

Masterarbeit

Einfluss von epidemiologischen Parametern und Lifestyle-Parametern auf das Auftreten von einfachen und kombinierten chromosomalen Veränderungen bei subfertilen Frauen

eingereicht von

Rüdiger Hochstätter

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (M.Sc.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Das Kinderwunsch Institut Schenk GmbH

und an dem

Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von

Dr.med.univ. Michael Schenk, MAS

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

Graz, am 26. September 2020

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 26. September 2020

Rüdiger Hochstätter eh

Danksagungen

Ich möchte mich bei Dr. Michael Schenk und seinem wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. Gregor Weiss für ihre Unterstützung und Geduld in der Erstellung dieser Masterarbeit herzlich bedanken.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Jochen Geigl und Prof. Mag. DDr. Erwin Petek für die Vermittlung des Masterarbeitsthemas.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	i
Danksagungen	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Zusammenfassung	vi
Abstract	vii
Glossar und Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
1 Einleitung	1
1.1 Definition Infertilität/Sterilität, Epidemiologie, Ursachen	1
1.1.1 Ursachen der Infertilität	2
1.2 Lifestyle Auswirkungen auf die Fertilität	9
1.2.1 Koitus-Frequenz	9
1.2.2 Konsanguinität	9
1.2.3 Ernährung	9
1.2.4 Gewicht	11
1.2.5 Bewegung	13
1.2.6 Psyche	14
1.2.7 Koffein-Konsum	15
1.2.8 Nikotinabusus	15
1.2.9 Alkoholabusus	17
1.2.10 Medikamenten- & Drogeneinnahme	17
1.2.11 Luftverschmutzung	19
1.2.12 Pestizide, endokrine Disruptoren und weitere Chemikalien	19

1.2.13	Schwermetalle	19
1.2.14	Strahlung	20
1.2.15	Kontrazeptiva	21
1.2.16	Arztbesuche	21
1.2.17	Bekleidung.....	21
1.2.18	Sauna, Whirlpools & heiße Bäder	22
1.2.19	Gleitgele	22
1.3	Bedeutung der Genetik in der Reproduktionsmedizin	23
1.3.1	Polkörperbiopsie	26
1.3.2	Blastomerbiopsie	27
1.3.3	Trophektodermbiopsie	28
1.3.4	Minimal- & Nicht-invasive Präimplantationsdiagnostik.....	29
1.4	Überblick über genetische Analysen des Präimplantationsscreenings ...	30
1.4.1	FISH	30
1.4.2	Quantitative Realtime-PCR.....	30
1.4.3	Microarray-Diagnostik.....	31
1.4.4	NGS.....	34
1.5	Forschungsfrage	35
2	Material und Methoden.....	36
2.1.1	Studiendesign	36
2.1.2	PatientInnenkollektiv	36
2.1.3	Statistische Analyse.....	37
3	Ergebnisse	38
4	Diskussion.....	53
4.1	Einfluss von epidemiologischen und Lifestyle-Faktoren auf chromosomale Veränderungen	53
4.2	Präimplantationsdiagnostik – der richtige Weg?	56

4.3	Limitationen.....	58
4.4	Conclusio	58
5	Literaturverzeichnis	60

Zusammenfassung

Hintergrund: Fast 50% der im Rahmen einer IVF-Behandlung gewonnenen Embryonen weisen eine Aneuploidie auf. Seit der kommerziellen Einführung des Präimplantationsscreenings vor ungefähr 20 Jahren hat man sich eine mit der Anwendung einhergehende Verbesserung der Schwangerschafts- bzw. Lebendgeburtenrate in der IVF-Behandlung erhofft.

Als Forschungsfrage interessierte uns, ob sich in den Polkörperbiopsien unseres subfertilen Patientenkollektivs Häufungen an unbalancierten Chromosomenaberrationen mittels a-CGH-Verfahren feststellen lassen. Zudem wollten wir erfahren, ob diese Chromosomenaberrationen mit klinischen Parametern in Verbindung zu bringen sind bzw. welchen Stellenwert das Präimplantationsscreening (PGT-A) in der klinischen Routine einnimmt.

Methoden: In dieser monozentrischen, retrospektiven Studie wurden die in den Jahren 2013-2017 von der Kinderwunsch Institut Schenk GmbH beim Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz bzw. der HLN-Genetik GmbH in Auftrag gegebenen a-CGH-Untersuchungen ausgewertet. Es wurde an 73 subfertilen Patientinnen an 129 Polkörperuntersuchungszeitpunkten eine Polkörperbiopsie an 465 Oozyten durchgeführt. Da bei 15 Polkörperbiopsien die a-CGH-Auswertung als Polkörper-Paar (getrennte Untersuchung der Polkörper 1 & 2) erfolgte, wurden 480 a-CGH-Untersuchungen ausgewertet.

Ergebnisse: Im Gesamtkollektiv (n=480) traten 72,08% unbalancierte Polkörper bzw. 20,21% balancierte Polkörper auf. Von den unbalancierten Polkörpern (n=346) wiesen 85,26% einzelne Chromosomenveränderungen bzw. 14,74% multiple Chromosomenveränderungen auf. Die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen (n=295) zeigte am öftesten Zugewinne an den Chromosomen 9, 16, 19, 22 bzw. Verluste an den Chromosomen 4, 13-16, 18, 21.

Diskussion: Die erhobenen und ausgewerteten Daten decken sich mit den in der Literatur bereits publizierten Zahlen.

Eine weitere routinemäßige Anwendung des PGT-A zur Verbesserung des IVF-Outcomes kann anhand der veröffentlichten Arbeiten derzeit nicht empfohlen werden.

Abstract

Background: Nearly 50% of the embryos created by in vitro fertilization (IVF) are aneuploid. Since the commercial introduction of preimplantation genetic screening (PGT-A) 20 years ago, hope for an improvement of pregnancy and live birth rates in IVF-treatment has been raised.

Our research question was, if accumulations of chromosomal aberrations in the a-CGH analyses of polar bodies in our subfertile patient collective as described in the literature could be found. Besides we wanted to find associations between chromosomal aberrations and clinical parameters, and asses the value of preimplantation genetic screening (PGT-A) in clinical routine.

Methods: In this monocentric, retrospective study the a-CGH analyses from the years 2013-2017 ordered by the Kinderwunsch Institut Schenk GmbH at the Diagnostic and Research Institute of Human Genetics of the Medical University of Graz and the HLN-Genetik GmbH were evaluated. A polar body biopsy was performed in 465 oocytes, at 129 consultations of 73 subfertile patients. 480 -CGH analyses were performed as in 15 polar body biopsies separate a-CGH-evaluation of the 1. & 2. polar body was done.

Results: In our patient collective (n=480) 72,08% unbalanced polar bodies and 20,21% balanced polar bodies were found. Of the unbalanced polar bodies (n=346) 85,26% had single chromosomal aberrations and 14,74% had multiple chromosomal aberrations. A-CGH of the unbalanced polar bodies with single chromosomal aberrations (n=295) showed most frequently gains in chromosome 9, 16, 19, 22 and losses in chromosome 4, 13-16, 18, 21.

Conclusion: The gained data is in accordance with the literature.

According to the literature a continuous routine clinical utilization of PGT-A cannot be recommended at the moment for the improvement of IVF-outcome.

Glossar und Abkürzungen

a-CGH	array comparative genomic hybridization
AZF	Azoospermiefaktor
BMI	Body-Mass-Index
CGH	comparative genomic hybridization
CF	Cystische Fibrose
CRP	C-reaktives Protein
DNA	deoxyribonucleic acid
FISH	fluorescence in situ hybridization
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
ICSI	intracytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In-vitro-Fertilisation
LH	luteinisierendes Hormon
Mbp	Megabasenpaare
m-CGH	metaphase comparative genomic hybridization
NGS	Next-generation sequencing
NSAR	nichtsteroidales Antirheumatikum
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
PAP	Papanicolaou
PCD	primäre ziliäre Dyskinesie
PCO	polyzystische Ovarialsyndrom
PCR	polymerase chain reaction
PGS	Präimplantationsscreening ("Preimplantation genetic screening")

PGT-A	preimplantation genetic testing for aneuploidy
PKB	Polkörperbiopsie
py	pack year
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
ROS	Reactive Oxygen Species
SHBG	Sexualhormon-bindendes-Globulin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
u.a.	unter anderem
WGA	Whole Genome Amplification

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Meilensteine der Humangenetik & der Präimplantationsdiagnostik	23
Abbildung 2 – Entwicklungsstadien, an denen eine Präimplantationsdiagnostik (PID) durchgeführt werden kann	26
Abbildung 3 – Darstellung m-CGH & a-CGH.....	33
Abbildung 4 – Absolute Altersverteilung bei Polkörperpunktion	38
Abbildung 5 – BMI-Verteilung bei Polkörperpunktion	39
Abbildung 6 – Nikotinabusus im Patientinnenkollektiv.....	39
Abbildung 7 – Oligoasthenoteratozoospermie (OAT) im Patientenkollektiv	40
Abbildung 8 – Polkörperverteilung im Kollektiv.....	41
Abbildung 9 – Aufteilung unbalancierter Polkörper.....	41
Abbildung 10 – Eingesendete Polkörper im Kollektiv	42
Abbildung 11 – Anteil fragmentierte Polkörper unter den gepoolten Polkörpern ..	43
Abbildung 12 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen.....	44
Abbildung 13 – Polkörperverteilung – Nichtraucherinnen.....	45
Abbildung 14 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Nichtraucherinnen.....	46
Abbildung 15 – Polkörperverteilung - Raucherinnen	47
Abbildung 16 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Raucher	48
Abbildung 17 – Polkörperverteilung nach BMI	48
Abbildung 18 – Polkörperverteilung nach Alter.....	49
Abbildung 19 – Polkörperverteilung - Kein OAT	49
Abbildung 20 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Kein OAT	50

Abbildung 21 – Polkörperverteilung - OAT	51
Abbildung 22 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - OAT	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Ursachen der Infertilität.....	3
--	---

1 Einleitung

1.1 Definition Infertilität/Sterilität, Epidemiologie, Ursachen

Es wird geschätzt, dass weltweit bis zu 15% der Gesamtbevölkerung (1) bzw. in manchen Regionen bis zu 30% an Infertilität leiden (2). Hierbei können Lifestyle-Faktoren einen positiven wie auch negativen Einfluss auf die Fertilität haben (3). Der stärkste negative Vorhersagefaktor für die Fertilität ist ein höheres Lebensalter der Frau bei Schwangerschaftseintritt. Viele Paare verschieben die Verwirklichung des Kinderwunsches aufgrund der Ausbildung bzw. der Verfolgung der Karriere immer weiter nach hinten (2, 3).

Die Diagnose Infertilität wird hierbei von der „American Society of Reproductive Medicine“ als fehlender Schwangerschaftseintritt nach mindestens 1-jährigem Versuch einer spontanen Konzeption definiert (4).

Als Subfertilität gilt jede Form bzw. Ausprägung von reduzierter Fertilität bei Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch, die eine Schwangerschaft anstreben (2).

Der Begriff Sterilität entspricht einem permanenten Zustand der Infertilität (5).

Mit der Weiterentwicklung der Reproduktionsmedizin (u.a. der Oozyten- und Embryonen-Vitrifikation) und damit einhergehend der Erhöhung der Schwangerschafts- und Lebendgeburtenraten auf vergleichbare Werte zu dem Gebrauch von frischen Oozyten haben Frauen die Möglichkeit bekommen auch im fortgeschritteneren Lebensalter Kinder zu bekommen (4).

Bei Frauen kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Zunahme der Dauer bis zum Schwangerschaftseintritt bzw. einer Abnahme der Fertilität (6). 6-7 Jahre vor der Menopause beginnen Menstruationsunregelmäßigkeiten. Aber nicht nur die

Wahrscheinlichkeit auf einen Schwangerschaftseintritt nimmt ab, sondern auch die Chance auf Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Es besteht eine inverse Korrelation des mütterlichen Alters und dem Eintritt einer euploiden Schwangerschaft (3). So ist bei Frauen im Alter von über 40 Jahren von einer Chromosomenfehlverteilungsrates bei den Eizellen von bis zu 80% auszugehen (7). Diese Zunahme an Chromosomenanomalien bzw. Aneuploidien mit dem mütterlichen Alter erhöht das Risiko für spontane Aborte. Insgesamt ist die Fertilität bei Frauen ab ca. 35 Jahren herabgesetzt (8).

Mit zunehmendem Alter kommt es jedoch nicht nur bei Frauen, sondern auch bei Männern zu einer Abnahme der Fertilität. So sinken mit zunehmendem Alter bei Männern die Testosteronspiegel ab, was in Folge zu Hypogonadismus führt. Wird diesem Hypogonadismus mit Testosterongabe entgegengewirkt, so kann es dadurch zu einer Unterdrückung der Spermatogenese kommen. Zusätzlich beginnt ab dem 35. Lebensalter eine Abnahme der Samenqualität hinsichtlich Motilität und Volumen bzw. einer Zunahme der morphologisch abnormalen Spermien. Überschreitet ein Mann das 40. Lebensjahr zeigt sich ein Abfall in der Motilität und in der Lebensfähigkeit der Spermien, eine Zunahme der Dauer bis zum Schwangerschaftseintritt, sowie eine signifikante Zunahme der DNA-Schäden in den Spermien (3).

1.1.1 Ursachen der Infertilität

Es gibt Faktoren, die die Fertilität beider Geschlechter einschränken bzw. spezifisch nur ein Geschlecht betreffen können. Siehe **Tabelle 1**.

Beide Geschlechter betreffend	
<ul style="list-style-type: none"> • Infektion • Hypogonadotroper Hypogonadismus • Systemische Erkrankungen • Hyperprolaktinämie • Beeinträchtigungen der Ziliarfunktion • Cystische Fibrose • Lifestyle-Faktoren/-Erkrankungen 	
Weiblich	Männlich
<ul style="list-style-type: none"> • Prämatüre Ovarialinsuffizienz • Uterusmyome • Polyzystisches Ovarialsyndrom • Endometriumpolypen • Endometriose 	<ul style="list-style-type: none"> • Testikuläre Defizienz • Post-testikuläre Beeinträchtigungen

Tabelle 1 – Ursachen der Infertilität (modifiziert nach Borght MV et Wyns C(2))

1.1.1.1 Fertilität beeinträchtigende Ursachen beide Geschlechter betreffend

Krankheitserreger können auf Frauen bzw. Männern unterschiedliche fertilitätsschädigende Auswirkungen haben. Als die wichtigsten, die Fertilität beeinträchtigenden Erreger, gelten Chlamydia trachomatis bzw. Neisseria gonorrhoeae (2).

Beim hypogonadotropen Hypogonadismus kommt es zu einer unzureichenden Stimulation der Gonaden mittels Luteinisierendem Hormon (LH) bzw.

Follikelstimulierendem Hormon (FSH). Die Ursache hierfür liegt in einer geschädigten Hypophyse oder einer unzureichenden/fehlenden Sekretion von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) durch den Hypothalamus (9). Der vererbte zentrale Hypogonadismus tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf (2).

Zahlreiche systemische Erkrankungen können eine negative Auswirkung auf die weibliche Fertilität haben u.a. Sepsis, schwere Nierenerkrankungen, schlecht eingestellter Diabetes mellitus, unbehandelte Zöliakie, aktive Autoimmunerkrankungen, Vitamin-D-Mangel und subklinische Hypothyreose. Betrachtet man das männliche Geschlecht so wirken sich ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus, ein metabolisches Syndrom oder ein arterieller Hypertonus negativ auf die Zeugungsfähigkeit aus (2).

Hyperprolaktinämie führt bei Frauen aufgrund der Hemmung der Gonadotropin-Ausschüttung zu einer Anovulation bzw. bei Männern zu niedrigen Testosteronwerten mit in Folge Infertilität bzw. sexueller Beeinträchtigung. Die Prävalenz einer Hyperprolaktinämie liegt ungefähr bei 10/100.000 Männern und 30/100.000 Frauen (2).

Eine gute Ziliarfunktion im Eileiter ist wichtig für den Transport der Spermien bzw. in Folge des Embryos. Neben Schädigung der Ziliarfunktion durch Pathogene bzw. Entzündungen kann auch eine primäre ziliäre Dyskinesie (PCD) für einen beeinträchtigenden Tubentransport verantwortlich sein (9). Dabei handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung mit einer geschätzten Prävalenz von ca. 1/10.000 bis 1/40.000 pro Lebendgeburt. Bei Männern äußert sich eine PCD als Unbeweglichkeit der Spermien aufgrund einer fehlerhaften Geißelbewegung der Spermien (2).

Die Erkrankung Cystische Fibrose (CF) zeichnet sich durch eine Funktionsstörung exokriner Drüsen mit der Bildung von zu zähflüssigem Schleim aus. Die Ursache der Erkrankung liegt in einer Mutation im Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

(CFTR)-Gens (9). CF ist weltweit verbreitet - gehäuft bei Ashkenazi-Juden (circa 1/2270 Neugeborenen) und weißen Europäern (circa 1/2500 Neugeborenen) (10). Bei Frauen wirkt sich hauptsächlich die Verdickflüssigung des Zervixsekrets, welche den Spermindurchtritt erschwert, negativ auf die Fertilität aus. Bei Männern schränkt die mit einer CF gewöhnlicherweise einhergehende kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens bei gleichzeitig nicht beeinträchtigter Spermatogenese die Zeugungsfähigkeit ein (2).

Für die Zeugungsfähigkeit beeinträchtigende Lifestyle-Faktoren siehe **Seite 9**.

1.1.1.2 Fertilität beeinträchtigende Ursachen das weibliche Geschlecht betreffend

Bei der prämaturnen Ovarialinsuffizienz kommt es zu einem Ausbleiben des Menstruationszyklus vor dem 40. Lebensjahr in Kombination mit erhöhten Serum-FSH-Werten bei Messungen an 2 verschiedenen Zeitpunkten. Betroffen sind hiervon 1% aller Frauen. Eine prämaturne Ovarialinsuffizienz kann aufgrund genetischer, infektiöser, metabolischer bzw. umweltbedingter Ursachen hervorgerufen werden. Zudem ist sie mit Autoimmunerkrankungen assoziiert bzw. kann in Folge von Chemotherapeutika und/oder Operationen entstehen. Als genetische Ursachen sind das Turner-Syndrom bzw. das Fragile-X-Syndrom zu nennen (9).

Bei Uterusmyomen handelt es sich um die häufigsten gutartigen Tumore des weiblichen Genitaltrakts. Sie treten gehäuft und mit stärkerer Ausprägung bei dunkelhäutigen Frauen auf. Der genaue Pathomechanismus, der zur Einschränkung der Fertilität führt, ist nicht geklärt. Es könnte u.a. ein mit ihnen zusammenhängender reduzierter Blutzuffluss zum Endometrium, eine veränderte endometriale Rezeptivität, eine Verdrängung der Gebärmutterhöhle bzw. eine gestörte uterine Kontraktilität verantwortlich sein (2).

Beim polyzystischen Ovarialsyndrom (PCO) handelt es sich um eine endokrine Störung, welche bis zu 20% aller Frauen im zeugungsfähigen Alter betrifft (4). Es handelt sich hierbei um die häufigste endokrine Störung bei Frauen (11).

Dabei sind 75% aller Frauen, welche an anovulatorisch bedingter Unfruchtbarkeit leiden, vom PCO-Syndrom betroffen.

Die Diagnose wird anhand der Rotterdam-Kriterien gestellt, wobei mindestens 2 für die Diagnosestellung zutreffen müssen: Hyperandrogenismus, Oligo- bzw. Anovulation oder durch das typische, durch Ultraschall festgestellte Aussehen des Ovars (mindestens 12 Follikel zwischen 2-9 mm im Durchmesser oder $\geq 10\text{cm}^3$ Ovarialvolumen).

Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und Hyperandrogenismus spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des PCO-Syndroms. Der genaue Mechanismus, wie es zur Störung der ovariellen Funktion und in Folge Anovulation kommt, ist nicht genau bekannt. Für das PCO-Syndrom ist hierbei charakteristisch, dass es zu einem Entwicklungsstopp der Antralfollikel bei 5-10mm kommt. Behandelt werden kann das PCO-Syndrom mit der Einnahme von Metformin, welches eine Zunahme der Insulinsensitivität, eine Abnahme der hepatischen Gluconeogenese, die hepatische Aufnahme von Laktat und Alanin und eine Zunahme der Umwandlung von Pyruvat in Alanin bewirkt.

Zudem kann eine kohlenhydratarme Diät eine Reduktion der Insulinproduktion als Behandlungsalternative zur medikamentösen Therapie bewirken. Diese Therapien können zu einer Zunahme der Oozyten-Reifung und in Folge besserer Fertilität bei Patientinnen mit PCO-Syndrom führen (4).

Beim Vorhandensein von Endometriumpolypen sind ein reduziertes Implantationspotential des Embryos bzw. eine höhere Rate an Schwangerschaftsverlusten in der Frühschwangerschaft beschrieben worden (2).

Die Prävalenz von Endometriose wird auf 0.8 – 6% bei Frauen im reproduktiven Alter bzw. bei subfertilen Frauen bis auf 20 – 50% geschätzt. Man geht davon aus, dass es im Rahmen der Erkrankung zu einer herabgesetzten Fertilität aufgrund von Adhäsionen bzw. Fibrosierungen, chronischen peritonealen Entzündungen, endokrinen Veränderungen und immunologischen Störungen kommt (12).

1.1.1.3 Fertilität beeinträchtigende Ursachen das männliche Geschlecht betreffend

Bei der testikulären Dysfunktion kann zwischen der vererbten Form, der erworbenen Form und der idiopathischen Form unterschieden werden (2).

Zu den vererbten Formen der testikulären Dysfunktion zählen die Anorchie, die testikuläre Dysgenese und der Kryptorchismus.

Die häufigsten genetischen Veränderungen bei denen eine testikuläre Dysfunktion auftritt sind das Klinefelter-Syndrom (47,XXY) und Mikrodeletionen im Bereich des Y-Chromosoms (2).

