit wird in der Gynäkologie genaugenommen in zwei verschiedene Begriffe unterteilt: Einerseits in die Infertilität, das Unvermögen trotz Konzeption ein lebendes Kind zu gebären, andererseits die Sterilität, die Unmöglichkeit schwanger zu werden. Die beiden Begriffe werden jedoch häufig als Synonym verwendet, da der Begriff „Infertilität“ in der deutschen Sprache nur selten Verwendung findet. ¹

Ein Paar wird als steril definiert, wenn bei diesem in einem Jahr trotz regelmäßigem und unverhütetem Geschlechtsverkehrs keine Schwangerschaft auftritt; solche Paare machen geschätzt 7-15% der weltweiten Population aus. ²

Die meisten infertilen Paare, die sich an Kinderwunschinstiute wenden, sind jedoch nicht – wie der Begriff suggeriert - komplett unfähig, schwanger zu werden, sondern weisen nur eine gewisse Schmälerung der Fruchtbarkeit auf. Vollkommen steril wären beispielsweise ein bilateral orchiektomierter Mann oder eine hysterektomierte Frau. ¹

Oft wird behauptet, dass der Grund einer ungewollten Kinderlosigkeit zu je 40% beim Mann oder bei der Frau liegen kann und zu 20% unbekannt ist oder bei beiden Partnern liegt. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Faktoren noch häufiger bei beiden Partnern zugleich zu finden sein könnten. ^{1,3}

1.1.1.2 Gründe einer Unfruchtbarkeit

Die Ursachen für eine Unfruchtbarkeit sind sehr vielfältig; wie häufig die einzelnen Faktoren jedoch unter den sterilen Patientinnen und Patienten auftreten, ist allerdings schwer zu sagen.

Einige Einflüsse können sowohl bei Männern als auch bei Frauen eine Minderung der Fruchtbarkeit verursachen, etwa ein hohes Alter ⁴ oder sexuell übertragbare Krankheiten ^{5,6}.

Dazu kommen chronische Krankheiten wie Hormonstörungen, Diabetes mellitus, Zöliakie, Schilddrüsenerkrankungen sowie Erkrankungen der Hypophyse, der Nebennieren, der Nieren und der Leber. ¹

Ein weiterer Faktor ist die Genetik: Es gibt zahlreiche genetische Aberrationen wie etwa das Klinefelter Syndrom beim Mann ⁷, oder das Turner Syndrom bei der Frau ⁸, die eine Schwangerschaft erschweren oder gar unmöglich machen können.

Seltener, aber erwähnenswert, sind auch die Folgen von Krebs und dessen Behandlung; wie etwa die Entfernung oder Bestrahlung von erkrankten Keimdrüsen, sowie die Chemotherapie. ^{9,10}

Zudem ist ein ungesunder Lebensstil nicht förderlich für die Fruchtbarkeit: Adipositas, sowie chronische Expositionen zu Noxen wie Nikotin, Alkohol, Schwermetalle und Pflanzenschutzmitteln stehen im Verdacht die Fertilität zu senken. ¹

Die Probleme, die nur den Mann betreffen, sind meist mit dessen Hoden und der dortigen Spermienproduktion vergesellschaftet. Eine Beeinflussung der Spermienanzahl oder Qualität kann viele Ursachen haben, wie beispielsweise Infektionen (z.B. Mumps), Hodenhochstand, Varikozelen, Durchblutungsstörungen oder Hyper-/Hypothermien. ¹

Die Krankheiten, die nur Frauen im gebärfähigen Alter betreffen, sind meist gynäkologischer Art und betreffen die Ovarien, die Eileiter sowie Ovar und Vagina.

In den Eileitern, Vagina und Zervix sind die Probleme meist obstruktiver Natur, wie sie beispielsweise durch Chlamydien-Infektionen, angeborene Fehlbildungen oder Endometrioseherde hervorgerufen werden können. Im Uterus hingegen gehen die Probleme meist auf Myome, Malformationen oder auf ein Asherman-Syndrom zurück. Dort kann zusätzlich eine immunologische Sterilität bestehen, bei der die eintretenden Spermien durch Makrophagen angegriffen werden. ^{1,11}

Eine ovarielle Sterilität kann ebenfalls mehrere Gründe haben, die sich in ihrer Pathogenese voneinander stark unterscheiden. Die wichtigsten sind hierbei das Poor Ovarian Reserve Syndrom, die Ovarialinsuffizienz und das PCOS. ¹

Eine Sonderstellung bei den Erkrankungen der Frau nimmt die Endometriose ein, bei der man bis heute den genauen Pathomechanismus noch nicht vollständig versteht. Es wird jedoch angenommen, dass die Krankheit auf mehreren Ebenen negativen Einfluss nimmt: Auf die Eizellen und deren Qualität im Ovar, auf den Eileiter, auf die Hormonsynthese und auf den Aufbau des Endometriums. ¹²

1.1.2 Das Krankheitsbild der Endometriose

1.1.2.1 Vorkommen

Die Endometriose ist eine häufige gutartige gynäkologische Erkrankung und wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Thomas Cullen beschrieben.¹³ In den Industriestaaten ist sie eine der Hauptgründe für eine Hospitalisierung.¹⁴ Definiert wird sie durch das Vorkommen von Endometrium oder diesem ähnelndem Gewebe außerhalb des Cavum uteri.⁴

Die Herde befinden sich meistens im kleinen Becken (samt Ovarien), im Douglas-Raum und an dem Ligamentum sacrouterinum; sie können jedoch an fast jeder erdenklichen Stelle auftreten. Endometriale Zysten an den Ovarien werden Endometriome genannt (siehe Abb. 2).¹



Abbildung 2: Oberflächliche Peritonealendometriose¹

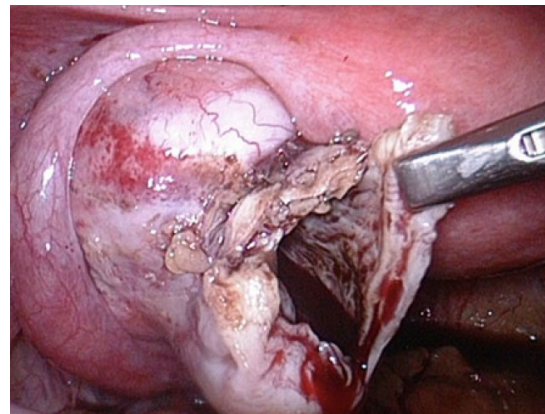


Abbildung 1: Endometriom¹

Es wird vermutet, dass 10% aller Frauen und bis zu 15% der Frauen im gebärfähigen Alter an Endometriose leiden.¹⁵

Bei infertilen Frauen hingegen liegt sogar bei 47% der Betroffenen eine Endometriose vor, wohingegen nur 0,5-5% der fertilen Frauen betroffen sind.^{16,17}

1.1.2.2 Entstehungsmechanismus

Wie die Endometriose entsteht ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch ein multifaktorieller Entstehungsmechanismus vermutet, da einerseits Verwandte ersten Grades überdurchschnittlich häufig ebenfalls betroffen sind und andererseits auch Umwelteinflüsse eine wesentliche Rolle spielen.¹⁸

Es wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung zu 47% von genetischen Faktoren und zu 53% von Umweltfaktoren abhängt.¹⁹

Aus vielen Entstehungstheorien werden bis heute bevorzugt 2 Hypothesen diskutiert: die Transplantationstheorie nach Sampson und die Metaplasietheorie nach Meyer.¹

Sampson - welcher als Erster eine Theorie zur Entstehung der EM lieferte - vermutete, dass die EM durch eine retrograde Menstruation entstanden sei, durch welche endometriale Fragmente ins Peritoneum gelangten und dort an- und weiterwuchsen. Gegen diese Hypothese der Autotransplantation spricht unter anderem, dass sich die Endometriose-Herde von dem des intrauterinen Endometriums im Aufbau unterscheiden.^{13,20}

Laut der Metaplasietheorie werden für die Entstehung der Krankheit bereits im Peritoneum befindliche pluripotente Mesothelzellen angeregt sich in endometriales Gewebe zu differenzieren. Als Grund für das Vorliegen dieser Zellen im Peritoneum wird ebenfalls eine retrovaginale Menstruation diskutiert.¹

Da diese retrograde Menstruation, die bei beiden Theorien eine große Rolle spielt, jedoch physiologisch ist, könnte es noch andere Faktoren geben, die in die Entstehung mit einfließen. Eine Möglichkeit hierfür wäre das Vorliegen von endometrialen Stammzellen, welche in der „Stammzelltheorie“ beschrieben wird.²¹

Auch wenn der Ursprung dieses extrauterinen Endometriums nicht eindeutig geklärt ist, weiß man, dass es an den Orten, an denen es auftritt, eine

Entzündungsreaktion hervorruft, die von Angiogenese, Adhäsionen, Fibrosierung, Narbenbildung und nervaler Infiltration begleitet wird. Dies wiederum zieht Schmerzen, Subfertilität und Begleiterkrankungen nach sich. ¹

Zudem führt meist eine Dysregulation des Immunsystems dazu, dass endometriale Fragmente nicht phagozytiert werden; wobei jedoch unbekannt ist, ob diese Störung des Immunsystems eine Folge oder eine Ursache der Krankheit darstellt. ²²

1.1.2.3 Symptome

Warum bei einer EM Schmerzen auftreten können ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass die Nerven in den Herden Nervenwachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren ausgesetzt werden, wodurch auch längerfristig das ZNS sensibilisiert werden könnte. ²³

Klinisch zeigt die EM nicht immer eindeutige Zeichen: einige Patientinnen können schwerste Symptome aufweisen, andere wiederum gar keine; letztere asymptomatischen Patientinnen, machen sogar bis zu 44% der Fälle aus. ²⁴
Doch auch wenn Symptome auftreten, ist eine Diagnose nicht immer leicht zu stellen, da die Symptome nicht sehr spezifisch sind und denen von vielen anderen Krankheiten ähneln. ¹

Gynäkologisch zeigt sich bei Patientinnen sehr häufig eine Dysmenorrhoe, die meist durch einen zyklischen Unterbauchschmerz charakterisiert ist. Dieser Schmerz wird häufig die 1-2 Tage vor der Menstruationsblutung am stärksten empfunden und lässt bei einigen Frauen nach Beginn der Blutung nach, wohingegen er bei anderen Patientinnen während der Menses sein Maximum erreicht. ¹

Auch bei Menorrhagien, irregulären Blutungen, Dyspareunie, chronischen Unterleibschmerzen, Subfertilität und Störungen des Harn- und Geschlechtsapparates sollte an eine EM gedacht werden. ²⁵

Typisch sind auch abdominelle Beschwerden wie Bauchschmerzen, Obstipation, Blähungen, Flatulenzen, Stuhldrang und das Gefühl einer unvollständigen Darmentleerung.²⁶

1.1.2.4 Begleiterkrankungen

Die EM scheint jedoch nicht nur Schmerzen und Unfruchtbarkeit zu bedingen, sondern auch das Vorkommen von anderen Krankheiten zu begünstigen, wobei auch hier der Pathomechanismus meist nicht verstanden ist. So besteht bei EM-Patientinnen ein höheres Inzidenz-Risiko hinsichtlich Eierstock-, Brust-, und schwarzem Hautkrebs, sowie an Asthma, Atopie und kardiovaskulären und autoimmunen Erkrankungen.²⁷

Wie bei vielen anderen chronischen Krankheiten treten bei EM-Patientinnen auch psychische Krankheiten wie Angststörungen und Depressionen häufiger auf.²⁸

1.1.2.5 Diagnostik

Bei deutschen und österreichischen Patientinnen verzögert sich die Diagnosestellung einer EM – von den ersten Symptomen bis zur korrekten Diagnose – durchschnittlich um 10,4 Jahre und wird zu 74% mindestens einmal falsch diagnostiziert.²⁹

Dies liegt zum einen daran, dass die EM symptomatisch vielen anderen Krankheitsbildern ähnelt und die Symptome mit der Schwere des Krankheitsbildes nur gering korrelieren.¹

Andererseits sind die diagnostischen Möglichkeiten begrenzt:

Weder für Blut³⁰, noch für Urin³¹ gibt es zufriedenstellende Biomarker, wodurch die Labordiagnostik ausscheidet.

Auch eine physikalische Untersuchung – welche eine SpekulumEinstellung und eine bimanuelle vaginal-rektale Tastuntersuchung beinhalten sollte – kann nur Endometriome an den uterosacralen Ligamenten mit passabler Sensitivität ertasten.³²

Mit den meisten bildgebenden Verfahren kann eine EM ebenfalls nicht sicher diagnostiziert oder ausgeschlossen werden.

Am besten eignet sich hierbei noch das MRT, welches ein nützliches diagnostisches Mittel insbesondere zum Auffinden von tiefen Herden darstellt. Der diagnostische Wert dieser Methode hängt jedoch stark von der Erfahrung der untersuchenden Person ab.^{32,33}

Eine ebenfalls erfolgversprechende Methode, jedoch mit geringeren Kosten und Aufwand verbunden, stellt die transvaginale und transrektale Sonographie dar. Diese kann die meisten Fälle von Endometriose relativ sicher und unkompliziert diagnostizieren.³²

Den Goldstandard stellt jedoch nach wie vor die Laparoskopie mit histologischem Nachweis dar. Die histologische Nachuntersuchung der Biopsate ist dabei erforderlich, weil es sich nur bei circa 50% der als verdächtig eingeschätzten Läsionen histologisch tatsächlich um EM-Herde handelt.³⁴

Diese Methode ist jedoch aufgrund der Tatsache, dass es sich um einen operativen Eingriff handelt, nicht immer praktikabel.

1.1.3 Erklärungsversuche für die Subfertilität

Die Endometriose ist einer der häufigsten Ursachen einer Subfertilität.

Gesunde Paare haben eine monatliche Fertilitätsrate von 0,15–0,20 pro Zyklus.

Für an einer unbehandelten EM leidenden Frau liegt dieser Wert nur bei 0,02–0,10 pro Zyklus.³⁵

Dieser Wert ist auch bei minimaler und leichter EM erniedrigt, erhöht sich jedoch nach Herdentfernungen bei leichten Ausprägungen.^{36,37}

1.1.3.1 Mechanische Ursachen

Bei starken Ausprägungen der Krankheit – wie etwa der „frozen pelvis“ - ist die Subfertilität oft leicht zu erklären, da diese häufig zu zerstörten Beckenstrukturen und somit zu gestörten Eizellaufnahmen und -transport führen können.¹

Da jedoch auch ein geringes Ausmaß der Krankheit zu teils schweren Einschränkungen der Fruchtbarkeit führen kann, zeigt sich, dass der Einfluss der EM auf die Fertilität über eine gestörte Anatomie hinausgeht. Weshalb die weniger schweren Formen der EM, welche die Beckenstrukturen nicht beeinflussen, die Fertilität negativ beeinflussen, ist jedoch noch größtenteils unklar und Gegenstand verschiedener Erklärungsversuche.¹

1.1.3.2 Immunologische Ursachen

Eine Ursache der Subfertilität ist sehr wahrscheinlich die erhöhte Immunabwehr, welche eine Folge der chronischen Entzündung ist.

Diese bewirkt eine erhöhte Anzahl von Leukozyten und Makrophagen in den Herden und im Peritonealfliuid, wodurch wiederum vermehrt Cytokine und

Wachstumsfaktoren wie IL- 1,6 und 8, TNF, RANTES und VEGF produziert werden. Diese wiederum rekrutieren peritoneale Kapillaren und Leukozyten. ^{38,39}

Die aus der Endometriose folgende erhöhte Immunreaktion kann auf mehreren Ebenen die Fruchtbarkeit der Frau einschränken; so kann daraus etwa eine Schädigung der Eizellen resultieren. ¹

1.1.3.3 Einfluss auf Keimzellen

Dass die Eizellen bei einer Endometriose an Qualität verlieren ist schon lange bekannt. Dies zeigt sich besonders deutlich daran, dass Eizellspenden von erkrankten Spenderinnen eine niedrigere SS-Rate zeigen. ⁴⁰

Der Grund dafür ist zumindest bei Endometriomen verständlich, da die Entzündung die Follikel dort direkt beeinflusst, worauf die erhöhten Entzündungswerte von IL-6 und IL-8 in der Follikelflüssigkeit in diesen Fällen hinweisen. ⁴¹

Ein weiterer Grund für den Qualitätsverlust der Eizellen ist eine Schädigung der DNS. Als Grund dafür werden neben der erhöhten Immunreaktion freie Radikale und oxidativer Stress diskutiert. ^{42,43}

Die Eizellen können auch bei minimaler EM beschädigt sein. So wurde unter dem Elektronenmikroskop nachgewiesen, dass Eizellen bei milder EM eine Vielzahl von abnormalen Mitochondrien mit kleinen, geschwollenen oder verschwommenen Vakuolen aufweisen und die Gesamtanzahl der Organellen auch signifikant reduziert ist; in wieweit dies die Funktion der Eizellen einschränkt ist jedoch fraglich. ⁴⁴

In einem Tierversuch wurden wiederum Schäden im Cytoskelett der Eizellen nachgewiesen, welche mit der Dauer und dem Schweregrad der Krankheit positiv korrelierten. ⁴⁵

Es gibt auch Hinweise, dass der Spindelapparat der Eizellen durch die Erkrankung beeinträchtigt werden könnte. ⁴⁶

Aber nicht nur weibliche Keimzellen werden von der erhöhten Immunantwort negativ beeinflusst. Besonders bei moderater und schwerer EM können Makrophagen die Motilität von eintretenden Spermien um bis zu 80% reduzieren, was ebenfalls ein wahrscheinlicher Einflussfaktor auf die SS ist. ⁴⁷

1.1.3.4 Einfluss auf den Eileiter

Der Transport der Eizellen durch die Eileiter kann durch die Entzündung beeinflusst werden.

Bei den Betroffenen ist die Zilienmotilität ⁴⁸ und die Innervation der Tube ⁴⁹ herabgesetzt, was wiederum den Eizell- und Embryotransport behindern kann.

Es wird zudem angenommen, dass die EM die embryonale Entwicklung im Eileiter direkt beeinträchtigen könnte. Im Tierversuch teilten sich Embryonen, welche mit Peritonealfliuid von Endometriosepatientinnen in Kontakt waren, signifikant langsamer. ⁵⁰

1.1.3.5 Einfluss auf das Endometrium

Es werden jedoch nicht nur die Gameten und deren Transportsystem beeinflusst, auch das Endometrium wird verändert.

Die Entzündungszellen bewirken eine Progesteron-Rezeptor-Dysregulation sowie eine Aktivierung von Genen, welche wiederum zu einer verringerten endometrialen Aufnahmebereitschaft führen. Zudem wird durch die Verminderung der Progesteron-Rezeptoren ebenfalls eine Reduzierung von Oberflächenstrukturen wie MUC1 bewirkt, die wiederum wichtig für die Implantation des Embryos sind. ⁵¹

Es gibt ebenfalls Studien, die darauf hinweisen, dass EM-Patientinnen im

Endometrium über eine erhöhte Expression von Enzymen wie Katalase ⁵² und Glutathionperoxidase ⁵³ verfügen.

