

**Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody**

---

Kryokonservierung von Pronukleusstadien an der Universitätsfrauenklinik zu  
Lübeck der Jahre 1998 bis 2010: ein Methodenvergleich

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Julia Klett  
aus Lübeck

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Daniel A. Beyer

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.08.2013**

**zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.08.2013**

**-Promotionskommission der Sektion Medizin-**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Grundlagen der extrakorporalen Befruchtung.....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Die ovarielle Stimulation .....	7
1.1.1.1 GnRH-Agonisten .....	7
1.1.1.2 GnRH-Antagonisten .....	8
1.1.4 Intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI) .....	10
1.1.5 Embryotransfer .....	12
1.1.6 Kryo-Embryotransfer .....	12
<b>1.2 Kryokonservierung .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Einführung.....	14
1.2.2 Schädigungen durch das Einfrieren und Auftauen .....	15
1.2.3 Gefriermethoden .....	17
1.2.3.1 „slow-rate freezing“ .....	17
1.2.3.2 Vitrifikation .....	18
1.2.4 Stellenwert der Vitrifikation .....	20
<b>2. Fragestellung .....</b>	<b>21</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Patientenkollektiv .....</b>	<b>22</b>
3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	23
<b>3.2 Datenerhebung.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Ethikvotum und Anmeldung der Arbeit bei dem U.S.Amerikanischen Gesundheitsamt (U.National Institutes of Health) .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Beschreibung der angewandten Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.4.1 Ovarielle Stimulation .....	26
3.4.2 Follikelpunktion .....	28
3.4.3 Qualitative und quantitative Bestimmung der Ejakulatparameter und Aufbereitung für die Methoden der assistierten Reproduktion nach WHO-Kriterien (World Health Organization - WHO 1999). .....	28
3.4.4 In-vitro-Fertilisation (IVF) und intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI).....	29
3.4.5 Kryokonservierungsverfahren .....	30
3.4.5.1 Slow-rate-freezing .....	30
3.4.5.1 Vitrifikation .....	32
3.4.6 Zusammensetzung der bei der Kryokonservierung in unserem Labor verwendeten Lösungen.....	33
3.4.7 Auftauverfahren .....	35
3.4.7.2 Auftauen von Eizellen im Vorkernstadium nach langsamen Einfrieren.....	35
3.4.7.1 Auftauen von vitrifizierten Eizellen im Vorkernstadium .....	36

3.4.8 Schleimhautaufbau vor Kryotransfer.....	39
3.4.9 Beurteilung der Embryoqualität.....	39
3.4.10 Embryotransfer .....	40
<b>3.5 Berechnung der Implantationsrate und Definition der Schwangerschaft.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6 Statistik.....</b>	<b>42</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1 Demographische Variablen.....	43
4.2 Ursachen der Infertilität.....	44
4.3 Reproduktionsbiologische Variablen I .....	45
4.4 Reproduktionsbiologische Variablen II .....	46
4.5 Transferierte Embryonen im Frisch-ET .....	47
4.6 Zeitlicher Verlauf der beiden Methoden.....	48
4.7 Behandlungskosten.....	51
<b>5. Beantwortung der Fragestellung .....</b>	<b>53</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>7.Zusammenfassung .....</b>	<b>64</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>10.Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>11. Abkürzungen .....</b>	<b>79</b>
<b>12. Anhang .....</b>	<b>81</b>
<b>13. Danksagung .....</b>	<b>87</b>
<b>14. Curriculum vitae .....</b>	<b>88</b>

# 1. Einleitung

In Deutschland sind etwa 1,5 Mio. Paare, d.h. ca. 15-20% der Paare ungewollt kinderlos (Diedrich et al. 2008 ). Dies zeigt, dass die ungewollte Kinderlosigkeit ein großes Problem der heutigen Gesellschaft darstellt. Als ursächlich für diese Problematik werden zum einen vermehrte Umwelteinflüsse wie Schadstoffbelastungen in Luft, Wasser und Nahrungsmitteln, zum anderen eine Änderung der Lebensgewohnheiten mit Verlegung der Familienplanung in ein höheres Lebensalter der Frau mit deutlich eingeschränkten Fertilisierungsraten und einer längeren Einwirkzeit potenzieller Noxen diskutiert (Feichtinger 1991).

Seit der Geburt des ersten Kindes nach In-vitro-Fertilisation (IVF) und Embryotransfer 1978 wurden im Bereich der Reproduktionsmedizin große Fortschritte gemacht. Zunächst war eine Behandlung nur bei tubarer Sterilität möglich. Im weiteren Verlauf konnte der Indikationsbereich der IVF-Behandlung durch die Einführung weiterer Verfahren wie z. B. der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) um die idiopathische, die immunologischen und die männliche Subfertilität erweitert werden (Diedrich et al. 1998).

2010 wurden in Deutschland in 124 Zentren 75.928 Behandlungszyklen dokumentiert. Dabei entstanden in Deutschland bei 50.583 IVF, ICSI und IVF/ICSI Behandlungen 13.318 Schwangerschaften (Deutsches IVF-Register - DIR 2010). Anhand dieser Zahlen wird deutlich, dass die Sterilitätsbehandlung durch die extrakorporale Befruchtung zu einem Routinebehandlungsverfahren geworden ist.

Zu Beginn der Behandlung erfolgt die ovarielle Stimulation mit dem Ziel einer ovariellen Superovulation. Auf diesem Wege entstehen mehrere reife Follikel. Bei der nachfolgenden Follikelpunktion werden so häufig mehr Oozyten gewonnen als später in den Uterus transferiert werden können. Um eine Steigerung der Schwangerschaftsrate pro Follikelpunktion und eine damit verbundene Reduktion der psychischen und physischen Belastung der Patientin sowie eine Kostenreduktion zu erreichen, erfolgt die Lagerung der Eizellen durch Kryokonservierung. Durch die Kryokonservierung besteht auch die Möglichkeit, Eizellen bei einer drohenden ovariellen Überstimulation (OHSS) zu erhalten und

in einem späteren, spontanen oder leicht stimulierten Zyklus zu transferieren. Gleichzeitig kann so auch die Entwicklungsdesynchronisation bei IVF vermieden werden (Diedrich et al. 1998).

Nach den in Deutschland bestehenden Vorgaben durch das Embryonenschutzgesetz (EschG) dürfen nur Eizellen im Vorkernstadium gefriergelagert werden, da diese laut Gesetz nicht als Embryonen gelten (EschG 1991). Vergleichende Studien haben gezeigt, dass die Kryokonservierung im Pronukleusstadium im Vergleich zur Kryokonservierung im Embryonalstadium hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit den optimalen Zeitpunkt darstellt (Horne et al. 1997, Senn et al. 2000).

Als Verfahren zur Kryokonservierung wurde lange Zeit das „slow-rate freezing“ verwendet. Seit einigen Jahren wird auch das Einfrieren durch Vitrifikation vermehrt eingesetzt. Diese ultrarapide Einfrieremethode ermöglicht das kristallisationsfreie Einfrieren biologischen Materials ohne Anwendung programmierbarer Einfriergeräte. Auf diese Weise kann im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden der Kryokonservierung eine deutliche Verringerung des zeitlichen, personellen und apparativen Laboraufwandes erreicht werden. In einer retrospektiven Auswertung reproduktionsbiologischer und klinischer Daten von 245 Patientinnen der Sterilitätssprechstunde der Universitäts-Frauenklinik Lübeck konnte weiterhin eine Überlegenheit der Vitrifikation hinsichtlich der Überlebensrate der 2 PN-Eizellen, eines höheren Embryo-Scores und einer höheren Anzahl idealer Embryonen pro Transfer sowie einer besseren Implantationsrate gezeigt werden (Schultze-Mosgau 2007).

Die folgende Arbeit soll nun die Ergebnisse des Transfers von „frischen“ Embryonen mit denen des Transfers von Embryonen nach Vitrifikation und nach Konservierung mittels „slow-rate freezing“ vergleichen.

## 1.1 Grundlagen der extrakorporalen Befruchtung

### 1.1.1 Die ovarielle Stimulation

Die suffiziente ovarielle Stimulation mit nachfolgender Gewinnung reifer Eizellen stellt die Grundlage für den Behandlungserfolg einer IVF dar (Diedrich et al.1998). Die erste erfolgreiche extrakorporal erzielte Schwangerschaft beim Menschen entstand aus einem im nicht stimulierten Zyklus punktierten Follikel (Stephoe und Edwards 1978). Aufgrund des unsicheren Punctionserfolges sowie den niedrigen Schwangerschaftsraten nach Transfer eines Embryos erfolgt die ovarielle Stimulation heute in Form einer kontrollierten ovariellen Hyperstimulation mit dem Ziel der Gewinnung mehrerer befruchtungsfähiger Eizellen. Derzeit haben sich Analoga des Gonadotropin-releasing Hormons (GnRH) in Kombination mit Gonadotropinen als Standardmedikation der Eierstockstimulation im Rahmen der IVF etabliert (Griesinger 2006). Nach ihrer Wirkungsweise können GnRH-Agonisten von den GnRH-Antagonisten unterschieden werden.

#### 1.1.1.1 GnRH-Agonisten

GnRH-Agonisten sind synthetisch hergestellte Substanzen, die sich häufig nur in einer der 10 Aminosäuren von dem natürlichen GnRH unterscheiden (Burgus et al.1972). Aus dieser Veränderung resultiert eine 100- bis 200-fach erhöhte Rezeptoraffinität, eine verlängerte Halbwertszeit und eine erschwerte Inaktivierbarkeit (Diedrich et al. 1998). Die Behandlung mit den GnRH-Agonisten erfolgt mit dem Ziel der Einstellung eines reversiblen hypogonadotropen Hypogonadismus.

Initial kommt es während der Behandlung zu dem sogenannten Flare-up-effekt, d.h. es werden zunächst nach Rezeptoraktivierung die hypophysären Gonadotropinspeicher entleert. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Down-Regulierung der Rezeptoren sowie zu einer Desensitivierung der Hypophyse (Schmutzler und Diedrich 1990). Durch diese Desensitivierung können ein vorzeitiger spontaner LH Anstieg und die damit einhergehende verminderte Befruchtungsfähigkeit und die verminderte Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft nach Embryotransfer (Loumayer 1990) vermieden werden. In der

Behandlung mit GnRH-Agonisten hat sich Therapie nach dem „langen Protokoll“ durchgesetzt. Im „langen Protokoll“ erfolgt der Einsatz des GnRH-Agonisten in der späten Luteal- oder frühen Follikelphase des Vorzyklus. Nachfolgend kommt es zunächst zu einem Ansteigen der Gonadotropine durch Entleerung der Speicher in der Hypophyse. Nach 2-3 Wochen tritt dann die vollständige Suppression der Hypophyse mit dem erwünschten hypogonadotropen Hypogonadismus und insbesondere mit der Hemmung der LH-Sekretion ein. Diese Suppression hält nach Gabe eines Depotpräparates für die Dauer von 4-6 Wochen. Innerhalb der ersten 3 Tage des Stimulationszyklus wird mit der tgl. intramuskulären Gabe von HMG begonnen. Die Patientin erhält in den ersten 3 Tagen 2 Ampullen HMG (150 IE) an den weiteren 4 Tagen 3 Ampullen HMG täglich. Im weiteren Verlauf wird der HMG-Bedarf dann durch tägliche Follikulometrie und Bestimmung des Serum-Östradiolspiegels individuell bestimmt. Die Ovulationsinduktion mit 10.000 IE. erfolgt, wenn in den Kontrolluntersuchungen eine Follikelgröße von 18-20 mm und ein Serum-Östradiolspiegel von 250-350 pg pro Einzelfollikel vorliegen (Küpker et al. 1998). Die Follikelpunktion wird 36 h nach Gabe des hCG durchgeführt.