Das Klinefelter-Syndrom zeichnet sich durch einen hypergonadotropen Hypogonadismus im Erwachsenenalter mit hohen FSH- und LH-Werten und niedrigen bis niedrig-normalen Testosteronwerten bzw. nicht nachweisbaren Serum-Inhibin-B-Werten in den meisten Patienten aus. Wenngleich bei Männern mit Klinefelter-Syndrom meistens eine Azoospermie besteht, können bei manchen Erkrankten einzelne Restherde, in denen eine Spermatogenese bis zu reifen Spermien stattfindet, bestehen. Der genaue Mechanismus der testikulären Degeneration ist bisher nicht eindeutig geklärt. Die Prävalenz des Klinefelter-Syndroms liegt bei 1/500 bis 1/1000 Männern (2).

Mikrodeletionen im Bereich der Azoospermiefaktor (AZF)-Region des Y-Chromosoms können zu einer Verschlechterung der Samenqualität bzw. zu einer Veränderung der Histologie des Hodens, wie z.B. einer Hypospermatogenese oder eines Sertoli-cell-only-Syndroms, führen (2). Mit nachweisbaren Mutationen in 8-12% der Männer mit Azoospermie und 3-7% der Männer mit Oligozoospermie stellen sie die häufigste molekulargenetische Ursache der männlichen Infertilität dar (13).

Die AZF-Region befindet sich auf dem proximalen Anteil des langen Arms des Y-Chromosoms und wird in die Subregionen AZFa, AZFb und AZFc unterteilt. Mutationen in den Subregionen AZFa und AZFb sind mit einer Azoospermie vergesellschaftet. Veränderungen in der AZFc-Region, welche am häufigsten betroffen ist, führen zu moderater bis ausgeprägter Oligozoospermie (2).

Zu der erworbenen Form der testikulären Dysfunktion zählen u.a. die Hodentorsion, die Orchitis, exogene Noxen (Medikamente usw.), endogene Faktoren (u.a. Varikozele, systemische Erkrankungen) bzw. Hodentraumen oder -Operationen (2).

Bei den post-testikulären Beeinträchtigungen unterscheidet man zwischen der Störung der Ejakulationsfähigkeit und einer Verlegung der Samenwege. Die Verlegung der Samenwege kann in den Nebenhoden, in den Vasa deferentia oder in den Ductus ejaculatorii liegen.

Als häufigste post-testikuläre Beeinträchtigung tritt eine Verlegung im Nebenhoden, welche als erworbene Form i.e.L. auf eine abgelaufene Infektion des Nebenhodens zurückzuführen ist, auf.

Verlegungen des Vas deferens können nach Infektionen, Herniotomien oder gewollt nach Vasektomien auftreten.

Verlegungen der Ductus ejaculatorii, welche nur 1-3% der post-testikulären Beeinträchtigungen ausmachen, können entweder cystisch oder postinflammatorisch bedingt sein. Postinflammatorisch nach abgelaufener Prostatitis bzw. cystisch als Müller-Gang-Zyste/Utrikuluszyste (2).

1.2 Lifestyle Auswirkungen auf die Fertilität

1.2.1 Koitus-Frequenz

Regelmäßiger ungeschützter Geschlechtsverkehr ist bei Paaren mit Kinderwunsch ein wichtiger Faktor zur Verwirklichung einer Schwangerschaft. Kurz nach der Menstruationsblutung sollte alle 1-2 Tage miteinander verkehrt werden (14).

1.2.2 Konsanguinität

Als konsanguine Ehe wird eine Ehe zwischen Verwandten zwischen zweitgradigen Cousins und Cousinen oder enger verstanden. In westlichen Ländern sind konsanguine Ehen, bis auf ethnische und religiöse Minderheiten, selten. In weiten Teilen der Welt, wie etwa Nordafrika, im mittleren Osten, in Asien und Indien ist sie jedoch noch weit verbreitet.

Bei weiblichen Nachkommen aus konsanguinen Beziehungen sind eine Assoziation mit Infertilität und eine prämaturne reduzierte Ovarialreserve beschrieben. Zudem ist bei Nachkommen aus konsanguinen Ehen die Inzidenz von rezessiv-vererbten Erbkrankheiten erhöht (15).

1.2.3 Ernährung

Eine ausgewogene und gesunde Ernährung ist ein wichtiger Bestandteil, um einen guten allgemeinen Gesundheitszustand zu erhalten. Aber auch auf die Fertilität hat unsere Ernährung Einfluss.

So führt bei Männern eine Diät reich an Kohlenhydraten, Ballaststoffen, Folsäure, Lycopin, Gemüse und Früchten zu einer verbesserten Samenqualität. Auch eine Reduktion der Eiweiß- sowie Fettaufnahme sind von Vorteil für die Fertilität. Die Aufnahme von Antioxidantien könnte zu einer Verbesserung der Spermienqualität führen. Antioxidantien sind Moleküle wie Albumin, Ferritin, Caeruloplasmin sowie kleinere Moleküle wie etwa α -Tocopherol (Vitamin E),

Ascorbinsäure (Vitamin C), β -Carotin, Harnsäure, reduziertes Glutathion, Bilirubin, die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Entgiftung des Körpers von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Bei ROS handelt es sich um freie Radikale wie etwa dem Hyperoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und dem Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}). Weiters zählen auch freie Radikale, welche Derivate des Stickstoffs sind, dazu: unter anderem das Peroxinitrit-Anion ($ONOO^-$), das Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) als auch das Stickstoffdioxid (NO_2^{\cdot}). Diese freien Radikale entstehen als Nebenprodukte bei der Zellatmung. Ein Überangebot an ROS, was in Folge zu oxidativem Stress führt, hat eine Einschränkung der Spermienmotilität, eine Veränderung der DNA und eine Verringerung der Membranintegrität zur Folge (3, 16). So konnte durch einen Cochrane-Review 2014 unter Einschluss von 48 Studien gezeigt werden, dass Männer nach oraler Einnahme von Antioxidantien eine signifikante Zunahme in der Lebendgeburtenrate sowie Schwangerschaftsrate aufwiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe (17).

Betrachtet man die Ernährung von Patientinnen mit Kinderwunsch so scheint ein Konsum von tierischem Eiweiß, insbesondere Hühner- und Putenfleisch, statt Kohlenhydraten mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer ovulatorischen Unfruchtbarkeit einherzugehen. Gegenteilig zeigt sich beim Austausch von Kohlenhydraten mit pflanzlichem Eiweiß ein protektiver Effekt (18).

Kinderwunsch-Patientinnen sollten angewiesen werden, vermehrt einfach ungesättigte Fettsäuren, anstatt Trans-Fettsäuren zu konsumieren, da der Konsum von Trans-Fettsäuren mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer ovulatorischen Unfruchtbarkeit einherzugehen scheint. Auch die Einnahme von Vitaminen, Mineralstoffen, Nahrungsmitteln mit niedrigem glykämischen Index, von nicht fettreduzierten Molkereiprodukten im Gegensatz zu fettarmen Molkereiprodukten und Eisen zeigen einen positiven Effekt auf die ovarielle Fertilität (3).

Bei der Einnahme von Folsäure zeigt sich, dass höhere Dosierungen als jene, welche in der Schwangerschaft zur Vorbeugung vor Neuralrohrdefekten empfohlen werden, mit einer geringeren Rate an Infertilität, einem geringeren Risiko für einen Schwangerschaftsverlust als auch mit größeren Erfolgchancen in einer

Kinderwunschbehandlung in Verbindung stehen (16). Hierbei ist hervorzuheben, dass Polymorphismen im MTHFR-Gen, wie etwa c.677C>T (p.Ala222Val; rs1801133) oder c.1298A>C (p.Glu429Ala; rs1801131), zu einer verringerten enzymatischen Aktivität und in Folge zu erhöhten Homocystein-Spiegeln führen können. Dies kann den Eintritt einer Schwangerschaft negativ beeinflussen. Um diese erhöhten Homocystein-Spiegel auszugleichen ist bei Vorliegen eines MTHFR-Polymorphismus bei infertilen Frauen auf die notwendige höhere Zufuhr von Folsäure zu achten (4).

Die Zufuhr von Antioxidantien und von Vitamin D, wenn kein Mangel besteht, scheint bei Frauen nicht von Vorteil zu sein (16).

Zusammenfassend kann man bei Männern als auch bei Frauen zur Fertilitätssteigerung eine gesunde Ernährung mit dem Hauptaugenmerk auf Fisch bzw. Meeresfrüchten, Vollkorn, Früchten und Gemüse empfehlen (16).

1.2.4 Gewicht

Übergewichtigkeit wird, insbesondere in den Industrienationen, zu einem immer größeren Problem. Bei einem Body-Mass-Index (BMI) von unter 18.5 kg/m² wird von Untergewicht gesprochen, bei einem BMI zwischen 18.5 kg/m² und 24.9 kg/m² von Normalgewicht, bei einem BMI von über 25 kg/m² von Übergewicht und ab einem BMI von 30 kg/m² spricht man von Fettleibigkeit (3). Diese wird nochmals in 3 Klassen unterteilt: Adipositas Grad I zwischen 30.0-34.9 kg/m², Adipositas Grad II zwischen 35.0-39.9 kg/m² und Adipositas Grad III über 40 kg/m² (19).

Weltweit leiden 13% der Männer bzw. 21% der Frauen an Fettleibigkeit (2). Die Gewichtszunahme in der westlichen Welt ist auf eine hochkalorische Ernährung in Verbindung mit dem Verzicht auf eine angemessene körperliche Bewegung zurückzuführen. Diese Entwicklung bewirkt nicht nur die Entstehung von Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen unter der Bevölkerung, sondern wirkt sich auch negativ auf die männliche als auch weibliche Fertilität aus.

So zeigen übergewichtige Männer eine Reduktion in der Beweglichkeit bzw. der Konzentration der Spermien als auch eine Zunahme der DNA-Schäden in den Spermien. Zusätzlich besteht eine Beziehung zwischen Fettleibigkeit und erektiler Dysfunktion. Die erhöhten Estradiol-Werte könnten hierfür verantwortlich sein,

welche durch das im Fettgewebe vorhandene Enzym Aromatase entstehen. Dieses Enzym sorgt für die Umwandlung von Androgenen zu Estradiol. Weitere durch die Gewichtszunahme beeinträchtigte Hormone mit Auswirkung auf die Fertilität sind das Inhibin B und das Leptin. Fallende Inhibin B-Werte im Rahmen einer Gewichtszunahme bewirken eine Verringerung der Sertoli-Zellen und der Spermienproduktion. Bei Leptin handelt es sich um ein Hormon, das einen Effekt unter anderem auf Entzündungen, die Appetitkontrolle und eine verringerte Insulinsekretion zeigt. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass die Leptinkonzentrationen in übergewichtigen Mäusen im Vergleich zu dünnen Mäusen beinahe fünfmal so hoch waren. Damit einhergehend deckten sich die erhöhten Leptinwerte bei den übergewichtigen Mäusen mit einer fünfmal niedrigeren Fertilität. Zudem zeigte sich eine Down-Regulation der Leptinrezeptoren auf dem Hoden, was auf eine Leptinresistenz als Ursache für männliche Infertilität hindeutet (3).

Aber ebenso Untergewicht scheint bei Männern mit einer verringerten Spermienkonzentration bzw. Fertilität einherzugehen (3).

Bei Frauen liegen ähnliche Forschungsergebnisse vor: sowohl ein BMI unter 19 kg/m² als auch ein BMI über 25 kg/m² wirkt sich bei Frauen negativ auf deren Fertilität aus (4).

So zeigt sich bei fettleibigen Frauen eine signifikant höhere Fehlgeburtenrate im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen (3, 19). Darüber hinaus war auch die Rate an rezidivierenden Frühaborten bei übergewichtigen Frauen im Vergleich zu nicht übergewichtigen Frauen erhöht (3). Betrachtet man die Lebendgeburtenrate pro durchgeführtem IVF/ICSI-Zyklus, so sieht man eine statistisch signifikante Reduktion bei Frauen mit einem BMI >25 kg/m² im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen (19).

Auch eine negative Korrelation zwischen Zunahme des BMI und der Implantation ist beschrieben. Auffallend ist jedoch, dass bei übergewichtigen und fettleibigen Frauen unter 35 Jahren eine geringere Rate an Aneuploidien als im Vergleichskollektiv nachweisbar ist.

Diese negativen Schwangerschafts-Outcomes könnten auf die bei fettleibigen Frauen veränderte Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit zurückzuführen sein. Hierbei weist die Follikelflüssigkeit eine erhöhte Insulin-, Laktat-, CRP- und

Triglyceridkonzentration auf, mit erniedrigten Werten an SHBG. Die negativen Effekte von Fettleibigkeit scheinen reversibel zu sein – so kann bei fettleibigen anovulatorischen Frauen ein Gewichtsverlust zur Wiederaufnahme der Ovulation führen (3).

Bei untergewichtigen Frauen tritt gehäuft eine ovarielle Dysfunktion bzw. eine ovarielle Infertilität auf. Zudem konnte in einer Meta-Analyse gezeigt werden, dass untergewichtige Frauen ein erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt haben (3).

1.2.5 Bewegung

Ein gesundes Maß an körperlicher Ertüchtigung kann bei Männern zu einer Verbesserung der Fruchtbarkeit führen. So konnte bei übergewichtigen Ratten gezeigt werden, dass Bewegung in Verbindung mit einer Diät zu einer Verbesserung der Morphologie bzw. Motilität der Spermien und zu einer Abnahme der freien Sauerstoffradikale und der DNA-Schäden in den Spermien führt. Zudem ist bekannt, dass moderat sportliche Männer eine bessere Spermienmorphologie aufweisen, als Wettkampf- oder Leistungssportler.

Bei übermäßigem Radfahren kann es zu einer Verschlechterung der Spermienqualität kommen. So konnte gezeigt werden, dass mehr als 5 Stunden Radfahren pro Woche mit einer geringeren Spermienmotilität und -konzentration bei diesen Männern einhergeht (3). Anabole Steroide, die von manchen Sportlern zur Leistungssteigerung eingenommen werden, können über die Hemmung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse zu einem hypogonadotropen Hypogonadismus mit teilweiser bzw. kompletter Unterbindung der Spermatogenese führen (20).

Bei Frauen zeigt ein moderates körperliches Training unabhängig vom BMI eine schwache Korrelation mit einer erhöhten Fortpflanzungsfähigkeit. Jedoch kann eine übermäßige sportliche Betätigung zu einer Beeinträchtigung der Reproduktionsfähigkeit im Sinne einer hypothalamischen Funktionsstörung führen. Dabei kommt es zur Veränderung der pulsatilen GnRH-Ausschüttung mit als Folge auftretenden Zyklusstörungen. Es besteht eine signifikante negative Korrelation mit der Fertilität und der Intensität, der Dauer und der Frequenz des durchgeführten Trainings. Bei Frauen, welche sich einer IVF-Behandlung unterziehen und

zumindest für 1 Jahr mehr als 4 Stunden pro Woche Ausdauersport betrieben haben, ist eine geringere Lebendgeburtenrate als auch eine höhere Rate an Implantationsfehlern bzw. Zyklusabbrüchen beschrieben (3).

1.2.6 Psyche

Stress spielt eine wichtige Rolle in unserer Gesellschaft.

Zusätzlich zum Alltagsstress haben Paare mit unerfülltem Kinderwunsch auch mit dem sozialen Druck, den finanziellen Kosten, den unerfüllten Wünschen, der Diagnosestellung, der Behandlung als auch mit den mit der Behandlung einhergehenden Fehlschlägen zu kämpfen (21).

Bei Männern, die mehr als 2 belastende Lebensereignisse vor der Kinderwunschbehandlung erfahren haben, kommt es entsprechend den WHO-Standards eher zu einer herabgesetzten Motilität, Morphologie und Konzentration der Spermien. Auch ein signifikanter Einfluss durch Stress auf die Spermiedichte ist beschrieben. Es wird angenommen, dass es durch Depression und Stress zu einer Verringerung der Ausschüttung von luteinisierendem Hormon (LH) und Testosteron kommt. Dies hat eine gestörte Gonadenfunktion und damit einhergehend eine herabgesetzte Spermatogenese bzw. Spermienparameter zur Folge. Ob niedrige Testosteronwerte, eine Depression zur Folge haben, oder eine Depression niedrige Testosteronwerte ist noch ungeklärt. Bemerkenswert dabei ist, dass 10% der Männer, die sich in einer Kinderwunschabteilung vorstellen, die Diagnosekriterien einer Angststörung bzw. einer Depression erfüllen. Zudem wird davon ausgegangen, dass Männer oftmals ihre Ängste und ihren sexuellen Stress nicht mitteilen (3).

Auch bei Frauen hat Stress einen negativen Einfluss auf die Fertilität. So ist eine längere Zeitspanne bis zur Konzeption bei Frauen, welche mehr als 32 Stunden pro Woche arbeiteten, als bei Frauen, die zwischen 16-32 Stunden pro Woche ihrer Arbeit nachgingen, beobachtet worden. Um die 30% der Frauen, die sich mit unerfülltem Kinderwunsch an einer Kinderwunschabteilung vorstellen, erfüllen die Diagnosekriterien einer Angststörung bzw. einer Depression. Unter Miteinbeziehung von kognitiver Verhaltenstherapie bzw. Selbsthilfegruppen kann eine Steigerung der Konzeptionsrate erzielt werden. Zudem ist bekannt, dass eine positive Grundstimmung eine höhere Chance für ein lebendgeborenes Kind mit sich

bringt bzw. höhere Angstlevel mit einem höheren Risiko für eine Totgeburt vergesellschaftet sind (3).

1.2.7 Koffein-Konsum

Koffeinkonsum scheint einen negativen Effekt auf die weibliche Fertilität zu haben (21). So ist mit einer Zunahme der Zeitdauer bis zum Schwangerschaftseintritt bei erhöhtem Koffeinkonsum, insbesondere bei einer Aufnahme von mehr als 500mg Koffein pro Tag, zu rechnen. Weitere negative Effekte sind ein höheres Risiko für eine Fehlgeburt, einen intrauterinen Kindstod bzw. eine Totgeburt. Auffallend ist, dass bei Frauen, die mehr als 500mg Koffein pro Tag zu sich nahmen, seltener auffällige Karyogramme im Abortmaterial nachgewiesen werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass nicht genetische Defekte für die Fehlgeburten verantwortlich seien, sondern unbekannte durch Koffein verursachte Mechanismen (3).

In einem systematischen Review von Ricci et al. (22) konnte für Männer, die Koffein konsumierten, keine Veränderung der Samenqualität festgestellt werden. Jedoch scheint es, dass Koffeinkonsum mit DNA-Defekten, Aneuploidien und DNA-Strangbrüchen, in den Spermien in Verbindung gebracht werden kann. In einigen der in diesem systematischen Review eingeschlossenen Studien zeigt sich eine verlängerte Zeitdauer bis zur Empfängnis, was auf eine herabgesetzte Zeugungsfähigkeit unter dem Einfluss von Koffein hindeuten könnte (22). Dennoch ist nicht klar, ob diese Ergebnisse nicht mit einer mit häufigem Koffeinkonsum einhergehenden ungesunden Lebensweise (22) oder mit der methodischen Qualität zahlreicher Studien zusammenhängen könnten (16).

1.2.8 Nikotinabusus

Es ist hinlänglich bekannt, dass das Tabakrauchen, mit seinen über 4700 enthaltenen Schadstoffen, ein hohes Gesundheitsrisiko darstellt.

Rauchende Männer scheinen im Vergleich zu Nichtrauchern eine verringerte Fertilität zu besitzen. Sie neigen dazu eine Abnahme in der Dichte, der Morphologie, der Beweglichkeit, in der Befruchtungsfähigkeit der Spermien als auch in der Vitalität aufzuweisen (23). Darüber hinaus wurde in zahlreichen Studien ein

Zusammenhang zwischen dem Rauchen und der Zunahme der DNA-Schäden in den Spermien gefunden. Es wird angenommen, dass die Stoffwechselprodukte des Tabakkonsums zu einer Entzündungsreaktion führen, welche mit einer erhöhten Leukozytenzahl in der Samenflüssigkeit und in Folge erhöhten Werten an reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht. Zudem wurde gezeigt, dass Rauchen sich auf das endokrine System auswirkt. Es kommt zu verringerten Testosteronwerten bei gleichzeitig erhöhten Werten an luteinisierendem und follikelstimulierendem Hormon (FSH) (3).

Obwohl die Zahl der Raucherinnen in den Vereinigten Staaten von Amerika unter den Frauen im reproduktiven Alter in den letzten Jahren zurückgegangen ist, wird sie noch auf ca. 21% geschätzt. Wie bei den Männern scheinen Raucherinnen eine herabgesetzte Fertilität im Vergleich zu Nichtraucherinnen zu besitzen. Zurückzuführen sei dies unter anderem auf eine mit dem Rauchen einhergehende reduzierte ovarielle Reserve und Ovarialfunktion (24).

Zusätzlich könnte sich auch ein durch Rauchen gestörter Hormonhaushalt negativ auf die Fertilität auswirken. So stellten Windham et al. (25) fest, dass starke Raucherinnen, welche täglich mehr als 20 Zigaretten rauchten, geringere Progesteronspiegel in der Lutealphase im Vergleich zu Nichtraucherinnen aufwiesen bzw., dass Raucherinnen, welche täglich mehr als 10 Zigaretten rauchten, im Übergang von der Lutealphase auf die Follikelphase erhöhte urinaire FSH-Werte aufwiesen (25).

Darüber hinaus nimmt man an, dass die Schadstoffe im Zigarettenrauch die Eizell-Aufnahme und den Transport des Embryos im Eileiter beeinträchtigen. Eine höhere Rate an ektopen Schwangerschaften und eine herabgesetzte Fertilität von Raucherinnen spricht für diese Annahme (9).

Aber auch die uterine Umgebung scheint durch das Zigarettenrauchen verändert zu sein. So zeigte sich bei Eizellspenden im Rahmen einer IVF bei Frauen, die 0-10 Zigaretten pro Tag rauchten, eine signifikant höhere Schwangerschaftsrate (52.2%) als bei Frauen, die 10-20 Zigaretten pro Tag rauchten (34,1%) (3).