Dies lässt auf vermehrten oxidativen Stress durch freie Radikale schließen, was ebenfalls einer Einnistung und Schwangerschaft hinderlich sein könnte. ^{52,53}

Auch andere Enzyme wie Xanthinoxidase ⁵⁴, Superoxiddismutase ⁵⁵ und NO-Synthase ⁵⁶ werden im falschen Maß generiert und bei Biomarkern, die bei der Implantation eine Rolle spielen, wie etwa GdA, OPN, LPA3 und HOXA10, wurden etliche von der Norm abweichende Expressionen gefunden ⁵⁷.

Inwieweit diese Abweichungen sich auf die Subfertilität auswirken ist jedoch auch hier noch unklar. ^{54,56-58}

1.1.3.6 Einfluss auf den Zyklus und die Hormonsynthese

Zu guter Letzt nimmt die EM auch einen Einfluss auf den weiblichen Zyklus und die Hormonsynthese.

So dauert die Follikelphase länger, die Östrogenproduktion ist verringert und die Konzentration von LH im Serum und im Follikel ist reduziert. ^{59,60}

Zudem scheint die Krankheit einen Einfluss auf die Synthese des Anti-Müller-Hormons zu haben, welches für die embryonale Entwicklung sehr wichtig ist. Patientinnen weisen davon sowohl einen erhöhten Spiegel im Peritonealfliuid, als auch einen erniedrigten Serumspiegel an Zyklustag 3 auf. ^{61,62}

Der Einfluss dieser Veränderungen auf die Fertilität ist auch hier schwer messbar. ^{60,61}

1.1.4 Behandlung der endometriosebedingten Infertilität

Da es an aktuell vorliegenden Studiendaten mangelt und bereits vorliegende Daten teilweise widersprüchlich sind, kann keine gesicherte Aussage darüber gemacht werden, wie effektiv die einzelnen Behandlungsmethoden der endometrioseassoziierten Subfertilität sind. Dies erschwert eine Therapieempfehlung sehr. ⁶³

1.1.4.1 Hormontherapien

Prinzipiell kann man sagen, dass Frauen mit EM, die ihre Fruchtbarkeit verbessern wollen, von einer alleinigen medikamentösen Hormontherapie ohne ART nur gering profitieren. ⁶³

Die Datenlage auf diesem Gebiet ist zwar nicht sehr detailliert; die existierenden Studien über ovarialsupprimierende Mittel wie GnRH-Analoga, LNG-IUP und Danazol geben diesen Therapien jedoch keinen Anhalt auf eine Besserung der Fruchtbarkeit. ⁶⁴

Auch prä- und postoperativ gibt es keine wissenschaftlichen Erkenntnisse, die für eine Hormonbehandlung sprechen würden. ⁶⁵

Eine derartige Behandlung wird laut ESHRE-Guidelines deshalb nicht befürwortet. ⁶³

1.1.4.2 Operationen

Operationen hingegen können besonders bei Frauen mit minimaler bis leichter EM helfen die Subfertilität zu verbessern, weswegen ein Eingriff in diesen Stadien von den Guidelines empfohlen wird. ^{37,63}

Es gibt zudem Hinweise darauf, dass eine laparoskopische Herdentfernung mit

CO₂-Laser als Operationsmethode in den meisten Fällen noch wirkungsvoller als eine monopolare Elektrokoagulation sein kann. ⁶⁶

Bei Endometriomen hingegen hat sich gezeigt, dass man hierbei am besten eine Exzision der endometrialen Kapsel durchführen sollte. ⁶⁷

1.1.4.3 Assistierte Reproduktionstechnik (ART)

Die beste Möglichkeit, trotz einer Endometriose-induzierten Subfertilität eine SS zu erwirken, sind die Methoden der ART; also ovarielle Stimulation, intrauterine Insemination (IUI) und In-vitro-Fertilisierung (IVF). Sie werden von den Guidelines besonders dann empfohlen, wenn die Tubenfunktion beeinträchtigt ist, ein männlicher Faktor in die Infertilität mit einfließt und/oder andere Verfahren schon fehlgeschlagen sind. ⁶³

So kann eine intrauterine Insemination die SS-Raten bei minimaler bis leichter EM erhöhen; eine zusätzliche ovarielle Stimulation kann die Chancen dabei noch weiter verbessern. ⁶⁸

Wenn eine operative Entfernung von EM-Herden stattgefunden hat, ist es günstig die IUI innerhalb von 6 Monaten im Anschluss durchzuführen. ⁶⁹

Eine derartige Behandlung wird bei infertilen Patientinnen mit minimaler bis leichter EM empfohlen. ^{63,65}

Die effizienteste und erfolgreichste Methode, eine durch die EM induzierte Infertilität zu überwinden ist jedoch eine andere ART: die In-vitro-Fertilisation. ⁷⁰

Der Erfolg dieser Prozedur wird nicht von der Krankheit beeinflusst und ist bei Erkrankten ebenso erfolversprechend wie bei Gesunden. ⁷¹

Ob dabei GnRH-Antagonist- oder GnRH-Agonistprotokolle verwendet wurden scheint keinen Einfluss zu haben. ⁷²

Eine längere Gabe von GnRH-Agonisten von 3-6 Monaten vor der Behandlung scheint jedoch die Raten der SS und Lebendgeburten zu erhöhen. ⁷³

Bei minimaler bis leichter EM kann zusätzlich eine vollständige Entfernung der Herde zum Erfolg der Behandlung beitragen; bei anderen Formen der Krankheit scheinen Operationen jedoch keinen Benefit zu bewirken. ^{73,74}

Zysten an den Ovarien ab 3cm werden deshalb nur zur Schmerzbehandlung oder Zugänglichmachung von Follikeln entfernt, da derartige Operationen zudem sehr gefährlich für die Ovarien sein können. ⁶³

Ähnlich verfährt man auch bei der tiefen EM, deren operative Exzision zwar zur Schmerztherapie beitragen kann, für die Fertilität jedoch wahrscheinlich keinen Nutzen bringt. ⁷⁵

1.2 Die In-vitro-Fertilisation

1.2.1 Definition

Die In-vitro-Fertilisation (IVF) bezeichnet das Verfahren der extrakorporalen Befruchtung von aus den Ovarien entnommenen Eizellen, um eine Schwangerschaft zu erzielen. ⁴

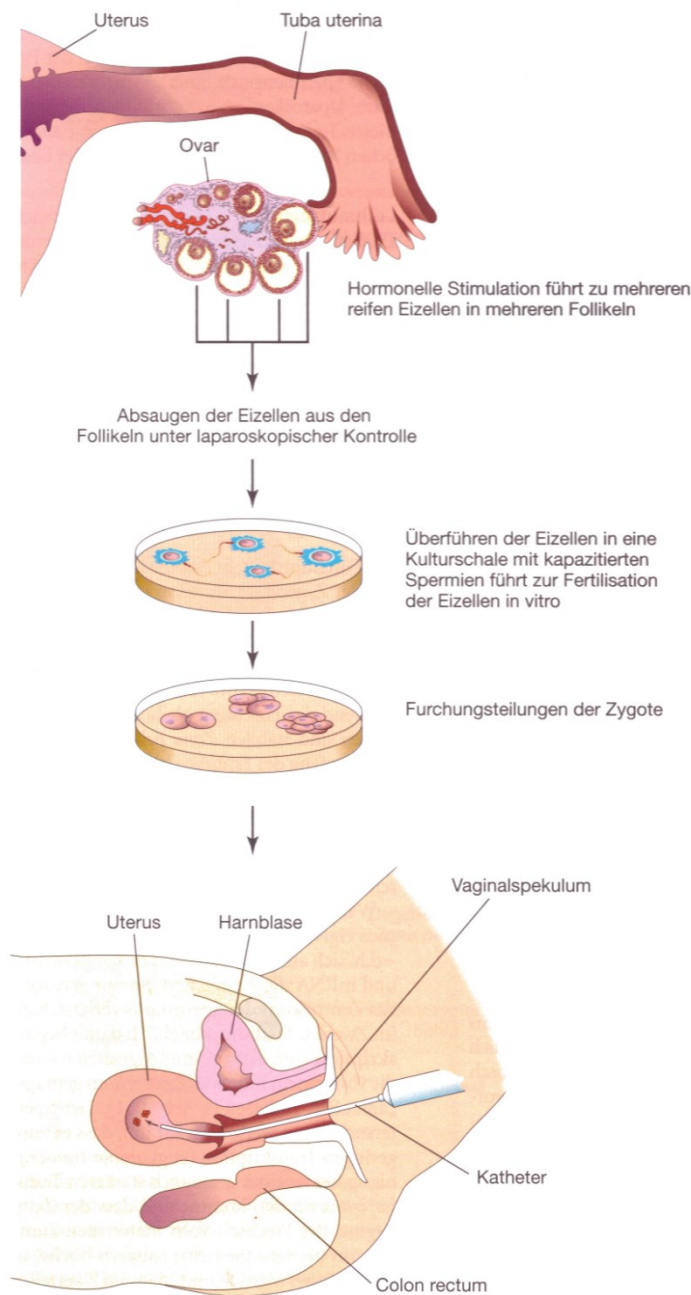


Abbildung 3: Ablauf einer IVF ⁷⁶

1.2.2 Die Geschichte der IVF und des TLI

1.2.2.1 Anfänge der Reproduktionsmedizin

Unfruchtbarkeit ist keineswegs ein Thema der modernen Zeit. Tatsächlich gibt es keine Hinweise darauf, dass die Prävalenz auf diesem Gebiet zunehmend ist.⁷⁷

Im Gegensatz zu den Problemen haben sich jedoch die Problemlösungsverfahren im Laufe der Zeit – und insbesondere in den letzten Jahrzehnten – sehr geändert. Der erste große Durchbruch begann damit, dass 1905 eine Fertilitätssteigerung von unfruchtbaren Patientinnen durch die Bestrahlungen der Ovarien entdeckt wurde. Im Jahr 1926 fand man heraus, dass eine Bestrahlung der Hypophyse ähnliche Resultate lieferte.¹

Diese Form der Ovarien- und Hypophysenstimulation hielt sich mehrere Jahrzehnte als Therapie der Wahl bei sterilen Frauen, auch wenn neuere Studien^{78,79} bei diesen Verfahren ein erhöhtes Krebsrisiko nachweisen konnten.

1.2.2.2 Die Entwicklung der In-vitro Fertilisation

Der wahrscheinlich größte Meilenstein der Reproduktionsmedizin ist jedoch die noch relativ junge Methode der In-vitro-Fertilisation.

Bei dieser assistierten Reproduktionstechnik werden der Frau einige gereifte Eizellen entnommen, diese befruchtet und nach einigen Tagen unter Beobachtung in einem Brutschrank wieder reimplantiert.⁴

Im Jahr 1965 wurde zum ersten Mal eine Eizelle außerhalb des Körpers befruchtet; es dauerte aber noch bis 1978, dass das erste durch IVF gezeugte Kind auf die Welt kam. Dies gilt als Geburtsstunde der modernen Reproduktionsmedizin.¹

Anfang der 80er Jahre gelang es zudem, die Eizellen transvaginal unter Ultraschallkontrolle zu gewinnen, was die bisherige laparoskopische Gewinnung um ein vielfaches vereinfachte.¹

1.2.2.3 Die Weiterentwicklung der IVF

1992 wurde auf diesem Gebiet ein weiterer großer Fortschritt – besonders in Bezug auf die männliche Fruchtbarkeit – getan, als zufällig die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) erfunden wurde. Durch diese Methode ist es seitdem möglich, mit nur einem einzelnen Spermium eine Schwangerschaft auszulösen.⁴

In den über zwei Jahrzehnten seit Erfindung der ICSI wurde jedoch kein Verfahren mehr erforscht, das auch nur annähernd so effektiv die SS-Chancen verbessert. Die Wissenschaft auf diesem Gebiet konzentrierte sich eher darauf, die IVF weiter zu perfektionieren. So wurden neue Techniken wie etwa das assisted hatching, die Kryokonservierung und die Präimplantationsdiagnostik erforscht.¹

Zudem wurden die gängigen Verfahren weiter verbessert und unliebsame Risiken wie Mehrlingsschwangerschaften und das ovarielle Hyperstimulationssyndrom weiter reduziert.⁸⁰

1.2.2.4 Die Entwicklung der Time-lapse Inkubatoren

Eine der größten Herausforderung blieb jedoch die richtige Embryonenauswahl. Diese ist sehr wichtig, da die Embryonen allesamt verschiedene Qualitäten und somit unterschiedliche Chancen auf eine erfolgreiche SS bieten.⁸¹

Ein großer Schritt zur Bewältigung dieses Problems wurde 2009 getan, als die ersten Time-lapse Inkubatoren vorgestellt wurden. Diese Geräte konnten erstmals die gesamte extrakorporale Entwicklung der Embryonen dokumentieren, ohne den Embryo dafür aus dem Brutschrank nehmen zu müssen.⁸²

Dass die kontinuierliche Beobachtung der befruchteten Embryonen wertvolle Informationen für die Embryonenauswahl liefern könnte, wurde bereits Ende der 80er Jahre diskutiert; die Forschung auf diesem Gebiet wurde jedoch durch die

beschränkten technischen Möglichkeiten limitiert. ⁸³

Einige Versuche wurden damals mit analogen Videoaufnahmen gemacht; diese aufwändige Technik setzte sich jedoch nicht durch. ⁸⁴

So dauerte es bis 2011, dass mit dem EmbryoScope® (siehe Abb.4) die ersten Time-Lapse Inkubatoren auf den Markt kamen und die Embryonenauswahl revolutionierten.



Abbildung 4: EmbryoScope® time-lapse system ⁸⁵

1.2.2.5 Die Möglichkeiten eines TLI

Ein TLI bringt gleich mehrere Vorteile mit sich. Einerseits müssen die Embryonen zur mikroskopischen Untersuchung nicht mehr aus dem Brutschrank genommen werden. Das erspart viel Aufwand und ist schonender für den Embryo. ⁸⁶

Andererseits liefert die lückenlose Dokumentation wichtige Informationen über den Embryo: neben der Möglichkeit, sonst unbemerkte abnormale Teilungsverhalten zu entdecken, spielen hier vor allem die Zellteilungszeiten eine wichtige Rolle. Diese sind ein guter Indikator für die Embryonenqualität und können bei der Embryonenauswahl helfen. ⁸⁷

Zudem lassen sich durch die Teilungszeiten erstmals Einflüsse auf die Morphokinetik – und so auch indirekt auf die Qualität – des Embryos untersuchen. Die Anzahl der Studien ist hierbei zwar noch relativ gering; die vorliegenden Studienergebnisse lassen jedoch erkennen, dass der TLI ein nützliches Werkzeug zur Forschung auf dem Gebiet der Infertilität sein kann.

So war beispielsweise schon lange bekannt, dass das PCOS eine negative Gewichtung auf die weibliche Fruchtbarkeit ausübt. Es wurde jedoch erst 2014 in einer Studie mit einem TLI nachgewiesen, dass die Krankheit einen tatsächlichen Einfluss auf die Eizellen und somit auf den Embryo und dessen Morphokinetik hat.

⁸⁸

Dieser Nachweis gelang auch bei einem anderen negativen Einflussfaktor auf die weibliche Fruchtbarkeit: dem Nikotinkonsum. ⁸⁹

Bei einer weiblichen Adipositas hingegen konnte ein Einfluss auf die Morphokinetik des Embryos hingegen nicht nachgewiesen werden – was wiederum darauf hindeutet, dass die Subfertilität bei Adipositas wahrscheinlich nicht allein von einer Qualitätsminderung der Eizellen stammt. ⁹⁰

1.2.3 Der Ablauf einer IVF

1.2.3.1 Ovarielle Stimulation

Im normalen Zyklus reift bei den meisten geschlechtsreifen Frauen alle 23-35 Tage eine Eizelle heran.⁷⁶

Obwohl es zwar möglich ist, jene einzelne Eizelle für die IVF zu gewinnen, wird jedoch in den meisten Fällen mithilfe von Hormonen eine ovarielle Stimulation durchgeführt, um gleich mehrere Eizellen parallel zum Reifen zu bringen.⁴

Diese kontrollierte ovarielle Hyperstimulation wird durch die Gabe von Gonadotropinen ermöglicht, die gleichzeitig mehrere Follikel wachsen lassen.¹ Um einem vorzeitigen LH-Anstieg – und somit einer Schädigung der Eizellen und Effizienzmindering der ovariellen Stimulation – vorzubeugen, werden die Patientinnen zudem mit GnRH-Agonisten oder -Antagonisten vorbehandelt.⁴

Zu der richtigen Verabreichung dieser Medikamente gibt es verschiedene Protokolle mit den jeweiligen Vor- und Nachteilen, die in ihrer Effizienz jedoch als gleichwertig angesehen werden können.⁴

Die Wirkung der GnRH-Agonisten beruht auf einer Stimulation der Hypophyse, wo sie durch eine verstärkte Bindung und verlängerte Halbwertszeit einen Wirkungsverlust des natürlichen GnRHs herbeiführen, und somit die LH- und FSH-Spiegel stark senken.⁹¹

Bei dem langen Protokoll (siehe Abb. 5) werden die GnRH Agonisten in der Mitte der Lutealphase des Vorzyklus oder der frühen Follikelphase des Behandlungszyklus verabreicht. Die Stimulation mit Gonadotropinen wird erst dann gestartet, wenn eine hypophysäre Suppression bereits erreicht ist.⁹²

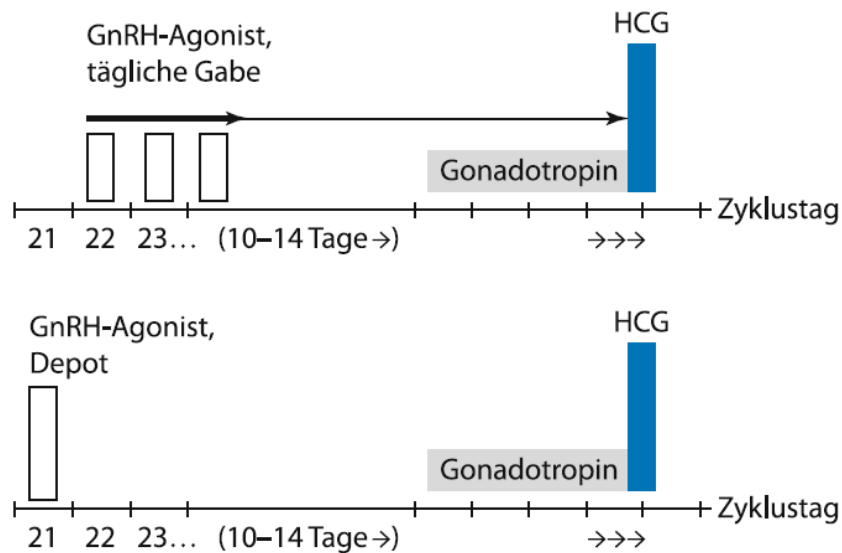


Abbildung 5: Langes Protokoll ⁴

Das kurze und ultrakurze Protokoll (siehe Abb. 6) wiederum nützt den kurzzeitig stimulierenden Effekt der GnRH Agonisten und startet die Gabe von Gonadotropin bereits sehr kurz nach Stimulationsbeginn; dadurch wird jedoch das Risiko eines ovariellen Hyperstimulationssyndroms erhöht. ⁹²