#### *1.1.1.2 GnRH-Antagonisten*

Seit 1999 sind zwei GnRH-Antagonisten (Cetrorelix und Ganirelix) für den Einsatz bei der IVF zugelassen. Vorteile beim Einsatz dieser Substanzgruppe liegen in einer deutlichen Verringerung der Gesamtbehandlungsdauer, in der sofortigen Suppression der LH-Sekretion, in einem geringeren Gonadotropinverbrauch und in der geringeren Wahrscheinlichkeit eines schweren Überstimulationssyndroms (Albano et al. 2000). Der unter der Behandlung mit Agonisten auftretende Flare-up- Effekt entsteht bei Gabe von Antagonisten nicht, so dass die Gabe erst im Stimulationszyklus nötig wird. Zunächst erfolgt die Stimulation mit HMG oder rekombinanten FSH. Ab dem 6. Stimulationstag (=7. Zyklustag) wird dann zusätzlich täglich ein GnRH-Antagonist subkutan verabreicht (Felberbaum et al. 1995). Die Ovulationsauslösung mit hCG sowie die Follikelpunktion verlaufen analog dem langen Protokoll bei Agonistengabe.

### **1.1.1 Follikelpunktion**

Die Follikelpunktion erfolgt unter Ultraschallkontrolle transvaginal mit einer Punktionskanüle. Nach einem kurzen Überblick über die Beckenorgane wird die im Bildschirm integrierte Punktionslinie über der Mitte des zu punktierenden Follikels eingestellt. Ist die zu überwindende Gewebsschicht möglichst dünn wird die Nadel in den Follikel vorgeschoben und der Inhalt aspiriert. Die anderen Follikel des Ovars werden nachfolgend, ohne die Nadel zurückzuziehen, ebenfalls aspiriert.

Nach Abschluß der Punktion wird das Aspirat mikroskopisch untersucht, die Oozyten werden isoliert und hinsichtlich ihres Reifegrades beurteilt. Die Oozyten werden dann sofort in Reagenzröhrchen mit Kulturmedium verbracht und im Brutschrank bei 37°C bis zur Insemination gelagert (Küpker et al. 1998).

### **1.1.2 Insemination und In-vitro-Kultivierung**

Die in-vitro-Kultivierung erfolgt nach den allgemeinen Prinzipien der Zellkultivierung. Das Milieu im Reagenzglas muss durch entsprechende Kulturmedien und Bedingungen wie z.B. Druck, Temperatur, Feuchtigkeit, Begasung und pH-Wert die Gegebenheiten in den Tuben imitieren (Diedrich et al. 1998). Für die IVF und die Embryokultivierung stehen folgende Kulturmedien zur Verfügung:

- Ham`s F-10-Medium
- Earles-Medium und
- Menezo-B2-Medium.

Das am häufigsten verwendete Medium ist Ham`s-F10-Medium. Es enthält 15-20% inaktiviertes Nabelschnurserum mit einem pH von 7,2-7,4 (Küpker et al. 1998).

Vor der Insemination erfolgt zunächst die Aufbereitung des Ejakulates. Hierfür stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung: Konzentration, Swim-up, Glaswollfiltration und Mini-swim-up.

Des Weiteren werden die Oozyten hinsichtlich ihres Reifegrades beurteilt. Die unreifen Eizellen werden noch ca. 4-6h vorinkubiert, um eine Nachreifung zu erreichen.

Die reifen Eizellen werden nun mit den Spermatozoen und 1ml Kulturmedium in einem Reagenzröhrchen kultiviert. Nach 15-20h erfolgt die mikroskopische Beurteilung der Eizellen. Es werden zunächst die noch anhaftenden Granulosazellen abpräpariert. Die erfolgreiche Fertilisierung zeigt sich im Vorhandensein eines zusätzlichen männlichen Vorkernes. Wichtig bei der Beurteilung ist auch der Ausschluss von Polyploidien. Diese Zellen sind zu protokollieren und vom Transfer auszuschließen (Diedrich et al. 1998). 3 der imprägnierten Eizellen werden dann in ein frisches Kulturmedium gebracht. Die restlichen imprägnierten Oozyten im Pronukleusstadium werden kryokonserviert und stehen für spätere Embryotransfers zur Verfügung. 40-48h nach der Insemination werden maximal 3 sich jetzt im 4-8-Zellstadium befindende Embryonen in den Uterus transferiert.

#### **1.1.4 Intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI)**

Der Indikationsbereich für die klassische In-vitro-Fertilisation beschränkte sich 1978 zunächst nur auf die tubare Sterilität. Um den Indikationsbereich zu erweitern und besonders auch die schwere männliche Subfertilität mit in den Indikationsspektrum aufzunehmen, wurde die klassische In-vitro-Fertilisation um Verfahren der assistierten Fertilisierung ergänzt. Diese Verfahren sind als mechanische Penetrationshilfen zu verstehen, die es den Spermatozoen ermöglichen, die Barriere der Zona pellucida und der Eizellmembran zu durchbrechen. Dies ist bei schwerer Oligoasthenoteratozoospermie mit spermatogener Dysfunktion auf akrosomaler und/oder Rezeptorebene nicht möglich (Küpker et al. 1994). 1987 berichtete die Arbeitsgruppe von Laws-King erstmals über eine erfolgreiche Fertilisierung nach dem Einbringen eines Spermatozoons in den perivitellinen Spalt (Laws-King et al. 1978). Im darauffolgenden Jahr beschrieb die Gruppe um Gordon das „drilling“ (Anbohren) der Zona pellucida, bevor die Oozyte einer Spermatozoensuspension ausgesetzt wurde (Gordon et al. 1988). Als weitere Fertilisierungstechnik kam auch die

partielle Zonadissektion zum Einsatz. Die erfolgreichste Methode der assistierten Fertilisierung ist jedoch die intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI). 1988 berichteten Lanzendorf et al. erstmals über eine geglückte Fertilisierung mit Pronukleusbildungen nach Injektion eines Spermatozoons in das Zytoplasma einer Eizelle. 1992 konnten Palermo et al dann erste ausgetragene Schwangerschaften nach ICSI vermelden.

Die Methode der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion verläuft wie folgt:

Die ovarielle Stimulation, Ovulationsinduktion und Follikelpunktion verläuft nach dem Protokoll der herkömmlichen IVF. Die Ejakulataufbereitung erfolgt nach dem Percoll-Verfahren oder der Mini-swim-up-Methode n. Al-Hasani (Al-Hasani et al. 1995). Im weiteren Verlauf werden dann die Kumuluszellen enzymatisch und die Corona radiata mechanisch entfernt. Bei der anschließenden Kontrolle des Reifestadiums der Oozyten werden die Oozyten in der Metaphase II für die ICSI selektiert. Die Eizellen werden dann in jeweils einen Tropfen Medium auf eine Petrischale gebracht. 1  $\mu$ l der Spermatozoensuspension mit je 5  $\mu$ l Medium und PVP werden in die Mitte der Petrischale gegeben. Nachfolgend wird die gesamte Schale mit 3,5 ml Paraffinöl überschichtet.

Für die Mikroinjektion wird ein Invertmikroskop mit Phasenkontrastobjektiven, hydraulischen Mikromanipulatoren und Injektoren verwendet. Die Samenzelle wird zunächst mit Hilfe der Spitze der Injektionspipette immobilisiert und dann möglichst flach vom Geißelende her in die Pipette aufgenommen. Die Pipette wird dann innerhalb der Ölschicht zu einem, eine Eizelle enthaltenden, Mediumtropfen geführt. Die Eizelle wird zunächst so gedreht, dass der Polkörper entweder bei 12 oder bei 6 Uhr liegt. Die Oozyte wird dann durch die Haltepipette angesogen und in dieser Stellung fixiert. Nun wird die Injektionspipette, an deren Spitze das Spermium liegt, vorsichtig bei 3 Uhr in das Zytoplasma der Oozyte eingestochen und die Samenzelle injiziert. Sobald der Kopf der Samenzelle die Pipettenspitze verlassen hat wird die Pipette zurückgezogen. Auf diese Weise kann die mit der Samenzelle in das Zytoplasma gebrachte Menge an Medium und PVP möglichst gering gehalten werden.

Nach der Injektion werden die Eizellen in Medium gesetzt und in den Brutschrank gegeben. 18 h später erfolgt dann die mikroskopische Untersuchung auf das Vorhandensein von Vorkernen. 3 der imprägnierten Eizellen werden dann zum späteren Transfer in den Uterus für weitere 24h in den Brutschrank gegeben. Überzählige imprägnierte Eizellen werden sofort kryokonserviert und können dann bei Bedarf zu einem späteren Zeitpunkt transferiert werden (Küpker et al. 1998).

### **1.1.5 Embryotransfer**

Der Embryotransfer erfolgt ca. 40-48h nach der Insemination. Hierbei wird ein Metallkatheter mit Führungsdraht in den Zervikalkanal der in Steinschnittlage liegenden Patientin eingebracht. Nach dem Entfernen des Führungskatheters wird der mit den Embryonen und einer geringen Menge Kulturmedium (20-35µl) beladene Transferkatheter bis in den Fundus uteri vorgeschoben. Die Embryonen und das Medium werden nun in den Uterus transferiert.

Nachfolgend wird mit der medikamentösen Unterstützung der Lutealphase begonnen. Diese Unterstützung kann entweder durch die Substitution von hCG, in einer Dosierung von 5.000 IE am Tage des Transfers, sowie an Tag 2 und 5 nach Transfer oder durch die vaginale Applikation von Progesteron in Form von Vaginalkapseln oder -gel erfolgen (Diedrich et al.1998). Die Substitution von Progesteron wird bei Gefahr einer ovariellen Überstimulation ( $E_2 > 3.000 \text{ pg/ml}$  zum Zeitpunkt der Follikelpunktion) der Behandlung mit hCG vorgezogen (Schill et al. 2000).

### **1.1.6 Kryo-Embryotransfer**

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, den Transfer der zuvor kryokonservierten Embryonen vorzubereiten bzw. durchzuführen.

Zum einen kann der Transfer der Kryo-Embryonen in einem Spontanyklus erfolgen. Voraussetzung hierfür ist ein ovulatorischer und regelmäßiger Zyklus (Weig 2009). Um den Zeitpunkt für den Transfer zu bestimmen, ist eine Kontrolle des Serum-LH notwendig. 2 Tage nach Bestimmung des LH-Peaks werden die Embryonen aufgetaut und transferiert.