Dies könnte durch Rauchen bedingte anti-östrogene Effekte auf das sich entwickelnde Endometrium, eine veränderte Angiogenese des Endometriums, eine veränderte Gen-Expression im Endometrium bzw. einen Einfluss auf die

Trophoblastinvasion erklärbar sein (9).

1.2.9 Alkoholabusus

Bei Männern wurde Alkoholkonsum mit einer herabgesetzten Libido, einer Atrophie der Hoden und einer verringerten Spermienzahl in Verbindung gebracht (21). Außerdem ist eine geringere Ejakulatsmenge, eine Verschlechterung der Spermienmorphologie bzw. der Spermienmotilität und eine Abnahme der Gesamtzahl der Spermien beschrieben worden (23). Ob der durch Alkoholkonsum im Körper erhöhte oxidative Stress auch zu einer Zunahme an oxidativem Stress bei den Spermien führt, ist unklar (3).

Frauen mit übermäßigem Alkoholkonsum scheinen im Vergleich zur Normalbevölkerung eher an Infertilität zu leiden. Eine klare Menge an Alkohol, welche in der Schwangerschaft sicher konsumiert werden kann ist nicht festgelegt. Aus diesem Grund besteht derzeit die Empfehlung zur Alkoholkarenz für Frauen, die eine Schwangerschaft planen (26). Zahlreiche negative Effekte könnten mit dem Konsum von Alkohol verbunden sein. So scheint sich die Wahrscheinlichkeit des Schwangerschaftseintritts zu verringern und das Risiko eines spontanen Aborts bzw. eines intrauterinen Kindstods zu erhöhen (27).

Darüber hinaus kann eine Störung der Lutealphase, das Ausbleiben des Eisprungs sowie eine gestörte Blastozystenentwicklung verursacht werden. Zurückzuführen sei dies auf Hormonschwankungen u.a. erhöhte Östrogenwerte, die in Folge zu einer verringerten FSH-Ausschüttung führen. Dadurch kann es zu einer Unterdrückung der Follikulogenese und der Ovulation kommen (3).

1.2.10 Medikamenten- & Drogeneinnahme

Generell scheinen illegale Drogen einen negativen Effekt auf die Fertilität zu haben. Marihuana, eines der verbreitetsten Suchtgifte weltweit, enthält Cannabinoide, die an Rezeptoren des Uterus bzw. des Ductus deferens binden und so ihre fertilitätseinschränkende Wirkung entfalten.

Bei Männern führen Cannabinoide zu einer Reduktion der Testosteronproduktion der Leydig-Zellen, zu einer Modulation der Apoptose der Sertoli-Zellen und zu einer Abnahme der Spermatogenese, der Spermienmotilität, der Akrosomenreaktion

bzw. der Kapazitation der Spermien.

Marihuana-konsumierende Frauen haben im Vergleich zum Normalkollektiv ein höheres Risiko für eine primäre Infertilität. Es wird angenommen, dass Cannabinoide einen negativen Einfluss auf den Eileitertransport und auf die fetale bzw. plazentare Entwicklung haben. Bei kurzzeitigem Konsum kann es zu einem Abfall der LH-Werte kommen, welche sich jedoch bei dauerhaftem Konsum aufgrund der Toleranzentwicklung normalisieren. Mitunter könnte der Marihuana-Konsum auch eine Ursache für den Eintritt einer Totgeburt sein (3).

Ein Langzeitkonsum von Kokain kann bei Männern Impotenz bzw. ein erschwertes Erreichen des Orgasmus bewirken (28).

Zugleich kann der Konsum eine Zunahme der Prolaktinwerte und eine Abnahme der freien und der totalen Testosteronwerte im Serum hervorrufen, was zu einer Beeinträchtigung der Spermatogenese führen kann (3).

Bei Frauen kann es zu einer gestörten ovariellen Antwort auf Gonadotropine kommen, zu einer vorzeitigen Plazentalösung (3) bzw. zu einer Abnahme der sexuellen Aktivität (28).

Die Einnahme von Opiaten kann bei Männern zu einer eingeschränkten Sexualfunktion bzw. Spermienqualität, in erster Linie Spermienmotilität, führen (3). So können heroinabhängige Männer an einem Verlust der Libido, an erektiler Dysfunktion, an einem verzögerten Samenerguss, an einer Unfähigkeit einen Orgasmus zu erreichen bzw. an Infertilität leiden (28).

Bei Frauen können vorzeitige Plazentalösungen unter Opiateinnahme auftreten (3). Zudem können Opioide mit ihrer direkten Wirkung auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse die Inzidenz an Zyklusstörungen bzw. Oligomenorrhöen erhöhen (29).

Betrachtet man verschreibungspflichtige Arzneimittel so können einige sowohl bei Frauen als auch bei Männern als Nebenwirkung die Einschränkung der Fertilität zur Folge haben. Zu diesen gehören Medikamente aus unter anderem folgenden Gruppen: anabole Steroide, Antiandrogene, Antibiotika, Antiepileptika, Antihypertensiva, Antimalariamittel, Chemotherapeutika, Antihelminthika, Antipsychotika, Kortikosteroide, Antiemetika (z.B. Metoclopramid), H₂-Rezeptor-

Antagonisten, Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (u.a. Clomiphen) mit ihren negativen Wirkungen auf das Wachstum der Gebärmutterschleimhaut. Natürlich sind hier auch Kontrazeptiva und Abortiva zu nennen, deren Zweck die Verhinderung bzw. der Abbruch einer Schwangerschaft ist (3).

1.2.11 Luftverschmutzung

Männer scheinen mit einer zunehmenden Luftverschmutzung eher eine Abnahme der Spermienmotilität, eine Verschlechterung der Spermienmorphologie und ein erhöhtes Risiko für eine DNA-Fragmentation zu zeigen. Auch wurde von einer signifikant negativen Korrelation der Spermienkonzentration mit den Ozonwerten, welche auf die Männer einwirkten, beschrieben. Bei Frauen können Fehlgeburten, Totgeburten und Frühgeburten auftreten (3).

1.2.12 Pestizide, endokrine Disruptoren und weitere Chemikalien

Für eine Vielzahl verschiedener Chemikalien ist ein negativer Effekt auf die Reproduktionsfähigkeit von Frauen wie auch Männern beschrieben (30). So können durch diese natürliche Hormone nachgeahmt, eine normale Hormonaktivität verhindert bzw. eine veränderte Funktion und Regulation des endokrinen Systems bewirkt werden (3).

1.2.13 Schwermetalle

Zu den Schwermetallen werden unter anderem Cadmium, Arsen, Lithium, Kobalt, Aluminium, Quecksilber, Blei und Bor gezählt. Für einige dieser Metalle ist eine Auswirkung auf die reproduktive Fähigkeit beschrieben worden. So wurde experimentell für Cadmium bei Mäusen gezeigt, dass es zu testikulärer Nekrose und zu Veränderungen in der Libido und der Fertilität führen kann. Für Blei, welches unter anderem in Farben, Metallprodukten, Batterien und Keramik enthalten sein kann, ist eine Störung der Hormonwerte und des Pubertätsbeginns, ein Eingriff in die Hypothalamus-Hypophysen-Achse und eine generelle Abnahme der Fertilität beschrieben. Zudem kann es zu Menstruationsstörungen, einer

herabgesetzten Samenqualität und zu Früh-, Fehl- bzw. Totgeburten kommen. Betrachtet man Quecksilber, das unter anderem in Batterien, der Industrie und Thermometern Anwendung findet, so kann es eine gestörte Spermatogenese bzw. eine gestörte fetale Entwicklung bewirken. Da sich Quecksilber in der Nahrungskette immer weiter anreichert, kann es über den Verzehr von belasteten Meeresfrüchten zu einer Bioakkumulation im Menschen mit entsprechenden Folgen führen. Bei dem Schwermetall Bor, welches in der Herstellung von Glas, Zement, Seife, Leder und Teppichen benutzt wird, sind ähnliche Auswirkungen auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse wie bei Blei beschrieben (3).

1.2.14 Strahlung

Unterschiedliche Arten von Strahlung können einen bleibenden Schaden auf den menschlichen Körper haben. Dabei wird zwischen ionisierender und nicht-ionisierender Strahlung unterschieden (31).

Röntgen- und Gammastrahlung kann hierbei eine permanente Schädigung der empfindlichen Zellen im Körper bewirken. Eine bleibende Sterilität kann durch die Einwirkung auf die Keim- und die Leydig-Zellen hervorgerufen werden (3). Aber nicht nur ionisierende Strahlung kann einen negativen Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit haben.

So geht mit der zunehmenden Verwendung von unter anderem Mobiltelefonen, Laptops, WLAN-Netzwerken bzw. Mikrowellenherden, in den letzten Jahren eine neue Gefahr für den Erhalt der Fertilität einher. Denn die emittierte Strahlung konnte in zahlreichen Studien mit einer Abnahme der Samenqualität in Verbindung gebracht werden. Es ist eine Verringerung der progressiven Spermienmotilität, der Spermienmotilität, der morphologisch normalen Spermien und der Spermienvitalität sowie eine Zunahme der freien Sauerstoffradikale (ROS) in der Samenflüssigkeit bei Mobiltelefonnutzung gezeigt worden (31). Interessant ist hierbei, dass das Tragen eines Mobiltelefons in der Hüftgegend mit einer signifikant schlechteren Spermienmotilität in Verbindung steht als das Tragen an einer anderen Körperstelle bzw. der Verzicht auf das bei sich Tragen des Mobiltelefons (32).

Welchen Einfluss elektromagnetische Strahlung auf die weibliche Fertilität hat ist bisher nicht geklärt (33).

1.2.15 Kontrazeptiva

Wenngleich die Verwendung von Kontrazeptiva die Verhinderung einer Schwangerschaft bezwecken soll, so können sie auch einen positiven Effekt auf den Erhalt der reproduktiven Fähigkeit zeigen.

So kann der Einsatz von oralen Kontrazeptiva Endometriose bzw. Unterleibsentzündungen („pelvic inflammatory disease“) entgegenwirken. Weiters können Präservative das Risiko für die Infektion mit sexuell übertragbaren Krankheiten senken und somit zum Erhalt der Zeugungsfähigkeit beitragen (3).

1.2.16 Arztbesuche

Regelmäßige Arztbesuche scheinen für beide Geschlechter von Vorteil für die Zeugungsfähigkeit zu sein.

Jedoch scheinen Männer bei Infektionen oder sexuellen Funktionsstörungen selten medizinische Hilfe in Anspruch zu nehmen. Zurückzuführen ist dies auf mangelndes Bewusstsein für Behandlung und Beratung hinsichtlich sexueller Funktionsstörungen.

Bei Frauen ist die jährliche PAP (Papanicolaou)-Abstrich-Abnahme bei dem/der FrauenärztIn mit dem Erhalt der Fertilität assoziiert. Zudem scheinen Frauen, welche von sich selbst angeben in einem guten Gesundheitszustand zu sein, fruchtbarer zu sein. Zurückzuführen könnte dies auf die damit einhergehende frühere Erkennung von sexuellen Funktionsstörungen und sexuell übertragbaren Erkrankungen sein. In Summe ist demnach ein besserer Zugang zu medizinischer Versorgung mit einer verbesserten Fertilität verbunden (3).

1.2.17 Bekleidung

Dass die Erhöhung der Hodentemperatur einen negativen Einfluss auf die Spermienparameter hat, ist hinlänglich bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei enganliegender Unterwäsche zu einer signifikant höheren Hodentemperatur kommt und damit einhergehend zu einer Verschlechterung der Samenparameter

kommen kann (34).

1.2.18 Sauna, Whirlpools & heiße Bäder

Da es mit der Erhöhung der Hodentemperatur zu einer Verschlechterung der Samenqualität kommt, ist der Gedanke naheliegend, dass Besuche von Saunen, Whirlpools und heißen Bädern bei Männern auch zu einer Abnahme der Zeugungsfähigkeit führen könnten (35).

Garolla et al. (36) konnten zeigen, dass bei Männern mit Normozoospermie die durch Saunabesuche bedingte skrotale Hyperthermie eine signifikante, jedoch reversible, Beeinträchtigung der Spermatogenese bedingt (36).

Ähnlich konnten Shefi et al. (37) zeigen, dass mit dem Verzicht auf nasse Hitze (Whirlpools & heiße Bäder) bei einigen Patienten in seinem Patientenkollektiv (5/11) eine signifikante Verbesserung der Spermienqualität erreicht werden konnte. Anzumerken ist hierbei, dass sich Shefi et al. die Non-Responder (6/11) durch vermehrten Nikotinabusus (mean 5.6 pack years (py) vs. 0.11 py) erklären (37).

1.2.19 Gleitgele

In der Literatur ist sowohl für nicht kommerzielle Gleitmittel, wie etwa Pflanzenöl, Glycerin, Olivenöl bzw. Speichel, als auch für kommerziell erhältliche Gleitmittel ein negativer Effekt auf die Samenqualität beschrieben. Gleichzeitig benutzen zahlreiche Paare beim Geschlechtsverkehr Gleitmittel, auch wenn Kinderwunsch besteht, um vaginaler Trockenheit bzw. Schmerzen während des Koitus entgegen zu wirken (38).

1.3 Bedeutung der Genetik in der Reproduktionsmedizin

Die Humangenetik hat seit der erstmaligen erfolgreichen Durchführung einer Präimplantationsdiagnostik 1990 durch Handyside et al. (39) ihren festen Bestandteil in der Reproduktionsmedizin gefunden. In **Abbildung 1** sind Meilensteine der Genetik, der Präimplantationsdiagnostik, des Präimplantationsscreenings und der Einzelzell-Genom-Diagnostik aufgezeigt. Zudem ist die Erfindung des PCR-Verfahrens Anfang der 1980er, die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms Anfang der 2000er und die erstmalige vollständige 1000\$-Genom-Sequenzierung („whole genome sequencing“) im Jahre 2014 dargestellt.

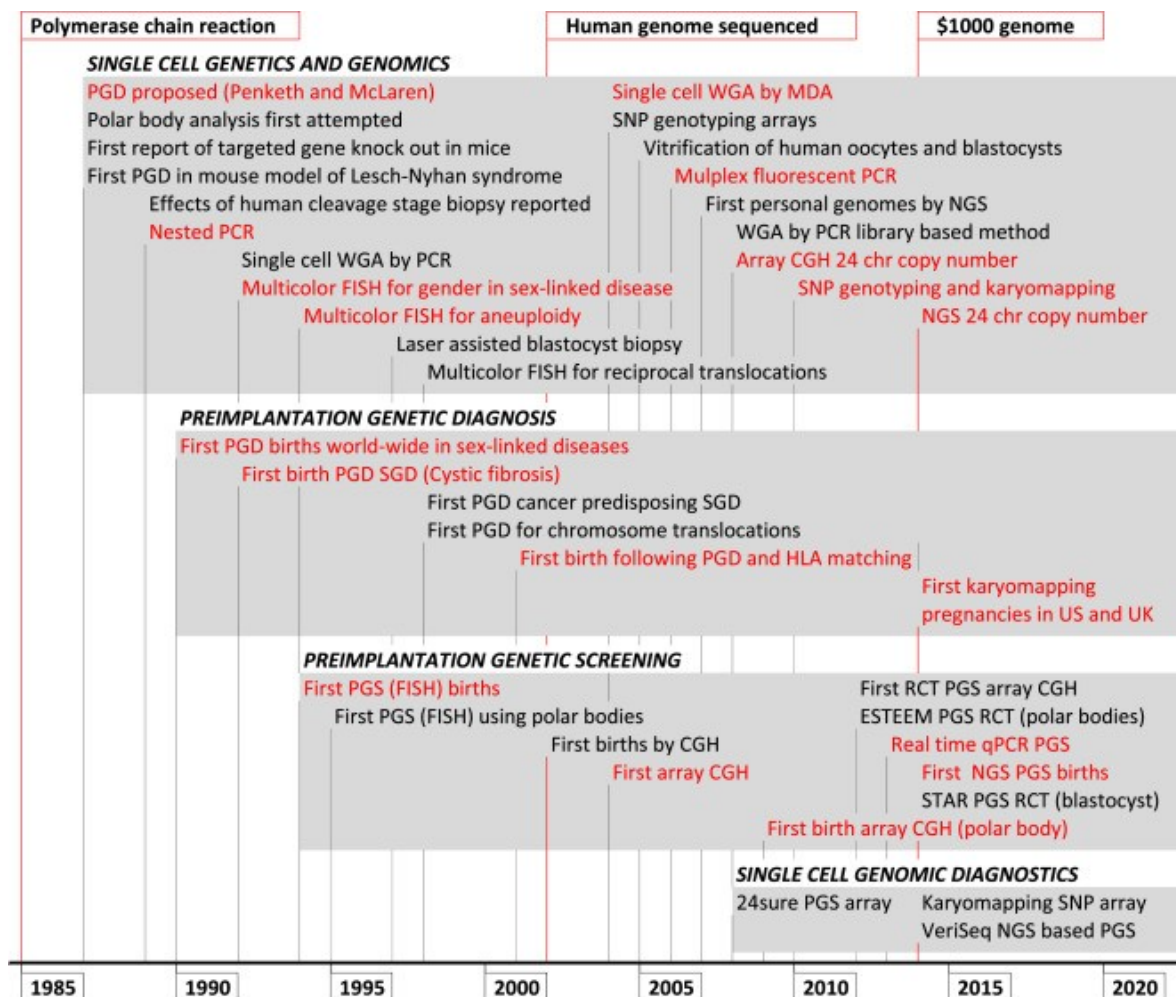


Abbildung 1 – Meilensteine der Humangenetik & der Präimplantationsdiagnostik übernommen von Niederberger C et al.(40)

Schätzungsweise 50% aller Embryonen, welche von Kinderwunsch-Paaren unter IVF-Therapie gewonnen werden, weisen eine Aneuploidie auf. Da 50-70% aller Fehlgeburten in der Durchschnittsbevölkerung durch eine Aneuploidie bedingt sind, erwartet man sich eine Verringerung der Fehlgeburtenrate nach IVF-Therapie durch den Verwurf der aneuploiden Embryonen (41).

So nimmt die genetische Untersuchung der Oozyte bzw. des Embryos vor der Auswahl bzw. dem anschließenden Transfer des ausgewählten Embryos in die Gebärmutter im Rahmen einer IVF-Therapie weltweit zu (42).

Es wird hierbei die Präimplantationsdiagnostik von dem Präimplantationsscreening unterscheiden. Bei der Präimplantationsdiagnostik wird bei Eltern mit einem hohen Risiko für die Weitergabe einer bestimmten Erbkrankheit der Embryo auf ebendiese untersucht. Das Präimplantationsscreening findet hingegen Anwendung um bei fortgeschrittenem mütterlichem Alter, wiederholtem Einnistungsversagen bzw. Schwangerschaftsverlusten bei Paaren mit normalen Karyotypen und bei schwerer männlicher Infertilität ("male factor") die Schwangerschaftsraten zu erhöhen (43, 44).

Dabei wird zwischen dem ehemals durchgeführten PGS 1.0 und PGS 2.0 unterschieden. Beim PGS 1.0 wurde eine Blastomer-Biopsie am Tag 3 nach Befruchtung durchgeführt (45, 46) und in Folge eine Überprüfung der Chromosomen, welche am häufigsten bei Spontanaborten bzw. Lebendgeburten mit chromosomalen Veränderungen betroffen sind, mittels FISH-Sonden (45, 47).

Beim PGS 2.0 wird eine Polkörperbiopsie bzw. Trophektodermbiopsie durchgeführt und in weiterer Folge eine Überprüfung aller 23 Chromosomen auf Euploidie (45).

Mit Juli 2016 erfolgte ein weiterer großer Schritt im Präimplantationsscreening mit der Einführung von mosaikartig klassifizierten Embryonen (PGS 3.0) (48). So erfolgte im PGS 2.0 die Einteilung von Embryonen in normal/abnormal. Beim PGS 3.0, welches in PGT-A ("preimplantation genetic testing for aneuploidy") umbenannt wurde, erfolgt die Einteilung der Embryonen in normal-euploid, mosaikartig bzw. abnormal-aneuploid (49). So sind vor allem bei der Blastomerbiopsie (bis 50%), aber auch bei der Trophektodermbiopsie (3-5%) in der genetischen Aufarbeitung Zellmosaiken feststellbar (50). Da sich mittels NGS-Verfahren aus einer Biopsie-

Probe mehr als eine Zelllinie festzustellen lässt, wurden sie zu der von der PGDIS (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society) empfohlenen diagnostischen Plattform für das PGT-A (49). In einer weltweiten Befragung von Patrizio et al. (51) gaben 90% der IVF-Institute an, PGT-A mittels NGS-Verfahren durchzuführen (51). Um als mosaikartiger Embryo eingeteilt zu werden, müssen in einer Trophektodermbiopsie mindestens 2 verschiedene Zelllinien mit einem aneuploiden DNA-Anteil zwischen 20-80% feststellbar sein. Unter 20% aneuploider DNA in der Probe wird der Embryo als normal-euploid bzw. über 80% aneuploider DNA in der Probe wird der Embryo als abnormal-aneuploid eingeteilt. Mosaikartige Embryonen können in Abhängigkeit des Mosaikbefundes potentiell transferierbar sein (49). So gehen Munné et Wells (52) davon aus, dass die Mehrheit der Embryonen mit aneuploiden Zellen zwischen 20-40% in der Biopsie einen euploiden Embryoblasten haben und somit bei Nichtvorhandensein eines euploiden Embryos transferiert werden könnten. Blastozysten mit komplexen Mosaiken bzw. 40-80% abnormen Zellen sollten vom Transfer ausgeschlossen bzw. als zuletzt zu transferierende Blastozysten betrachtet werden (52).

Gleicher et Orvieto (46) haben in einem Review dargelegt, dass ein PGS 2.0 ihrer Meinung nach nur bei Paaren mit einer guten Prognose, welche zuvor schon multiple erfolglose Embryonentransfers durchgemacht haben, bzw. einer großen Anzahl an qualitativ hochwertigen Embryonen, durchgeführt werden sollte. Dieses Vorgehen sollte einer weiteren Reduktion der Schwangerschafts- und Lebendgeburtenrate bei Paaren mit schlechter Prognose vorbeugen (46).