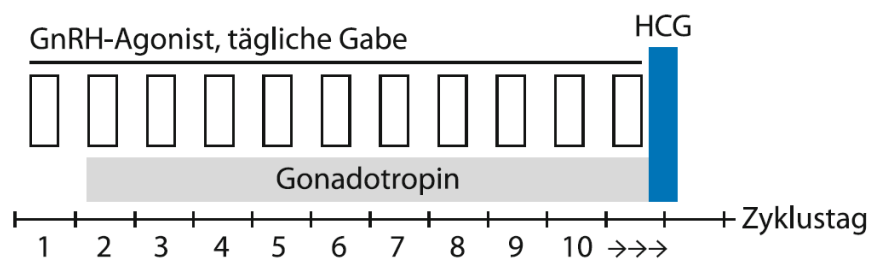


Abbildung 6: Kurzes Protokoll ⁴

Alternativ können auch Protokolle mit GnRH-Antagonisten verwendet werden. Diese Substanzen verursachen mit ihrer blockierenden Wirkung keine Gonadotropinsekretion und besitzen somit im Gegensatz zu den GnRH-Agonisten keine intrinsische Aktivität. Der Vorteil einer derartigen Behandlung liegt in einer kurzen Behandlungsdauer und dem geringeren Risiko eines Hyperstimulationssyndroms. ⁴

GnRH-Antagonisten können im Mehrfachdosisprotokoll, sowie im Einzeldosisprotokoll verabreicht werden (siehe Abb.7).⁴

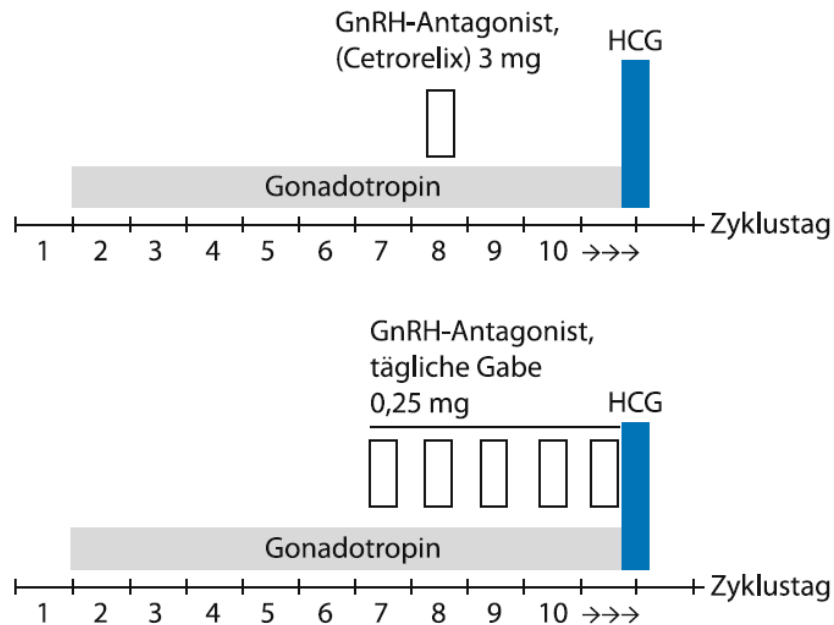


Abbildung 7: Antagonisten-Protokolle⁴

1.2.3.2 Follikelpunktion

Nachdem die Medikamente zu einem multiplen Follikelwachstum geführt haben, können Eizellen der Patientin entnommen werden.¹

Dafür wird das Ovar ultraschallgesteuert transvaginal punktiert und so die Oozyten-Cumulus-Komplexe – die Eizellen mit ihren umgebenden Granulosazellen – gewonnen und in einen Inkubator gegeben. Der Vorgang kann mit und ohne Narkose durchgeführt werden und benötigt durchschnittlich 5-10 Minuten.⁴

In der Regel wird versucht, alle gereiften Follikel mit einem Durchmesser von ca. 10mm oder mehr zu gewinnen.¹

Als ideal gilt dabei eine Anzahl von 10-15 gewonnenen Eizellen.⁹³

1.2.3.3 Aufbereitung der Spermien

Parallel dazu erfolgt die Spermienaufbereitung. Diese ist notwendig, da in der männlichen Samenflüssigkeit neben den benötigten Spermien noch andere Substanzen wie etwa die Prostata- und Samenbläschenflüssigkeit und teilweise auch übertragbare Krankheitserreger wie etwa HI-Viren zu finden sind.⁹⁴

Um die Spermien von dem Seminalplasma zu trennen muss das Ejakulat einem „Washing“ unterzogen werden. Hierzu verflüssigt man gegebenenfalls das Sperma, mischt es mit einem Kulturmedium und zentrifugiert das Gemisch. Anschließend schöpft man die Flüssigkeit ab und mischt die am Boden liegenden Spermien wiederum in einer Kulturflüssigkeit.¹

Anschließend ist es für eine IVF-Behandlung nötig, die beweglichen Spermien aufzukonzentrieren. Die gängigste Methode ist hierbei das Swim-Up Verfahren, bei dem die Spermien mit einem Kulturmedium überschichtet werden und nach einer Zeit der Überstand – der aus den Spermien besteht, die motil genug waren das Medium bis zur Oberfläche zu durchqueren – abgesaugt und verwendet wird. Diese Methode kann mit oder ohne vorangegangenes „Washing“ durchgeführt werden.¹

Es gibt noch alternative Verfahren, wie etwa die Glaswollfiltration und die Dichtegradientenzentrifugation. Diese Prozeduren sind zwar in ihrer Durchführung recht verschieden, doch sie alle sind in der Aufgabe, das Ejakulat zu reinigen und die mobilsten Spermien herauszufiltern als gleichwertig anzusehen.^{95,96}

1.2.3.4 Fertilisierung

Circa 2-3 Stunden nach Entnahme werden den Eizellen in einem Kulturschälchen je ca. 100.000 der aufbereiteten Spermien hinzugefügt und dieses anschließend in einen Inkubator gegeben. ^{1,4}

Sollte diese Art der Befruchtung nicht möglich sein – etwa aufgrund eines Mangels an Spermien oder einer undurchlässigen Zona pellucida – kann statt der IVF auch eine ICSI durchgeführt werden, bei der nur ein einzelnes Spermium mit einer Nadel in die Eizelle injiziert wird. Die SS-Raten zwischen diesen beiden Methoden ändern sich jedoch nicht signifikant. ^{97,98}

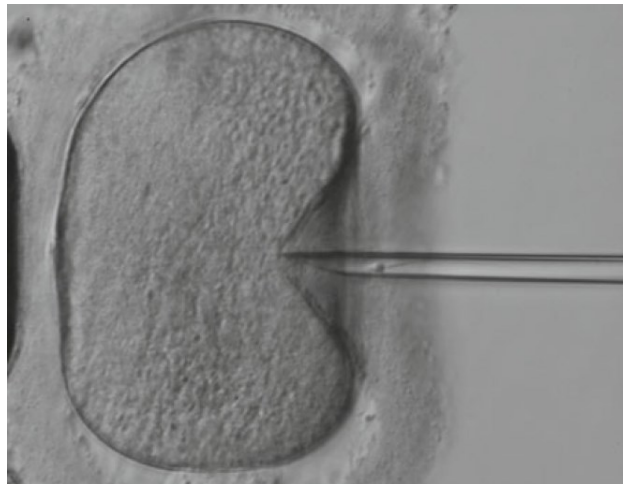


Abbildung 8: ICSI ⁴

1.2.3.5 Inkubation

Bei einer natürlichen Empfängnis wird die Eizelle im Eileiter der Mutter von einem Spermium befruchtet. Auf ihrem weiteren Weg durch den Eileiter teilt sich diese Zygote, bis sie nach ca. 3 Tagen mit 16-32 Zellen eine Morula bildet und sie nach 4-5 Tagen als frühe Blastozyste aus ihrer Eihaut schlüpft. Zu dieser Zeit ist sie meistens schon im Cavum uteri angekommen, wo sie sich als späte Blastocyste an Tag 5-6 in der Uteruswand einnisten kann und eine Schwangerschaft erwirkt. ⁷⁶

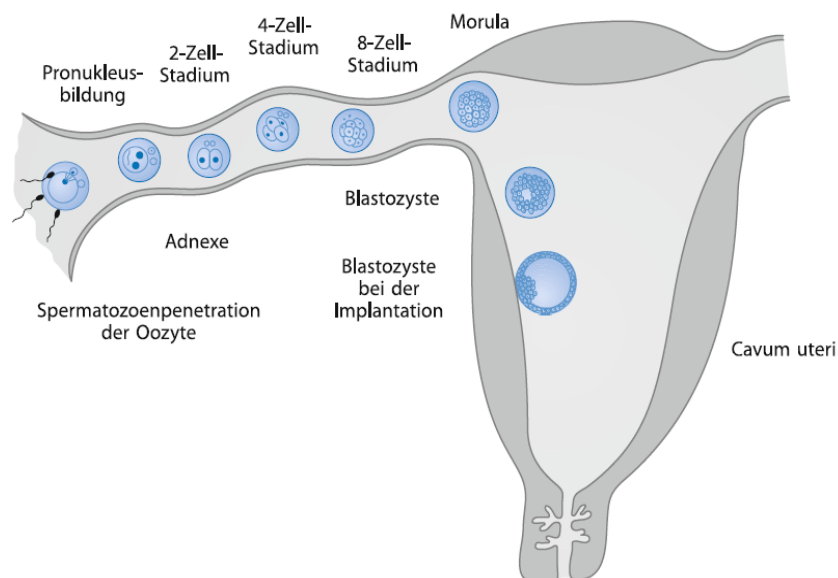


Abbildung 9: Zellteilung bei natürlicher Empfängnis ²

Bei der IVF werden die Eizellen in dieser Zeit nach der Befruchtung in einem Brutschrank – einem sogenannten Inkubator – untergebracht, in dem sie dieselbe Entwicklung durchmachen. Um die natürliche Umgebung der Mutter zu simulieren herrscht in diesem eine feuchte Atmosphäre bei 37° mit 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂.⁴

Während dieser Zeit im Inkubator werden von den Embryonen Daten gesammelt, anhand derer die Wahrscheinlichkeit auf eine erfolgreiche SS bewertet wird ⁹⁹

Dennoch bleibt die Auswahl des richtigen Embryos zur Reimplantation eine der größten Herausforderungen bei der IVF.

Besonders bei „Single Embryo-Transfers“, bei denen nur ein einziger Embryo transferiert wird, ist es entscheidend, den Embryo zu finden, der mit der höchsten Wahrscheinlichkeit zu einer normalen Schwangerschaft führt. Um zu diesem Ziel zu gelangen, haben sich verschiedene Ansätze der Embryonenbewertung entwickelt, welche in den verschiedenen Entwicklungsstadien Aussagen über die Embryonenqualität treffen können.⁹⁹

Dass die Embryonenbewertung kein einheitliches Verfahren darstellt, sondern in verschiedenen Instituten häufig sehr unterschiedlich gehandhabt wird, zeigt sich daran, dass erst 2011 erstmals ein internationaler Standard bei der Embryonenauswahl existierte.¹⁰⁰

1.2.4 Die Embryonenauswahl bei der IVF

1.2.4.1 Die Bewertung der Eizelle

Für die Abschätzung der Qualität der gewonnenen Eizellen gibt es kein einheitliches Verfahren. Die Bewertung erfolgt jedoch meist lichtmikroskopisch und polarisationsmikroskopisch, wobei das Hauptaugenmerk auf der Morphologie, der Position, der Lage des Spindelapparats sowie der Zona pellucida liegt.⁹⁹

Bei letzterer zeigte sich, dass eine verdickte ZP (höher als 15 µm) geringere Implantationschancen verursacht als eine mit dünneren Durchmessern.¹⁰¹

Auch ein irreguläre Zona pellucida scheint unterschiedliche Implantationsraten zu haben als eine ZP mit konstanter Dicke.¹⁰²

Im Eizellstadium ist ein standardisiertes Scoring jedoch sehr schwierig und der Nachweis des Einflusses der genannten Parameter auf die Geburtenrate ist nicht ausreichend.⁹⁹

1.2.4.2 Die Bewertung der Pronukleuszelle

Schon 16-18 Stunden nach der Befruchtung können erste Aussagen über die Embryoqualität gemacht werden. Dazu gibt es verschiedene Klassifikationen, von denen die populärste das Z-Score-System von Scott u. Smith³⁵ ist, welches seit 1990 existiert und ständig weiterentwickelt wurde.³⁰

Bei diesem System werden folgende Parameter berücksichtigt: Die Größe und Symmetrie des Pronucleus, das Aussehen des Zytoplasmas, sowie die Anzahl, Größe, Gleichförmigkeit und Verteilung der Nucleoli. Diese Qualitäten werden mit den Graden Z1-Z4 bewertet, wobei von Z1 und Z2 eine Entwicklung in hochqualitative Embryonen erwartet wird, von Z3 eine minderqualitative Entwicklung und von Z4 die schlechteste Entwicklung – was eine Folge von chromosomalen Abnormitäten sein kann.³⁵

Das sehr ähnliche Tesarik/Greco-System klassifiziert die pronukleäre Morphologie

in sechs Grade, wobei der Grad 0 eine normale Zygote beschreibt und die Grade 1-5 zunehmend irreguläre Zellen beschreiben (siehe Abb. 10).¹⁰³

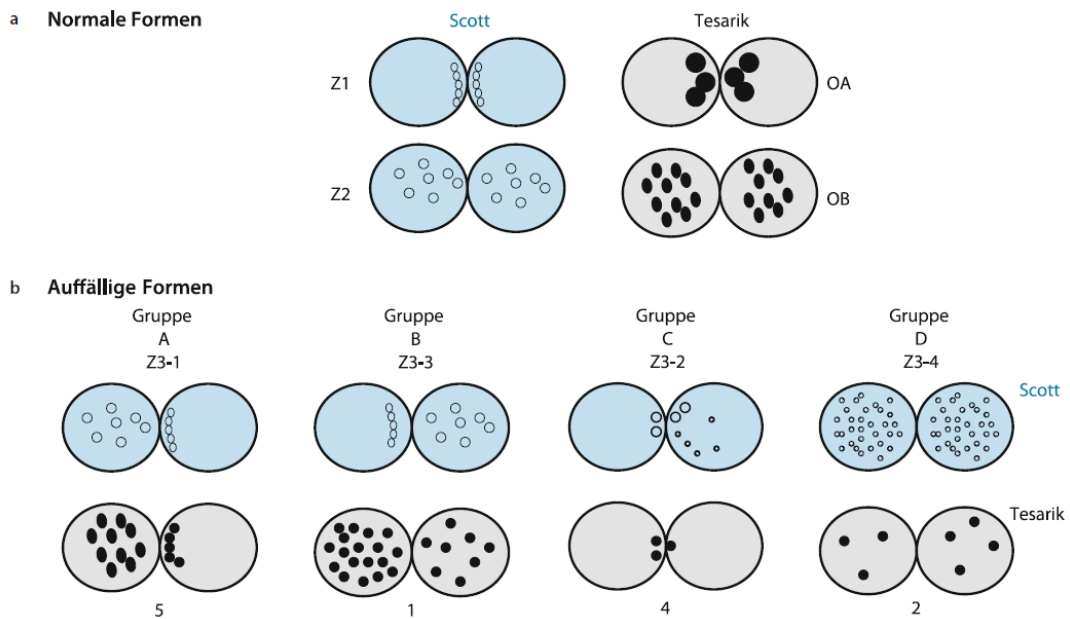


Abbildung 10: Scoring nach Scott und Tesarik⁴

Gegen die Bewertung der Kerne spricht jedoch, dass die Bewertung der Morphologie einen ungleich besseren Prädiktor für eine potentielle SS abgibt.¹⁰⁴

1.2.4.3 Die Bewertung des Embryos in der Teilungsphase

Sobald die Zelle sich teilt, können weitere Aussagen über die Embryonenqualität gemacht werden. Bis 2011 die ersten Time-lapse Inkubatoren auf den Markt kamen, war der Morphologie-Score hierfür die einzige Möglichkeit.⁸²

Die wichtigsten morphologischen Größen sind hierbei das Ausmaß der Fragmentation, die Größen/Symmetrie, das Vorliegen einer Mehrkernigkeit und die Anzahl der Zellen des Embryos. Als Ideal wird ein Embryo ohne multiple Kerne angesehen, der gleich große symmetrische Blastomeren mit einem möglichst geringen Anteil an Fragmenten aufweist und dabei keine Verzögerung in den Zellteilungen zeigt.⁹⁹

Aus diesen Parametern wird anschließend eine Score errechnet, der die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Embryos für eine erfolgreiche SS beschreibt. ⁹⁹

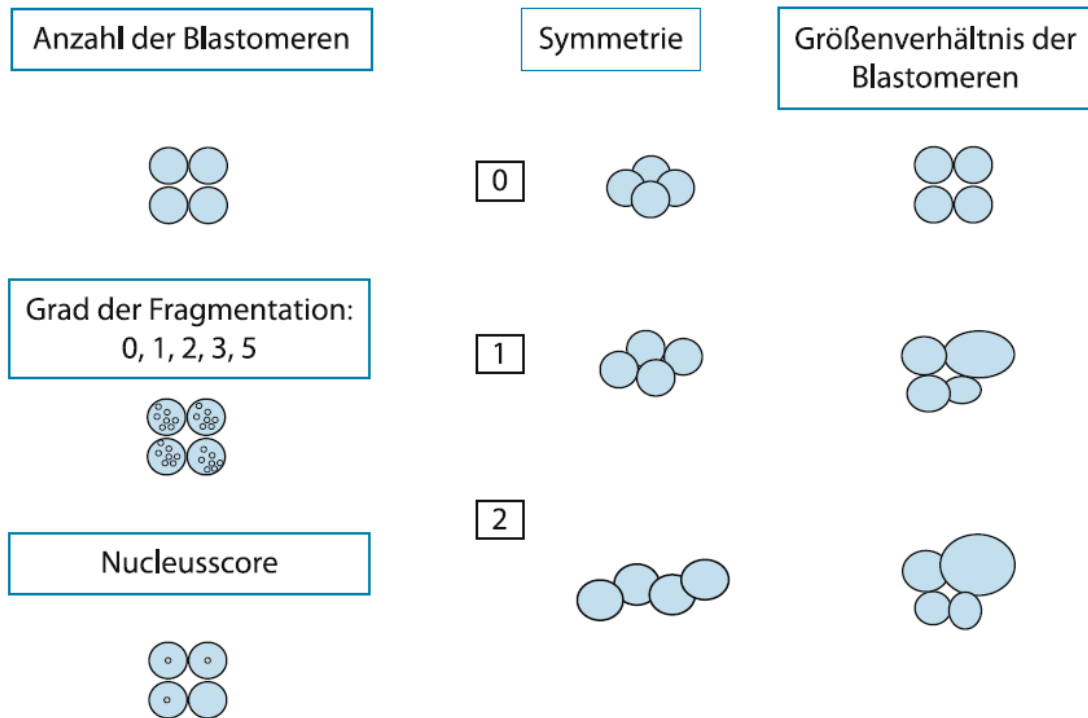


Abbildung 11: Morphologische Kriterien ⁴

Zur Bestimmung der Zellteilungen ohne einen Time-lapse Inkubator musste der Embryo in festgelegten Abständen – die je nach Institut variieren können – aus dem Brutschrank genommen und lichtmikroskopisch untersucht werden. Das erste Mal sollte dies nach einem Tag geschehen: Die Zygote sollte zu diesem Zeitpunkt bereits die beiden Vorkerne gebildet haben. Am 2. Tag sollte der Embryo schon das 4-Zell-Stadium erreicht haben. An Tag 3 liegt die Zahl bei einem gut entwickelten Embryo bereits zwischen 6 und 10. Einen Tag später sollte sich eine Morula gebildet haben, aus der sich an Tag 5 eine Blastozyste entwickelt. ⁷⁶

1.2.4.4 Die Bewertung der Blastozyste

Schließlich ist es auch noch möglich, die letzte Entwicklungsstufe des nicht implantierten Embryos zu bewerten, welche sich am 5. Tag nach der Befruchtung entwickelt haben sollte: die Blastozyste.