Vorteil der Methode ist, dass weitestgehend auf eine Hormonsubstitution und die damit verbundenen Risiken und Kosten verzichtet werden kann. Eine Substitution wird lediglich zur Unterstützung der Lutealphase in Form von vaginal appliziertem Progesteron erforderlich.

Nachteil des Verfahrens ist die zeitliche Ungenauigkeit des Transfers, durch die es zu hohen Abbruchraten kommt (Steck 2001).

Eine weitere Möglichkeit ist der Transfer der Kryoembryonen im stimulierten Zyklus. Hierbei werden, durch Gabe von Clomiphenzitrat oder von Gonadotropinen, die Folikelreifung und die Proliferationsphase des Endometriums stimuliert. 2 Tage nach Ovulationsauslösung mittels hCG werden die aufgetauten Embryonen transferiert. Eine Unterstützung der Lutealphase kann auch bei diesem Verfahren durch Applikation von exogenem Progesteron erfolgen. Nachteile dieses Verfahrens sind analog der Stimulation vor Follikelpunktion in der Gefahr der Überstimulation und in den hohen Behandlungskosten zu sehen.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit des Transfers der Kryoembryonen im artifiziellen Zyklus. Bei diesem, auch in der Universitätsklinik Lübeck routinemäßig durchgeführten, Verfahren erfolgt die Stimulation der Proliferationsphase durch transdermale, ggf. auch orale Applikation von Östradiol. Nach einer sonographischen Kontrolle der Endometriumdicke sowie einer Serumkontrolle von E2, LH und Progesteron am 14. Zyklustag wird mit der Progesterongabe begonnen. Hierdurch wird die Transformation des Endometriums in die Sekretionsphase erreicht, sodass der Transfer der aufgetauten Embryonen 2 Tage später erfolgen kann. Vorteile dieser Methode sind die gute Planbarkeit des Embryotransfers und die erhöhte Schwangerschaftswahrscheinlichkeit im Vergleich zum Transfer in den stimulierten Zyklen (Hoepfner et al. 2000).

## 1.2 Kryokonservierung

### 1.2.1 Einführung

Schon lange besteht ein wissenschaftliches Interesse am Einfrieren lebender Zellen. So gab es bereits 1776 erste Berichte über das Einfrieren und Auftauen von Spermatozoen im Schnee (Al-Hasani und Ozmen 2007). 1866 berichtete Ponchet über einen Volumenverlust bei eingefrorenen Erythrozyten (Luyet u. Rapatz 1970).

Mitte des 20. Jahrhunderts häuften sich dann die Berichte über weitere Kryokonservierungsversuche. Chang konnte in den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts die Entwicklungsfähigkeit zuvor auf 10°C heruntergekühlter Kaninchenembryonen nachweisen, indem er sie nach Erwärmung erfolgreich auf die Empfängertiere übertrug (Chang 1947, 1948). Über die Geburt lebender Mäuse nach vorheriger Kryokonservierung der Embryonen, nachfolgender Lagerung in flüssigem Stickstoff, Auftauen und Transfer konnten Whittingham und Wilmut 1972 berichten (Whittingham et al. 1972; Wilmut 1972). 1973 wurde in England das erste Kalb nach Embryokryokonservierung geboren (Wilmut und Rowsen 1973).

In den folgenden Jahren gelang es über Veränderungen der verwendeten Gefrierschutzmittel, deren Konzentration, der Äquibrillierungszeiten sowie der Einfrier- und Auftauraten die Ergebnisse nach Kryokonservierung zu verbessern. Aufgrund dieser Verbesserungen begann man Ende der 70er Jahre auch mit der Kryokonservierung menschlicher Embryonen. 1983 gelang Trounson und Mohr der erste erfolgreiche Transfer eines zuvor kryokonservierten humanen Achtzellers mit nachfolgender Schwangerschaft. Über erste Geburten nach Kryokonservierung menschlicher Eizellen wurde Mitte der 80er Jahre berichtet (Chen 1986; Al-Hasani et al. 1987).

Die Forschung konzentrierte sich nun auf eine Optimierung der Methode. Um die intrazelluläre Eiskristallbildung zu minimieren, wurden weitere Veränderungen der herkömmlichen Technik erprobt. So berichteten Rall und Fahy 1985 von einer

ultrarapiden Gefriermethode, der Vitrifikation, mit der sie Mäuseembryonen bei Temperaturen von  $-196^{\circ}\text{C}$  konservierten. Die erste Geburt eines lebenden Kalbes nach Vitrifikation von Blastozysten gelang 1992 (Kuwayama et al. 1992).

Seit der ersten Geburt nach vorheriger Vitrifikation humaner Oozyten 1999 (Kuleshova et al. 1999) wird die Vitrifikation im Rahmen der assistierten Reproduktion zunehmend eingesetzt.

### **1.2.2 Schädigungen durch das Einfrieren und Auftauen**

Für die erfolgreiche Kryokonservierung von Bedeutung sind die Einfrier- und Auftaugeschwindigkeiten, die Wahl und die Konzentration des Kryoprotektivums, die Serumzusätze und die Umsetztemperatur in flüssigen Stickstoff (Ludwig et al. 1998).

Im Rahmen der Kryokonservierung sind die Kristallisationsvorgänge von besonderer Bedeutung. Durch die Bildung intrazellulärer Eiskristalle kann die Zelle zerstört werden („lethal intracellular ice formation“). Eine intrazelluläre Kristallisation ist ausgeschlossen, wenn die Zelle ca. 90% ihres Zellwassers abgegeben hat, da die restlichen 10% des Wassers an Proteine und Salze gebunden sind und aus diesem Grunde nicht kristallisieren können. Die Voraussetzung für eine vollständige Entwässerung der Zelle ist ausreichend Zeit (Mazur 1963). Bei unzureichender Dehydrierung aufgrund hoher Einfriereschwindigkeiten kommt es zur Bildung von kleinen Kristallen (Van Verooij et al. 1975). Diese kleinen Kristalle haben bei langsamen Auftaugeschwindigkeiten aufgrund einer sehr hohen Oberflächenenergie das Bestreben, ihre Oberfläche zu verkleinern und sich zusammenzulagern (Mazur 1970). Bei dieser Rekristallisation kommt es zum Zerreißen der intrazellulären Membranen mit dem konsekutiven Absterben der Zelle.

Durch sehr langsame Einfriereschwindigkeiten und dem damit verbundenen langen Aufenthalt der Zelle in einem stark hypertonen Milieu kann es durch Ausfällen der intrazellulären Salze, einer Zusammenlagerung von Makromolekülen, einer pH-Änderung und einem osmotischen Schock zu einer

Zerstörung der Zelle kommen (Mazur 1970). Auch die Schrumpfung der Zelle und die damit verbundenen Brüche der Zellmembran können zu einer Schädigung führen (Meryman 1956). Werden die Lipide und Lipoproteine der Zellmembran zerstört, können Kationen in die Zelle eindringen und im Rahmen des Auftauvorganges kann mehr Wasser in die hypertone Zelle eindringen, sodass sie anschwillt und platzt (Lovelock 1953).

Eine weitere Gefahr der Zellschädigung besteht im „supercooling“, d.h. durch die Unterkühlung des Mediums. Hierzu kann es kommen, wenn die Kristallisation erst unter dem Gefrierpunkt d.h. bei Temperaturen  $< 12^{\circ}\text{C}$ , einsetzt. Hier kann zunächst durch die frei werdende Kristallisationswärme ein Ansteigen der Temperatur auf Bereiche um den Gefrierpunkt resultieren. Nachfolgend fällt sie dann jedoch mit wesentlich höherer Geschwindigkeit wieder auf die Umgebungstemperatur ab. Dieser schnelle Temperaturwechsel ist für eine verminderte Überlebensrate der Zellen verantwortlich (Whittingham 1977a).

Um die Schäden durch das „supercooling“ zu vermindern, wurde die Technik des „seeding“ entwickelt. Als „seeding“ wird die Kristallisationsauslösung bei Temperaturen kurz unterhalb des Gefrierpunktes bezeichnet. Diese Kristallisationsinduktion kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen.

Es kann ein Kristallisationskeim z.B. in Form eines Stückchen Trockeneis zugesetzt werden (Leibo et al. 1974; Leibo und Mazur 1978; Whittingham 1976).

Die Kristallisation kann durch das Berühren mit einer vorgekühlten Pinzette (Ali Mansoori 1975; Willadsen 1980) oder durch einen programmierten Kältestoß induziert werden (Ludwig et al. 1998).

Eine Methode, die das Selbstseeding auch im gesteuerten offenen System ermöglicht wurde 1981 in Erlangen entwickelt (Al-Hasani et al. 1983). Hierbei wurden mit einer Geißel versehene Plastikröhrchen als Gefriergutbehälter („Erlanger Straws“) verwendet. Beim Einfrieren ragt so zunächst nur die Geißel in den Gefrierbehälter. Bei Temperaturen um  $-20^{\circ}\text{C}$  bilden sich an der Geißelspitze durch „supercooling“ Eiskristalle, die mit weiterem Absenken des Straws an der Geißel entlang nach oben wachsen und, sobald der Straw den Gefrierpunkt erreicht, dort die Kristallisation auslösen.

Eine weitere Gefährdung der Zelle geht von dem verwendeten Kryoprotektivum und dessen Konzentration aus. Man unterscheidet penetrierende und nicht penetrierende Kryoprotektiva.

Die nicht penetrierenden Kryoprotektiva (u.a. Polyvidon) führen auf osmotischem Weg zu einer Dehydrierung der Zelle und zu einer verminderten Elektrolytkonzentration der umgebenden Flüssigkeit ( McGann 1978).

Die Gruppe der penetrierenden Kryoprotektiva, zu denen u.a. auch das Glycerin und das Dimethylsulfoxid gehören, senken den Gefrierpunkt und ermöglichen dadurch eine längere Dehydrierungsphase. Kritisch bei der Anwendung ist die Konzentration des Gefrierschutzmittels, da sowohl DMSO als auch Glycerin zur Störung der Na/K-ATPase führen können (Barnett 1978). Ethylenglykol Lösungen kommen heute aufgrund ihrer geringeren Toxizität und ihrer verbesserten Permeabilität vermehrt zum Einsatz (Kasai und Mukaida 2004).

### **1.2.3 Gefriermethoden**

Derzeit stehen 2 Methoden der Kryokonservierung routinemäßig zur Verfügung: das „slow-rate freezing“ und die Vitrifikation. Beide Methoden werden im Folgenden näher erläutert.