Rubio et al. (53) konnten zeigen, dass mit dem Präimplantationsscreening die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Schwangerschaft bzw. Lebendgeburt im Vergleich zur herkömmlichen morphologischen Embryo-Auswahl erhöht werden kann. So könnte es zu einer Verringerung von für die Frau belastenden Fehlgeburten und damit einhergehenden medizinischen Risiken kommen (53).

Bei der Gewinnung von Probenmaterial wird zwischen der Polkörperbiopsie, der Embryobiopsie, der Trophektodermbiopsie, der Blastozentese und verbrauchtem Blastozystenkulturmedium unterschieden (7, 43, 54, 55).

In **Abbildung 2** sind die unterschiedlichen Entwicklungsstadien, an denen eine Präimplantationsdiagnostik (PID) durchgeführt werden kann, abgebildet.

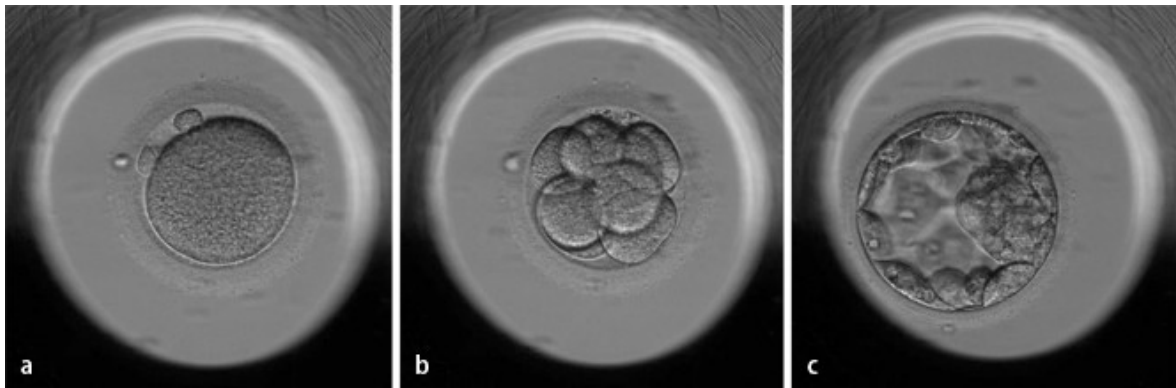


Abbildung 2 – Entwicklungsstadien, an denen eine Präimplantationsdiagnostik (PID) durchgeführt werden kann: a befruchtete Eizelle mit erstem und zweitem Polkörper, b Embryo im Acht-Zell-Stadium, c Blastozyste – übernommen von Montag M et al.(7)

1.3.1 Polkörperbiopsie

Da in der Meiose aus einem diploiden Chromosomensatz durch 2 Reifeteilungen eine Reduktion auf einen haploiden Chromosomensatz erfolgt, werden bei Männern aus diploiden Vorläuferzellen schlussendlich 4 haploide Spermien. Betrachtet man Frauen, so entstehen aus einer diploiden Vorläuferzelle eine Eizelle und 2 Polkörper. Der 1. Polkörper enthält einen Satz an Chromosomenbivalenten und der 2. Polkörper einen Chromatidensatz (7).

Bei der Polkörperbiopsie werden im Entwicklungsstadium der Metaphase-II der Eizelle bis zu ihrem Vorkernstadium die Polkörper zur weiteren Analyse gewonnen (7, 43).

Mithilfe der Polkörperbiopsie können nur mütterliche chromosomale Veränderungen bzw. im weiteren Sinne Aneuploidien der Eizelle diagnostiziert werden (44, 56). Aneuploidien paternalen Ursprungs können, wenngleich sie auch nur 3-4% der numerischen Chromosomenaberrationen darstellen, mit der Polkörperbiopsie nicht erkannt werden (57). Ebenso können numerische Chromosomenfehlverteilungen, welche erst nach Beendigung der Meiose entstehen, nicht festgestellt werden (7). Weitere Nachteile der Polkörperbiopsie sind der vor allem bei der Entnahme von vielen Eizellen einhergehende, Zeitaufwand bzw. die Untersuchungskosten. Die erhöhten Untersuchungskosten sind darauf

zurückzuführen, dass bei Durchführung der Polkörperbiopsie im Vorhinein nicht klar ist, welche Eizelle Potential hat sich in weiterer Folge zur Blastozyste weiterzuentwickeln (56).

Die Eröffnung der Zona pellucida kann mechanisch bzw. mittels Laser erfolgen. In den Händen von erfahrenen EmbryologInnen funktionieren beide Techniken gleich gut, wenngleich die Biopsie mittels Laser weniger zeitaufwendig ist (58).

Bei der Eröffnung der Zona pellucida ist auf eine adäquat große Öffnung zu achten. Bei einer zu großen Eröffnung könnten Blastomere während der Embryonalentwicklung verloren gehen, bei einer zu kleinen Eröffnung könnte der Embryo beim „Hatching“ im Blastozystenstadium eingeklemmt werden (58). Die Entnahme der Polkörper kann zu verschiedenen Zeitpunkten (sequentiell) oder zur selben Zeit (simultan) durchgeführt werden (7, 56). Dabei ist zu beachten, dass eine simultane Entnahme lediglich eine einmalige Manipulation erfordert und so den mit der Entnahme verbundenen Stress auf die Oozyte verringert. Das optimale Zeitfenster für die simultane Entnahme ist zwischen 8-14 Stunden nach der Befruchtung der Eizelle. Die nicht zeitgerechte Entnahme der Polkörper hat folgende Risiken: bei zu früher Entnahme könnten noch Reste des Spindelapparates des 2. Polkörpers vorhanden sein bzw. bei zu später Entnahme könnte sich der 1. Polkörper bereits zersetzt haben. Es hat sich gezeigt, dass bei jungen Frauen der 1. Polkörper anfälliger für meiotische Fehler ist als der 2. Polkörper bzw. sich die Situation für ältere Frauen umgekehrt verhält. Dennoch kann eine verlässliche Aussage über die Integrität der Eizelle nur durch die Analyse beider Polkörper gestellt werden (58).

Normalerweise erfolgt die a-CGH-Auswertung des 1. und des 2. Polkörpers getrennt, jedoch beschreiben Feichtinger et al. (57) die Möglichkeit der Auswertung der Polkörper im „Polkörper-Pool“ ohne einen signifikanten Verlust an Sensitivität und mit geringeren Analysekosten (57).

1.3.2 Blastomerbiopsie

Bei der Blastomerenbiopsie wird im Entwicklungsstadium der Furchungsteilungen eine Blastomere zur weiteren Analyse entnommen. Dies erfolgt gewöhnlich im

Sechs- bis Acht-Zell-Stadium (7). Mit einem Anteil von 90% aller weltweit pränataldiagnostisch durchgeführten Testungen, handelt es sich um die häufigste Biopsie-Methode des Embryos (44).

Dabei ist zu beachten, dass Embryonen in diesem Entwicklungsstadium hohe Raten an chromosomalen Abnormalitäten bzw. Mosaiken zeigen können. Die Rate an Mosaiken bei der Blastomerbiopsie kann bis zu 50% betragen (50). Somit sind die gewonnenen Befunde oftmals für eine Aussage über den kompletten genetischen Status des Embryos nicht zu verwenden (43, 44).

Zudem konnten Scott et al. (59) zeigen, dass eine Embryobiopsie im Vergleich zu einer Trophektodermbiopsie einen risikoreicheren Eingriff in Bezug auf die Implantationsfähigkeit des Embryos bzw. die Lebendgeburtenrate darstellt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass bei der Embryobiopsie (13%) mehr Gewebe entnommen wird als bei der Trophektodermbiopsie (2-3%) relativ zur Gesamtmasse des Embryos. Zudem wird bei der Trophektodermbiopsie im Gegensatz zur Embryobiopsie extraembryonales Gewebe entnommen bzw. findet die Entnahme am 5. Tag nach Befruchtung bereits nach der Aktivierung des embryonalen Genoms statt (59). Aus diesem Grund wird zunehmend, je nach Indikation, zur Polkörperbiopsie bzw. der Trophektodermbiopsie gewechselt (7).

1.3.3 Trophektodermbiopsie

Bei der Trophektodermbiopsie werden Trophektodermzellen einer Blastozyste zur weiteren diagnostischen Aufarbeitung entnommen (43).

Die Entnahme wird gewöhnlich am Morgen des 5 bzw. 6 Tages nach Befruchtung durchgeführt. Hierbei ist von Vorteil, dass mehrere Zellen für die Auswertung entnommen werden können, die Entnahme des Materials einfacher als die Entnahme von Polkörpern bzw. Blastomeren ist und die entnommenen Trophektodermzellen im Grunde kein Bestandteil des Embryos sind, da sie später an der Bildung der Plazenta beteiligt sind (7, 44). Zusätzlich ist mit der Trophektodermbiopsie eine umfassende Bewertung der chromosomalen Anteile des Embryos beider Elternteile möglich (7, 60). Zu beachten ist, dass in 3-5 % der Trophektodermbiopsien Zellmosaike feststellbar sind (50).

Singh et al. (61) empfehlen eine Trophektoderm-Biopsie erst ab dem „Hatching“ der

Blastozyste durchzuführen, da eine zu frühe Biopsie möglicherweise den Embryo schädigt und zu niedrigeren Schwangerschaftsraten führen könnte (61).

1.3.4 Minimal- & Nicht-invasive Präimplantationsdiagnostik

1.3.4.1 Blastozentese

Die Blastozentese stellt eine neuere Biopsiemethode zur genetischen Überprüfung des zukünftigen Embryos dar. Hierbei wird mit einer ICSI-Pipette von einer ausgedehnten Blastozyste Flüssigkeit aus der Blastozystenhöhle unter der Vermeidung von jedweder Zellaspiration gewonnen. Das gewonnene Material kann in weiterer Folge z.B. mittels NGS-Verfahren bzw. a-CGH ausgewertet werden. Ein Nachteil dieser Biopsiemethode ist, dass eine messbare DNA-Amplifikation mittels WGA aus dem gewonnenen Material im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden seltener möglich ist. Von Vorteil ist, dass mit der Blastozentese die Integrität der Blastozyste im Vergleich zur Trophektodermbiopsie möglicherweise eher gewahrt werden kann (54). Zudem erfordert sie weniger Laborequipment (u.a. Laser), ist in der technischen Durchführung einfacher und wird oftmals sowieso vor einer Kryokonservierung der Blastozysten durchgeführt, um die Überlebensrate nach dem Auftauen zu maximieren (55, 60).

Ob das gewonnene DNA-Material wirklich repräsentativ die genetische Verfassung des gesamten Embryos wiedergibt, ist bisher nicht eindeutig geklärt (62).

1.3.4.2 Verbrauchtes Blastozystenkulturmedium

Bei der Analyse von verbrauchtem Blastozystenkulturmedium handelt es sich um eine neuartige nicht-invasive kostengünstige Form der Präimplantationsdiagnostik. Dabei wird verbrauchtes Kulturmedium zum Zeitpunkt des Blastozystenstadiums zur weiteren Untersuchung auf embryonische DNA gewonnen (55).

1.4 Überblick über genetische Analysen des Präimplantations-screenings

Beim Präimplantationsscreening findet eine Überprüfung der biopsierten Zellen auf Euploidie aller 23 Chromosomen statt. Dabei können zahlreiche Verfahren zur genetischen Analyse angewendet werden (42).

1.4.1 FISH

Beim FISH-Verfahren („fluorescence in situ hybridization“) handelt es sich um das erste im Präimplantationsscreening eingesetzte Testverfahren (42). Das FISH-Verfahren kann dazu dienen chromosomale Veränderungen bzw. das Geschlecht des Embryos, bei PatientInnen die Trägerinnen einer x-chromosomalen Erbkrankheit sind, festzustellen (43).

Vorteile des FISH-Verfahrens sind eine kurze Bearbeitungszeit der Proben bzw. dass keine DNA-Amplifizierung, welche mit Amplifizierungsfehlern einhergehen könnte, notwendig ist (42).

Als Fehlerquellen sind Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz und subjektive Fehler in der Befundung des Fluoreszenzsignals zu nennen (42). Jedoch ist es mithilfe des Interphase-FISH möglich, zahlreiche Zellen parallel zu untersuchen und dadurch mögliche Fehlerquellen wie etwa Signalüberlagerungen und Variationen in der Hybridisierungseffizienz zu minimieren (43).

Eine simultane Beurteilung aller 23 Chromosomenpaare auf Euploidie ist mit dem FISH-Verfahren nicht möglich (42).

1.4.2 Quantitative Realtime-PCR

Mithilfe PCR-basierter („polymerase chain reaction“) Verfahren ist es grundsätzlich möglich, spezifische genetische Erkrankungen zu diagnostizieren (43).

Bei der quantitativen Realtime-PCR können alle 23 Chromosomenpaare in kurzer Zeit (4-12 Stunden) auf Aneuploidie untersucht werden (42, 50, 63).

Nachteile der qRT-PCR sind ein hoher Arbeitsaufwand und, dass nur eine begrenzte Anzahl an Loci entlang jedes Chromosoms untersucht werden kann. Zudem können strukturelle Chromosomenaberrationen bzw. uniparentale Disomien nicht diagnostiziert werden (42, 50).

1.4.3 Microarray-Diagnostik

1.4.3.1 CGH

Bei der CGH-Untersuchung („comparative genomic hybridization“) handelt es sich um eine Untersuchungstechnik, welche einen Brückenschlag zwischen der Zytogenetik und Molekulargenetik darstellt.

Dabei wird die DNA einer Testprobe bzw. einer normalen Kontrollprobe separat mittels WGA-Verfahren („whole genome amplification“) vervielfältigt. Danach werden die amplifizierten DNA-Proben mit 2 verschiedenen Fluorochromen markiert. Zur Veranschaulichung dient **Abbildung 3**.

In dieser Abbildung wurde die Kontroll-DNA mit einem roten Fluorochrom und die DNA der Testprobe mit einem grünen Fluorochrom markiert. In Folge werden beide Proben zu gleichen Teilen vermischt, auf einen Metaphase-Ausstrich einer männlichen Kontrollprobe (m-CGH) oder auf eine Array-Plattform, auf welcher kleine DNA-Fragmente aufgedruckt sind, aufgebracht, um nun in gegenseitigem Wettstreit auf dieser um die Hybridisierung mit bestehender Probe zu treten.

Bei der m-CGH wird so mittels spezieller Computersoftware das Rot-zu-Grün-Fluoreszenz-Verhältnis entlang eines jeden Metaphase-Chromosoms bei zumindest 6 Metaphase-Sets ausgewertet und als Ideogramm dargestellt. Zugewinne in Rot deuten auf einen Verlust einer Region bzw. eines Chromosoms in der Testprobe hin, Zugewinne in Grün auf einen Zugewinn einer Region bzw. eines Chromosoms in der Testprobe. Bei dieser Methode handelt es sich um ein aufwendiges und zeitintensives Testverfahren, wo die reine Laborarbeit ohne Auswertung bis zu 72 Stunden betragen kann (43).

Die a-CGH-Untersuchung arbeitet nach denselben Grundlagen wie das m-CGH-Verfahren, ermöglicht jedoch eine vollautomatische Analyse innerhalb von 12-24 Stunden (43, 50). Damit ist zumindest theoretisch eine Embryobiopsie an Tag 3 möglich, eine Auswertung der Probe und in Folge, anstatt eines Kryo-Transfers, ein

frischer Transfer an Tag 5 (43). Eine a-CGH-Untersuchung hat im Vergleich zu einem SNP-Array eine kürzere Bearbeitungszeit, jedoch auch eine, bei ca. 4000 im Genom untersuchten Positionen, geringere Auflösungsgrenze als ein SNP-Array (41, 50).

Schwachstellen der CGH-Untersuchung sind, dass Polyploidien und balancierte chromosomale Veränderungen (Translokationen, Inversionen) aufgrund des Testverfahrens nicht erkannt werden können (63). Weiters ist zu beachten, dass Veränderungen in der Nukleotid-Abfolge, wie Punktmutationen, intragenische Insertionen oder Deletionen bzw. Triple-Repeat-Veränderungen, mit diesem Verfahren nicht diagnostiziert werden können (43). Auch eine uniparentale Disomie kann mit diesem Verfahren nicht erkannt werden (50, 63).

Zugewinne oder Verluste in Genomregionen, welche durch den Array nicht abgedeckt sind, werden nicht erfasst (43). Weiters ist zu bedenken, dass es im Rahmen der Amplifizierung zu Fehlern kommen kann (42).

Ein Auflösungsvermögen von 2-10 Mbp, je nach verwendetem a-CGH-Chip bzw. an welcher Stelle im Genom die Chromosomenaberration liegt, wurden beschrieben (64).

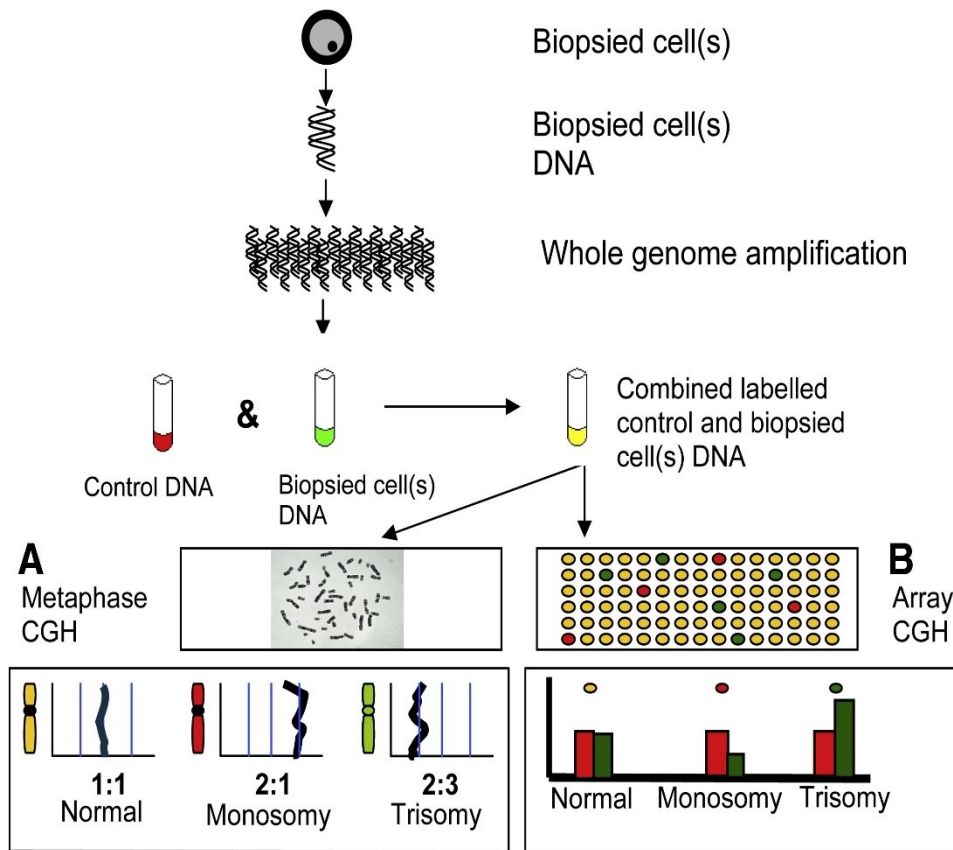


Abbildung 3 – Darstellung m-CGH & a-CGH übernommen von Harper JC et Harton G(43)

1.4.3.2 SNP-Array

Bei SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) handelt es sich um Variationen einzelner Basenpaare (Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin) in der genomischen DNA. Beim PGS werden ungefähr 300.000 SNPs üblicherweise in nicht kodierenden Bereichen über das gesamte Genom ausgewertet. Dabei erhält man für die untersuchten Stellen jeweils einen Genotyp (AA, AB, BB) (50). Die gewonnenen Daten werden in Folge mit einem Referenzgenom (HapMap) abgeglichen (42, 50). Auch bei der Durchführung eines SNP-Arrays ist eine Amplifizierung der mittels Biopsie gewonnenen DNA-Probe notwendig. Im Anschluss daran wird diese Probe auf an einen Microarray gebundene Oligonukleotide bestimmter SNP-Stellen hybridisiert. Durch die Hybridisierung kann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen darauf rückgeschlossen werden, ob es sich beim jeweiligen SNP um einen homo- bzw. heterozygoten Genotyp handelt (42).

Vorteile dieses Verfahrens sind, dass sowohl kleine Deletionen/Duplikationen gefunden werden können, eine uniparentale Disomie festgestellt werden kann bzw. gleichzeitig alle 23 Chromosomenpaare auf Euploidie überprüft werden können.

Zudem ist es mittels Abgleich mit elterlicher DNA möglich, im untersuchten Material zu bestimmen, welches Allel von welchem Elternteil stammt (42).

Dennoch ist es möglich, dass strukturelle de novo-Aberrationen unter der Auflösungsgrenze des SNP-Arrays verborgen bleiben (50).

1.4.4 NGS

Auch das NGS-("Next-generation sequencing")-Verfahren kann im Präimplantationsscreening eingesetzt werden. Eine möglichst fehlerfreie Amplifizierung des Probenmaterials ist hierbei wichtig, um die Entstehung von Artefakten gering zu halten (50).

Nach der Amplifizierung der Probe erfolgt die Fragmentierung der DNA bzw. eine Adapterligation an die zuvor entstandenen DNA-Fragmente – dieser Schritt wird „Library Preparation“ genannt (50). Wenn nur bestimmte Gene bzw. Gen-Panels ausgewertet werden sollen, kann eine Anreicherung der bestimmten Zielregionen („Target Enrichment“) erfolgen (65).

Je nach verwendeter NGS-Plattform erfolgt im Anschluss eine Emulsions-PCR (Ion Torrent™) bzw. eine Brücken-PCR (Illumina).

Als nächster Schritt erfolgt eine optisch-basierte (Illumina). bzw. pH-basierte Sequenzierung (Ion Torrent™) der Probe (50).

Im Rahmen der Datennachbearbeitung mittels Bioinformatik-Software werden die gewonnenen Daten mit einem Referenzgenom (z.B. hg19) abgeglichen (42) und die Artefakte identifiziert bzw. entfernt (50).