Das Blastozysten-Grading wurde um die Jahrtausendwende von Gardner et al.¹⁰⁵ entwickelt. Dieses konnte Blastozysten bewerten, von denen die besten bei zweifachem Transfer eine Implantationsrate von 72,8% aufwiesen, die niedrig eingestuft hingegen nur 28,1%.¹⁰⁵

Die wichtigsten Parameter für eine hohe Qualität der Blastozysten sind eine dünne Zona pellucida, ein glattes Trophektoderm, eine klar sichtbare Blastozystenhöhle, gleiche und nahe Blastomeradhäsionen, sowie eine gut entwickelte innere Zellmasse (siehe Abb. 12).⁹⁹







<p>1</p> <p>Early blastocyst</p> <p><i>Blastocoel less than half of the blastocyst</i></p>	 <p>1AA</p>		
<p>2</p> <p>Blastocyst</p> <p><i>Blastocoel more than half of the blastocyst</i></p>	 <p>2AA</p>		
<p>3</p> <p>Blastocyst</p> <p><i>Blastocoel fills the blastocyst</i></p>	 <p>3AA</p>		
<p>4</p> <p>Expanded blastocyst</p> <p><i>The embryo is large and the zona is thin</i></p>	 <p>4AA</p>	 <p>4BB</p>	 <p>4CC</p>
Inner cell mass	<i>Numerous and tightly packed cells</i>	<i>Several and loosely packed cells</i>	<i>Few cells</i>
Trophectoderm	<i>Many cells organized in epithelium</i>	<i>Several cells organized in loose epithelium</i>	<i>Few cells</i>

Abbildung 12: Blastozystenbewertung nach Gardner et al.⁹⁹

1.2.4.5 Die Bewertung des Embryos mithilfe eines TLI

Durch die Verwendung eines Time-lapse Inkubators kann die Morphologie des Embryos fast lückenlos untersucht und bewertet werden. Dies wird bewerkstelligt, indem – je nach Einstellung – beispielsweise alle 15 Minuten in mehreren Ebenen ein Bild von dem Entwicklungsstand des Embryos gemacht wird. Es können aber auch Beobachtungen gemacht werden, die sonst unentdeckt geblieben wären, wie etwa ein abnormales Teilungsverhalten. ¹⁰⁶

Dazu zählen direkte Teilungen vom 1-Zellstadium ins 3-Zellstadium bzw. vom 2-Zellstadium ins 5-Zellstadium. Derartige Zellteilungen machen 15,6% der Embryonen aus und betreffen hauptsächlich die Eizellen von jüngeren Frauen. ¹⁰⁶ Jedoch können auch Embryos mit abnormalem Teilungsverhalten zu Schwangerschaften mit gesunden Kindern führen. ¹⁰⁷

Ein weiteres abnormales Teilungsverhalten ist das sogenannte „reverse cleavaging“ ¹⁰⁸ – bei dem 2 Blastomeren wieder miteinander verschmelzen – und das Auftreten von mehrkernigen Zellen ¹⁰⁹.

Beides bewirkt eine erheblich verminderte Wahrscheinlichkeit auf eine SS. Mit dem Identifizieren und Ausschließen von Embryonen mit derartigen Anomalien wird die korrekte Embryonenauswahl wahrscheinlicher. ^{108,109}

Mit Hilfe des Time-lapse Inkubators lassen sich zudem die genauen Zellteilungszeiten des Embryos bestimmen. Mit diesen Teilungszeiten können ebenfalls Aussagen über die Qualität des Embryos gemacht werden. ¹¹⁰

In den letzten Jahren wurde viel daran geforscht, welche Teilungszeiten für eine hohe Implantationsrate sprechen und welche dagegen. Der aktuelle Stand der Forschung ist, dass die besten Prädiktoren für eine erfolgreiche Einnistung des Embryos folgende sind: der Zeitpunkt der Teilung zum 3-Zeller (t3), die Zeit zwischen der Teilung zum 2- und zum 3-Zeller (cc2) und der Zeitpunkt der Teilung zum 5-Zeller (t5). Idealerweise sollte t3 zwischen 34 und 40 Stunden, cc2 zwischen 9 und 12 Stunden und t5 zwischen 45 und 55 Stunden sein. ¹¹⁰

Zwar bieten Teilungszeiten, die durch die TLI gewonnen werden keine Alternative für die Embryonenauswahl über die Morphologie, kann diese jedoch entscheidend ergänzen. ¹¹¹

So kann ein Embryonenauswahlssystem, welches erst die Morphologie des Embryos bewertet, anschließend diejenigen mit abnormem Teilverhalten aussortiert und schlussendlich jene mit den besten Teilungszeiten beurteilt (siehe Abb. 13) Embryonen selektieren, welche beim SET eine Implantationsrate von 32% aufwiesen. ¹¹⁰

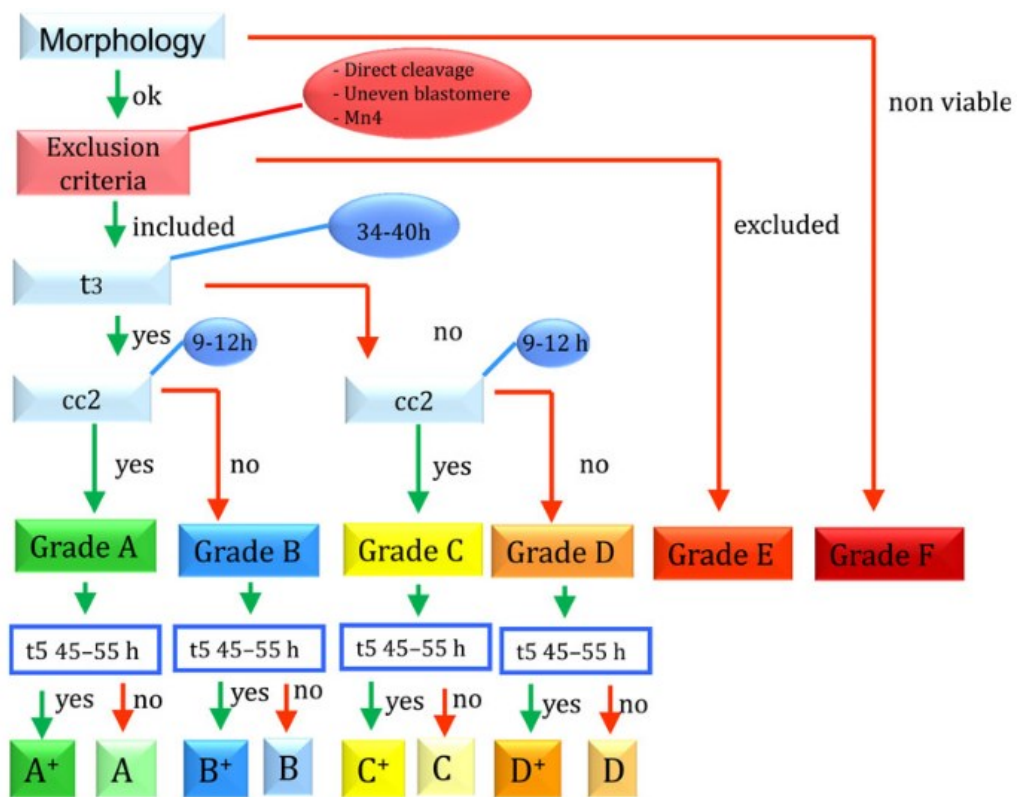


Abbildung 13: Beispiel für einen Auswahlalgorithmus ¹¹⁰

1.2.5 Der Embryonentransfer

Der Transfer des oder der geeignetsten Embryonen kann im Teilungsstadium ab Tag 2-3 und im Blastozystenstadium ab Tag 5-6 erfolgen.

In welchem der beiden Stadien die Reimplantation am besten erfolgt, ist oft umstritten, da sich die Schwangerschaftsraten der beiden Methoden in den meisten Fällen nicht wesentlich unterscheiden. ¹¹²

Der Blastozystentransfer wird meist bei SETs verwendet. Laut Studien sollte diese Art des Transfers besonders dann verwendet werden, wenn die Patientin über 35 Jahre alt ist und/oder von der Patientin mindestens 4 Embryonen zur Verfügung stehen. ¹¹³

Zudem hat der Zeitpunkt des Transfers auch Auswirkungen auf die Schwangerschaften selbst: Im Blastozystenstadium erhöht im Vergleich zum Teilungsstadium etwa das Risiko einer Frühgeburt, wohingegen das Risiko einer intrauterinen Wachstumsretardierung gesenkt wird. ¹¹⁴

Der Embryonentransfer in den Uterus wird mit einem Kunststoffkatheter durchgeführt und ist mittlerweile ein kurzer Eingriff, der ambulant durchgeführt wird. ⁴

Ob die Behandlung zu einer Schwangerschaft führt, hängt von mehreren Faktoren ab, wie etwa dem Alter der Mutter oder der Güte der Embryonenauswahl. Durchschnittlich ist die Chance auf eine klinische SS mit etwa 24% pro Embryonentransfer zu rechnen. ⁴

2 Material und Methoden

2.1 Datenherkunft

Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Studie, die einen eventuellen Einfluss der chronischen Krankheit Endometriose auf die Morphokinetik von frühen Embryonen untersuchen will, wie dies schon bei anderen vergleichbaren Einflussgrößen^{88,89} auf die weibliche Fruchtbarkeit nachgewiesen wurde.

Alle benötigten Daten stammen von Patientinnen des „Kinderwunsch Schenk Institut GmbH“, einem IVF-Institut in Dobl, in der Nähe von Graz. Eine Einverständniserklärung zur Verwendung der Daten seitens der Patientinnen liegt vor.

In den dortigen Datenbanken wurden je eine Gruppe von Embryonen von Patientinnen mit und von Patientinnen ohne Endometriose herausgesucht. Es wurden auch mehrere Embryonen pro Patientin in die Studie eingeschlossen.

Alle Patientinnen erhielten an dem genannten Institut eine IVF-Behandlung. Dabei wurden für die Stimulation fast ausschließlich kurze Protokolle verwendet; hierfür kamen als Gonadotropine die Medikamente GONAL-f®, Elonva® und Puregon® in der empfohlenen Dosis zum Einsatz. Als GnRH-Analogon wurde das Medikament Decapeptyl® verwendet, als Anagonist die Mittel Orgalutran® oder Cetrotide®.

Zum Auslösen der Ovulation wurde 36 Stunden vor der Punktion HCG in Form von Pregnyl® oder Ovitrelle® (letzteres Medikament bei frischen Transfers) gegeben.

Nach der Punktion erfolgte die Befruchtung teilweise mit konventioneller IVF, teilweise mit ICSI.

Anschließend wurden die Embryonen in einen Time-lapse Inkubator gegeben. Als Kulturmedium wurde „GM501 mit Phenolrot und Gentamicin“ verwendet.

Bei den Time-lapse Inkubatoren handelt es sich um zwei „Vitrolife EmbryoScope® time-lapse incubator“ Systeme, die seit August 2013 und Februar 2014 in dem Institut in Betrieb sind. Diese wurden programmiert, alle 15 Minuten den Entwicklungsstand des Embryos in 7 Ebenen zu dokumentieren. Die genauen Zellteilungszeiten wurden anhand des Bildmaterials mithilfe des Programms EmbryoViewer® von dafür ausgebildeten Embryologinnen und Embryologen bestimmt und darin eingetragen (siehe Abb. 14).

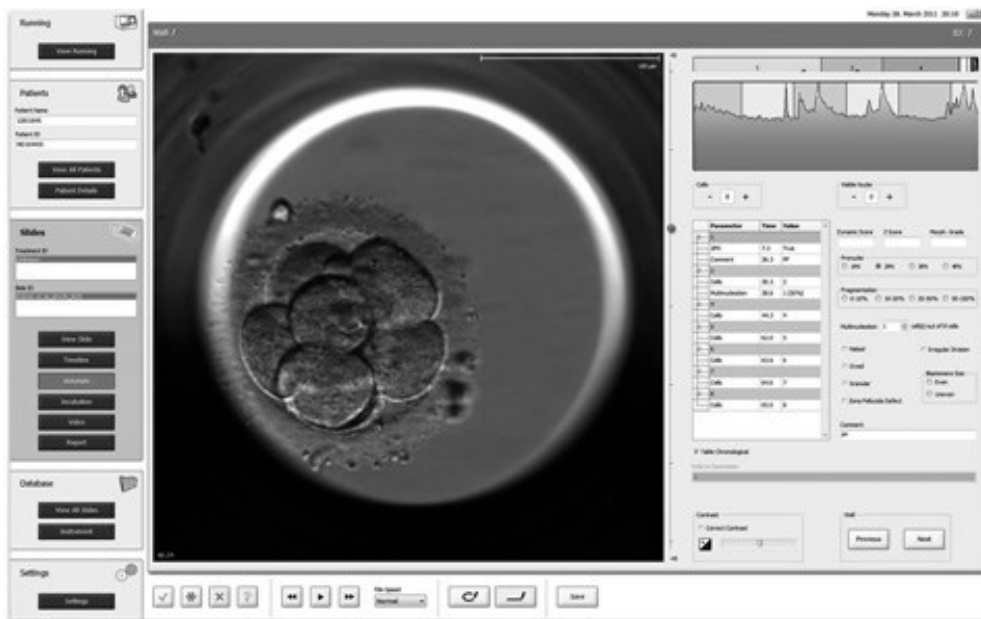


Abbildung 14: EmbryoViewer® Software ¹¹⁵

Die Eihautdicke wurde nach entsprechender Schulung vom Autor selbst bestimmt. Dazu wird anhand der Bilder im Programm EmbryoViewer® zum Zeitpunkt t3 die Zona Pellucida an drei Punkten – auf 12 Uhr, auf 3 Uhr und auf 6 Uhr der Eizelle - gemessen und daraus der Durchschnittswert berechnet. Wenn es nicht möglich war an einer dieser Stellen die ZP zu messen, wurde die Messung stattdessen auf 9 Uhr durchgeführt. Wenn auch dort oder gleich an mehreren Orten keine Messung durchgeführt werden konnte, wurden die messbaren Stellen genommen, die sich am nächsten an den beschriebenen Uhrzeiten befanden.

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Studie wurden aus der Datenbank zwei Gruppen von Embryonen herausgesucht: Die erste Gruppe bestand aus 73 Embryonen von Frauen mit Endometriose, die Kontrollgruppe setzt sich aus 73 Embryonen von Frauen ohne diese Erkrankung zusammen. Die Diagnose wurde hierbei meist laparoskopisch oder sonografisch gestellt.

Die Ausprägung der Krankheit spielte jedoch keine Rolle, da bereits bei sehr leichten Formen die Eizellqualität beeinträchtigt sein kann. ^{44,116}

Die Patientinnen der beiden Gruppen wurden nach BMI und Alter gematcht.

Ausschlusskriterien waren Adipostas (BMI>30), Anorexie (BMI<17,5), Alter über 35 und unter 25 Jahren, Nikotinabusus, Hormonstörungen (PCOS, eine reduzierte ovarielle Reserve, Kimakterum präkox, hypothalamische Amenorrhoe, AGS), Diabetes mellitus, chronische Entzündungen sowie schwere Erkrankungen von Leber, Schilddrüse oder Nieren.

Embryonen von Vätern mit Erbkrankheiten und groben Fehlbildungen der Spermien wurden ebenfalls ausgeschlossen. Es wurden zudem Embryonen exkludiert, die sich nicht bis in das 8-Zell-Stadium geteilt hatten.

2.3 Haupt- und Nebenzielgrößen

Die Hauptzielgröße ist t3, der Zeitpunkt der Teilung ins 3-zellige Stadium.

Diese Variable ist nicht nur ein guter Prädiktor für die Qualität des Embryos ¹¹⁰, sondern auch eine Größe, die sensibel auf innere und äußere Einflüsse reagiert, wie einige Studien ^{88,89,117} zeigen.

Die Nebenzielparameter sind die sonstigen Teilungen bis zur 8. Zellteilung, deren Teilungsintervalle, sowie die Dicke der Zona pellucida zum Zeitpunkt t3:

- t2, (Zeitpunkt der Teilung ins 2-zellige Stadium)
- t4, (Zeitpunkt der Teilung ins 4-zellige Stadium)
- t5, (Zeitpunkt der Teilung ins 5-zellige Stadium)
- t6, (Zeitpunkt der Teilung ins 6-zellige Stadium)
- t7, (Zeitpunkt der Teilung ins 7-zellige Stadium)
- t8, (Zeitpunkt der Teilung ins 8-zellige Stadium)
- cc2 (t3- t2)
- cc3 (t4- t3)
- cc4 (t5- t4)
- cc5 (t6- t5)
- cc6 (t7- t6)
- cc7(t8- t7)
- ZPT (Dicke der Zona pellucida zum Zeitpunkt t3)

2.4 Statistik

Die Fallzahl wurde vor Studienbeginn mithilfe vergleichbarer Studien^{89,90} für die Hauptzielgröße für ein α von 5% und eine Power von 90% auf 73 pro Gruppe errechnet.

Es wurden alle Zeitparameter mit einer ANOVA analysiert.