#### *1.2.3.1 „slow-rate freezing“*

Das „slow-rate freezing“ ist die zzt. am häufigsten angewendete Gefriermethode. Hierbei wird das einzufrierende Material zunächst in einer Reihe von Medien dehydriert, um eine intrazelluläre Kristallisation zu verhindern. Diese Medien enthalten Kryoprotektiva in aufsteigender Konzentration von bis zu maximal 10%, um den toxischen Einfluss auf die Zellen möglichst gering zu halten. Als Kryoprotektivum kommen überwiegend Propandiol oder Dimethylsulfoxid zum Einsatz. Durch den Zusatz von Makromolekülen wie z.B. Saccharose kann die Dehydrierung der Zellen zusätzlich gesteigert und die Konzentration des Kryoprotektivums gering gehalten werden.

Der Gefriervorgang erfolgt mit Hilfe eines speziellen, computergesteuerten Gefriersystems (z.B. CTE-Einfriergerät „offenes System“ der Fa. Cryotechnik

Erlangen). Hierdurch wird das Material schrittweise mit Kühlraten von 0,1°C/Minute bis 1°C/Minute auf Temperaturen zwischen -30°C bis -40°C heruntergekühlt und dann durch Überführen in flüssigen Stickstoff auf eine Lagerungstemperatur von -140°C bis -196°C gebracht.

### 1.2.3.2 *Vitrifikation*

Die Vitrifikation ist eine ultraschnelle Gefriermethode, bei der die Zellen direkt vom flüssigen in einen amorphen, glasförmigen (=vitriösen) Zustand übergehen. Diese Technik wurde entwickelt, um die zellschädigende intrazelluläre Eiskristallbildung zu vermeiden. Um dies zu erreichen, sind folgende Faktoren von entscheidender Bedeutung:

- a.) die Erhöhung der Einfriereschwindigkeit
- b.) die Erhöhung der Konzentration des Kryoprotektivums und die Dehydrierung der Zelle
- c.) die Steigerung der Viskosität der Vitrifikationslösung
- d.) die Erwärmungsgeschwindigkeit

Physikalisch kommt es zu einer extremen Zunahme der Viskosität der Vitrifikationslösung während des Herunterkühlens (Fahy et al. 1984).

Um möglichst hohe Kühlraten zu erreichen, werden die Zellen direkt in flüssigen Stickstoff (LN<sub>2</sub>) getaucht. Auf diese Weise können sie mit Kühlraten von mehr als 20.000°C/Minute auf eine Temperatur von -196°C heruntergekühlt werden. Beim Eintauchen der Zellen in den Stickstoff kommt es durch Erwärmung des LN<sub>2</sub> zum Verdampfen des Stickstoffs, der sich dann wie eine Isolierschicht um die Zelle legt und die Kühlrate verlangsamt. Um diesem Effekt entgegen zu wirken und die Kühlrate zu erhöhen, werden nur sehr kleine Probengrößen verwendet. Diese kleinen Volumina können nur durch den Einsatz spezieller Trägersysteme gewährleistet werden. Die von Vajta eingeführten, sehr dünnen Glaspipetten, die sogenannten „open pulled straws“ (OPS) werden am häufigsten eingesetzt (Vajta et al. 1998). Weiterhin Verwendung finden aber auch das Kryotop (Kuwayama

2001), das Hemi-Straw-System (Van der Vorst et al. 2001) und das Cryoloop (Lane et al. 1999).

Durch die Erhöhung der Konzentration eines permeablen Kryoprotektivum wird nahezu das gesamte intrazelluläre Wasser ersetzt. Verwendet wird hierbei bevorzugt Ethylenglykol (EG), da es eine geringe Toxizität auf Mäuseembryonen und Blastozysten sowie eine hohe Diffusionsrate durch die Zona pelucida und die Zellmembran zeigt (Emiliani et al. 2000). Dimethylsulfoxid (DMSO) kommt jedoch ebenfalls zum Einsatz. Um die toxische Wirkung des Kryoprotektivums möglichst gering zu halten, erfolgt zunächst die Äquibrilierung in der Äquibrilierungslösung (ES), die nur 10-15% des Kryoprotektivums enthält. Danach erfolgt die Überführung der Zellen in die 30-40% Kryoprotektivum enthaltende Vitrifikationslösung (VS). Hier verbleiben die Zellen nur wenige Sekunden, um dann in den Stickstoff getaucht zu werden. Der Vitrifikationslösung werden nicht permeable Substanzen mit hohem Molekulargewicht zugefügt (z.B. Disaccharide wie Saccharose). Durch diese Substanzen wird die Dehydrierung der Zelle verstärkt und eine kürzere Exposition der Zelle gegenüber dem toxischen Kryoprotektivum ermöglicht.

Die Viskosität der Vitrifikationslösung steigt zum einen mit deren Konzentration zum anderen durch den rapiden Kühlprozess. Durch Zusatz von Makromolekülen wie z.B. Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyethylenglykol (PEG) oder Ficoll kann die Viskosität der Lösung weiter gesteigert und dadurch die Menge des erforderlichen Kryoprotektivums reduziert werden (Shaw et al. 1997).

Beim Erwärmungsprozess ist die Geschwindigkeit ebenso wie beim Einfrieren von entscheidender Bedeutung. Um eine Rekristallisation während des Auftauvorganges zu vermeiden, muss ein schnelles Einfriermanöver auch ein schnelles Auftauen nach sich ziehen (Ludwig et al. 1998). Die vitrifizierten Zellen werden, um eine möglichst schnelle Erwärmung zu erreichen, direkt in die zuvor erwärmte Auftaulösung getaucht und zur Rehydrierung dann in eine weitere erwärmte Auftaulösung überführt.

#### **1.2.4 Stellenwert der Vitrifikation**

Das Verfahren der Vitrifikation stellt im Vergleich zu der herkömmlichen Slow-cooling-Kryokonservierung noch kein weltweit etabliertes Verfahren dar. Die Vitrifikation scheint jedoch für kryobiologisch problematisch einzufrierende Zellen (Oozyten, Zygoten, Blastozysten, Embryonen) im Vergleich zu der etablierten Methode der langsamen Kryokonservierung bezüglich der Überlebensraten und der nachfolgenden Entwicklung von Vorteil zu sein (Schultze-Mosagau 2007; Nawroth et al. 2005). Die bei der langsamen Kryokonservierung entstehenden Schädigungen durch Eisbildung können im Rahmen der Vitrifikation ausgeschlossen werden, da das Festwerden der Flüssigkeit durch eine Erhöhung der Viskosität erreicht wird. Die Vitrifikation bietet im Vergleich zu der mit einem hohen apparativen, personellen und zeitlichen Aufwand verbundenen langsamen Kryokonservierung die Möglichkeit einer enormen Zeit- und Kostenersparnis.

## 2. Fragestellung

Nach wie vor gilt die Methode des „slow-rate freezing“ als Goldstandard in der Kryokonservierung von Pronukleuseizellen. Die Methode der Vitrifikation wird nunmehr seit 6 Jahren bei in der Universitätsfrauenklinik Lübeck routinemäßig eingesetzt. Ziel der vorliegenden Arbeiten war es, die Ergebnisse der letzten 6 Jahre zu analysieren und mit denen des „slow-rate freezing“ sowie mit denen nach Frischtransfer zu vergleichen.

Hierzu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1. Welche Rückschlüsse, bezogen auf die Praktikabilität und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, liefert der Methodenvergleich?**
- 2. Unterscheiden sich die Überlebensraten der Pronukleus Eizellen nach Vitrifikation von denen nach Slow-rate-Freezing ?**
- 3. Läßt sich eine Abhängigkeit der Überlebensrate der Embryonen von Cofaktoren, wie dem Alter der Patientin, dem Gewicht der Patientin oder der Spermienqualität ableiten?**
- 4. Finden sich signifikante Unterschiede bezogen auf die Schwangerschaftsrate und die Implantationsrate im Methodenvergleich?**
- 5. Läßt sich aus den Ergebnissen der zukünftige Stellenwert für die Kryokonservierung und die Vitrifikation im Vergleich zum Frischtransfer ableiten?**

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Auswertung demographischer, reproduktionsbiologischer und klinischer Daten von Patientinnen, die sich in dem Zeitraum vom 01.01.1998 bis zum 31.12.2010 in der Sterilitätssprechstunde der Frauenklinik Lübeck in Behandlung befanden. Primäres Ziel der Arbeit war der Vergleich der Überlebens- und Schwangerschraten nach Auftauvorgang zwischen Vitrifikation und Slow rate freezing. Sekundäres Ziel war der Vergleich dieser Raten nach Kryokonservierung vs. Frischtransfer.

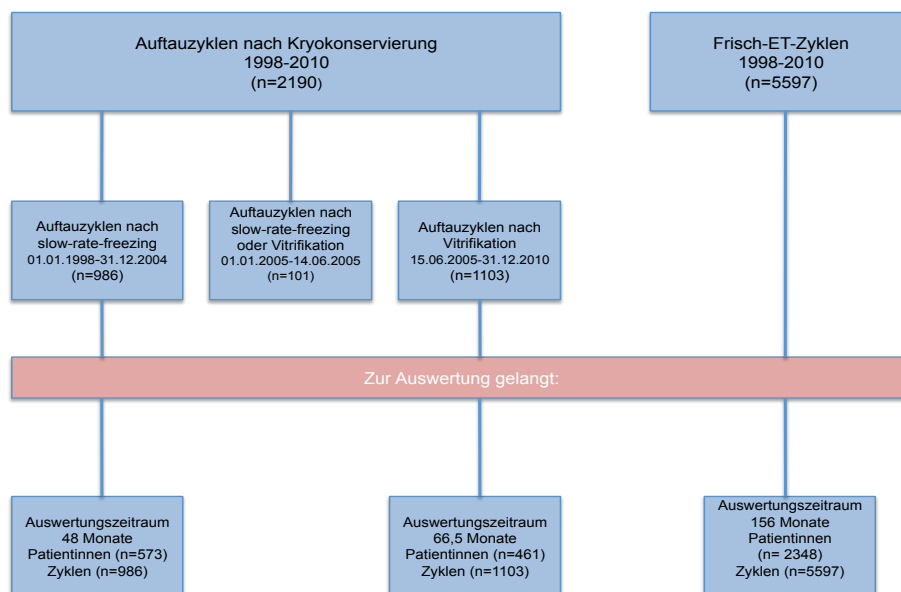


Abbildung 1: Patientenkollektiv

### 3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien waren für alle Patientinnen die Indikation zu einer kontrollierten ovariellen Hyperstimulation (COH) mit nachfolgender IVF oder ICSI. In der Frisch-transfergruppe wurde der Transfer von bis zu 3 Embryonen im gleichen Zyklus durchgeführt. In den beiden Kryokonservierungsgruppen erfolgte zunächst das Auftauen der zuvor mittels „slow-rate freezing“ oder Vitrifikation kryokonservierten, überzähligen 2 PN-Oozyten. Nachfolgend wurden die Embryonen transferiert. Die Follikelpunktion und der Embryotransfer fanden im Zeitraum zwischen dem 01.01.1998 und dem 31.12.2010 statt (Abbildung 1).