Das Verfahren eignet sich sowohl für das Präimplantationsscreening als auch insbesondere zeitgleich für die Präimplantationsdiagnostik der bei den Eltern bekannten bestehenden Mutationen, da mit diesem Verfahren auch einzelne bzw. multiple Genmutationen des Embryos diagnostiziert werden können (42).

1.5 Forschungsfrage

Unsere Forschungsfrage ist, ob sich im Rahmen des Präimplantationsscreenings der Polkörper mittels a-CGH-Verfahren Häufungen an unbalancierten strukturellen Chromosomenaberrationen bezogen auf spezifische Chromosomen aufzeigen lassen. Zudem wurde untersucht, ob in weiterer Folge diese mit klinischen Parametern korreliert werden können bzw. welchen Stellenwert das Präimplantationsscreening (PGS) in der klinischen Routine einnimmt.

2 Material und Methoden

2.1.1 Studiendesign

Es handelt sich hierbei um eine monozentrische, retrospektive Studie anhand von Krankenakten. Es bestand ein aufrechtes Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz (26-430 ex13/14) für die Durchführung dieser Masterarbeit. Für die in diese Arbeit übernommenen Abbildungen wurden die Bildlizenzen eingeholt.

2.1.2 PatientInnenkollektiv

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden die a-CGH-Polkörperuntersuchungen, welche durch die Kinderwunsch Institut Schenk GmbH in den Jahren 2013-2017 veranlasst wurden, ausgewertet.

Dabei fanden Patientinnen mit einem Mindestalter von 18 Jahren mit unerfülltem Kinderwunsch nach mehr als einem Jahr ungeschützten Geschlechtsverkehr mit ihrem Partner Einschluss. Es wurden für diese Studie weder ein Höchstalter noch Begleiterkrankungen als Ausschlusskriterien definiert.

Eine Bestimmung einer Stichprobengröße erfolgte aufgrund des Studiendesigns nicht.

Die Polkörperauswertungen wurde am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz bzw. der HLN-Genetik GmbH mittels a-CGH durchgeführt.

Im Rahmen dieser Studie wurden 480 a-CGH-Untersuchungen an Polkörpern in die Auswertung miteinbezogen. Dabei wurden Polkörperbiopsien an 465 Oozyten durchgeführt. Da bei 15 Polkörperbiopsien die a-CGH-Auswertung als Polkörper-Paar (getrennte Untersuchung der Polkörper 1 & 2) erfolgte, wurden 480 a-CGH-Untersuchungen ausgewertet.

Diese wurden in 129 Besuchen von 73 subfertilen Patientinnen gewonnen. 16 Patientinnen ließen an zwei, 5 Patientinnen an drei, 6 Patientinnen an vier, eine Patientin an sechs und eine weitere Patientin an acht verschiedenen Zeitpunkten

eine Polkörperuntersuchung durchführen.

Die untersuchten Hauptzielgrößen waren die Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen, die Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei Nichtrauchern, die Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei Rauchern, die Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei Fehlen eines OAT-Syndroms und die Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei Bestehen eines OAT-Syndroms.

Als Nebenzielgrößen dienten das Alter bei Punktion, die BMI-Verteilung bei der Polkörperpunktion, der Nikotinabusus im Patientenkollektiv, die Häufigkeit von Oligoasthenoteratozoospermie (OAT) im Patientenkollektiv, der chromosomale Status der Polkörper im Patientenkollektiv, die Aufteilung unbalancierter Polkörper in einzelne und multiple Chromosomenveränderungen, die Einteilung der eingesendeten Polkörper im Kollektiv, der Anteil fragmentierte Polkörper unter den gepoolten Polkörpern, die Polkörperverteilung nach Alter sowie die Polkörperverteilung nach BMI.

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Patientendaten wurden pseudoanonymisiert verarbeitet.

2.1.3 Statistische Analyse

Zur Speicherung der erhobenen PatientInnen Daten diente eine MS Excel 365 Arbeitsmappe. Die statistische Auswertung erfolgte ebenso über die Software MS Excel 365.

Die Analyse der erhobenen Parameter erfolgte mittels deskriptiver Statistik.

3 Ergebnisse

Die Altersverteilung in unserem Patientinnenkollektiv (n=73) im Rahmen der 129 durchgeführten Polkörperuntersuchungen ist in **Abbildung 4** ersichtlich. Die Altersspanne bei Polkörperpunktion erstreckte sich vom 21 bis 49 Lebensjahr mit einem medianen Alter von 39 Jahren (mean = 38.9, SD = ±4.4).

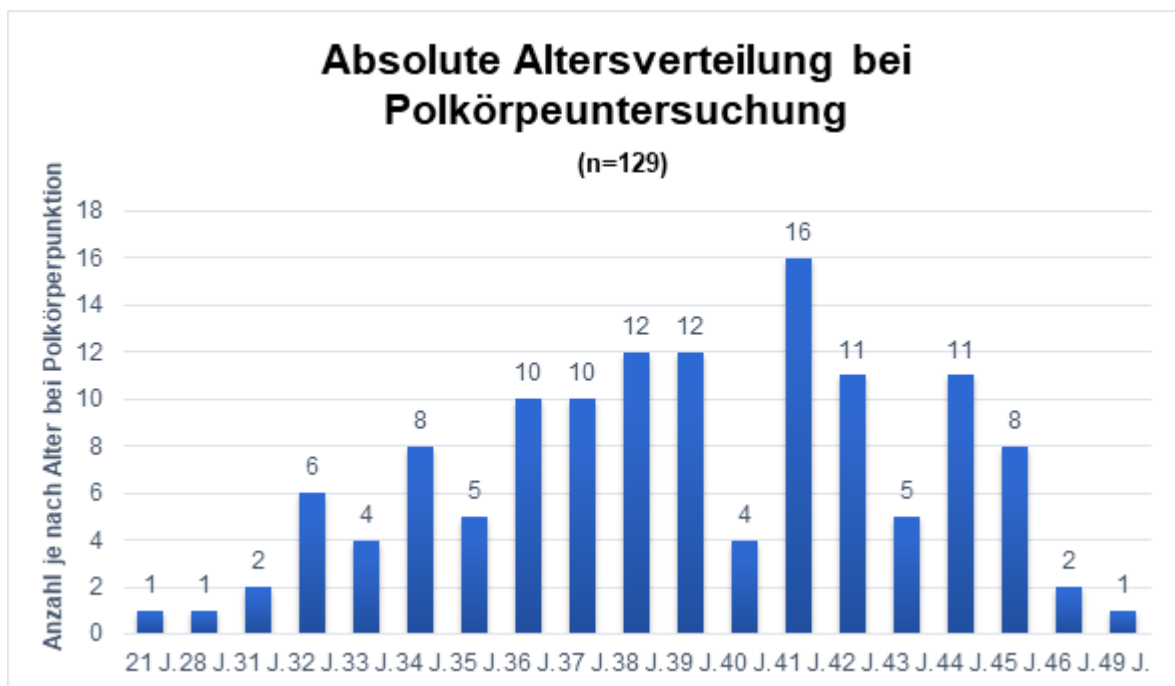


Abbildung 4 – Absolute Altersverteilung bei Polkörperpunktion

Bei 127 Polkörperpunktionen wurde die Körpergröße und das Körpergewicht der Patientin bei Punktion dokumentiert und daraus der BMI berechnet.

In unserem Patientinnenkollektiv war Normalgewicht mit 74% am häufigsten vertreten. Siehe **Abbildung 5**.

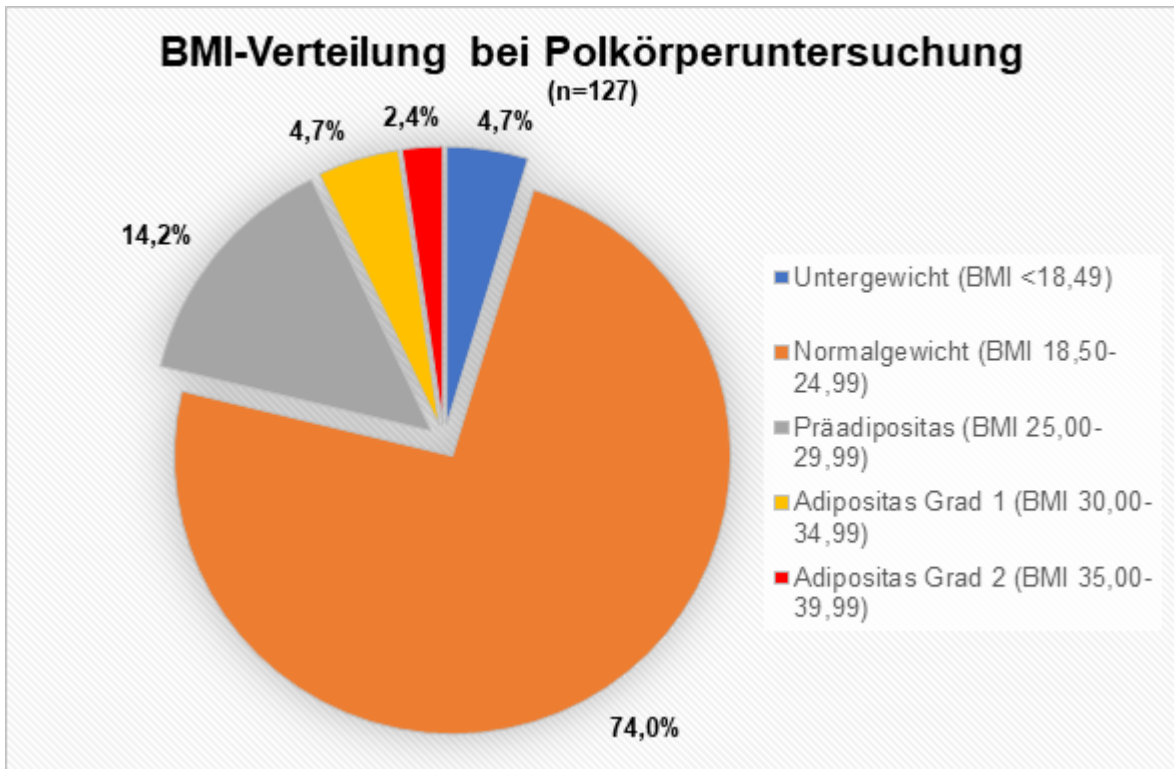


Abbildung 5 – BMI-Verteilung bei Polkörperpunktion

Im Rahmen der Vorstellung zur Polkörperentnahme (n=129) gaben in unserem Patientinnenkollektiv 88,37% der Patientinnen an „Nichtraucher“ zu sein und 11,63% „Raucher“ zu sein. Siehe **Abbildung 6**.

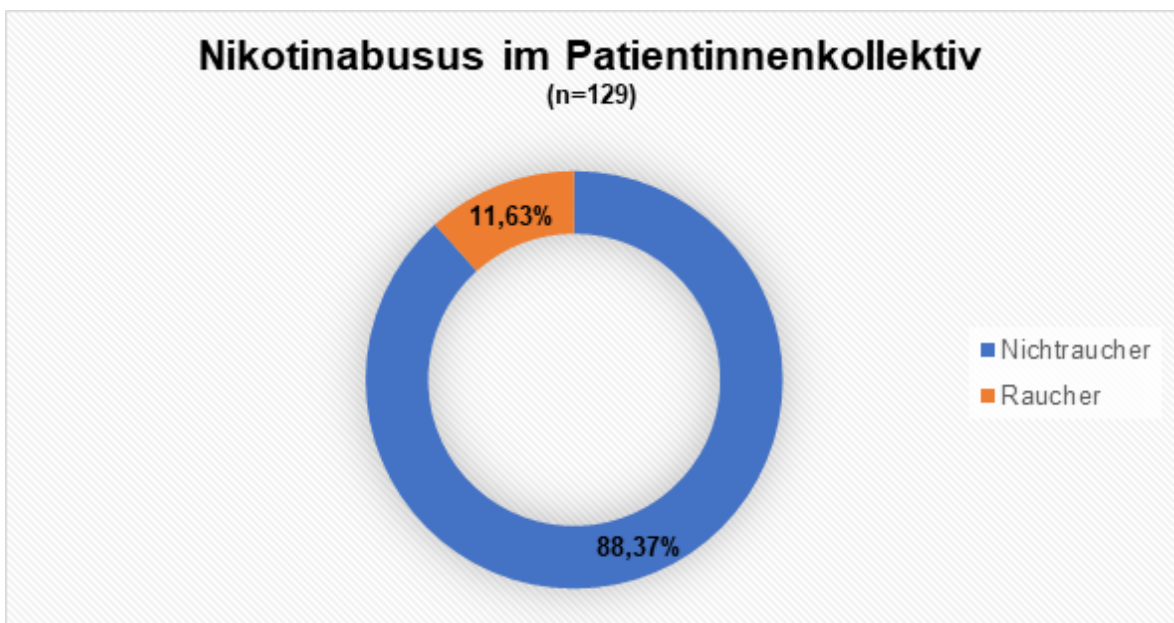


Abbildung 6 – Nikotinabusus im Patientinnenkollektiv

Bei 125 Polkörperpunktionen war die Samenqualität des für die Befruchtung der Eizelle verwendeten Samens aus der Datenbank erhebbar. Bei 17,6% der Samenspender in unserem Kollektiv bestand eine Oligoasthenoteratozoospermie. Siehe **Abbildung 7**.

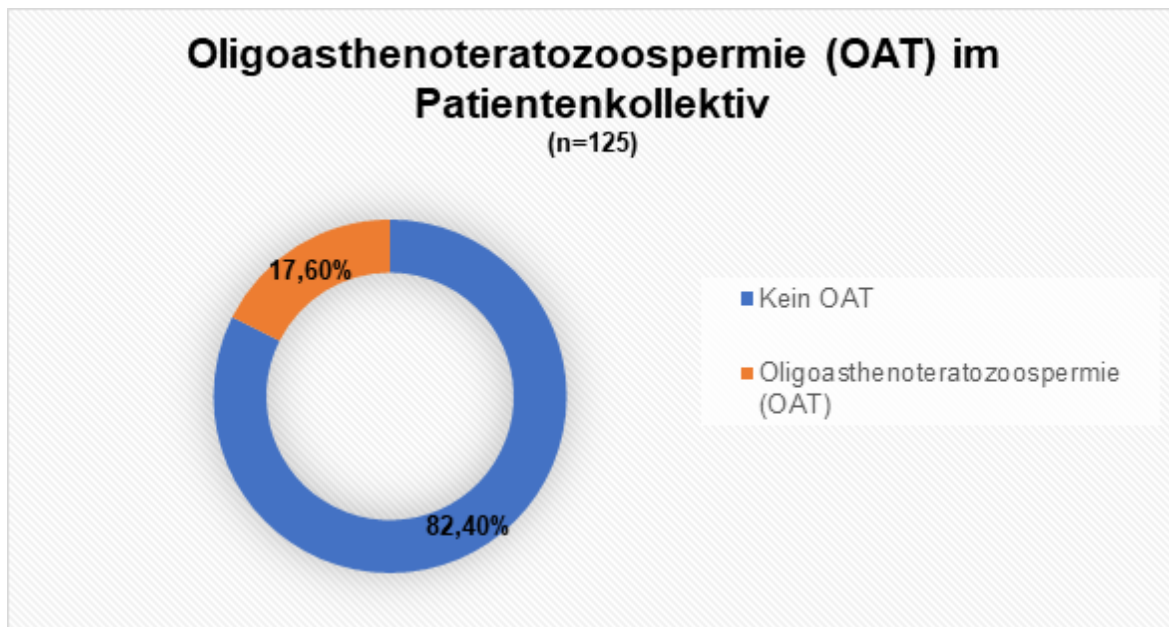


Abbildung 7 – Oligoasthenoteratozoospermie (OAT) im Patientenkollektiv

Betrachtet man alle durchgeführten Polkörperauswertungen mittels a-CGH in unserem Kollektiv, so handelt es sich bei 72,08% um unbalancierte Polkörper, bei 20,21% handelt es sich um balancierte Polkörper, bei 4,79% war keine Analyse aufgrund unzureichender DNA-Qualität möglich, bei 1,67% wurde keine Analyse des Polkörpers angefordert und bei 1,25% war aufgrund eines systemischen Fehlers keine Auswertung möglich. Siehe **Abbildung 8**.

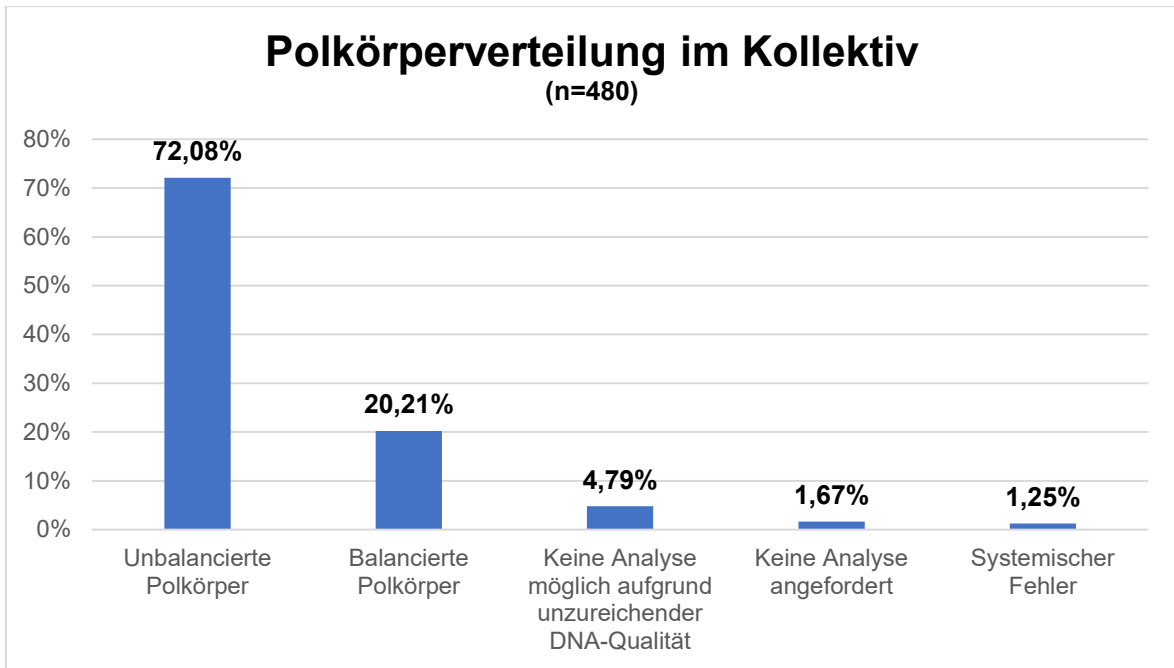


Abbildung 8 – Polkörperverteilung im Kollektiv

In **Abbildung 9** sind die unbalancierten Polkörper unseres Kollektivs in Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen und in Polkörper mit multiplen Chromosomenveränderungen aufgeschlüsselt. Hierbei haben 85,26% der untersuchten unbalancierten Polkörper einzelne Chromosomenveränderungen und 14,74% der untersuchten unbalancierten Polkörper multiple Chromosomenveränderungen in der a-CGH-Auswertung gezeigt.

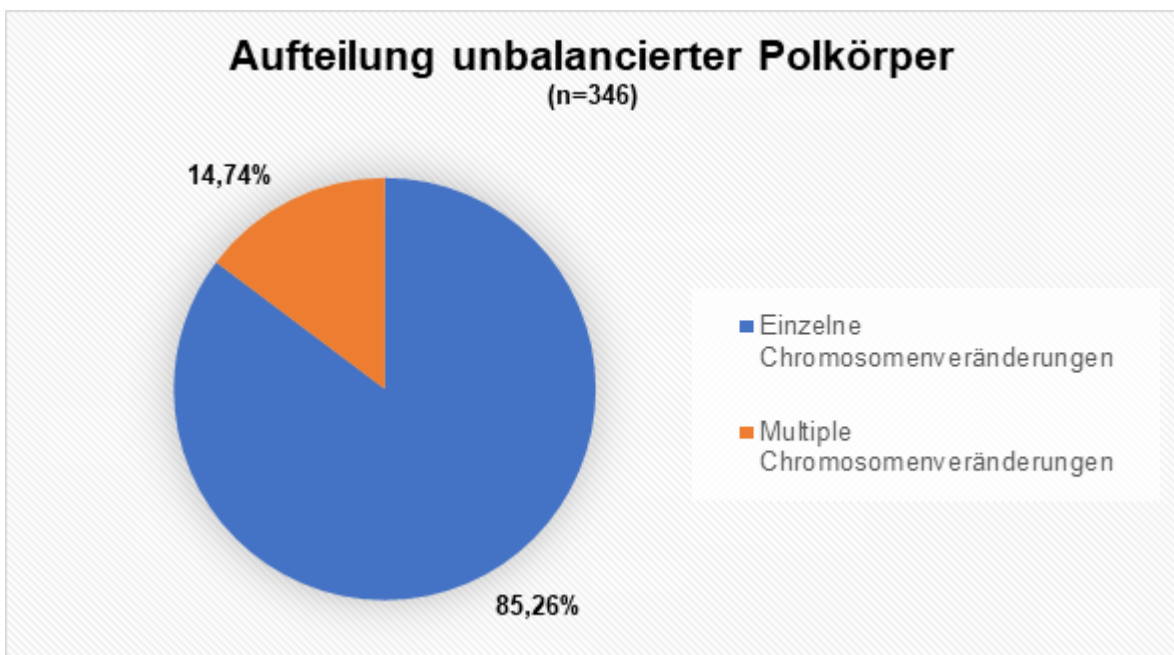


Abbildung 9 – Aufteilung unbalancierter Polkörper

Betrachtet man die 480 durchgeführten a-CGH-Untersuchungen genauer, so wurden bei 5,83% (28) der Untersuchungen nur der Polkörper 1. untersucht, in 6,25% (30) der Untersuchungen wurden Polkörper 1. & 2. getrennt als Polkörper-Paar untersucht und in der Mehrzahl der Fälle mit 87,92% (422) kam es zur Untersuchung der eingesendeten Polkörper als Polkörper-Pool (gemeinsame Untersuchung der Polkörper 1. & 2.). In keinem der Fälle kam es zur alleinigen Untersuchung des 2. Polkörpers. Insgesamt wurde an 465 Oozyten eine Polkörperbiopsie durchgeführt. Siehe **Abbildung 10**.