Da Embryonen von denselben Müttern in die Studie eingeschlossen wurden und Geschwister-Embryonen nicht als unabhängig angesehen werden können, wurde der Effekt der Mutter als zusätzlicher „random Effekt“ in das Modell aufgenommen. Es handelte sich hierbei also um ein allgemeines lineares Modell mit gemischten Effekten: dem „fixed effect“ der beiden Gruppen und der „random effect“ der Mütter.

Zusätzlich wurden die Hauptzielgröße t3 und die ZPT wurde mittels einem t-Test für unabhängigen Messungen auf Unterschiede zwischen den Gruppen analysiert.

2.5 Datenschutz

Alle Patientinnen wurden mit einer fortlaufenden Nummer pseudonymisiert. Die auszuwertenden Daten wurden nur mit diesem Code versehen in einer Excel-Tabelle auf einem PC mit Zugriffsbeschränkung am „Kinderwunsch Schenk Institut GmbH“ gespeichert und anschließend ausgewertet. Nur autorisierte Personen hatten Zugriff auf die Originaldaten.

2.6 Votum der Ethikkommission

Ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz wurde vor Beginn der Datensammlung eingeholt, welche keine Einwände gegen die Durchführung dieser Studie vorgebracht. Die Nummer des Votums lautet 28-401 ex 15/16 und wurde am 03.05.2016 unterschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Gesammelte Daten

Die Embryonen der Endometriose-Gruppe kamen von 17 verschiedenen Frauen, die Embryonen der Kontrollgruppe stammten von 19 verschiedenen Frauen.

Insgesamt wurden 146 Embryonen ausgewertet; davon 73 von Patientinnen mit Endometriose und 73 von Patientinnen ohne Endometriose.

Es konnten jedoch nicht immer alle Zeitparameter eines Embryos gesammelt werden, da die Datensätze unvollständig waren. Dies betrifft meist die höheren Teilungsstadien, wo durch die Vielzahl der dicht gedrängten Zellen die Zeitpunkte der Übergänge der verschiedenen Zellstadien nicht immer eindeutig festgestellt werden konnten.

Auch bei der Vermessung der ZP konnten einige Zellen nicht vermessen werden, was meist von einer Überdeckung durch Granulosazellen herrührte.

3.2 Verteilung des Alters und BMI

Die Daten der Embryonen der Endometriosegruppe kamen von Patientinnen, welche zum Zeitpunkt der Punktion im Durchschnitt 30,2 Jahre alt waren und einen BMI von durchschnittlich 21,1 hatten. Passend dazu wurde die gesunde Kontrollgruppe gematcht, bei der die Embryonen im Durchschnitt von Patientinnen im Durchschnittsalter von 30,5 Jahren stammten und deren durchschnittlicher BMI 20,8 war.

3.3 Auswertung der Daten

3.3.1 Nebenzielgröße t2

Für t2 wurde von 70 Embryonen der Patientinnen mit Endometriose ein Mittelwert von 26,8957 Stunden mit einer Standardabweichung von 3,01332 Stunden ermittelt. Bei den 73 Embryonen von den Patientinnen ohne Endometriose betrug der Mittelwert 26,4164 Stunden und die Standardabweichung 2,64712 Stunden. Bei der Analyse mittels der beschriebenen ANOVA stellte sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied heraus ($p=0,4621$).

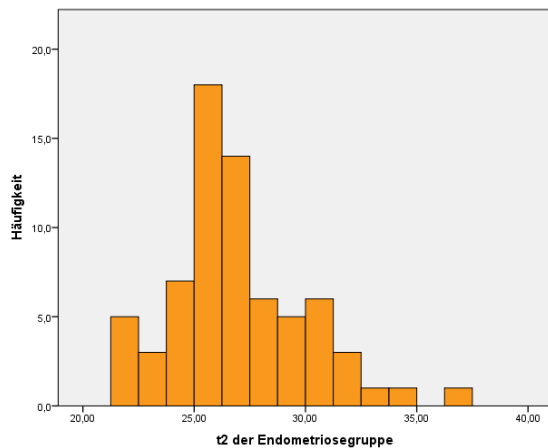


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung von t2 der Endometriosegruppe

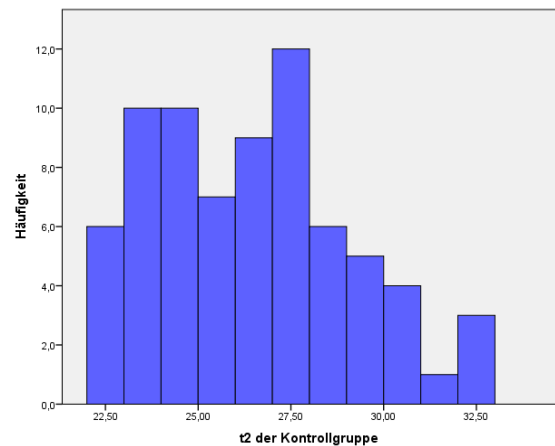


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung von t2 der Kontrollgruppe

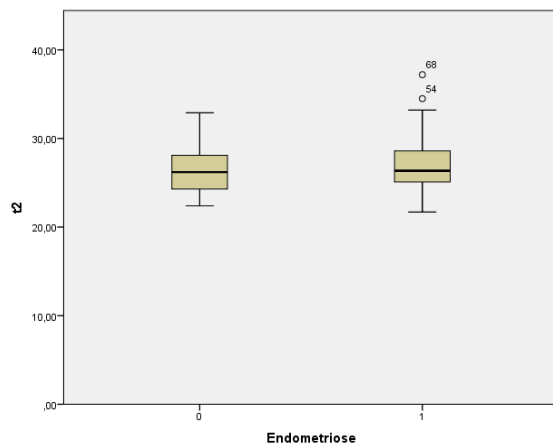


Abbildung 17: Boxplots von t2

3.3.2 Hauptzielgröße t3

Für die Hauptzielgröße t3 konnten für jede Gruppe 73 Zeiten gesammelt werden. Daraus errechnete sich für die Endometriosegruppe ein Mittelwert von 26,8957 Stunden mit einer Standardabweichung von 3,01332 Stunden. In der Kontrollgruppe war der Mittelwert 26,4164 Stunden mit einer Standardabweichung von 2,64712 Stunden.

Es konnte jedoch weder mit einem t-Test ($p=0,240$) noch mit einer ANOVA im mixed model ($p= 0,8587$) ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden.

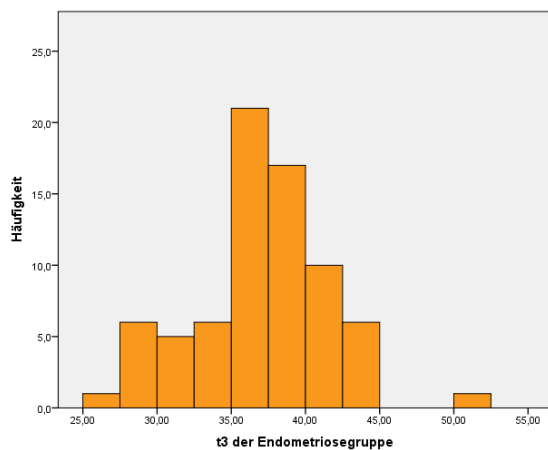


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung von t3 der Endometriosegruppe

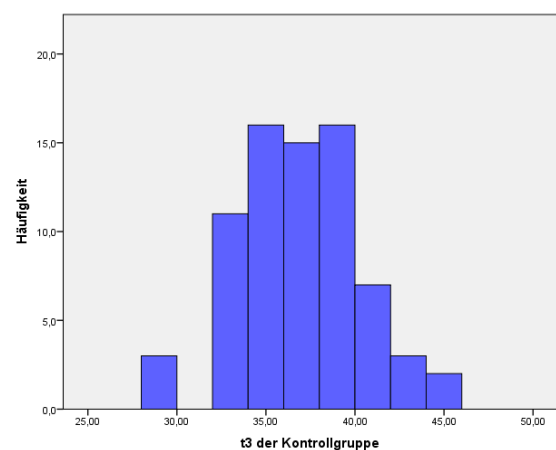


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung von t3 der Kontrollgruppe

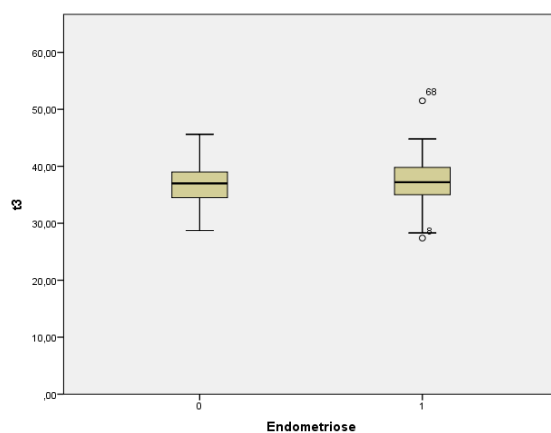


Abbildung 20: Boxplots von t3

3.3.3 Nebenzielgröße t4

Für den Zeitparameter t4 errechnete sich aus 69 Zeiten in der Endometriosegruppe eine Mittelwert von 38,7406 Stunden, sowie eine Standardabweichung von 4,27807 Stunden. Die Kontrollgruppe kam durch 71 Zeiten auf einen Wert von 38,9408 Stunden mit einer Standardabweichung von 3,89903 Stunden.

Die Auswertung konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufzeigen ($p=0,8872$).

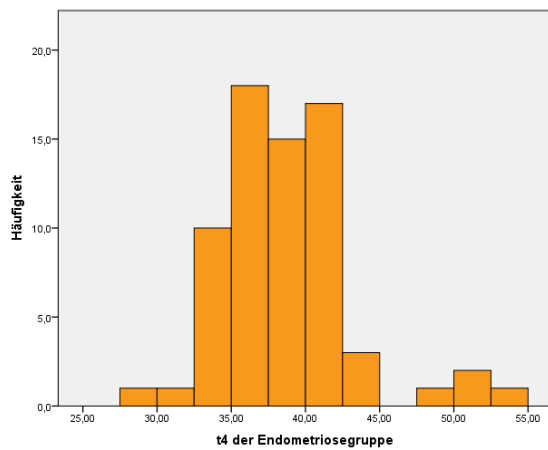


Abbildung 21: Häufigkeitsverteilung von t4 der Endometriosegruppe

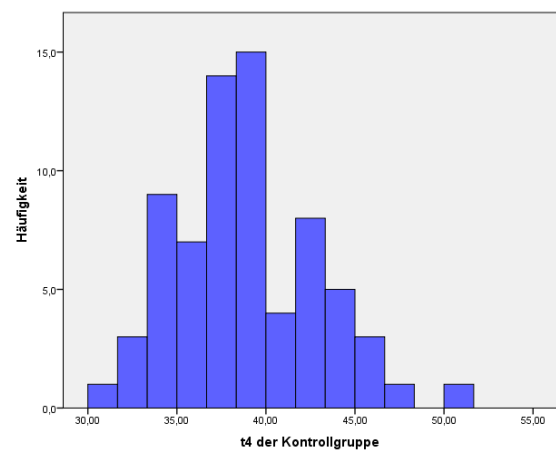


Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung von t4 der Kontrollgruppe

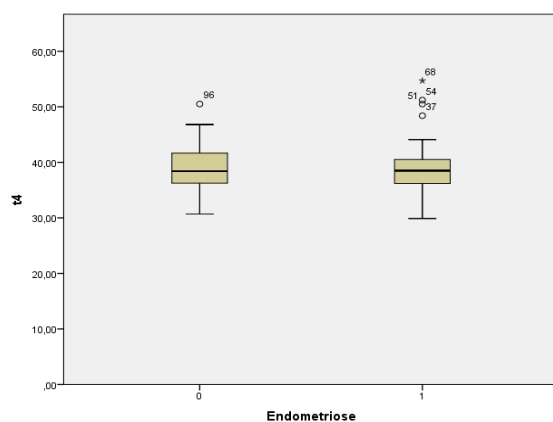


Abbildung 23: Boxplots von t4

3.3.4 Nebenzielgröße t5

Bei t5 errechneten sich die Werte aus jeweils 70 gesammelten Zeiten.

Die Mittelwerte und Standardabweichung bei t5 waren für die Endometriosegruppe 49,14 (7,17149) Stunden, sowie für die Kontrollgruppe 49,7086 (6,1053) Stunden.

Die Varianzanalyse widerlegte auch hier einen signifikanten Zeitunterschied der Gruppen ($p=0,6157$)

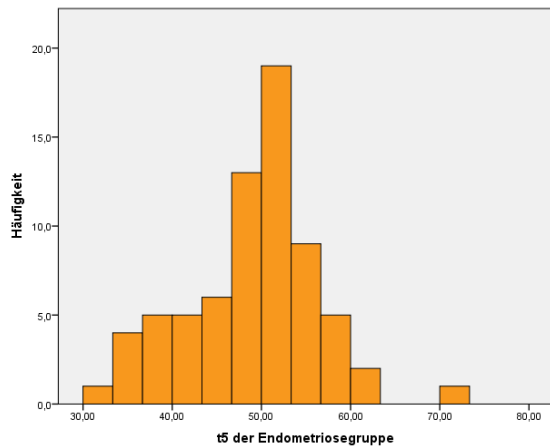


Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung von t5 der Endometriosegruppe

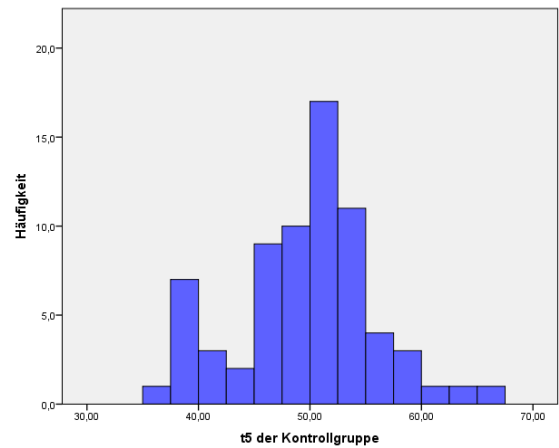


Abbildung 25: Häufigkeitsverteilung von t5 der Kontrollgruppe

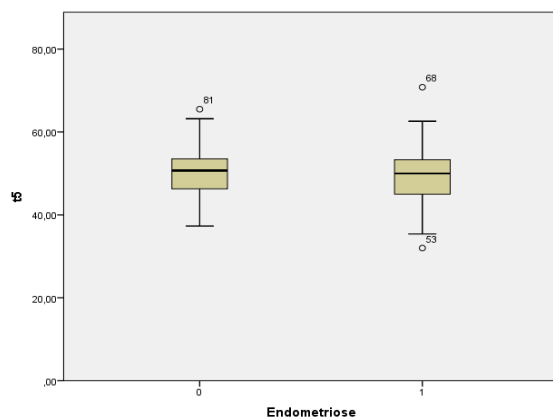


Abbildung 26: Boxplots von t5

3.3.5 Nebenzielgröße t6

Für diesen Parameter konnten für die erkrankte Patientinnengruppe 71 Zeiten, für die Kontrollgruppe 72 Zeiten gesammelt werden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen errechneten sich auf 52,6831 (6,12571) Stunden für erstere und 52,8694 (5,71523) Stunden für letztere Gruppe.

Eine ANOVA konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen ($p=0,9045$)

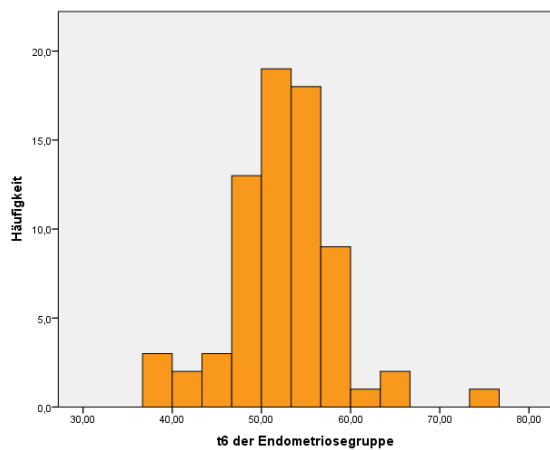


Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung von t6 der Endometriosegruppe

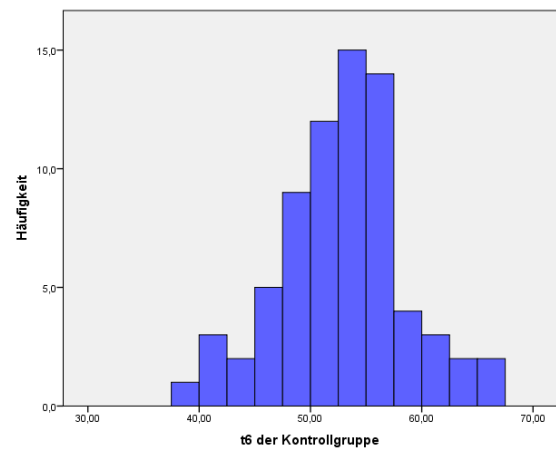


Abbildung 28: Häufigkeitsverteilung von t6 der Kontrollgruppe

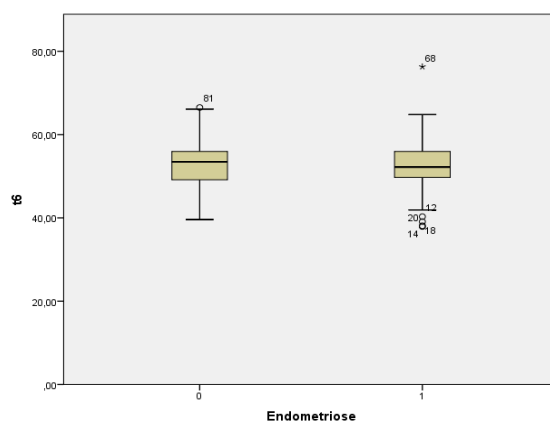


Abbildung 29: Boxplots von t6

3.3.6 Nebenzielgröße t7

Für die Endometriosegruppe konnten für diesen Parameter 58 Zeiten genommen werden, für die andere Gruppe waren es 52.

Der Mittelwert und die SD der erkrankten Gruppe fiel auf 56,3448 (7,20488) Stunden, die der Kontrollgruppe auf 58,5365 (8,656) Stunden.