Nicht berücksichtigt wurden in der Arbeit die Patientinnen, bei denen der Kryokonservierung bzw. dem Frischtransfer spezielle Behandlungsverfahren wie z.B. eine Polkörperdiagnostik (PKD) oder eine in-vitro-Maturation (IVM) vorausgingen. Des Weiteren wurden die Daten von Patientinnen, deren 2PN in dem Beobachtungszeitraum nicht aufgetaut wurden von der Auswertung ausgenommen (Tabelle 1).

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>-Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation</li><li>-Follikelpunktion ab dem 01.01.1998 und bis einschl. dem 31.12.2010</li><li>-IVF, ICSI, IVF und ICSI</li><li>-Frischtransfer</li><li>-Auftau nach „slow-rate freezing“</li><li>-Auftau nach Vitrifikation</li></ul>
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"><li>-Polkörperdiagnostik</li><li>-in-vitro-Maturation</li><li>-Auftau nach dem 31.12.2004 („slow-rate freezing“)</li><li>-Auftau nach dem 31.12.2010 (Vitrifikation)</li></ul>

**Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien**

### **3.2 Datenerhebung**

Die Datenerhebung erfolgte mittels der in der Lübecker Frauenklinik verwendeten elektronischen Datenbank „RecDate®“. In diesem Programm sind die Daten der in der Sterilitätssprechstunde behandelten Patientinnen dokumentiert. Es besteht die Möglichkeit, die Datenbank mit Hilfe mathematischer oder logischer Operatoren hinsichtlich bestimmter Fragestellungen zu durchsuchen (Pak et al. 2001). Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten unter den in Tabelle 2 genannten Durchsuchungskriterien durchsucht und durch demographische und reproduktionsbiologische Daten erweitert (Tabelle 2). Fehlende Daten wurden durch Informationen aus der jeweiligen Patientenakte oder einer separaten Dokumentation des IVF-Labors komplettiert.

### **3.3 Ethikvotum und Anmeldung der Arbeit bei dem U.S.Amerikanischen Gesundheitsamt (U.National Institutes of Health)**

Für die vorliegende Arbeit liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der medizinischen Universität zu Lübeck vom 19.01.2010 mit dem Aktenzeichen 09-195 vor.

Des Weiteren erfolgte eine Anmeldung der Arbeit bei der U.S.Amerikanischen Gesundheitsbehörde unter der Registriernummer NCT01088425 (<http://clinicaltrials.gov>)

Durchsuchungskriterien	Datum der Follikelpunktion Behandlung: IVF, ICSI, IVF/ICSI, Auftauen  Einfrierdatum Auftaudatum Vor- und Nachname Geburtsdatum
Demographische Variablen	Größe Gewicht BMI Alter zum Behandlungszeitpunkt Ursache der Sterilität
Reproduktionsbiologische Variablen	Aufgetaute vitale 2 PN nach ICSI Aufgetaute nicht ideale 2 PN nach ICSI Aufgetaute ideale 2 PN nach IVF Aufgetaute nicht ideale 2 PN nach IVF Morphologisch ideale Embryonen nach ICSI Morphologisch nicht ideale Embryonen nach ICSI Morphologisch ideale Embryonen nach IVF Morphologisch nicht ideale Embryonen nach IVF Transferierte Embryonen Biochemische Schwangerschaft Anzahl der intrauterinen Fruchthöhlen Anzahl der pos. Herzaktionen Zyklusausgang

**Tabelle 2: Erhobene Daten**

### 3.4 Beschreibung der angewandten Methoden

#### 3.4.1 Ovarielle Stimulation

Die kontrollierte ovarielle Überstimulation (COH) mit dem Ziel, die Reifung möglichst vieler Eizellen zu induzieren, erfolgte nach dem Multidosis-Antagonisten-Protokoll („Lübecker Protokoll“) oder nach dem langen Protokoll mit Einsatz eines GnRH-Agonisten.

Im Rahmen des „Lübecker Protokolls“ erfolgte die Gonadotropinstimulation ab dem 2. Zyklustag mittels täglicher Gaben von recFSH (Gonal-F®, MerckSerono GmbH, Darmstadt und Genf; Puregon®, Essex Pharma GmbH, München) oder mit HMG (Menogon HP®, Ferring, Kiel). Die Dosierung wurde individuell für jede Patientin angepasst. Entscheidend für die Dosierung waren u. a. das Alter der Patientin sowie auch das Ansprechen bei vorausgegangener kontrollierter ovarieller Überstimulationen. Der GnRH-Antagonist Cetrorelix (Cetrotide®, Serono Genf, Schweiz) wurde entsprechend dem Protokoll täglich vom 6. Stimulationstag bis zur Ovulationsauslösung mit einer Dosis von 0,25mg/d gegeben. Die Ovulation wurde, nachdem sonographisch mindestens 3 Follikel mit einer Größe von  $\geq 17\text{mm}$  darstellbar und ein Östradiolwert von 300-400 pg/ml pro Follikel  $> 15\text{mm}$  nachweisbar waren, mittels 10.000 IE. hCG (Predalon®, Organon, OSS Niederlande) s.c. induziert (Abbildung 2).

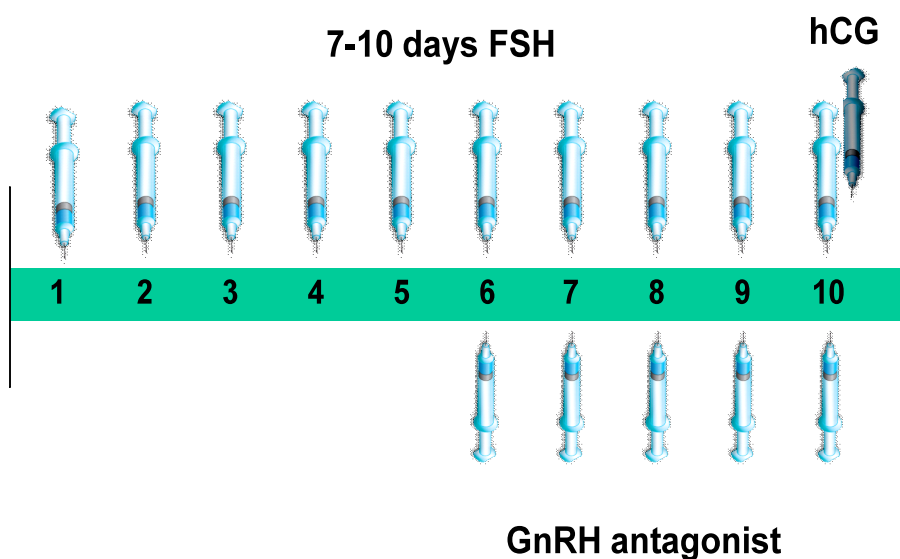
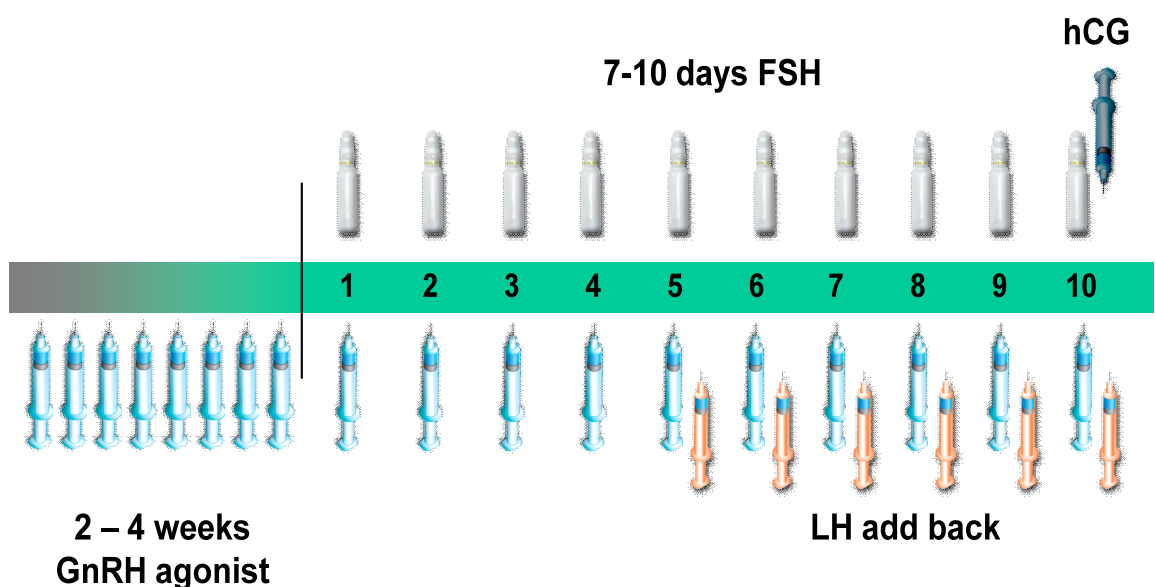


Abbildung 2: ovarielle Stimulation nach dem GnRH-Antagonisten Protokoll

Die COH nach dem „langen Protokoll“ erfolgte unter Einsatz eines GnRH-Agonisten (Abbildung 3). Hierbei wurde ab dem 21. Tag des vorangegangenen Zyklus ein GnRh-Agonist entweder als Depot mit 3,2mg Triptorelin s.c. (Decapeptyl® Gyn, Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel) oder täglich als Nasenspray Naforelin (Synarela® Heumann Pharma GmbH) verabreicht. Bei suffizienter hypophysärer Downregulation mit LH-Werten <10mIU/ml und Östradiolwerten < 50pg/ml sowie dem sonographischem Ausschluß funktioneller Ovarialzysten wurde dann die Stimulation ab dem 1. Zyklustag mittels recFSH (Gonal-F®, MerckSerono GmbH, Darmstadt und Genf; Puregon®, Essex Pharma GmbH, München) oder mit HMG (Menogon HP®, Ferring, Kiel) in individueller Dosierung begonnen. Ab dem 8. Zyklustag wurden regelmäßige Östradiol- und LH-Kontrollen sowie transvaginale Follikulometrien durchgeführt und die Dosierung des Gonadotropins dementsprechend angepasst. Bei sonographischer Darstellung von 3 Follikeln mit einer Größe von  $\geq 17\text{mm}$  und einem Östradiolwert von 300-400pg/m pro Follikel  $> 15\text{mm}$  erfolgte dann die Ovulationsauslösung mittels 10.000 IE. hCG (Predalon®, Organon, OSS Niederlande) s.c..



**Abbildung 3: Ovarielle Stimulation nach dem GnRH-Agonisten-Protokoll, „LH add back“ unter Studienbedingungen**

### 3.4.2 Follikelpunktion

Ca. 36 h nach Auslösen der Ovulation wurden die Follikel transvaginal sonographisch gesteuert punktiert. Das Punktat wurde makroskopisch und stereomikroskopisch durchmustert. Die so identifizierten Cumulus-Oocyten-Komplexe (COC) wurden gespült und die Eizellreife anhand morphologischer Kriterien beurteilt. Bis zur nachfolgenden Denudierung oder IVF wurden die COC in einem Inkubator aufbewahrt.