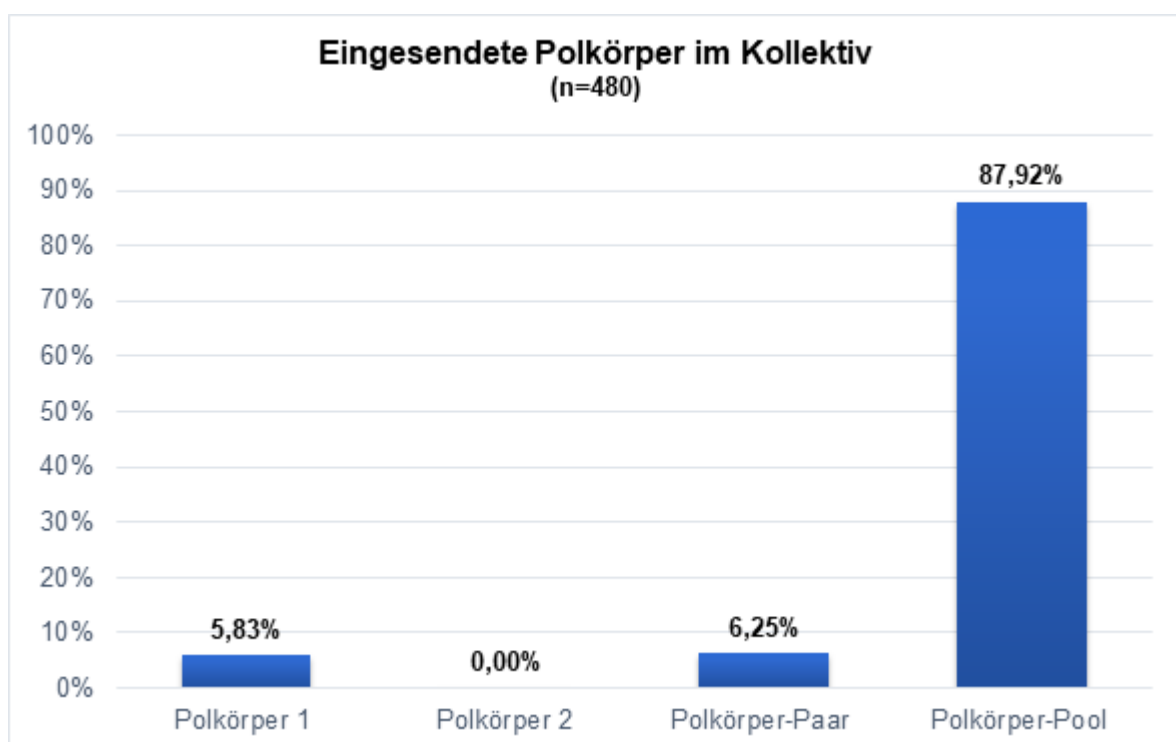


Abbildung 10 – Eingesendete Polkörper im Kollektiv

Betrachtet man die durchgeführten Untersuchungen der gepoolten Polkörper (n=422) genauer, so waren 2,84% der Polkörper-Proben fragmentiert. Siehe **Abbildung 11**.

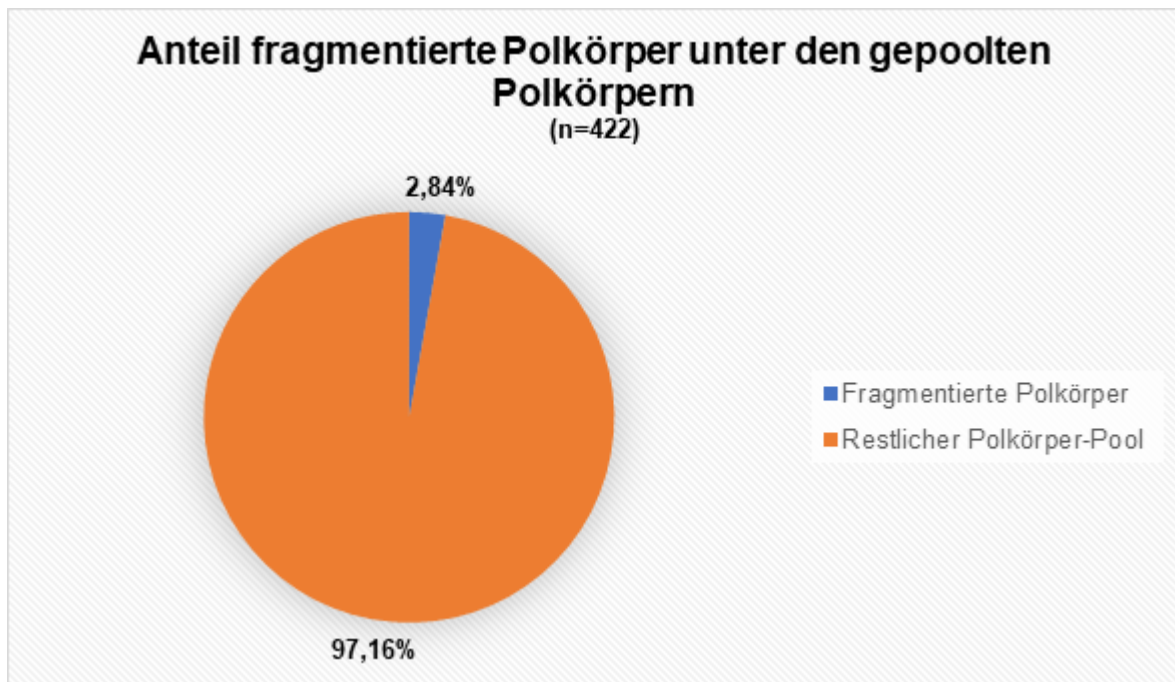


Abbildung 11 – Anteil fragmentierte Polkörper unter den gepoolten Polkörpern

In **Abbildung 12** ist die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen (n=295) ersichtlich. In grüner Farbe sind je nach Chromosomenarm die relativen Zugewinne bzw. in roter Farbe sind je nach Chromosomenarm die relativen Verluste dargestellt.

Auffallend ist hierbei, dass die Chromosomen 9, 16, 19 und 22 am öftesten Zugewinne bzw. im Gegensatz dazu die Chromosomen 4, 13-16, 18 und 21 gehäuft Verluste an chromosomalem Material zeigen.

Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen (n=295)

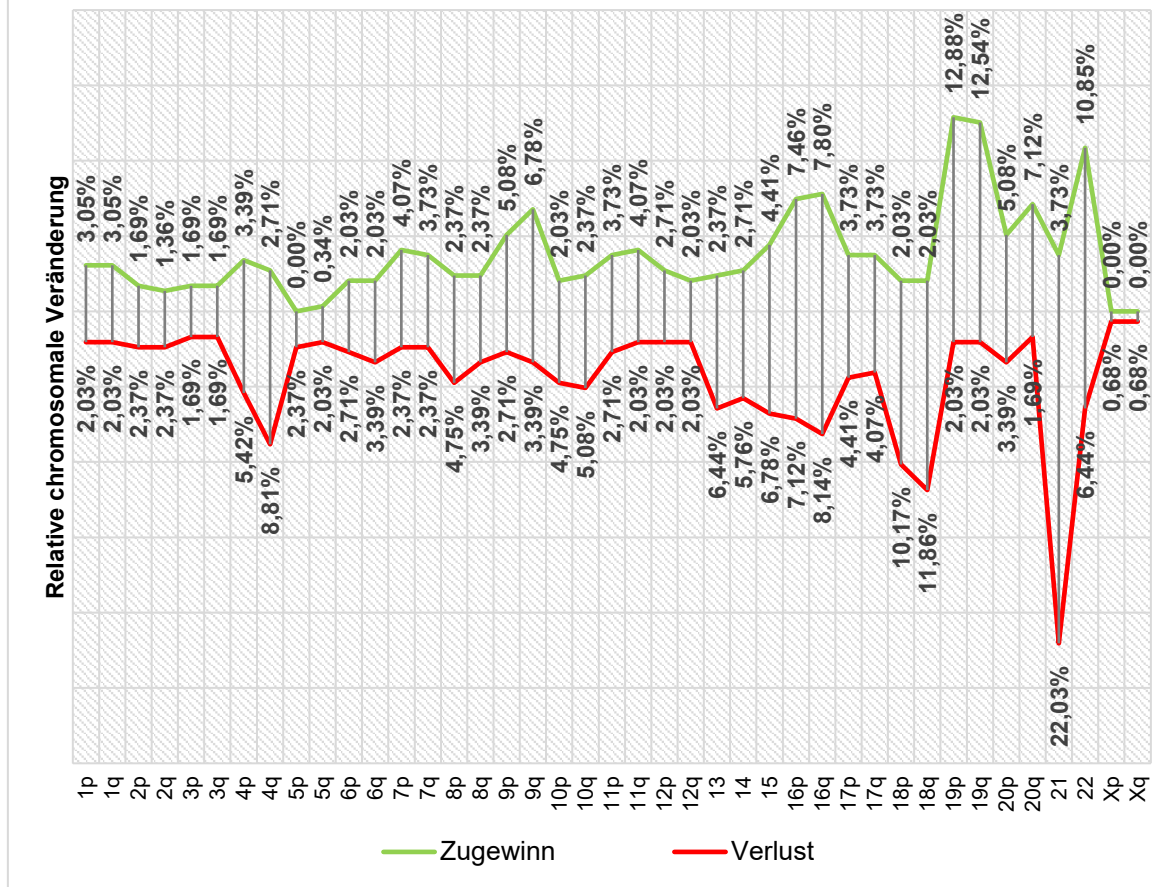


Abbildung 12 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen

In **Abbildung 13** ist die Verteilung der Polkörperauswertungen der Nichtraucherinnen (n=446) unseres Patientinnenkollektivs dargestellt.

So handelt es sich bei 71,52% um unbalancierte Polkörper, bei 20,85% handelt es sich um balancierte Polkörper, bei 4,48% war aufgrund unzureichender DNA-Qualität keine Analyse möglich, bei 1,79% wurde keine Analyse des Polkörpers angefordert und bei 1,35% war aufgrund eines systemischen Fehlers keine Auswertung möglich.

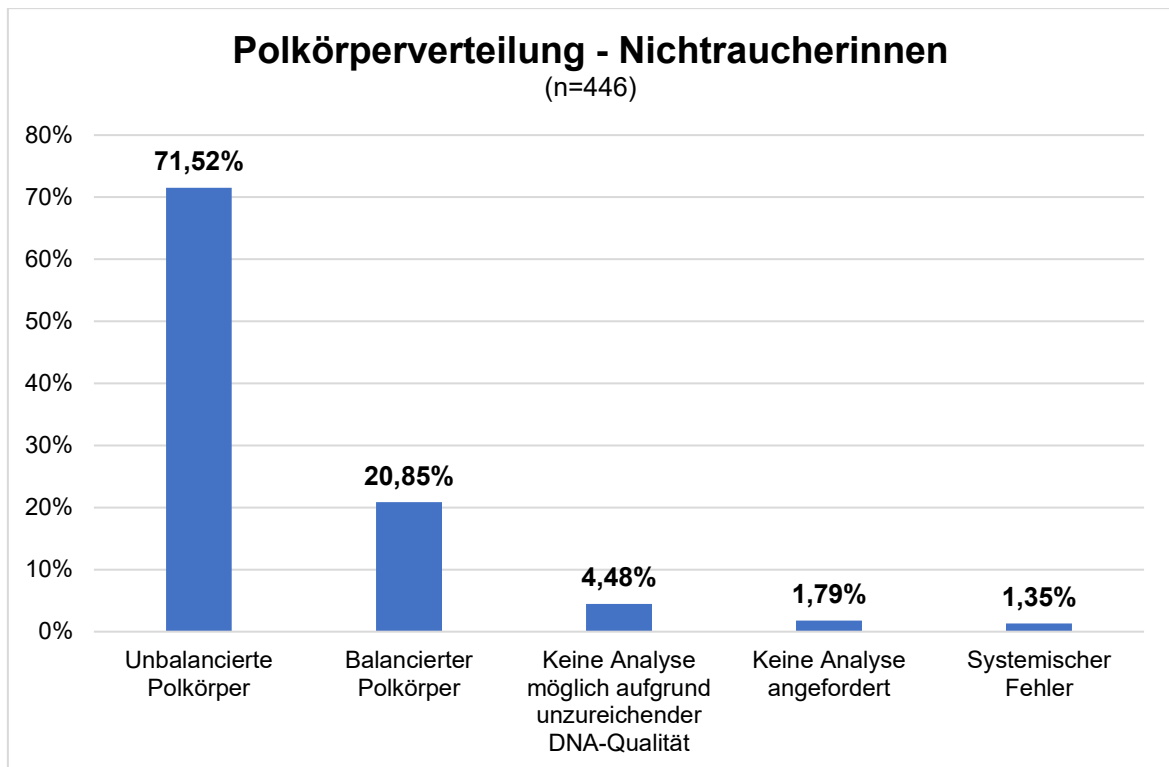


Abbildung 13 – Polkörperverteilung – Nichtraucherinnen

In **Abbildung 14** ist die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei den Nichtraucherinnen in unserem Kollektiv (n=270) ersichtlich. Es zeigt sich wie bereits im Gesamtkollektiv (Siehe **Abbildung 12**) vor allem ein Zugewinn bei den Chromosomen 9, 16, 19 und 22 bzw. ein Verlust bei den Chromosomen 4, 13-16, 18 und 21.

Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Nichtraucherinnen (n=270)

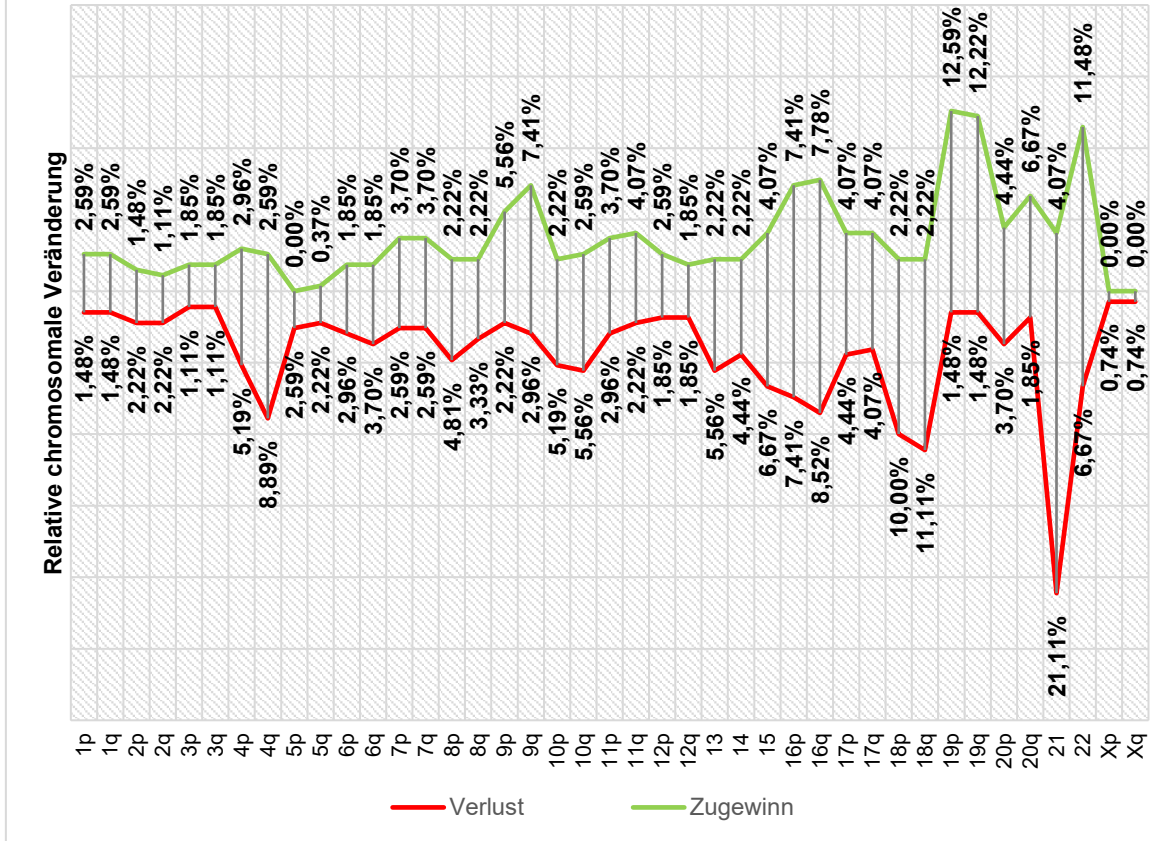


Abbildung 14 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Nichtraucherinnen

In **Abbildung 15** ist die Verteilung der Polkörperauswertungen der Raucherinnen (n=34) unseres Patientinnenkollektivs dargestellt.

So handelt es sich bei 79,41% um unbalancierte Polkörper, bei 11,76% handelt es sich um balancierte Polkörper und bei 8,82% war aufgrund unzureichender DNA-Qualität keine Analyse möglich.

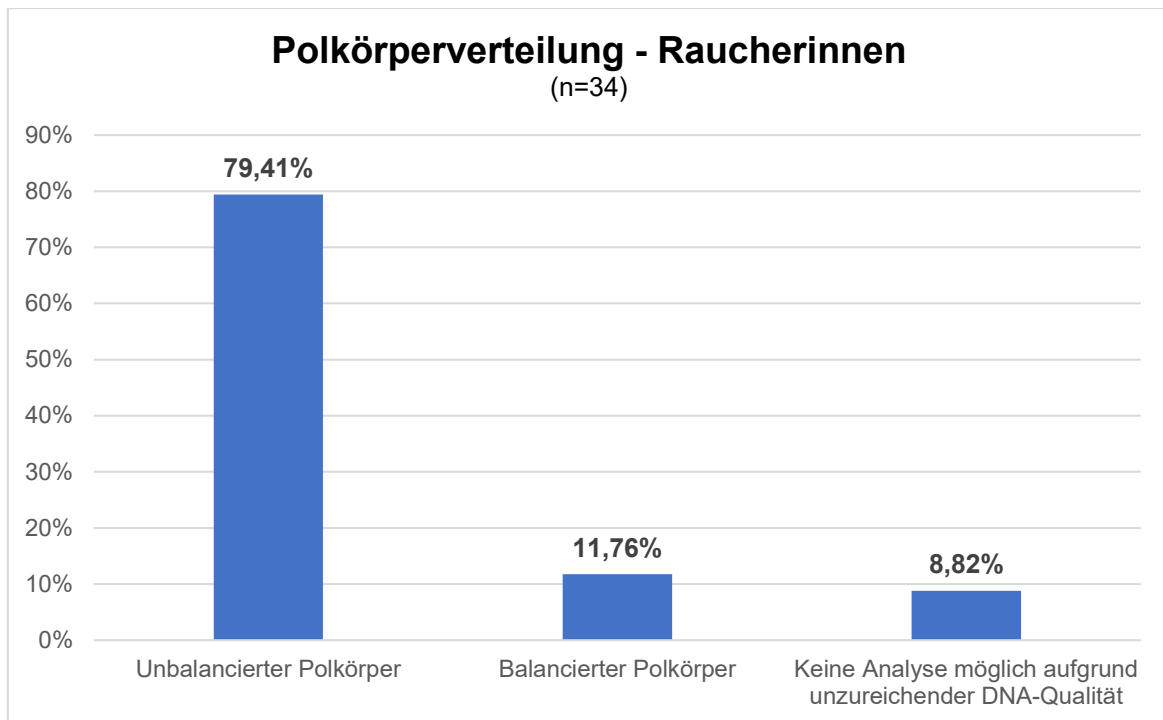


Abbildung 15 – Polkörperverteilung - Raucherinnen

In **Abbildung 16** ist die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei den Raucherinnen in unserem Patientinnenkollektiv (n=25) dargestellt. Es zeigt sich vor allem ein Zugewinn bei den Chromosomen 1, 4, 7, 14-16, 19-20 bzw. ein Verlust bei den Chromosomen 1, 3-4, 9, 13-15, 18-19 und 21.

In **Abbildung 17** ist die Polkörperverteilung nach BMI in unserem Patientinnenkollektiv (n=476) dargestellt. Auffallend ist hierbei, dass bei Patientinnen mit Untergewicht (BMI < 18,49) 8,7% balancierte Polkörper und 86,96% unbalancierte Polkörper bzw. bei Patientinnen mit Adipositas Grad 2 (BMI 35-39,99) 28,57% balancierte Polkörper und 64,29% unbalancierte Polkörper auftreten.

Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Raucherinnen (n=25)

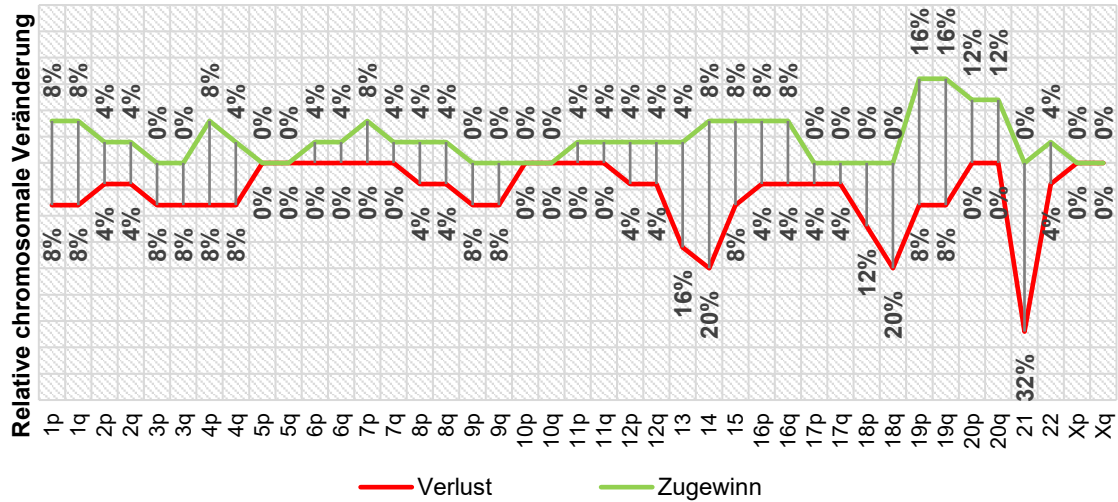


Abbildung 16 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Raucher

Polkörperverteilung nach BMI (n=476)

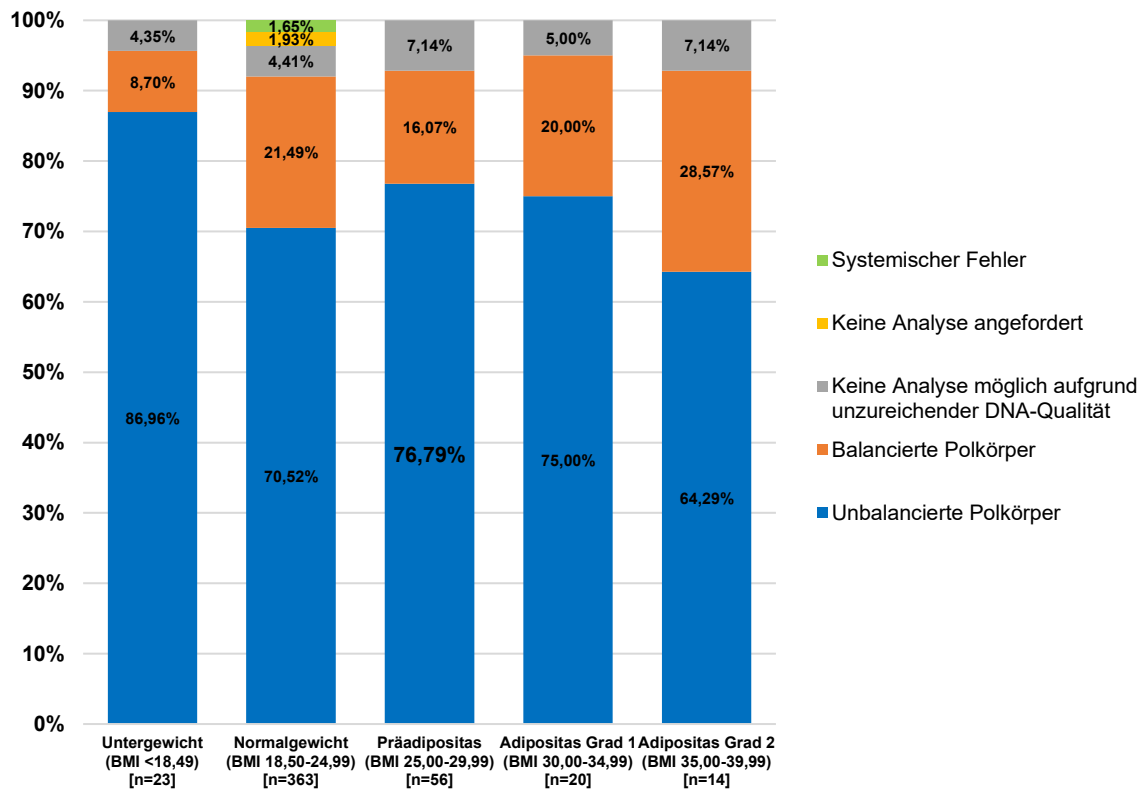


Abbildung 17 – Polkörperverteilung nach BMI

In **Abbildung 18** wird die Polkörperverteilung nach Alter in unserem Patientinnenkollektiv (n=480) aufgezeigt. Dabei zeigt sich erwartungsgemäß ein Abfall der balancierten Polkörper und ein Anstieg der unbalancierten Polkörper mit dem Alter.

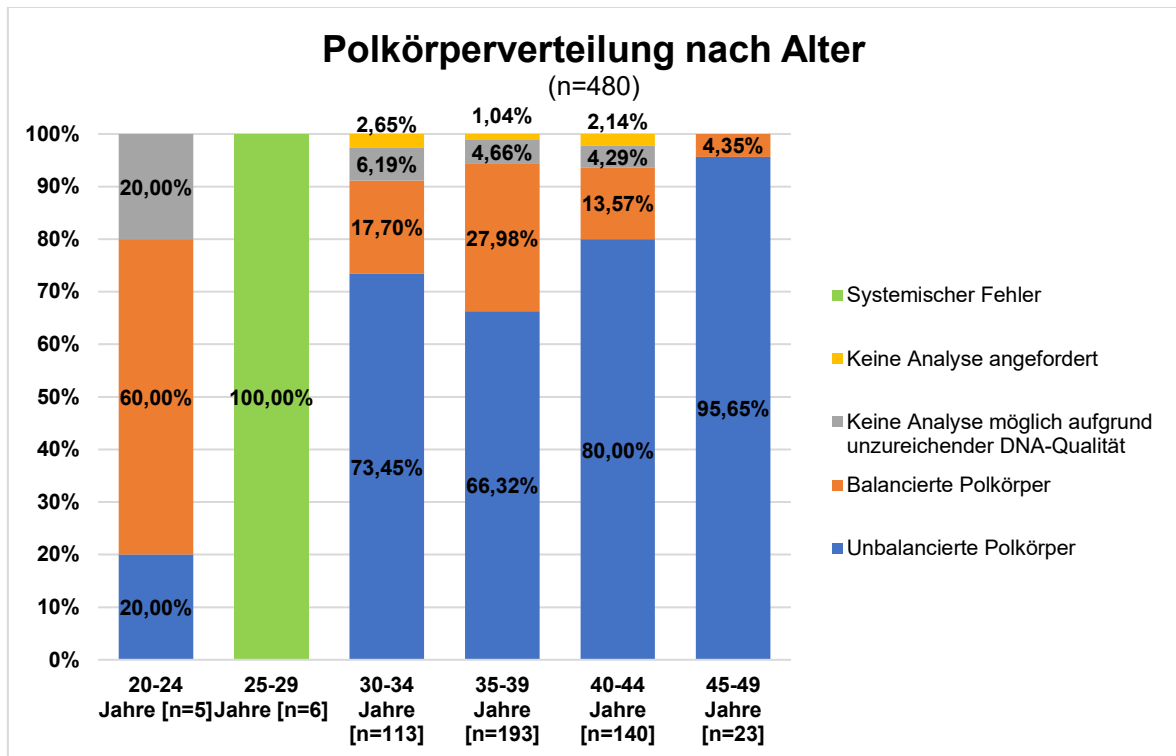


Abbildung 18 – Polkörperverteilung nach Alter

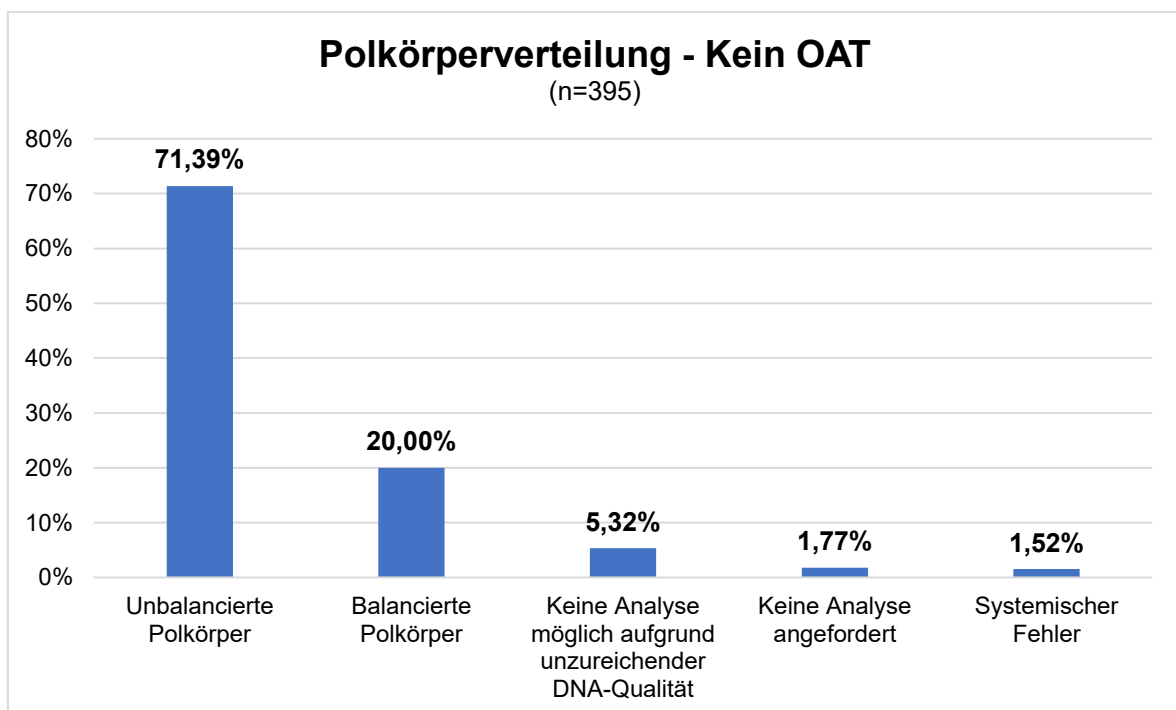


Abbildung 19 – Polkörperverteilung - Kein OAT

In **Abbildung 19** ist die Verteilung der Polkörperauswertungen der Patientinnen ohne OAT-Samen (n=395) unseres Patientinnenkollektivs dargestellt.

So handelt es sich bei 71,39% um unbalancierte Polkörper, bei 20% handelt es sich um balancierte Polkörper, bei 5,32% war aufgrund unzureichender DNA-Qualität keine Analyse möglich, bei 1,77% wurde keine Analyse der Polkörper angefordert und bei 1,52% war aufgrund eines systemischen Fehlers keine Auswertung möglich.

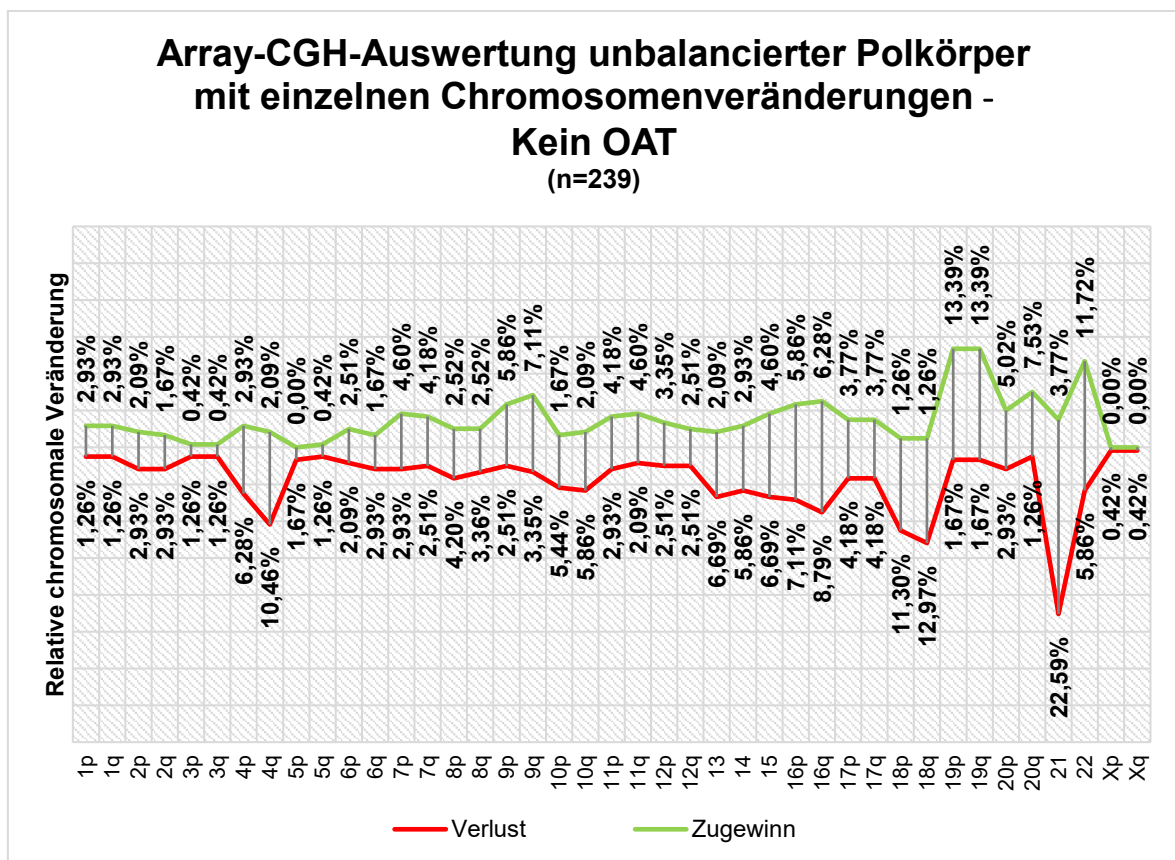


Abbildung 20 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - Kein OAT

In **Abbildung 20** ist die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei den Patientinnen ohne OAT-Samen in unserem Patientinnenkollektiv (n=239) dargestellt. Es zeigt sich vor allem ein Zugewinn bei den Chromosomen 9, 16, 19-20, 22 bzw. ein Verlust bei den Chromosomen 4, 10, 13-16, 18 und 21-22.

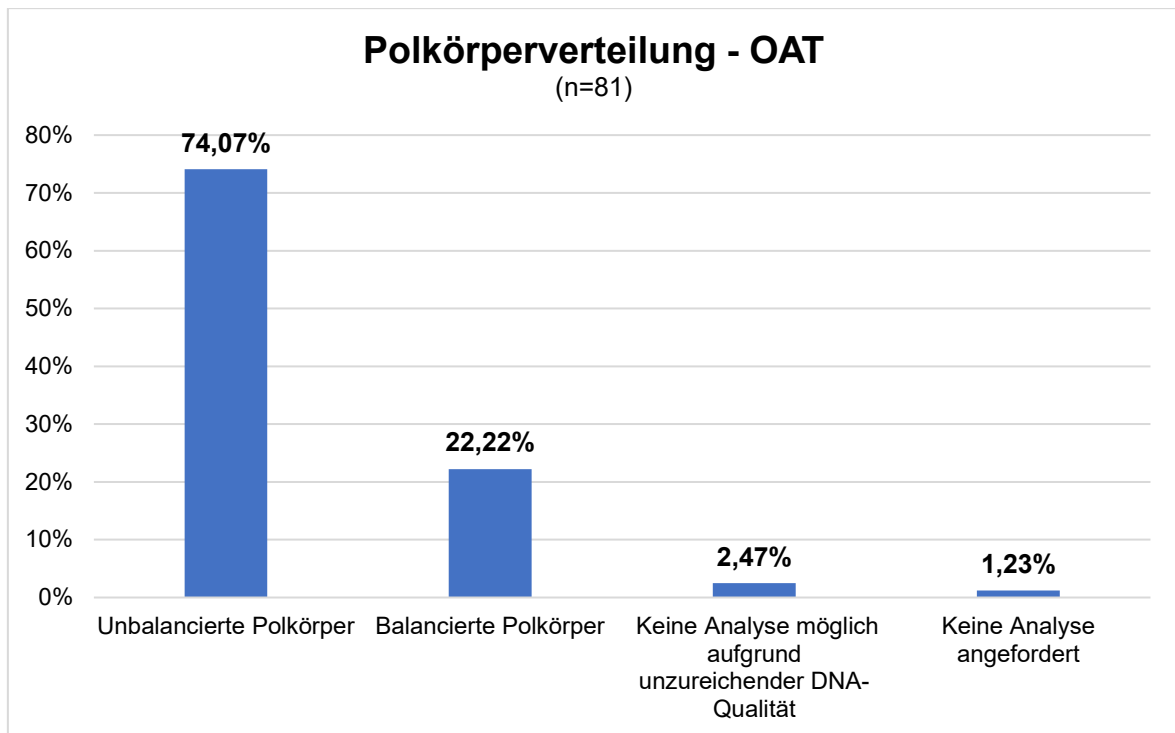


Abbildung 21 – Polkörperverteilung - OAT

In **Abbildung 21** ist die Verteilung der Polkörperauswertungen der Patientinnen mit OAT-Samen (n=81) unseres Patientinnenkollektivs dargestellt.

So handelt es sich bei 74,07% um unbalancierte Polkörper, bei 22,22% handelt es sich um balancierte Polkörper, bei 2,47% war aufgrund unzureichender DNA-Qualität keine Analyse möglich und bei 1,23% wurde keine Analyse der Polkörper angefordert.

In **Abbildung 22** ist die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei den Patientinnen mit OAT-Samen in unserem Patientinnenkollektiv (n=53) dargestellt. Es zeigt sich vor allem ein Zugewinn bei den Chromosomen 3-4, 9, 16, 18-20, 22 bzw. ein Verlust bei den Chromosomen 5-6, 8, 13-18 und 20-22.

Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - OAT (n=53)

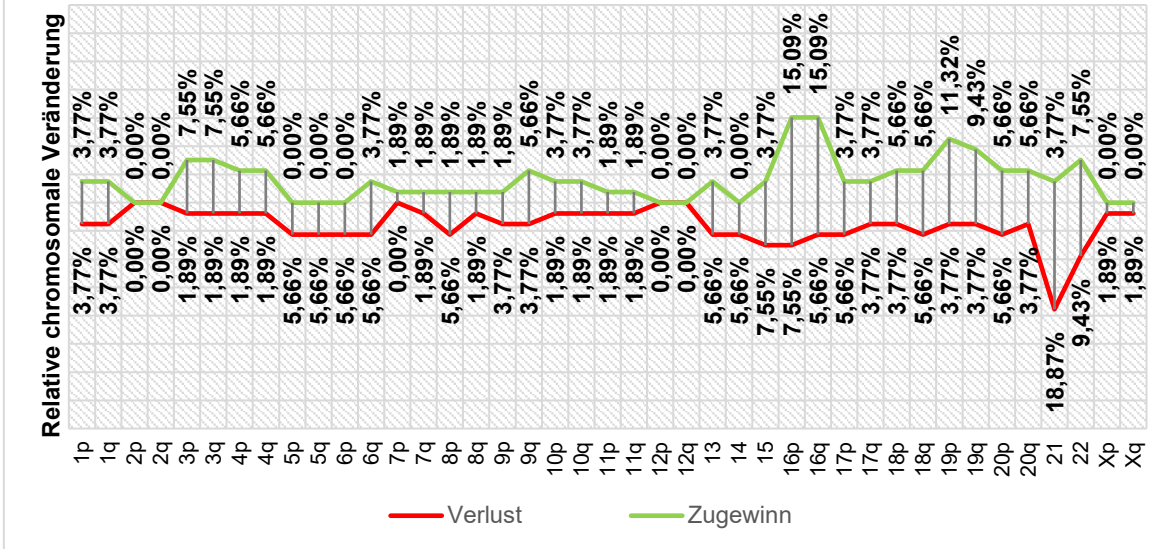


Abbildung 22 – Array-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen - OAT

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wollen wir einen Abriss über Ursachen der Infertilität, der fertilitätseinschränkenden Lifestyle-Faktoren, der Bedeutung der Genetik in der Reproduktionsmedizin sowie über mögliche genetische Analysen im Rahmen eines Präimplantationsscreenings geben.

Als Forschungsfrage interessierte uns, ob sich eine Häufung an unbalancierten Chromosomenaberrationen mittels a-CGH-Verfahren in den Polkörperbiopsien unseres Patientinnenkollektivs an subfertilen Paaren wie bereits in der Literatur (66) beschrieben feststellen lässt. Zudem wollten wir erfahren, ob diese Chromosomenaberrationen mit klinischen Werten in Verbindung zu bringen sind.

Da nahezu die Hälfte aller, durch IVF-Therapie gewonnenen, Embryonen eine Aneuploidie aufweisen (41), ist diese Erhebung für Kinderwunsch-Paare zur möglicherweise zukünftigen Verbesserung der Schwangerschafts- und Lebendgeburtenrate von Relevanz.

4.1 Einfluss von epidemiologischen und Lifestyle-Faktoren auf chromosomale Veränderungen

Es wurden an 73 Patientinnen 129 Polkörperuntersuchungen in Auftrag gegeben bzw. in Summe 480 a-CGH-Untersuchungen dieser Polkörper durchgeführt.

In **Abbildung 4** ist die absolute Altersverteilung unseres Patientinnenkollektivs bei Vorstellung zur Polkörperentnahme (n=129) aufgelistet. Diese Altersstruktur ist vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Kollektiven (44, 66), bei denen ebenfalls eine Abklärung der Polkörper mittels a-CGH-Verfahren durchgeführt wurde.

Vergleicht man die BMI-Verteilung unserer Patientinnen (siehe **Abbildung 5**) mit der BMI-Verteilung von 30 bis 45-jährigen Frauen durch die Statistik Austria bei der Gesundheitsbefragung 2014 (67) so fällt auf, dass unser Patientinnenkollektiv einen niedrigeren BMI als die Normalbevölkerung aufweist. So weisen in der

Gesundheitsbefragung 2014 der Statistik Austria 4.8% der Frauen zwischen 30-45 Jahren Untergewicht auf (vgl. zu 4.7% in unserem Kollektiv), 65% Normalgewicht (vgl. zu 74% in unserem Kollektiv), 21.1% Präadipositas (vgl. zu 14.2% in unserem Kollektiv) bzw. 9.1% einen BMI $>30\text{kg/m}^2$ (vgl. zu 7.1% in unserem Kollektiv) (67).

Vergleicht man den Nikotinabusus unseres Patientinnenkollektivs (siehe **Abbildung 6**) mit den 30 bis 45-jährigen Frauen der Gesundheitsbefragung „Aktueller Raucherstatus 2014“ der Statistik Austria (68), so sind nur 11.63% unserer Patientinnen im Vergleich zu 39.9% im Vergleichskollektiv Raucherinnen.