Trotz einer Mittelwertdifferenz von über 2 Stunden konnte die ANOVA für t7 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bestimmen ($p=0,3544$)

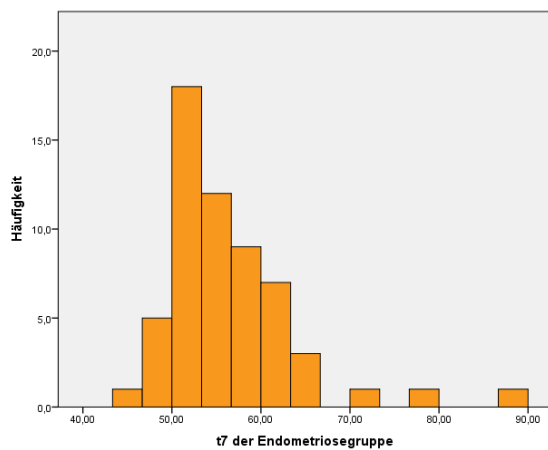


Abbildung 30: Häufigkeitsverteilung von t7 der Endometriosegruppe

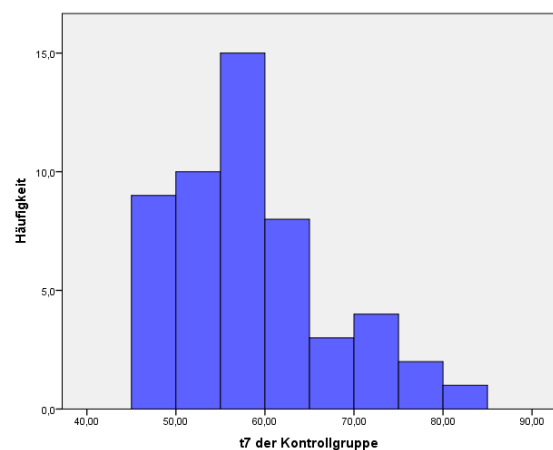


Abbildung 31: Häufigkeitsverteilung von t7 der Kontrollgruppe

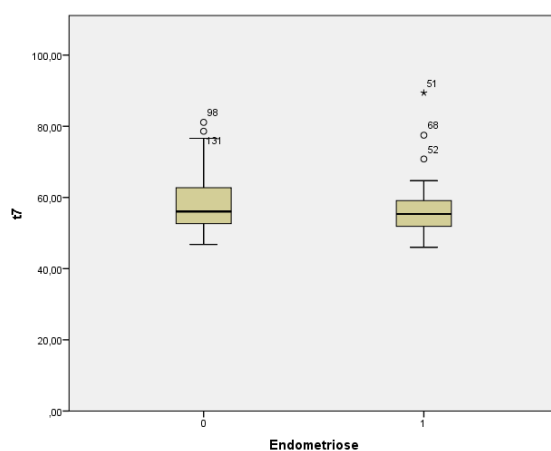


Abbildung 32: Boxplots von t7

3.3.7 Nebenzielgröße t8

Für den Zeitparameter t8 wurden für die Endometriosegruppe 70 Zeiten gesammelt, für die Kontrollgruppe 68. Bei den gesammelten Daten errechnete sich Mittelwert und Standardabweichung von 60,5914 (9,79569) Stunden für die Endometriosegruppe und 63,6868 (9,25651) Stunden für die Kontrollgruppe.

Wie bei t7 waren auch bei diesem Zeitparameter größere Zeitunterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen, doch auch hier konnte die Varianzanalyse keine Signifikanz feststellen ($p=0,3352$)

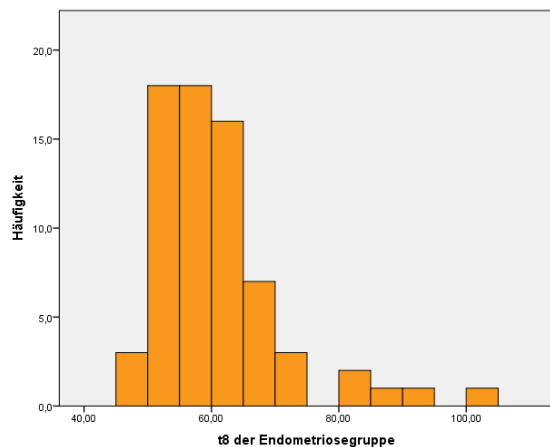


Abbildung 33: Häufigkeitsverteilung von t8 der Endometriosegruppe

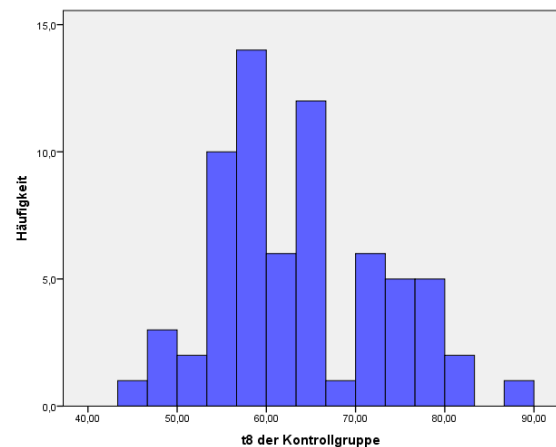


Abbildung 34: Häufigkeitsverteilung von t8 der Kontrollgruppe

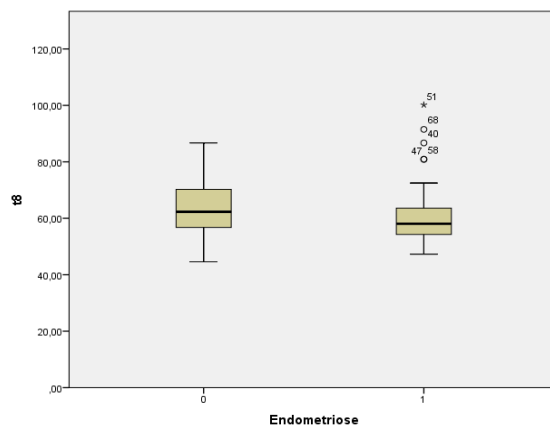


Abbildung 35: Boxplots von t8

3.3.8 Nebenzielgröße cc2

Für die Endometriosegruppe errechnete sich für cc2 – die Zeitdifferenz zwischen t2 und t3 – Mittelwert und Standardabweichung von 10,3086 (3,15175) Stunden; es wurden 70 Zeiten analysiert. Für die 73 Zeiten der Kontrollgruppe ergaben sich ein Mittelwert und eine SD von 10,3986 (3,17234) Stunden.

Die ANOVA konnte keine signifikanten Zeitunterschiede feststellen ($p=0,9235$).

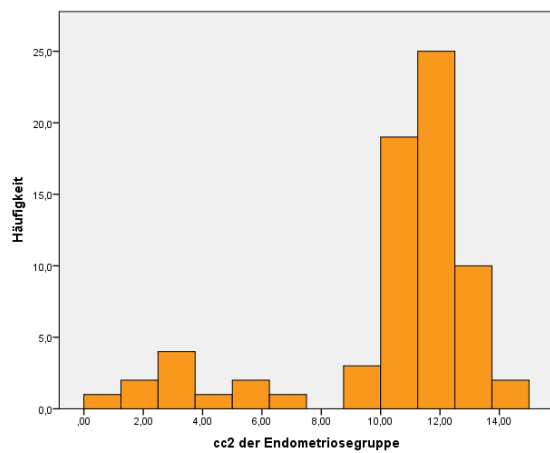


Abbildung 36: Häufigkeitsverteilung von cc2 der Endometriosegruppe

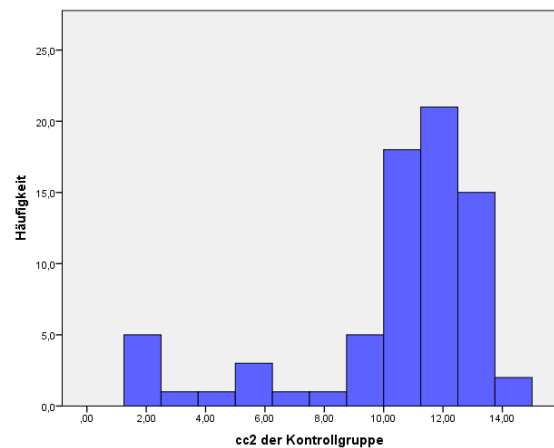


Abbildung 37: Häufigkeitsverteilung von cc2 der Kontrollgruppe

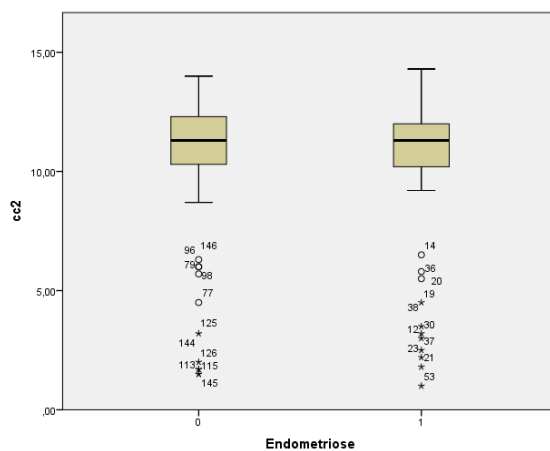


Abbildung 38: Boxplots von cc2

3.3.9 Nebenzielgröße cc3

Bei dem Zeitparameter cc3, der Zeitdifferenz zwischen t3 und t4, wurde bei der Endometriosegruppe 69 Zeiten gemessen und daraus ein Mittelwert und eine SD von 1,9739 (2,81622) Stunden berechnet. Die Kontrollgruppe kam auf 71 Messungen und einen Mittelwert und eine SD von 2,093 (3,0466) Stunden.

Durch die ANOVA konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erwiesen werden ($p= 0,7878$).

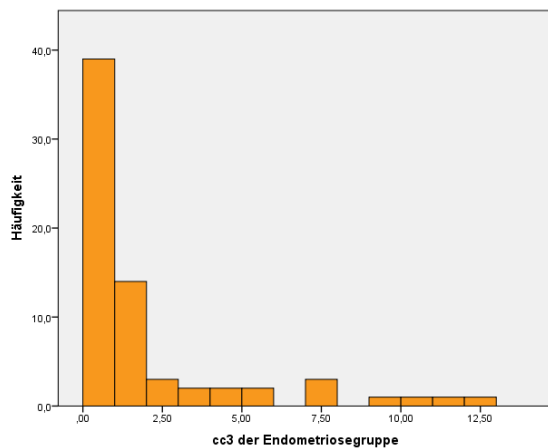


Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung von cc3 der Endometriosegruppe

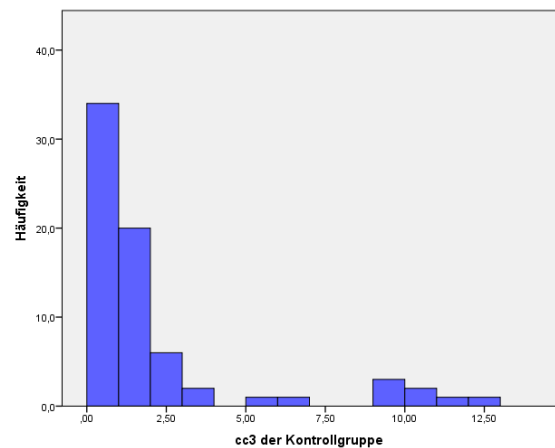


Abbildung 40: Häufigkeitsverteilung von cc3 der Kontrollgruppe

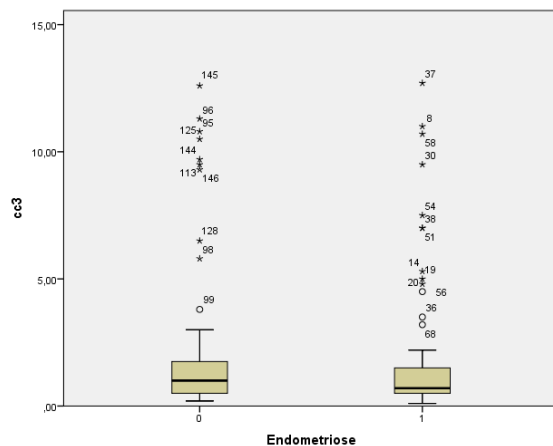


Abbildung 41: Boxplots von cc3

3.3.10 Nebenzielgröße cc4

Bei dem Zeitunterschied zwischen t4 und t5 wurden für die Gruppe mit Endometriose 66 Zeiten gemessen und daraus ein Mittelwert und eine SD von 10,8545 (4,72301) Stunden berechnet. Die Kontrollgruppe kam auf 68 Messungen und einen Mittelwert und eine SD von 11,1853 (4,87725) Stunden.

Durch die ANOVA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erwiesen werden ($p= 0,7439$).

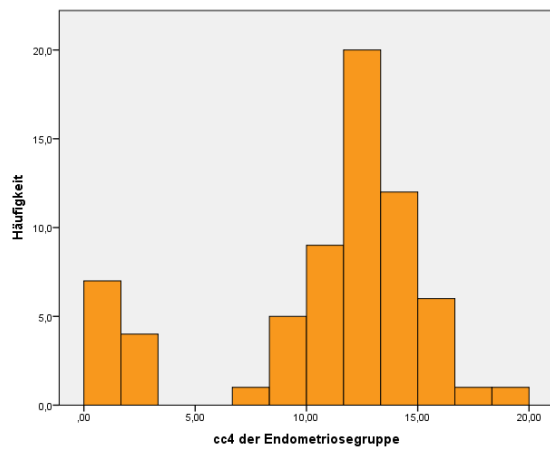


Abbildung 42: Häufigkeitsverteilung von cc4 der Endometriosegruppe

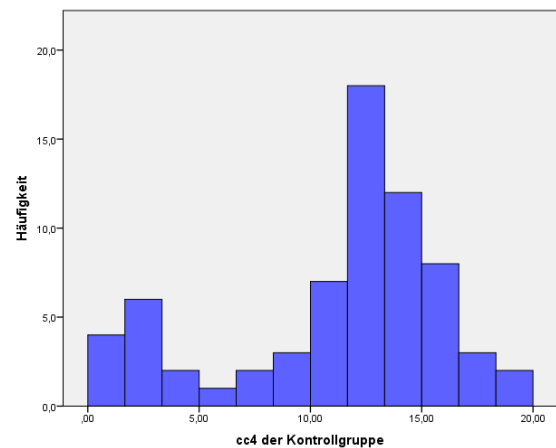


Abbildung 43: Häufigkeitsverteilung von cc4 der Kontrollgruppe

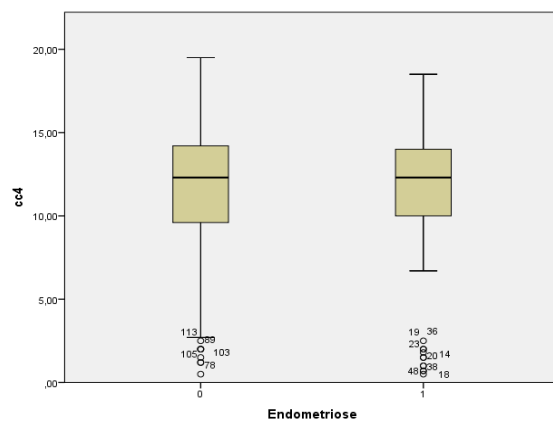


Abbildung 44: Boxplots von cc4

3.3.11 Nebenzielgröße cc5

Für cc5 – der Zeitdifferenz zwischen t5 und t6 - wurden jeweils 68 Zeiten gemessen. Für die Embryonen der Frauen mit Endometriose wurden daraus ein Mittelwert und eine SD von 3,4 (4,26849) Stunden und für die Embryonen von Frauen ohne EM ein Mittelwert und eine SD von 3,2221 (3,99208) Stunden ermittelt.

Auch bei cc5 konnte die ANOVA keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen errechnen ($p= 0,7029$).

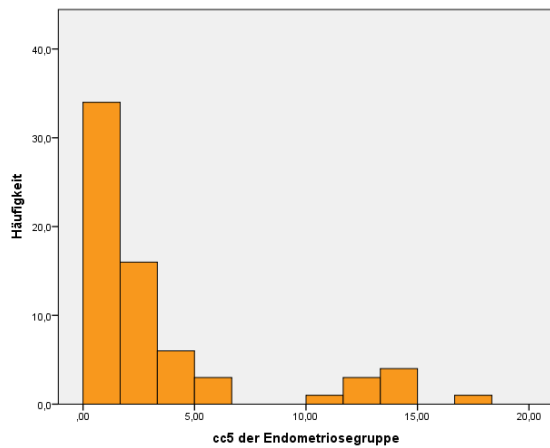


Abbildung 45: Häufigkeitsverteilung von cc5 der Endometriosegruppe

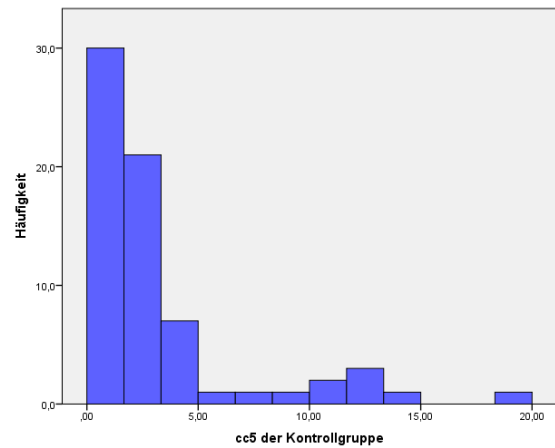


Abbildung 46: Häufigkeitsverteilung von cc5 der Kontrollgruppe

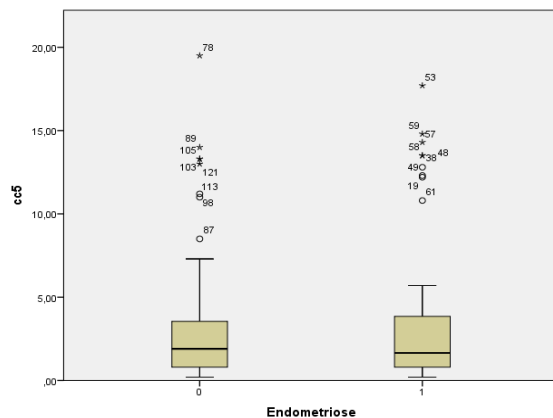


Abbildung 47: Boxplots von cc5

3.3.12 Nebenzielgröße cc6

Der Parameter cc6 – die Zeit zwischen t6 und c7 - wurde für die Endometriosegruppe 57-fach gemessen und daraus ein Mittelwert und eine SD von 3,0596 (4,16876) Stunden berechnet. Die Kontrollgruppe kam auf 51 Messungen und einen Mittelwert und eine SD von 6,6784 (7,30989) Stunden.

Obwohl sich der Mittelwertunterschied der beiden Gruppen auf über 3 Stunden belief, konnte die ANOVA im mixed model keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen ($p=0,0662$).