Die Denudierung diente der Vorbereitung der Eizellen auf die ICSI. Hierbei wurden die Eizellen mechanisch mittels Pipetten und enzymatisch mittels einer Hyaluronidase (Fa. Sage) von den umgebenden Granulosazellen gelöst.

### 3.4.3 Qualitative und quantitative Bestimmung der Ejakulatparameter und Aufbereitung für die Methoden der assistierten Reproduktion nach WHO-Kriterien (World Health Organization - WHO 1999).

Vor der Aufbereitung des Ejakulates erfolgte zunächst ein Kurzspermiogramm. Hierbei wurden folgende Parameter bestimmt:

- a. **Volumen des Ejakulates**  
(Bestimmung durch Wiegen gegen einen leeren Tara-Becher)
- b. **Konzentration der Spermien** [Millionen/Milliliter (Mio./ml)]  
(entsprechend der Anzahl der Spermien pro Blickfeld)
- c. Prozent **Motilität**
  - WHO „A“: schnell progressiv
  - WHO „B“: langsam progressiv
  - WHO „C“: lokal motil
  - WHO „D“: immotil
- d. Anzahl **morphologisch normaler Spermatozoen** pro Blickfeld
- e. Anzahl der **Rundzellen** pro Blickfeld
- f. **„Besonderheiten“**, z.B. hohe Viskosität, starke Agglutinationen, hohe Konzentration an Rundzellen (>7Mio./ml)

Zur weiteren Verarbeitung des Ejakulates wurde zunächst das Seminalplasma durch Waschen mit IVF-Medium (IVF-Universalmedium, Medicult, Berlin) und Zentrifugation entfernt. Das auf diese Weise entstandene Pellet diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Arbeitsschritte, die in Abhängigkeit von Quantität und Qualität des Ejakulates sowie den weiter geplanten Verfahren der ART (IVF oder ICSI) erfolgten.

**A.: Glaswoll-Säulenfiltration:**

Die Glaswoll-Säuleninfiltration wurde eingesetzt, um Agglutinationen zu entfernen. Sie bedingt hohe Verluste motiler Spermatozoen, so dass sie nur bei IVF- Behandlungen mit ausreichenden Mengen Sperma zum Einsatz kam (*SOP Nr. 21 Labor für Reproduktion*). Hierbei wurde das mit IVF- Medium resuspendierte Pellet auf eine Glaswoll-Filtrationssäule aufgegeben und das Filtrat aufgefangen.

**B.: Swim-up und Mini-swim-up:**

Durch die Verfahren des Swim-up und des Mini-swim-up wurden progressiv motile Spermatozoen angereichert und für die IVF- oder ICSI-Behandlung vorbereitet.

Hierbei wurde das durch das Waschen entstandene Pellet mit Medium überschichtet und ca. 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubation befanden sich die progressiv motilen Spermatozoen im Medium während die immobilen Spermatozoen, Rundzellen und Debris im Pellet verblieben.

**3.4.4 In-vitro-Fertilisation (IVF) und intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)**

Im Rahmen der IVF wurden je drei der Cumulus-Oocyten-Komplexe (COC) mit einer Menge von  $1 \times 10^5$  der mittels der o.g. Verfahren aufbereiteten , progressiv motilen Spermien, in 1ml IVF-Universalmedium (Fa. Medicult) inseminiert.

Im Rahmen der ICSI wurde jeweils ein morphologisch normal aussehendes und sich progressiv bewegendes Spermium ausgewählt und mit Hilfe zweier in einen

Mikromanipulator eingespannten Mikropipetten (ICSI-Pipette und Halte-Pipette) unter 200-facher Vergrößerung in die Mitte je einer Eizelle eingebracht. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt bis alle Eizellen injiziert waren.

Nach Insemination bzw. nach Injektion wurden die Eizellen für 16 bis 20 h im Kulturbrutschrank gelagert.

Die stereomikroskopische Vorkernkontrolle erfolgte nach 16-20 h. Es wurden hierbei 1-3 der Eizellen mit 2 Vorkernen für den Embryotransfer im mittleren Mediumtropfen belassen und für weitere 24 Stunden im Inkubator aufbewahrt. Die übrigen Eizellen mit 2 Vorkernen wurden im weiteren Verlauf nach der jeweiligen Methode kryokonserviert. Eizellen, mit keinen, wenigen oder überzähligen Vorkernen wurden verworfen (SOP Nr.12 und 13, Labor für Reproduktion).

### **3.4.5 Kryokonservierungsverfahren**

In unserem Labor kommen zwei unterschiedliche Kryokonservierungsverfahren zur Anwendung. Zunächst erfolgte die Kryokonservierung nach der Technik des „slow-rate freezing“. Im Verlauf etablierte sich dann zunehmend die Technik der Vitrifikation. Dieses Kryokonservierungsverfahren wird seit dem 15.06.2005 ausschließlich angewendet.

#### *3.4.5.1 Slow-rate-freezing*

Zunächst wurden die Lösungen des „Quinn`s Advantage® Embryo Freeze Kit“ (Fa. SAGE, über KB Biosystems) im Brutschrank warm gestellt. Nachfolgend wurden die Center-well-Schalen entsprechend der Gebrauchsanweisung mit 0,7 ml der Medien befüllt und auf eine Wärmeplatte gestellt:

Schale 1	0,5 M Propandiol (PPD)-Lösung
Schale 2	1,5 M PPD-Lösung
Schale 3	1,5 M PPD-Lösung und 0,1 M Saccharose

Um den Kryo-Straw (CTE-Kryo-Straw mit Geißel, Fa. Cryo-technik Erlangen) vorzubereiten, wurde dieser mit Medium 3 befüllt und das Ende der Geißel verschweißt. Die Äquibrilierung erfolgte nun, indem 2-3 der 2 PN-Oozyten zunächst 5 min bei Raumtemperatur (RT) in Schale 1, nachfolgend 10 Minuten in Schale 2 inkubiert wurden. Danach wurden die Eizellen in der Schale mit Medium 3 gespült und in den vorbereiteten Straw überführt. Nachdem die beladenen Straws mit einer Kugel verschlossen worden waren, erfolgte das Einfrieren im CTE-Einfriergerät „Offenes System“ (Cryo-Technik Erlangen) nach dem „Lübecker Protokoll“ (SOP Nr.17, Labor für Reproduktion, Al-Hasani et Ludwig 1996; Tabelle 3).

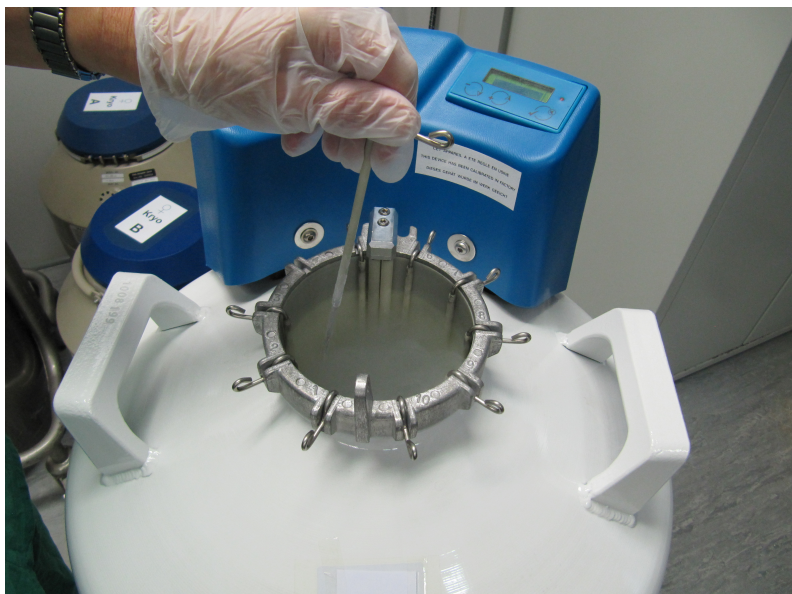
Rampe	Temperatur	Kühlgeschwindigkeit (°C/min)
1	RT bis 0°C	1,0
2	0 °C bis -2 °C	0,5
3	-2 °C bis -4 °C	0,3
4	-4 °C bis -5 °C	0,2
5	-5 °C bis -7 °C	0,1
6	-7 °C bis -33 °C	0,3
7	-33 °C	30 Minuten, dann Transfer in Flüssig-Stickstoff

**Tabelle 3: Einfrierprotokoll „ Lübecker Protokoll“ (nach Al-Hasani 1996)**

Dann erfolgte der Transfer der Straws aus dem CTE-Stickstofftank zunächst in einen stickstoffgefüllten Zwischenlagerungsbehälter, im weiteren Verlauf dann zur Lagerung in einen, ausschließlich Slow-rate-freezing-Eizellen enthaltenden, Stickstofftank.

#### 3.4.5.1 Vitrifikation

Zunächst wurden sowohl die Äquibrilierungslösung (ES; Fa. Irvine, enthält HEPES-Puffer, 7,5% DMSO und 7,5% EG) als auch die Vitrifikationslösung (VS, Fa. Irvine, enthält HEPES-Puffer, DMSO15%, 15% EG, 0,5 M Sukrose) in einem Inkubator erwärmt. Nachfolgend wurden je 300 µl ES und 700 µl VS in eine Center-Well-Schale (Fa. Falcon) pipettiert und bei 37°C auf eine Heizplatte gestellt. Für die Äquibrilierung wurden nun die 2 PN-Oozyten in den Tropfen mit der ES überführt und dort für mindestens 8 min belassen. Im Verlauf der Äquibrilierung kam es zunächst zu einem Schrumpfen der Zellen, im weiteren Verlauf wieder zu einer Volumenzunahme. Sobald die 2 PN-Oozyten wieder ein Volumen von rund 80% des Ausgangsvolumens erreicht hatten wurden sie in Zweierportionen in die Vitrifikationslösung überführt. Nach einer Inkubationszeit von 45-60 sec in der VS wurden die Vorkernstadien mit Hilfe einer Transferpipette (Nr 1 oder 2 der Fa. Swemed über Vitrolife) auf die Spitze des Kryotop (Fa. Kitazato) übertragen und direkt in den flüssigen Stickstoff (LN<sub>2</sub>) getaucht. Im LN<sub>2</sub> wurde dann eine Kunststoffspitze über die Spitze des Kryotops geschoben, das Top in das Goblet des Aluhängers geschoben und der Aluhänger in einem Stickstofftank gelagert. (SOP Nr.19.1). Das Verfahren im Überblick zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 4: Stickstofftank und "straw" zur Konservierung der Pronukleusstadien**