Es ist davon auszugehen, dass die mit dem Rauchen (3) als auch die mit Übergewicht (3, 4, 19) einhergehenden negativen Auswirkungen auf die Fertilität unsere Patientinnen, dazu veranlassen, einen gesunden Lebensstil anzustreben.

Eine Oligoasthenoteratozoospermie ist mit 17.6% (siehe **Abbildung 7**) in unserem PatientInnenkollektiv deutlich häufiger festzustellen, als wie von Owolabi et al. (69), bei infertilen Kinderwunsch-Paaren mit 2.1% beschrieben. Dies ist unserer Meinung nach darauf zurückzuführen, dass eine schwere männliche Infertilität eine Indikation für die Durchführung eines Präimplantationsscreenings darstellt (43).

Verpoest et al. (66) haben im Rahmen der ESTEEM-Multicenter-Studie in einem Patientinnenkollektiv von 36-40 jährigen Frauen (38.6 ± 1.4 Jahre, $N=205$) an 1023 Oozyten eine Polkörperbiopsie und ein Aneuploidie-Screening mittels a-CGH-Verfahren durchgeführt. 242 Oozyten (24%) waren euploid, 525 Oozyten (51%) waren aneuploid, 44 Oozyten (4%) waren euploid kompensiert, für 84 Oozyten (8%) konnte nur ein unschlüssiges Ergebnis gewonnen werden und bei 128 Oozyten (13%) war keine Auswertung möglich (66).

Geraedts et al. (70) haben in einem PatientInnenkollektiv von 41 Kinderwunsch-Paaren, bei denen eine ICSI durchgeführt wurde, die Polkörper von 226 Oozyten mittels a-CGH-Verfahren ausgewertet. Die a-CGH-Ergebnisse von beiden Polkörpern konnten in 195 Oozyten gewonnen werden. Dabei waren 55 (28%) Oozyten euploid und 140 (72%) Oozyten aneuploid (70).

Die Polkörperverteilungen in unserem Patientinnenkollektiv (siehe **Abbildung 8**), die Polkörperverteilung der Nichtraucherinnen unseres Kollektivs (siehe **Abbildung 13**), die Polkörperverteilung der Raucherinnen unseres Kollektivs (siehe **Abbildung 15**), die Polkörperverteilung der Paare ohne OAT unseres Kollektivs (siehe

Abbildung 19), sowie die Polkörperverteilung der Paare mit OAT unseres Kollektivs (siehe **Abbildung 21**) sind mit denen von Verpoest et al. (66) bzw. Geraedts et al. (70) vergleichbar. Auffallend ist eine erhöhte Anzahl an unbalancierten Polkörpern bzw. eine reduzierte Anzahl an balancierten Polkörpern bei den Raucherinnen (n=34) unseres Kollektivs (siehe **Abbildung 15**). Die geringe Fallzahl sowie die möglicherweise mit dem Rauchen einhergehende Anfälligkeit für Chromosomenaberrationen könnten hierfür verantwortlich sein.

In unserem Kollektiv wurde die Auswertung der Polkörper im „Polkörper-Pool“ (gemeinsame Untersuchung der Polkörper 1 & 2) angestrebt. Dies hat, wie von Feichtinger et al. (57) beschrieben, den Vorteil geringerer Analysekosten ohne einen signifikanten Verlust an Sensitivität. So wurden 87.92% (422) unserer 480 a-CGH-Untersuchungen an einem „Polkörper-Pool“ durchgeführt (siehe **Abbildung 10**). Bei Kinderwunschpaaren mit balancierten Translokationen wurden die a-CGH-Untersuchungen an Polkörper-Paaren (getrennte Untersuchung der Polkörper 1 & 2) durchgeführt. In unserem Kollektiv entfielen 6.25% (30) der a-CGH-Untersuchungen auf Polkörper-Paare.

In **Abbildung 12** ist die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen (n=295) bzw. in **Abbildung 14** ist die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei den Nichtraucherinnen in unserem Kollektiv (n=270) ersichtlich. Am häufigsten sind in beiden Gruppen unbalancierte Zugewinne an den Chromosomen 9, 16, 19, 22 bzw. Verluste an den Chromosomen 4, 13-16, 18, 21. Unsere Ergebnisse decken sich mit den in der Literatur (57) am häufigsten beschriebenen chromosomalen Aberrationen in aneuploiden Oozyten.

Betrachtet man **Abbildung 20**, in welcher die a-CGH-Auswertung der unbalancierten Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen bei den Patientinnen ohne OAT-Samen in unserem Kollektiv (n=239) dargestellt ist, so decken sich die chromosomalen Veränderungen nahezu mit denen von **Abbildung 12** bzw. **Abbildung 14**. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund wesentlich kleinerer Fallzahlen die **Abbildung 16** (a-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen der Raucherinnen, n=25)

sowie die **Abbildung 22** (a-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen der OAT-Paare, n=53) ein abweichendes Bild zeigen. Bei der a-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen der Raucherinnen sind an den Chromosomen 1,4,7,14-16,19-20 Zugewinne bzw. an den Chromosomen 1, 3-4, 9, 13-15, 18-19, 21 Verluste aufgetreten. Bei der a-CGH-Auswertung unbalancierter Polkörper mit einzelnen Chromosomenveränderungen der OAT-Paare sind in den Chromosomen 3-4, 9, 16, 18-20, 22 Zugewinne bzw. in den Chromosomen 5-6, 8, 13-18, 20-22 Verluste feststellbar.

In **Abbildung 17** ist die Polkörperverteilung nach BMI in unserem Patientinnenkollektiv (n=476) dargestellt. Auffallend ist hierbei, dass in der Gruppe der untergewichtigen Frauen (BMI <18.49) die Anzahl der balancierten Polkörper mit 8.7% am geringsten ist. In der Gruppe der Normalgewichtigen (BMI 18.5-24.99), der Gruppe mit Präadipositas (BMI 25-29.99) bzw. der Gruppe mit Adipositas Grad 1 (BMI 30-34.99) verhält sich die relative Anzahl an balancierten Polkörpern mit 21.49%, 16.07% und 20% recht ähnlich. Bei Patientinnen mit einem BMI zwischen 35-39.99 kg/m² (Adipositas Grad 2) zeigt sich eine mit 28.57% tendenziell höhere Menge an balancierten Polkörpern. Auch in der Literatur (71, 72) sind bereits höhere Zahlen an euploiden Fehlgeburten bei Frauen mit einem BMI >25 kg/m² beschrieben.

In **Abbildung 18** wird die Polkörperverteilung nach Alter in unserem Patientinnenkollektiv (n=480) dargestellt. Wie bereits in der Literatur (3, 71, 72) beschrieben, zeigt sich auch in unserem Patientenkollektiv eine mit zunehmendem maternalen Alter abnehmende Menge an balancierten Polkörpern bzw. Oozyten.

4.2 Präimplantationsdiagnostik – der richtige Weg?

Seit der kommerziellen Einführung des Präimplantationsscreenings vor etwa 20 Jahren besteht ein lebhafter Diskurs über die Sinnhaftigkeit des PGT-A (ehemals PGS) zwischen BefürworterInnen und KritikerInnen (49).

In einer 2018 publizierten Studie von Neal et al. (73) proklamierten diese, dass bei Kinderwunsch-Paaren mit mehr als einem durch IVF-Behandlung gewonnenen Embryo die Kombination aus IVF/Aneuploidie-Screening kosteneffizienter zu einer Lebendgeburt führe als eine alleinige IVF (73). Robins JC et McQueen DB (74) führten einige Bedenken an dieser Studie an - u.a. seien ihrer Meinung nach in der Berechnung die genetischen Analysekosten zu gering angegeben bzw. sei in dem Berechnungsmodell bei jeder Frau, welche eine Fehlgeburt erleide, entgegen der klinischen Praxis eine Abort-Curettage einberechnet worden (74).

In der 2018 publizierten ESTEEM-Multicenterstudie von Verpoest et al. (66) konnte keine signifikante Verbesserung der Lebendgeburtenrate durch ein Aneuploidie-Screening (Polkörper untersucht mittels a-CGH-Verfahren) bei Frauen mit fortgeschrittenem Alter und Konzeption mittels intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) festgestellt werden. Jedoch ist eine signifikante Reduktion an Aborten bzw. gesetzten medizinischen Interventionen, wie etwa eine geringere Anzahl an Embryo-Kryokonservierungen, Embryotransfers bzw. doppelter Embryotransfers, ersichtlich (66).

Auch in der 2019 publizierten STAR-Multicenterstudie von Munné et al. (75) konnte keine Verbesserung der Lebendgeburtenrate durch ein Aneuploidie-Screening (Trophektodermibiopsie analysiert mittels NGS-Verfahren [Veriseq PGS]) im Vergleich zur morphologischen Embryonenauswahl festgestellt werden bei Frauen im Alter zwischen 25 und 40 Jahren. In der Post-hoc-Analyse der Subgruppe der 35-40-jährigen Frauen, zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Lebendgeburtenrate unter Zuhilfenahme des Aneuploidie-Screenings pro Embryotransfer (75). In einer von Orvieto et Gleicher durchgeführten Re-Analyse (48) der STAR-Multicenterstudie in der Subgruppe der 35-40-jährigen Frauen konnte keine signifikante Verbesserung der Lebendgeburtenrate durch sie festgestellt werden (48). Die Re-Analyse erfolgte aufgrund statistischer Fehler in der Arbeit von Munné et al. (75).

Aufbauend auf die Daten der ESTEEM-Multicenterstudie haben Neumann et al. eine Kostenanalyse zur Aneuploidie-Untersuchung von Eizellen mittels Polkörperbiopsie und a-CGH-Verfahren im Kontext der assistierten Reproduktion in Deutschland (76) als auch eine allgemeine Kostenanalyse der Polkörperbiopsie mit in Folge a-CGH-Untersuchung (77) veröffentlicht. In beiden Arbeiten konnte gezeigt

werden, dass ein generelles Aneuploidie-Screening an Polkörpern mittels a-CGH-Untersuchung bei fortgeschrittenem mütterlichem Alter mit hohen Kosten einhergehen würde und somit im Routinebetrieb nicht zu empfehlen ist (76, 77).

Zudem spricht es gegen das PGT-A, dass weltweit bereits von ca. 200 Lebendgeburten, bei denen die Embryonen mittels des PGT-A als abnormal-aneuploid oder mosaikartig klassifiziert wurden, berichtet wurde. Von einer höheren Zahl an Lebendgeburten nach erfolgtem auffälligem PGT-A wird ausgegangen (51).

4.3 Limitationen

Als Limitation unserer Studie bzw. der Untersuchung der Polkörper an sich ist zu nennen, dass mit der Polkörperbiopsie paternale meiotische Fehler ebenso wie postmeiotische chromosomale Anomalien nicht feststellbar sind (47).

Weiters erfolgte in unserer Studie lediglich die Auswertung unbalancierter Chromosomenaberrationen bezogen auf spezifische Chromosomen bei Polkörpern mit einzelnen Chromosomenveränderungen. Polkörper mit multiplen Chromosomenveränderungen wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Zudem ist zu nennen, dass auch ein unauffälliges a-CGH-Ergebnis beider Polkörper einer Oozyte nicht eine euploide Oozyte garantiert. So beschreibt Geraedts et al. (70) eine Diskordanzrate des a-CGH-Ergebnisses beider Polkörper bzw. der Zygote von 6% (70).

4.4 Conclusio

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Polkörperverteilung bzw. die Verteilung der chromosomalen Aberrationen unseres Kollektivs in der aCGH-Auswertung vergleichbar zu den in der Literatur bereits veröffentlichten Daten sind. Am häufigsten sind in unserem Kollektiv unbalancierte Zugewinne an den Chromosomen 9, 16, 19, 22 bzw. Verluste an den Chromosomen 4, 13-16, 18, 21 festgestellt worden. Auffallend ist, dass Patientinnen mit einem BMI > 35 kg/m² tendenziell eine höhere Anzahl an balancierten Polkörpern aufweisen bzw. mit

zunehmendem maternalen Alter eine Abnahme der balancierten Polkörper einhergeht.

Betrachtet man die in der Literatur veröffentlichten Daten, so kann eine weitere routinemäßige Anwendung des PGT-A zur Verbesserung des IVF-Outcomes derzeit nicht empfohlen werden (48, 49).

Ob mittels Präimplantationsscreening das IVF-Outcome in Zukunft verbessert werden kann, bleibt abzuwarten.

5 Literaturverzeichnis

1. Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update*. 2007;13(3):209-23.
2. Vander Borght M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018;62:2-10.
3. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:66.
4. Silvestris E, Lovero D, Palmirotta R. Nutrition and Female Fertility: An Interdependent Correlation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:346.
5. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*. 2017;108(3):393-406.
6. Mutsaerts MA, Groen H, Huiting HG, Kuchenbecker WK, Sauer PJ, Land JA, et al. The influence of maternal and paternal factors on time to pregnancy--a Dutch population-based birth-cohort study: the GECKO Drenthe study. *Hum Reprod*. 2012;27(2):583-93.
7. Montag M, Toth B, Strowitzki T. [Preimplantation diagnosis--PID: preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56(12):1670-8.
8. Kimberly L, Case A, Cheung AP, Sierra S, AlAsiri S, Carranza-Mamane B, et al. Advanced reproductive age and fertility: no. 269, November 2011. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012;117(1):95-102.
9. Hart RJ. Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol Rev*. 2016;96(3):873-909.
10. Schrijver I. Mutation distribution in expanded screening for cystic fibrosis: making up the balance in a context of ethnic diversity. *Clin Chem*. 2011;57(6):799-801.

11. Franks S. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(7):1035-41.
12. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96(6):659-67.
13. Cariati F, D'Argenio V, Tomaiuolo R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med*. 2019;17(1):267.
14. Optimizing natural fertility: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2017;107(1):52-8.
15. Oniya O, Neves K, Ahmed B, Konje JC. A review of the reproductive consequences of consanguinity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;232:87-96.
16. Gaskins AJ, Chavarro JE. Diet and fertility: a review. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218(4):379-89.
17. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(12):CD007411.
18. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Protein intake and ovulatory infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(2):210.e1-7.
19. Supramaniam PR, Mittal M, McVeigh E, Lim LN. The correlation between raised body mass index and assisted reproductive treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis of the evidence. *Reprod Health*. 2018;15(1):34.
20. Semet M, Paci M, Saïas-Magnan J, Metzler-Guillemain C, Boissier R, Lejeune H, et al. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*. 2017;5(4):640-63.
21. Anderson K, Nisenblat V, Norman R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2010;50(1):8-20.
22. Ricci E, Vigano P, Cipriani S, Somigliana E, Chiaffarino F, Bulfoni A, et al. Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. *Nutr J*. 2017;16(1):37.

23. Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, Menafrà D, Pozza C, Pivonello R, et al. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):3.
24. Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;110(4):611-8.
25. Windham GC, Mitchell P, Anderson M, Lasley BL. Cigarette smoking and effects on hormone function in premenopausal women. *Environ Health Perspect*. 2005;113(10):1285-90.
26. Gormack AA, Peek JC, Derraik JG, Gluckman PD, Young NL, Cutfield WS. Many women undergoing fertility treatment make poor lifestyle choices that may affect treatment outcome. *Hum Reprod*. 2015;30(7):1617-24.
27. Van Heertum K, Rossi B. Alcohol and fertility: how much is too much? *Fertil Res Pract*. 2017;3:10.
28. Mollaioli D, Ciocca G, Limoncin E, Di Sante S, Gravina GL, Carosa E, et al. Lifestyles and sexuality in men and women: the gender perspective in sexual medicine. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):10.
29. Wright TE. Screening, brief intervention, and referral to treatment for opioid and other substance use during infertility treatment. *Fertil Steril*. 2017;108(2):214-21.
30. Chiang C, Mahalingam S, Flaws JA. Environmental Contaminants Affecting Fertility and Somatic Health. *Semin Reprod Med*. 2017;35(3):241-9.
31. Kesari KK, Agarwal A, Henkel R. Radiations and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):118.
32. Kilgallon SJ, Simmons LW. Image content influences men's semen quality. *Biol Lett*. 2005;1(3):253-5.
33. Marci R, Mallozzi M, Di Benedetto L, Schimberni M, Mossa S, Soave I, et al. Radiations and female fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):112.
34. Mínguez-Alarcón L, Gaskins AJ, Chiu YH, Messerlian C, Williams PL, Ford JB, et al. Type of underwear worn and markers of testicular function among men attending a fertility center. *Hum Reprod*. 2018;33(9):1749-56.
35. Jung A, Schuppe HC. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia*. 2007;39(6):203-15.

36. Garolla A, Torino M, Sartini B, Cosci I, Patassini C, Carraro U, et al. Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2013;28(4):877-85.
37. Shefi S, Tarapore PE, Walsh TJ, Croughan M, Turek PJ. Wet heat exposure: a potentially reversible cause of low semen quality in infertile men. *Int Braz J Urol.* 2007;33(1):50-6; discussion 6-7.
38. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Short RA, Evenson DP. Effect of vaginal lubricants on sperm motility and chromatin integrity: a prospective comparative study. *Fertil Steril.* 2008;89(2):375-9.
39. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990;344(6268):768-70.
40. Niederberger C, Pellicer A, Cohen J, Gardner DK, Palermo GD, O'Neill CL, et al. Forty years of IVF. *Fertil Steril.* 2018;110(2):185-324.e5.
41. Treff NR, Zimmerman RS. Advances in Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disease and Aneuploidy. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2017;18:189-200.
42. Brezina PR, Kutteh WH. Clinical applications of preimplantation genetic testing. *Bmj.* 2015;350:g7611.
43. Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril.* 2010;94(4):1173-7.
44. Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod.* 2011;26(1):41-6.
45. Geraedts J, Sermon K. Preimplantation genetic screening 2.0: the theory. *Mol Hum Reprod.* 2016;22(8):839-44.
46. Gleicher N, Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res.* 2017;10(1):21.

47. Rubio C, Rodrigo L, Mir P, Mateu E, Peinado V, Milan M, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1044-8.
48. Orvieto R, Gleicher N. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A)-finally revealed. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(3):669-72.
49. Mochizuki L, Gleicher N. The PGS/PGT-A controversy in IVF addressed as a formal conflict resolution analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(3):677-87.
50. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(7):823-32.
51. Patrizio P, Shoham G, Shoham Z, Leong M, Barad DH, Gleicher N. Worldwide live births following the transfer of chromosomally "Abnormal" embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(8):1599-607.
52. Munné S, Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*. 2017;107(5):1085-91.
53. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castillón G, Guillén A, Vidal C, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril*. 2017;107(5):1122-9.
54. Magli MC, Pomante A, Cafueri G, Valerio M, Crippa A, Ferraretti AP, et al. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertil Steril*. 2016;105(3):676-83.e5.
55. Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, Poli M, Girardi L, Giancani A, et al. Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril*. 2018;110(5):870-9.e5.
56. Harper JC. Preimplantation genetic screening. *J Med Screen*. 2018;25(1):1-5.
57. Feichtinger M, Stopp T, Göbl C, Feichtinger E, Vaccari E, Mädler U, et al. Increasing live birth rate by preimplantation genetic screening of pooled polar bodies using array comparative genomic hybridization. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128317.

58. Montag M, Koster M, Strowitzki T, Toth B. Polar body biopsy. *Fertil Steril*. 2013;100(3):603-7.
59. Scott RT, Jr., Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*. 2013;100(3):624-30.
60. Gianaroli L, Magli MC, Pomante A, Crivello AM, Cafueri G, Valerio M, et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1692-9.e6.
61. Singh S, Hobeika E, Knochenhauer ES, Traub ML. Pregnancy rates after pre-implantation genetic screening for aneuploidy are only superior when trophectoderm biopsy is performed on hatching embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(4):621-8.
62. Farra C, Choucair F, Awwad J. Non-invasive pre-implantation genetic testing of human embryos: an emerging concept. *Hum Reprod*. 2018;33(12):2162-7.
63. Griffin DK, Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? *Reproduction*. 2018;156(1):F29-f50.
64. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod*. 2011;26(6):1560-74.
65. Normand EA, Alaimo JT, Van den Veyver IB. Exome and genome sequencing in reproductive medicine. *Fertil Steril*. 2018;109(2):213-20.
66. Verpoest W, Staessen C, Bossuyt PM, Goossens V, Altarescu G, Bonduelle M, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial. *Hum Reprod*. 2018;33(9):1767-76.
67. Body-Mass-Index (BMI) nach WHO-Definition 2014 - Gesundheitsbefragung 2014. STATISTIK AUSTRIA; 2015.
68. Aktueller Raucherstatus 2014 - Gesundheitsbefragung 2014. STATISTIK AUSTRIA; 2015.

69. Owolabi AT, Fasubaa OB, Ogunniyi SO. Semen quality of male partners of infertile couples in Ile-Ife, Nigeria. *Niger J Clin Pract.* 2013;16(1):37-40.
70. Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod.* 2011;26(11):3173-80.
71. Kroon B, Harrison K, Martin N, Wong B, Yazdani A. Miscarriage karyotype and its relationship with maternal body mass index, age, and mode of conception. *Fertil Steril.* 2011;95(5):1827-9.
72. Landres IV, Milki AA, Lathi RB. Karyotype of miscarriages in relation to maternal weight. *Hum Reprod.* 2010;25(5):1123-6.
73. Neal SA, Morin SJ, Franasiak JM, Goodman LR, Juneau CR, Forman EJ, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy is cost-effective, shortens treatment time, and reduces the risk of failed embryo transfer and clinical miscarriage. *Fertil Steril.* 2018;110(5):896-904.
74. Robins JC, McQueen DB. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: costly or cost effective? *Fertil Steril.* 2018;110(5):851.
75. Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril.* 2019;112(6):1071-9.e7.
76. Neumann K, Griesinger G. An Economic Analysis of Aneuploidy Screening of Oocytes in Assisted Reproduction in Germany. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2020;80(2):172-8.
77. Neumann K, Sermon K, Bossuyt P, Goossens V, Geraedts J, Traeger-Synodinos J, et al. An economic analysis of preimplantation genetic testing for aneuploidy by polar body biopsy in advanced maternal age. *Bjog.* 2020;127(6):710-8.