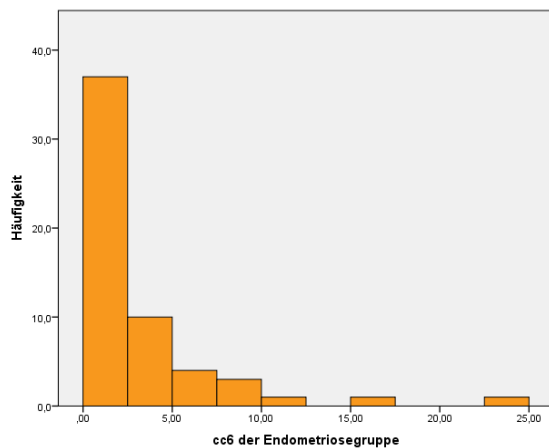


Abbildung 48: Häufigkeitsverteilung von cc6 der Endometriosegruppe

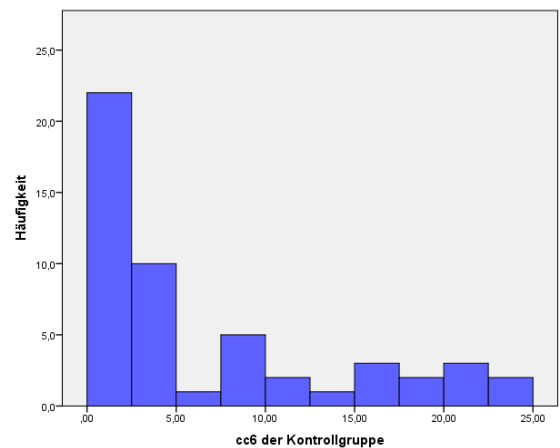


Abbildung 49: Häufigkeitsverteilung von cc6 der Kontrollgruppe

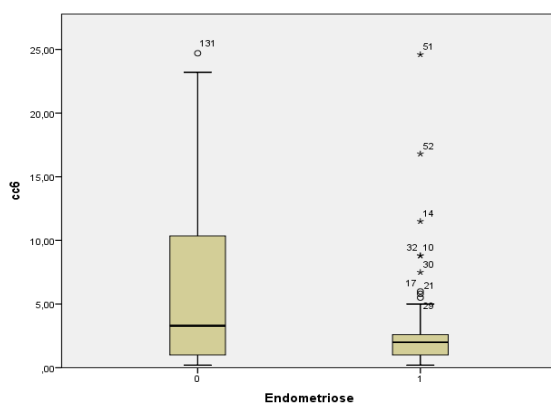


Abbildung 50: Boxplots von cc6

3.3.13 Nebenzielgröße cc7

Bei dem Zeitparameter cc7 – der Differenz von t7 zu t8 – wurden für die Endometriosegruppe 55 Zeiten gemessen und daraus ein Mittelwert und eine SD von 4,6727 (5,01496) Stunden berechnet. Die Kontrollgruppe kam mit 48 Messungen auf einen Mittelwert und eine SD von 4,5408 (4,39753) Stunden.

Auch hier errechnete sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p= 0,9769$).

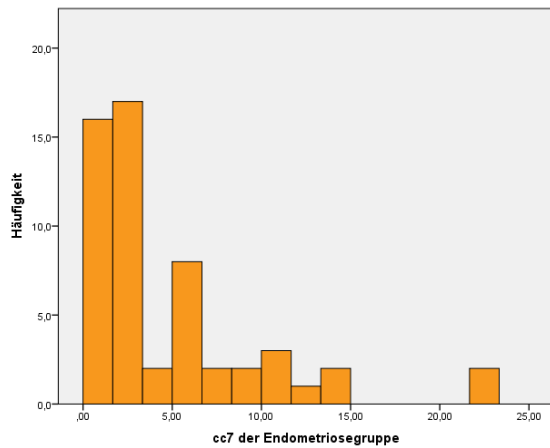


Abbildung 51: Häufigkeitsverteilung von cc7 der Endometriosegruppe

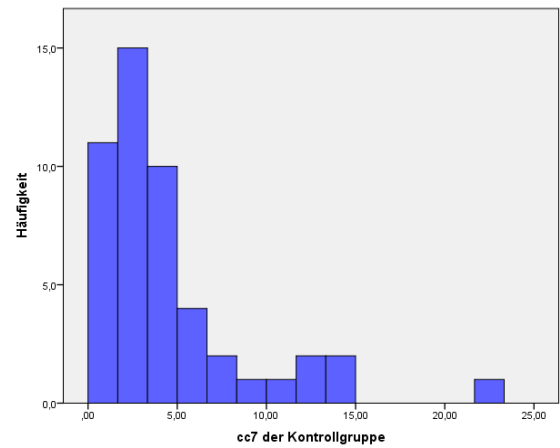


Abbildung 52: Häufigkeitsverteilung von cc7 der Kontrollgruppe

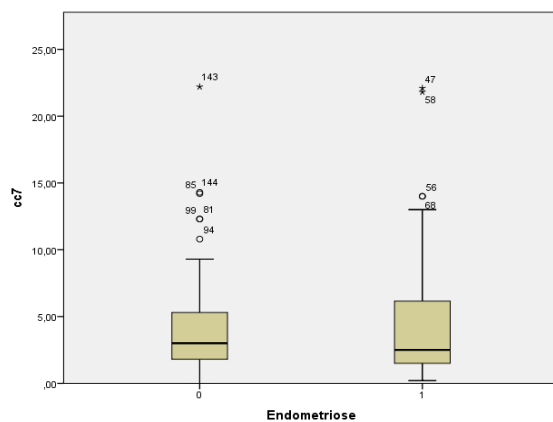


Abbildung 53: Boxplots von cc7

3.3.14 Nebenzielgröße ZPT

Die Eihautdicke wurde an 66 Embryonen aus der Endometriosegruppe gemessen, woraus sich ein Mittelwert und eine SD von 18,0121 (2,34636) μm errechneten. Die Kontrollgruppe kam auf 71 Messungen und einen Mittelwert und eine SD von 18,5836 (2,66484) μm .

Es konnte jedoch mit einem t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen errechnet werden ($p=0,184$).

Eine ANOVA im mixed model konnte dieses Ergebnis bestätigen ($p=0,558$).

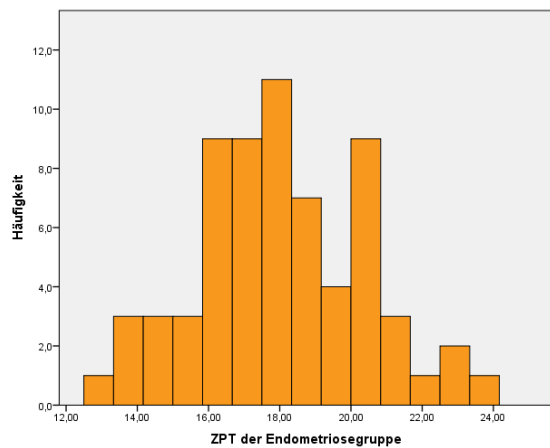


Abbildung 54: Häufigkeitsverteilung der ZPT der Endometriosegruppe

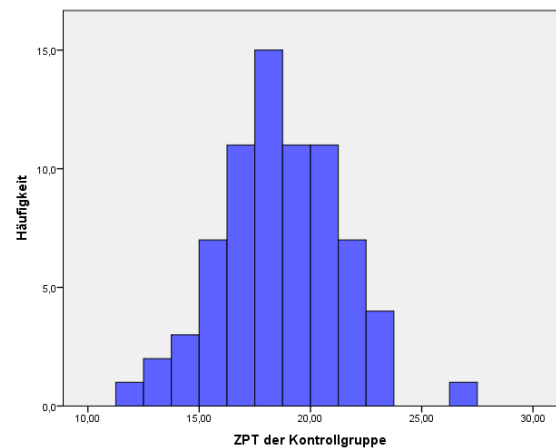


Abbildung 55: Häufigkeitsverteilung der ZPT der Kontrollgruppe

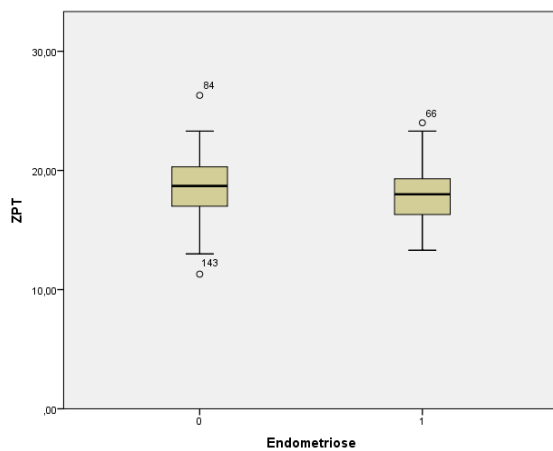


Abbildung 56: Boxplots der ZPT

4 Diskussion

Es handelt sich bei dieser Arbeit um die erste Studie, die einen Einfluss der EM auf die Morphokinetik von frühen Embryonen untersucht.

Bei anderen Faktoren mit einem schädlichen Einfluss auf die Eizellqualität, wie beispielsweise dem PCOS⁸⁸, aneuploiden Zellen¹¹⁸ oder auch schädlichen Noxen⁸⁹, konnten teilweise gravierende Änderungen der Teilungszeiten nachgewiesen werden.

Das hyperandrogene PCOS bewirkt beispielsweise eine Verzögerung von t2, t3, t4 und t7.⁸⁸

Aneuploide Embryonen wiesen unter Anderem verlängerte Teilungszeiten in t2, t5, cc2 und cc3 auf.¹¹⁸

Sogar ein Nikotinkonsum der Mutter bewirkte signifikant langsamere Teilungszeiten in t3, t4 und t5.⁸⁹

Da davon auszugehen war, dass die EM einen ähnlich schädlichen Einfluss auf den Embryo haben würde wie die genannten Einflussfaktoren, wurden die Teilungszeiten und deren Zwischenzeiten einer EM-Gruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass sich bei keiner der untersuchten Zeiten t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, cc2, cc3, cc4, cc5, cc6 und cc7 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestimmen lässt.

Besonders gering fielen die Unterschiede bei der Betrachtung der Hauptzielgröße t3, und den Nebenzielgrößen t2, t4, t5, t6, cc2, cc3, cc4, cc5, und cc7 aus.

Dort wurden nur sehr geringe Mittelwertunterschiede von unter einer Stunde zwischen den Gruppen gemessen.

Beim Vergleich der dieser Mittelwerte war auch keine Tendenz erkennbar: in einigen Fällen waren die Mittelwerte der EM-Gruppe leicht länger, in einigen die der Kontrollgruppe.

Doch warum ändern sich bei einem PCOS, einer Aneuploidie oder einem Nikotinkonsum die Teilungszeiten und bei einer EM nicht?

Einen Erklärungsversuch auf diese Frage liefert die Vermutung, dass der Hauptgrund für die Unfruchtbarkeit bei diesen Einflussgrößen hauptsächlich von einer Schädigung der Eizelle rührt.

Am besten erklärt sich dies bei einer Aneuploidie. Die Ursache für die verringerte Embryonenqualität beruht dabei einzig auf einer fehlerhaften Anzahl der Chromosomen und keinen sonstigen Einflussfaktoren. ¹¹⁸

Obwohl der Tabakkonsum einen Einfluss auf das Endometrium ¹¹⁹ und eine Verdickung der ZP ¹²⁰ bewirkt, wird als Hauptursache der Subfertilität eine Schädigung der Keimzellen angenommen; diese führt auch bei rauchenden Männern zu einer geringeren Fruchtbarkeit ¹.

Dabei greift der Nikotinkonsum nicht nur in die Follikulogenese ein, sondern schädigt auch die Eizelle und deren DNA, die meiotische Spindel und die Granulosazellen durch Noxen wie Nikotin und Kadmium. ¹²¹

Die daraus resultierenden Schäden zeigen sich unter anderem in signifikant schlechteren Ergebnissen von Therapien der ART. ¹²²

Bei dem PCOS ist die Pathogenese etwas komplizierter.

Die Ursache dieser Krankheit ist zwar nicht vollständig geklärt, hat jedoch einen großen Einfluss auf die Ovarien und die darin lagernden Eizellen. ¹²³

In diesen Ovarien besteht neben der Bildung von multiplen Zysten eine hormonelle Störung der Follikelproliferation. Die Hauptursache der Infertilität sind dadurch ausgelöste Ovulationsstörungen. ¹²³

Da bei dieser Krankheit auch die IVF Implantationsraten signifikant niedriger waren, scheint es nicht verwunderlich, dass sich ein derartiger Einfluss auf die Eizellen auch in den Embryonenteilungszeiten widerspiegelt. ¹²⁴

Beim Krankheitsbild der Endometriose ist es – und das unterstreicht auch diese Studie – unwahrscheinlich, dass die Subfertilität eine alleinige Folge des endometrialen Einflusses auf die Eizellen ist. ¹

Erst in Verbindung mit den anderen Folgen der Endometriose, wie der geringeren Zilienmotilität ⁴⁸, der gestörten Innervation der Tuben ⁴⁹, dem veränderten Endometrium ¹²⁵, der erhöhten Immunantwort auf Spermien ⁴⁷, dem veränderten

Hormonstatus^{61,62} und eventuell noch einigen anderen, noch nicht entdeckten Aspekten, können sich die hohen Subfertilitätsraten bei Endometriose auch erklären lassen. Der Faktor der Eizellschädigung könnte hierbei eine untergeordnete Rolle spielen.

Welche der einzelnen Faktoren dabei die größte und welcher die geringste Rolle spielt ist dabei schwer zu erklären und hängt dabei teilweise wohl auch von dem individuellen Krankheitsbild der Patientin ab.

Bei einzelnen Fällen kann diese Frage zwar beantwortet werden: Bei Patientinnen, bei denen der Eizelltransport durch eine lokal destruierenden Endometriose oder eine obstruktiven Tubenendometriose gestört wird, wird die Infertilität mit großer Wahrscheinlichkeit an jenem Faktor liegen.¹

Auch Patientinnen, bei denen sich eine immunologische Infertilität gebildet hat, dürfte die Infertilität zum Großteil durch einem Mangel von motilen Spermien verursacht werden.⁴⁷

Aber in wie weit die anderen Faktoren, wie etwa die gestörte Innervation der Tuben⁴⁹, die verlangsamte Zilienmotilität⁴⁸, die reduzierte Embryoaufnahme im Uterus¹²⁵ und eben die Eizellschädigung die Chancen auf eine Schwangerschaft beeinflusst, ist nur sehr schwer zu sagen.¹

Besonders im Hinblick auf die Eizellschädigung und dem daraus resultierenden Qualitätsverlust der Embryonen sind deren Folgen auf die Implantations- und Schwangerschaftsrate weniger gut erforscht und bereits existierende Studien teilweise widersprüchlich.

So werden in den Studien, die Auswirkungen der EM auf eine IVF-Behandlung untersuchen, keine Unterschiede in den Implantationsraten von Embryonen von gesunden und erkrankten Frauen gefunden.⁷¹

Eine Studie aus dem Jahr 1994 von Simon,C et al. besagt hingegen, dass gespendete Eizellen eine erniedrigte Implantationswahrscheinlichkeit aufweisen, wenn diese von erkrankten Spenderinnen kamen.⁴⁰

Es ist auch möglich, dass noch andere Faktoren existieren, die durch die EM beeinflusst werden und noch weitgehend unbekannt sind.

Als einer dieser Faktoren wurde bei Studienbeginn die Dicke der Zona pellucida vermutet, da Veränderungen der Schichtdicke der ZP schon bei anderen Einflussfaktoren wie dem Nikotinkonsum nachgewiesen wurden.¹²⁰

Zudem verliefen die Punktionen bei ICSI-Behandlungen laut Aussage der Embryologinnen und Embryologen am Institut subjektiv anders, wenn die Embryonen von Patientinnen mit dieser Krankheit stammten.

Auch bei der konventionellen IVF hatte man beobachtet, dass die Befruchtungsraten niedriger waren als bei Befruchtungen mittels ICSI.¹²⁶

Durch die Ergebnisse dieser Studie zeigt sich jedoch keine signifikante Abweichung der durchschnittlichen Eihautdicken zwischen den beiden Gruppen.

Es könnten daher in Zukunft Studien folgen, welche die Zusammensetzung der Zona pellucida der Embryonen bei Endometriose untersuchen. Auch Dickschwankungen der Eihaut sollten in zukünftigen Messungen untersucht werden, da bei dieser Studie nur ein durchschnittlicher Wert von 3 Messpunkten berücksichtigt wurde.

Doch während bei den Zielgrößen t2, t3, t4, t5, t6, cc2, cc3, cc4, cc5, und cc7 mit hoher Sicherheit ein durch die Endometriose bedingter Einfluss ausgeschlossen werden konnte, waren die Ergebnisse bei den Zeiten von t7, t8 und cc6 weniger eindeutig. Bei diesen Zeitparametern konnten Unterschiede zwischen den Mittelwerten von bis zu über 3 Stunden gefunden werden. Die Zeiten waren dabei für die EM-Gruppe durchwegs länger als für die Kontrollgruppe.

Zwar konnte die ANOVA im mixed model auch bei diesen Zielgrößen keinen signifikanten Unterschied erkennen; die Zeiten könnten jedoch ein Hinweis darauf sein, dass Studien mit einer größeren Stichprobe dort einen signifikanten Unterschied ermitteln könnten und somit einen Einfluss der EM auf die Zellteilungen ab dem 6-zelligen Stadium nachweisen könnten.

Dass bei Embryonen von Frauen mit EM für t7, t8 und cc6 eine Veränderung der Morphokinetik vorliegt, die mit dem Stichprobenumfang dieser Studie nicht errechnet werden konnte, ist nicht unrealistisch.

Die einfachste Erklärung hierfür wäre logischerweise, dass die EM einen tatsächlichen Einfluss auf die Teilungszeiten der Embryonen haben könnte. Dies war schließlich die anfängliche Vermutung dieser Studie und hatte einige Gründe, die dafür sprechen würden.

Es wurde schon in zahlreichen Studien der Einfluss der EM auf die Eizellen erfolgreich untersucht. Dabei wurden teils sehr unterschiedliche Ansatzpunkte der Schädigung gefunden, die unter anderem durch oxidativen Stress^{42,43} und ein inflammatorisches Milieu⁴¹ verursacht wurden.

So werden unter anderem Schädigungen des Zytoskeletts⁴⁵, eine Beeinträchtigung des Spindelfaserapparates⁴⁶, eine Schädigung der DNA sowie das Vorliegen von abnormen Mitochondrien⁴⁴ beschrieben.

All diese Veränderungen können im direkten Zusammenhang mit einer gestörten Zellteilungsrate verstanden werden.

Neben diesen Faktoren könnten jedoch noch andere Größen die Teilungen beeinflussen, bei denen die EM nur eine indirekte Rolle spielt.

Wie bereits erwähnt, hat sich gezeigt, dass eine Befruchtung durch eine konventionelle IVF bei Endometriosepatientinnen weniger erfolgversprechend als eine ICSI ist.¹²⁶

Dies führt dazu, dass an Instituten bei solchen Embryonen bevorzugt ICSIs durchgeführt werden, was wiederum zu einem höheren Anteil dieser Behandlungsmethode in der Endometriosegruppe als in der Kontrollgruppe geführt haben könnte. Da die Schwangerschaftsraten von ICSI und konventioneller IVF jedoch gleich sind und die ICSI nicht im Verdacht steht, die die Embryonenqualität zu senken, wurde die Art der Befruchtung bei dieser Studie nicht berücksichtigt.