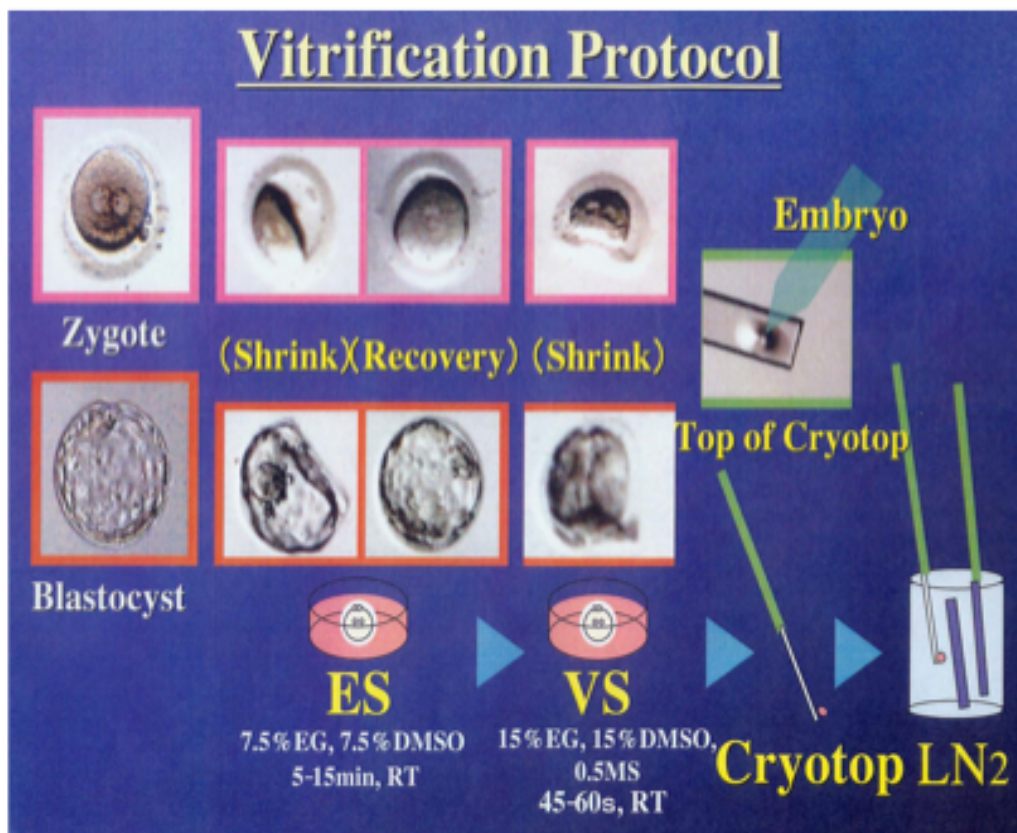


Abbildung 5: Vitريفikationsprotokoll

### 3.4.6 Zusammensetzung der bei der Kryokonservierung in unserem Labor verwendeten Lösungen

Die Zusammensetzung der bei der Kryokonservierung in unserem Labor verwendeten Lösungen zeigt Tabelle 4.

<b>Vitrifikation</b>	Äquibrilierungslösung (ES) Fa. Irvine	-Medium M199 [enthält 21mM HEPES-Puffer, 20% DSS (Dextran Serum Supplement, 10mg/ml Protein), 35 µg/ml Gentamicin] - 7,5% DMSO - 7,5% EG
	Vitrifikationslösung (VS) Fa. Irvine	-Medium M199 [enthält 21mM HEPES-Puffer, 20% DSS (Dextran Serum Supplement, 10mg/ml Protein), 35 µg/ml Gentamicin] - 15% DMSO - 15% EG - 0,5 M Saccharose
<b>„slow-rate freezing“</b>	Lösung 1	- 0,5 M Propandiol - 12 mg/ml humanes Serum-Albumin
	Lösung 2	- 1,5 M PPD - 12 mg/ml humanes Serum-Albumin
	Lösung 3	- 1,5 M PPD-Lösung - 0,1 M Saccharose - 12 mg/ml humanes Serum-Albumin

**Tabelle 4: Zusammensetzung der bei der Kryokonservierung verwendeten Lösungen**

### 3.4.7 Auftauverfahren

Entsprechend den beiden in unserem Labor angewendeten Gefrierverfahren erfolgt das Auftauen nach zwei unterschiedlichen Protokollen. Diese unterscheiden sich u. 8a. hinsichtlich der verwendeten Lösungen sowie auch des erforderlichen Zeitaufwandes.

#### *3.4.7.2 Auftauen von Eizellen im Vorkernstadium nach langsamen Einfrieren*

Vor Beginn des Auftauens wurden zunächst die Auftaumedien des Auftau-Kits („Quinn`s Advantage® Embryo Thaw-Kit“, Fa. SAGE, über KB Biosystems) im Brutschrank warm gestellt, ein mit Aqua dest. gefülltes Wasserbad auf 37°C erwärmt sowie jeweils 1ml der Auftaumedien 0,5 M Saccharose und 0,2 M Saccharose (Tabelle 5) in Center-well-Schalen (Fa. Falcon) pipettiert und auf eine Wärmeplatte mit 37°C gestellt. Nachdem der entsprechende Straw aus dem Lagerbehälter entnommen worden ist, wurde der Straw zunächst für 30 sec in Raumluft gehalten, sodass evtl eingeschlossenes N<sub>2</sub> entweichen konnte. Um das Eis zu schmelzen, wurde der Straw nachfolgend für ca. 60 sec in das vorbereitete Wasserbad gehalten. Der Straw wurde dann geöffnet, wobei hier 2 Methoden zum Einsatz kamen:

#### **Methode 1:**

Die mit der Kugel verschlossene Seite des straws und ein Teil der Geißel wurden abgeschnitten und durch die Geißel wird mit einer feinen Kanüle Auftaumedium (0,5 M Saccharose) gespritzt. Die dabei austretende Flüssigkeit wurde in einer Plastik-Schale aufgefangen und die Vorkernstadien unter einem Stereomikroskop lokalisiert.

#### **Methode 2:**

Geißelseite und Kugelseite wurden abgeschnitten und der Inhalt des Straws in eine Plastischale geschüttet. Die Lokalisation der Vorkernstadien erfolgte ebenfalls mittels eines Stereomikroskops.

Mit einer Transferpipette wurden die 2 Pronukleus-Oozyten dann in 0,5 M Saccharose überführt und dort 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die 2 PN-Oozyten in das 0,2 M Saccharose enthaltende Auftaumedium

transferiert und dort ebenfalls 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Pronukleus-Oozyten in Cleavage-Medium gespült und 30 Minuten nach der Erwärmung die Vitalität der 2 Pronukleus-Oozyten stereomikroskopisch überprüft. Im weiteren Verlauf wurden die Eizellen über Nacht im Inkubator kultiviert und am nächsten Tag transferiert (SOP Nr.18, Labor für Reproduktion)

Abbildung 6 zeigt eine Eizelle im Vorkernstadium nach Kryokonservierung und Erwärmung und 24 h nach erfolgter Teilung.



**Abbildung 6: a) Eizelle im Vorkernstadium nach Kryokonservierung und Erwärmung und b) 24 h nach erfolgter Teilung**

#### *3.4.7.1 Auftauen von vitrifizierten Eizellen im Vorkernstadium*

48 h vor dem geplanten Kryoembryotransfer wurde zunächst eine Kulturschale mit Cleavage-Medium (Fa. Sage) über Nacht im Brutschrank äquilibriert. 24 h vor dem Transfer wurden die Auftaumedien Medium 1 (1,0 M Saccharose, Fa. Irvine) und Medium 2 ( 0,5 M Saccharose, Fa. Irvine; Tabelle 5) im Inkubator auf 37°C erwärmt und vor dem Auftauen je 700 µl in zwei Center-Well-Schalen pipettiert. Zu Beginn des Auftauvorgangs wurde eine mit LN<sub>2</sub> gefüllte Styroporbox neben den Lagerbehälter gestellt, die entsprechenden Kryotops anhand der Beschriftung identifiziert und aus den Lagerbehälter geholt. Das Krytop wurde dann direkt aus dem Stickstoff in die Schale mit dem Medium 1 überführt , die 2 PN-Oozyten durch

Schwenken vom Kryotop gelöst und dort für 1 Minute inkubiert. Im weiteren Verlauf erfolgte dann die 3-minütige Inkubation in Medium 2 und das nachfolgende Spülen im Cleavage-Medium.

30 min nach der Erwärmung wurde dann die mikroskopische Vitalitätskontrolle durchgeführt. Die für den Transfer vorgesehenen vitalen Eizellen wurden daraufhin über Nacht im Inkubator kultiviert und am folgenden Morgen entsprechend dem „Frisch“-Transfer in den Uterus der Patientin transferiert ( SOP Nr. 20.1, Labor für Reproduktion; Abbildung 7).



Abbildung 7: Auftauprotokoll nach Vitrifikation

Auftauen nach Vitrifikation	Lösung 1	-Medium M199 (enthält 21 mM HEPES-Puffer, 20% DSS (Dextran Serum Supplement, 10 mg/ml Protein), 35 µg/ml Gentamicin- - 15% DMSO - 15% EG - 1,0 M Saccharose
	Lösung 2	-Medium M199 (enthält 21mM HEPES-Puffer, 20% DSS (Dextran Serum Supplement, 10mg/ml Protein), 35 µg/ml Gentamicin- - 15% DMSO - 15% EG - 0,5 M Saccharose
	Cleavage Medium	Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, Kalziumacetat, Natriumbicarbonat, Glucose, Natriumpyruvat, Alanyl-Glutamin, Taurin, L-Asparagin, L-Asparat, Glycin, L-Prolin, L-Serin, Natriumcitrat, EDTA, Gentamicin, Phenol Rot
Auftauen nach „slow-rate freezing“	Lösung 1	- 0,5 M Saccharose - 12 mg/ml humanes Serum Albumin
	Lösung 2	- 0,2 M Saccharose - 12 mg/ml humanes Serum Albumin
	Cleavage Medium	Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, Kalziumacetat, Natriumbicarbonat, Glucose, Natriumpyruvat, Alanyl-Glutamin, Taurin, L-Asparagin, L-Asparat, Glycin, L-Prolin, L-Serin, Natriumcitrat, EDTA, Gentamicin, Phenol Rot

**Tabelle 5: Zusammensetzung der, beim Auftauen verwendeten Lösungen**

### **3.4.8 Schleimhautaufbau vor Kryotransfer**

Die Schleimhautvorbereitung vor dem geplanten Kryotransfer erfolgte ab dem 1. Zyklustag zunächst mit Östrogenpflastern (Estradot®, Novartis Pharma GmbH) nach dem Protokoll zum Schleimhautaufbau (s.Anhang). Am 14. Zyklustag wurden dann sonographisch die Endometriumhöhe und laborchemisch die Serumkonzentration von LH, E2 und Progesteron bestimmt. Konnte auf diese Weise eine ausbleibende Ovulation bestätigt werden, wurde am Folgetag mit der täglichen vaginalen Applikation von Progesteron (Crinone® Vaginalgel 8% , Serono) begonnen. Ab dem 16. Zyklustag erfolgte dann nach individueller Planung der Embryotransfer. Die Hormongabe wurde über den Transfer hinaus bis zum Schwangerschaftstest (12-14 Tage nach Transfer) mit der täglichen Anwendung des Vaginalgels und der Applikation von 2 Pflastern alle 2 Tage fortgesetzt.