97,98

Ein leichter Einfluss auf die späteren Teilungszeiten nach t6 kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Es wäre daher empfehlenswert, eventuelle Unterschiede bei den embryonalen Teilungsraten zwischen ICSI und konventioneller IVF zu untersuchen.

Eine weitere Ursache bei IVF-Behandlungen könnte die lange Kultivierung selbst sein. Es fällt auf, dass nur die späteren Zellteilungen nach t6 eine Tendenz zu

einer verzögerten Teilung zeigen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Embryonen die Kultivierung in dem Inkubator nur bis zu einer gewissen Dauer tolerieren.

Es ist bereits bekannt, dass die Brutschränke und das Kulturmedium zwar versuchen der natürlichen Umgebung in vivo möglichst nahe zu kommen, dies aber nicht vollständig schaffen. ¹²⁷

Es wäre also möglich, dass Embryonen, die bereits durch einen oder mehrere der genannten Einflussfaktoren der Endometriose beeinträchtigt wurden, auf dieses künstliche Umfeld besonders sensibel reagieren könnten. Wenn dies in einer folgenden Studie bestätigt werden könnte, würde dies in diesen Fällen für einen früheren Rücktransfer des Embryos und gegen einen späten Blastozystentransfer sprechen.

Es sollte jedoch abschließend erwähnt werden, dass selbst wenn eine Folgestudie eine Verzögerung von t7, t8 oder cc6 bestätigen könnte, es keine Hinweise darauf gibt, dass mit einer verzögerten Zellteilung nach t6 von einem ernsthaften Qualitätsverlust der Embryonen ausgegangen werden sollte, da diese Teilungszeiten laut aktuellem Stand der Forschung keine wichtigen Marker für die Embryonenqualität darstellen. ¹¹⁰

Die Ergebnisse dieser Studie weisen zusammenfassend darauf hin, dass die durch die Endometriose induzierte Infertilität weniger Ursache einer verringerten Eizellqualität ist, sondern eher aus den anderen Faktoren, bzw. deren Zusammenspiel resultiert.

5 Literaturverzeichnis

1. Klaus D, Ludwig M, Griesinger G. *Reproduktionsmedizin*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. 10.1007/978-3-642-30181-0.
2. Montoya JM, Bernal A, Borrero C. Diagnostics in assisted human reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2002;5(2):198-210.
3. Chiamchanya C, Su-angkawatin W. Study of the causes and the results of treatment in infertile couples at thammawat hospital between 1999-2004. *J Med Assoc Thai*. 2008;91(6):805-812.
4. Kaufmann M, Costa S,D., Scharl A. *Die Gynäkologie*. Vol 2016. 3. Auflage ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. Accessed 2/5/2016. 10.1007/978-3-642-20923-9.
5. Paavonen J, Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: Impact on human reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999;5(5):433-447.
6. Kramer DG, Brown ST. Sexually transmitted diseases and infertility. *Int J Gynaecol Obstet*. 1984;22(1):19-27.
7. Rock A, Marcelli F, Robin G, Mitchell V, Leroy C, Rigot JM. Clinical and paraclinical features of klinefelter syndrome consulting for male infertility. *Prog Urol*. 2014;24(12):757-763.
8. Grynberg M, Bidet M, Benard J, et al. Fertility preservation in turner syndrome. *Fertil Steril*. 2016;105(1):13-19.

9. Levine JM, Kelvin JF, Quinn GP, Gracia CR. Infertility in reproductive-age female cancer survivors. *Cancer*. 2015;121(10):1532-1539.
10. Ostrowski KA, Walsh TJ. Infertility with testicular cancer. *Urol Clin North Am*. 2015;42(3):409-420.
11. Abrao MS, Muzii L, Marana R. Anatomical causes of female infertility and their management. *Int J Gynaecol Obstet*. 2013;123 Suppl 2:S18-24.
12. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*. 2008;90(2):247-257.
13. Benagiano G, Brosens I. Who identified endometriosis? *Fertil Steril*. 2011;95(1):13-16.
14. Soave I, Caserta D, Wenger JM, Dessole S, Perino A, Marci R. Environment and endometriosis: A toxic relationship. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(11):1964-1972.
15. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24(2):235-258.
16. Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril*. 2009;92(1):68-74.
17. Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: Epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1127:92-100.

18. Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: Heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(2):219-232.
19. Saha R, Pettersson HJ, Svedberg P, et al. Heritability of endometriosis. *Fertil Steril*. 2015;104(4):947-952.
20. Redwine DB. Was sampson wrong? *Fertil Steril*. 2002;78(4):686-693.
21. Maruyama T, Yoshimura Y. Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:2854-2863.
22. Kralickova M, Vetvicka V. Immunological aspects of endometriosis: A review. *Ann Transl Med*. 2015;3(11):153-5839.2015.06.08.
23. Asante A, Taylor RN. Endometriosis: The role of neuroangiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:163-182.
24. Rawson JM. Prevalence of endometriosis in asymptomatic women. *J Reprod Med*. 1991;36(7):513-515.
25. Dun EC, Kho KA, Morozov VV, Kearney S, Zurawin JL, Nezhat CH. Endometriosis in adolescents. *JSLS*. 2015;19(2):10.4293/JSLS.2015.00019.
26. Ek M, Roth B, Ekstrom P, Valentin L, Bengtsson M, Ohlsson B. Gastrointestinal symptoms among endometriosis patients--A case-cohort study. *BMC Womens Health*. 2015;15:59-015-0213-2.
27. Kvaskoff M, Mu F, Terry KL, et al. Endometriosis: A high-risk population for major chronic diseases? *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):500-516.

28. Friedl F, Riedl D, Fessler S, et al. Impact of endometriosis on quality of life, anxiety, and depression: An austrian perspective. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292(6):1393-1399.
29. Hudelist G, Fritzer N, Thomas A, et al. Diagnostic delay for endometriosis in austria and germany: Causes and possible consequences. *Hum Reprod*. 2012;27(12):3412-3416.
30. Nisenblat V, Bossuyt PM, Shaikh R, et al. Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;5:CD012179.
31. Liu E, Nisenblat V, Farquhar C, et al. Urinary biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;12:CD012019.
32. Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Darai E. Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril*. 2009;92(6):1825-1833.
33. Saba L, Sulcis R, Melis GB, et al. Diagnostic confidence analysis in the magnetic resonance imaging of ovarian and deep endometriosis: Comparison with surgical results. *Eur Radiol*. 2014;24(2):335-343.
34. Walter AJ, Hentz JG, Magtibay PM, Cornella JL, Magrina JF. Endometriosis: Correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(7):1407-11; discussion 1411-3.

35. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(8):441-447.
36. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, Meuleman C. Endometriosis and subfertility: Is the relationship resolved? *Semin Reprod Med.* 2003;21(2):243-254.
37. Jin X, Ruiz Beguerie J. Laparoscopic surgery for subfertility related to endometriosis: A meta-analysis. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2014;53(3):303-308.
38. Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis-associated infertility. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;53 Suppl 1:19-25.
39. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;75(1):1-10.
40. Simon C, Gutierrez A, Vidal A, et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: Results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod.* 1994;9(4):725-729.
41. Opoien HK, Fedorcsak P, Polec A, Stensen MH, Abyholm T, Tanbo T. Do endometriomas induce an inflammatory reaction in nearby follicles? *Hum Reprod.* 2013;28(7):1837-1845.
42. Da Broi MG, de Albuquerque FO, de Andrade AZ, Cardoso RL, Jordao Junior AA, Navarro PA. Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Cell Tissue Res.* 2016.

43. Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod Toxicol*. 2013;42:116-124.
44. Xu B, Guo N, Zhang XM, et al. Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis. *Sci Rep*. 2015;5:10779.
45. Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: A possible cause of infertility. *Fertil Steril*. 2010;94(5):1894-1899.
46. Da Broi MG, Malvezzi H, Paz CC, Ferriani RA, Navarro PA. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. *Hum Reprod*. 2014;29(2):315-323.
47. Oral E, Arici A, Olive DL, Huszar G. Peritoneal fluid from women with moderate or severe endometriosis inhibits sperm motility: The role of seminal fluid components. *Fertil Steril*. 1996;66(5):787-792.
48. Lyons RA, Djahanbakhch O, Saridogan E, et al. Peritoneal fluid, endometriosis, and ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Lancet*. 2002;360(9341):1221-1222.
49. Zhu L, Huang Q, Huang X, Zhang J, Xu H, Zhang X. Decreased nerve fibers in the oviduct isthmus of women with endometriosis. *Acta Histochem*. 2014;116(5):871-877.

50. Morcos RN, Gibbons WE, Findley WE. Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos: Possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril*. 1985;44(5):678-683.
51. Shen F, Yan C, Liu M, Feng Y, Chen Y. Decreased expression of mucin-1 in endometriosis endometrium correlated with progesterone receptor B involved in infertility. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;291(2):439-445.
52. Ota H, Igarashi S, Sato N, Tanaka H, Tanaka T. Involvement of catalase in the endometrium of patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 2002;78(4):804-809.
53. Ota H, Igarashi S, Kato N, Tanaka T. Aberrant expression of glutathione peroxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 2000;74(2):313-318.
54. Ota H, Igarashi S, Tanaka T. Xanthine oxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 2001;75(4):785-790.
55. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 1999;72(1):129-134.
56. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 1998;69(2):303-308.

57. Wei Q, St Clair JB, Fu T, Stratton P, Nieman LK. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2009;91(5):1686-1691.
58. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 1999;72(1):129-134.
59. Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA, Harlow CR, Hull MG. Pituitary-ovarian dysfunction as a cause for endometriosis-associated and unexplained infertility. *Hum Reprod*. 1995;10(12):3142-3146.
60. Cahill DJ, Hull MG. Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2000;6(1):56-66.
61. Hipp H, Loucks TL, Nezhat C, Sidell N, Session DR. Anti-mullerian hormone in peritoneal fluid and plasma from women with and without endometriosis. *Reprod Sci*. 2015;22(9):1129-1133.
62. Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS. Decreased anti-mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril*. 2008;89(5):1064-1068.
63. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, et al. ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(3):400-412.
64. Brown J, Farquhar C. Endometriosis: An overview of cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;3:CD009590.

65. Yap C, Furness S, Farquhar C. Pre and post operative medical therapy for endometriosis surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(3)(3):CD003678.
66. Chang FH, Chou HH, Soong YK, Chang MY, Lee CL, Lai YM. Efficacy of isotopic 13CO₂ laser laparoscopic evaporation in the treatment of infertile patients with minimal and mild endometriosis: A life table cumulative pregnancy rates study. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1997;4(2):219-223.
67. Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(2):CD004992. doi(2):CD004992.
68. Tummon IS, Asher LJ, Martin JS, Tulandi T. Randomized controlled trial of superovulation and insemination for infertility associated with minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril.* 1997;68(1):8-12.
69. Werbrouck E, Spiessens C, Meuleman C, D'Hooghe T. No difference in cycle pregnancy rate and in cumulative live-birth rate between women with surgically treated minimal to mild endometriosis and women with unexplained infertility after controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2006;86(3):566-571.
70. Surrey ES. Endometriosis-related infertility: The role of the assisted reproductive technologies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:482959.
71. Hamdan M, Dunselman G, Li TC, Cheong Y. The impact of endometrioma on IVF/ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2015;21(6):809-825.

72. Pabuccu R, Onalan G, Kaya C. GnRH agonist and antagonist protocols for stage I-II endometriosis and endometrioma in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2007;88(4):832-839.
73. Sallam HN, Garcia-Velasco JA, Dias S, Arici A. Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(1)(1):CD004635.
74. Opoien HK, Fedorcsak P, Byholm T, Tanbo T. Complete surgical removal of minimal and mild endometriosis improves outcome of subsequent IVF/ICSI treatment. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(3):389-395.
75. Papaleo E, Ottolina J, Vigano P, et al. Deep pelvic endometriosis negatively affects ovarian reserve and the number of oocytes retrieved for in vitro fertilization. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90(8):878-884.
76. Moore K, Persaud T. *Embryologie*. 5th ed. München: ; 2007.
77. Westendorp RG, Kirkwood TB. Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature*. 1998;396(6713):743-746.
78. Ron E, Auvinen A, Alfandary E, Stovall M, Modan B, Werner A. Cancer risk following radiotherapy for infertility or menstrual disorders. *Int J Cancer*. 1999;82(6):795-798.
79. Ron E, Boice JD, Jr, Hamburger S, Stovall M. Mortality following radiation treatment for infertility of hormonal origin or amenorrhoea. *Int J Epidemiol*. 1994;23(6):1165-1173.

80. Beall SA, DeCherney A. History and challenges surrounding ovarian stimulation in the treatment of infertility. *Fertil Steril*. 2012;97(4):795-801.
81. Basile N, Caiazza M, Meseguer M. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015;27(3):193-200.
82. Freour T, Lammers J, Splingart C, Jean M, Barriere P. Time lapse (embryoscope(R)) as a routine technique in the IVF laboratory: A useful tool for better embryo selection? *Gynecol Obstet Fertil*. 2012;40(9):476-480.
83. Kola I, Trounson A, Dawson G, Rogers P. Tripronuclear human oocytes: Altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol Reprod*. 1987;37(2):395-401.
84. Cohen J, Wiemer KE, Wright G. Prognostic value of morphologic characteristics of cryopreserved embryos: A study using videocinematography. *Fertil Steril*. 1988;49(5):827-834.
85. [Http://Www.vitrolife.com/en/products/EmbryoScope-time-lapse-system/support-material/product-images/](http://www.vitrolife.com/en/products/EmbryoScope-time-lapse-system/support-material/product-images/).
86. Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online*. 2010;20(4):510-515.
87. Basile N, Vime P, Florensa M, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: A multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*. 2015;30(2):276-283.

88. Wissing ML, Bjerger MR, Olesen AI, Hoest T, Mikkelsen AL. Impact of PCOS on early embryo cleavage kinetics. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(4):508-514.
89. Freour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barriere P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1944-1950.
90. Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: A time-lapse study. *Hum Reprod*. 2013;28(3):794-800.
91. Ludwig M. *Kinderwunschsprechstunde*. 2nd ed. ; 2007.
92. Obruca A, Fischl F, Huber J,C. GnRH - gonadotropin releasing hormon: Mechanismen und therapeutische anwendung in der assistierten reproduktion. *Journal für Fertilität und Reproduktion*. 1998;8(4/22/2016):28-33.
93. Timeva T, Milachich T, Antonova I, Arabaji T, Shterev A, Omar HA. Correlation between number of retrieved oocytes and pregnancy rate after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm infection. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:686-690.
94. Zafer M, Horvath H, Mmeje O, et al. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2016;105(3):645-655.e2.

95. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(4)(4):CD004507.
96. Tachawiwat K, Getpook C, Geater A. Comparison of hyaluronan binding assay scores of spermatozoa using swim-up techniques and density gradient centrifugation. *J Med Assoc Thai*. 2015;98 Suppl 2:S84-91.
97. Eindhoven SC, van Uiter EM, Laven JS, et al. The influence of IVF/ICSI treatment on human embryonic growth trajectories. *Hum Reprod*. 2014;29(12):2628-2636.
98. Borges E, Jr, Rossi LM, Locambo de Freitas CV, et al. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertil Steril*. 2007;87(2):316-320.
99. Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol*. 2004;4(1):5-22.
100. Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(9):891-900.
101. Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, Lindenberg S. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2000;17(6):323-328.
102. Palmstierna M, Murkes D, Csemiczky G, Andersson O, Wramsby H. Zona pellucida thickness variation and occurrence of visible mononucleated blastomers

in preembryos are associated with a high pregnancy rate in IVF treatment. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15(2):70-75.

103. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, et al. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod.* 2000;15(6):1396-1399.

104. Bar-Yoseph H, Levy A, Sonin Y, et al. Morphological embryo assessment: Reevaluation. *Fertil Steril.* 2011;95(5):1624-8.e1-2.

105. 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(6):1155-1158.

106. Almagor M, Or Y, Fieldust S, Shoham Z. Irregular cleavage of early preimplantation human embryos: Characteristics of patients and pregnancy outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(12):1811-1815.

107. Fan YL, Han SB, Wu LH, Wang YP, Huang GN. Abnormally cleaving embryos are able to produce live births: A time-lapse study. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(3):379-385.

108. Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the embryoscope time-lapse video system. *Fertil Steril.* 2014;102(5):1295-1300.e2.

109. Ergin EG, Caliskan E, Yalcinkaya E, et al. Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2014;102(4):1029-1033.e1.
110. Basile N, Vime P, Florensa M, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: A multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*. 2015;30(2):276-283.
111. Kirkegaard K, Ahlstrom A, Ingerslev HJ, Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril*. 2015;103(2):323-332.
112. Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, et al. Single day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: A prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Hum Reprod*. 2009;24(5):1051-1058.
113. Fernandez-Shaw S, Cercas R, Brana C, Villas C, Pons I. Ongoing and cumulative pregnancy rate after cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer using vitrification for cryopreservation: Impact of age on the results. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(2):177-184.
114. Maheshwari A, Kalampokas T, Davidson J, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos generated through in vitro fertilization treatment: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;100(6):1615-21.e1-10.

115. <https://www.ivi-fertility.com/de/patienten/techniken-k%C3%BCnstliche-befruchtung/embryoscope/>. .
116. Carvalho LF, Below A, Abrao MS, Agarwal A. Minimal and mild endometriosis negatively impact on pregnancy outcome. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(5):607-614.
117. Joergensen MW, Agerholm I, Hindkjaer J, et al. Altered cleavage patterns in human tripronuclear embryos and their association to fertilization method: A time-lapse study. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(4):435-442.
118. Chawla M, Fakhri M, Shunnar A, et al. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(1):69-75.
119. Soares SR, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Cigarette smoking affects uterine receptiveness. *Hum Reprod*. 2007;22(2):543-547.
120. Shiloh H, Lahav-Baratz S, Koifman M, et al. The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Hum Reprod*. 2004;19(1):157-159.
121. Zenzes MT. Smoking and reproduction: Gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2000;6(2):122-131.
122. Waylen AL, Metwally M, Jones GL, Wilkinson AJ, Ledger WL. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: A meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009;15(1):31-44.

123. El Hayek S, Bitar L, Hamdar LH, Mirza FG, Daoud G. Poly cystic ovarian syndrome: An updated overview. *Front Physiol.* 2016;7:124.
124. Pan JX, Liu Y, Ke ZH, et al. Successive and cyclic oral contraceptive pill pretreatment improves IVF/ICSI outcomes of PCOS patients and ameliorates hyperandrogenism and antral follicle excess. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31(4):332-336.
125. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet.* 2004;364(9447):1789-1799.
126. Komsky-Elbaz A, Raziel A, Friedler S, et al. Conventional IVF versus ICSI in sibling oocytes from couples with endometriosis and normozoospermic semen. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(2):251-257.
127. Blockeel C, Mock P, Verheyen G, et al. An in vivo culture system for human embryos using an encapsulation technology: A pilot study. *Hum Reprod.* 2009;24(4):790-796.