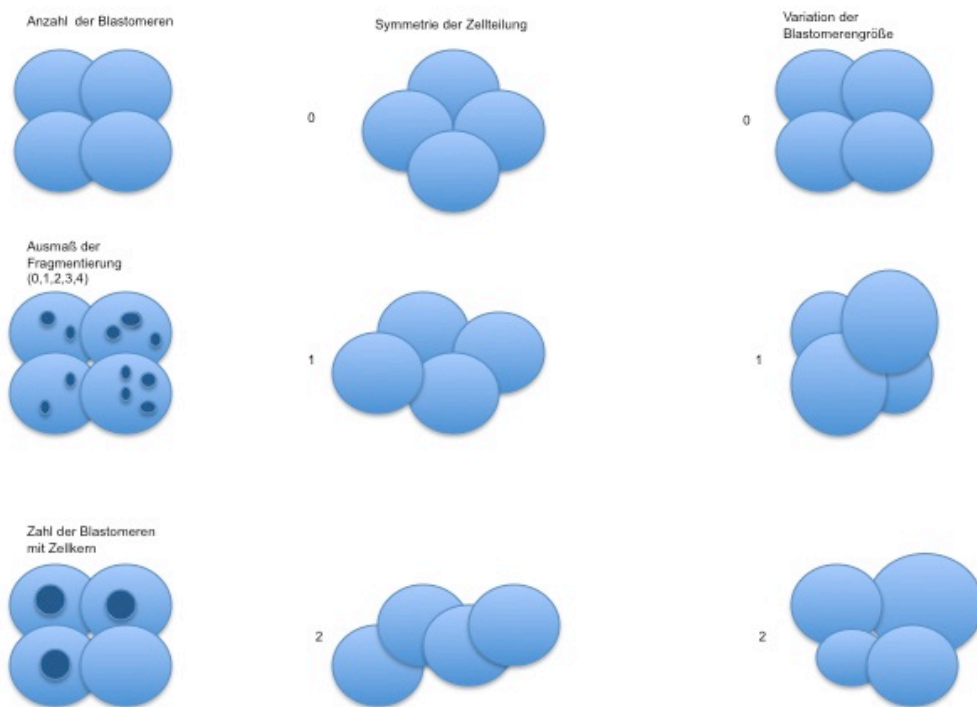
### **3.4.9 Beurteilung der Embryoqualität**

Die Morphologie der Embryonen wurde anhand mehrerer Kriterien am Tag des Embryotransfers lichtmikroskopisch beurteilt. Auf diese Weise konnte der sogenannte Embryo-Score ermittelt werden, der Aufschluss über das weitere Entwicklungspotential der Embryonen gibt.

Beurteilt wurden:

- die Zahl der Blastomeren
- das Ausmaß der Fragmentierung
- das Ausmaß der Variation der Blastomerengröße
- die Symmetrie der Zellteilung
- die Zahl der Blastomeren mit einem Zellkern

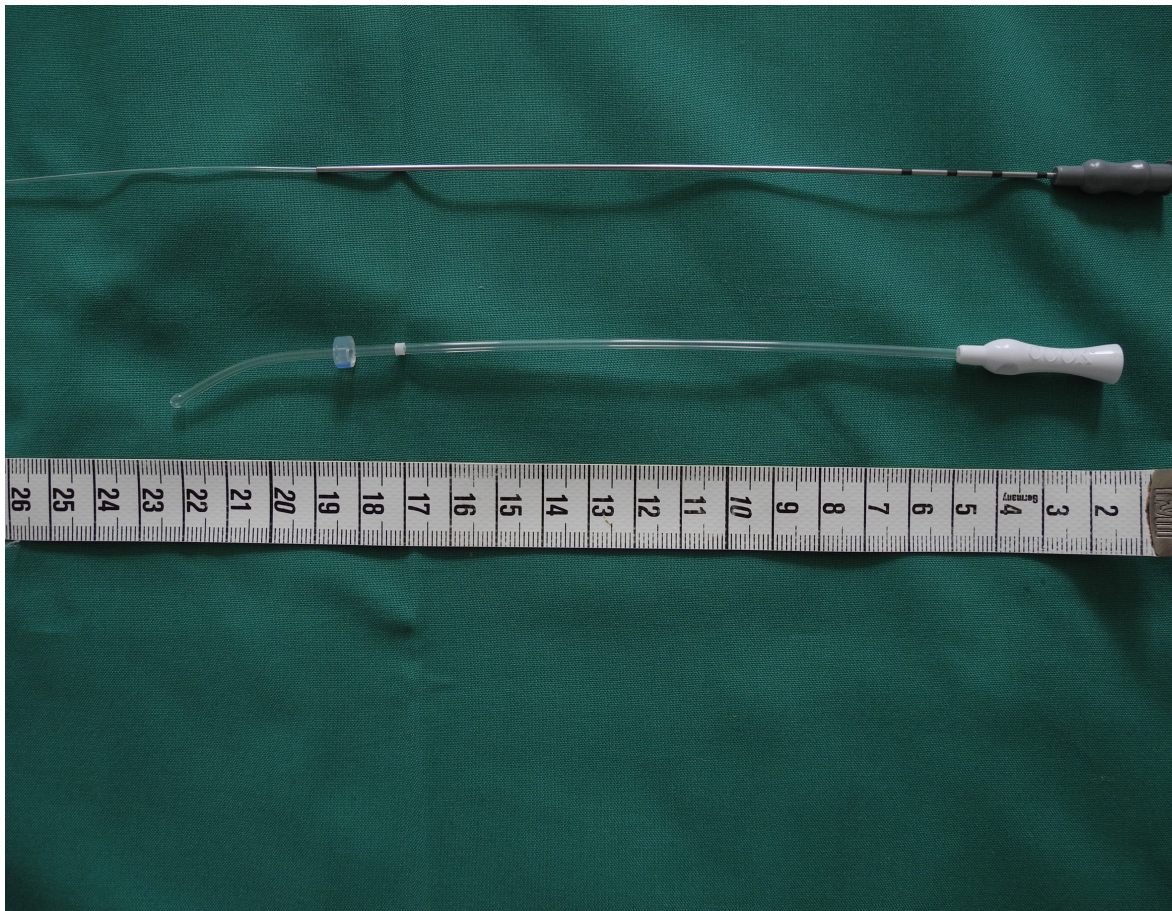
Den jeweiligen Kriterien wurde ein Punktwert zugeordnet (Abbildung 8). Durch Summation der einzelnen Punktwerte konnte dann der Embryoscore berechnet werden. Anhand des Embryoscore erfolgte dann die Unterteilung der Embryonen in „ideale“ und „nicht ideale Embryonen“ (Holte et al. 2007, Arce et al. 2006, Sjöblom et al. 2006).



**Abbildung 7: Beurteilung der Embryoqualität modifiziert n. Holte 2007**

### 3.4.10 Embryotransfer

Der Transfer der Embryonen erfolgte mit einem Embryotransferkatheter der Firma COOK MEDICAL (Abbildung 9). Bei der, in Steinschnittlage gelagerten, Patientin wurde zunächst mittels eines Vaginalspekulums der Muttermund exponiert und dann der Einführkatheter, ggf. mit einem Führungsdraht oder einem biegsamen Obturator gemeinsam, eingeführt. Daraufhin wurde mit Hilfe einer am Platzierungskatheter angebrachten Spritze die Embryonen in das Ende des Katheters aspiriert. Dieser wurde dann über den Einführkatheter in die Gebärmutter eingeführt und die Embryonen dort in die Gebärmutterhöhle eingespült. Nachfolgend wurde der Katheter wieder entfernt, auf evtl. verbliebene Embryonen geprüft und dann verworfen.



**Abbildung 8: Transferkatheter**

### **3.5 Berechnung der Implantationsrate und Definition der Schwangerschaft**

Die Implantationsrate in den einzelnen Gruppen wurde als prozentualer Anteil der Fruchthöhlen an der Zahl der transferierten Embryonen ermittelt.

Die klinische Schwangerschaft wurde bestätigt, sobald eine Herzaktion sonographisch nachgewiesen werden konnte.

### 3.6 Statistik

Die Datensammlung erfolgte computerbasiert durch RecDate<sup>®</sup> für Microsoft Windows für die reproduktionsbiologischen Daten. In Einzelfällen mussten die Patientenakten gesichtet werden. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 17.0 für Microsoft Windows (SPSS Inc. 2008, Chicago, IL, USA). Das multiple Signifikanzniveau war mit 5% bei zweiseitiger Fragestellung vorgegeben. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Kolmogorov-Smirnow-Test. Bei quantitativen Zielkriterien wurde zum Gruppenvergleich der U-Test nach Mann und Whitney für unverbundene Stichproben angewendet. Zum Vergleich der Grundwahrscheinlichkeiten zweier Binomialverteilungen in der Vierfeldertafel kam der  $\chi^2$ -Test nach Pearson zum Einsatz.

Eine multinomiale logistische Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um die Unabhängigkeit des Überlebens der 2 PN-Eizellen nach Kryoauftauvorgang durch Vitrifikation den Einflussfaktoren

- Alter der Patientin=  $X_1$ ,
- Gewicht der Patientin=  $X_2$ ,
- Spermienqualität =  $X_3$

zu überprüfen. Das Überleben der 2PN Eizellen wurde mit  $Y$  definiert. Die Güte des Modells wurde mit Hilfe des Likelihood-Quotienten-Tests errechnet. Als Referenzkategorie wurde „nicht überlebt“ gewählt. Nur Überlebensraten der 2 PN-Eizellen nach Vitrifikation und Auftauvorgang von  $> 50\%$  wurden als „überlebt“ definiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Demographische Variablen

In der Tabelle 6 wurden die demographischen Daten der Patientinnen zum Zeitpunkt der Follikelpunktion für die 3 Gruppen (Frisch-ET, Auftauzyklen nach „slow-rate freezing“ und Auftauzyklen nach Vitrifikation) ermittelt und einander gegenüber gestellt, um der Auswertung ein vergleichbares Patientkollektiv zugrunde legen zu können. Die Daten wurden in Form der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen dokumentiert.

Es zeigte sich, dass für alle 3 Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Alters der Patientinnen, der Körpergröße, des Gewichtes und des BMI festgestellt werden konnten. Weiterhin bestanden auch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der vorausgegangenen Schwangerschaften und Geburten.

	<b>Frisch-ET Zyklen (n=5597)</b>	<b>Auftauzyklen nach „slow-rate freezing“ (n=986)</b>	<b>Auftauzyklen nach Vitrifikation (n=1103)</b>
Alter zum Zeitpunkt der Follikelpunktion MW±SD (J)	34,18 ±4,69	32,62 ±4,31	33,87 ±4,1
Gravidität MW±SD (n)	1,6 ±1,07	1,4 ±0,8	1,4 ±0,8
Parität MW±SD (n)	0,65 ±0,87	0,9 ±0,1	1,0 ±0,12
Größe MW±SD (cm)	167,16 ±6,48	169,54 ±5,64	168,45 ±6,8
Gewicht MW±SD (kg)	67,28 ±11,7	74,2 ±9	66,5 ±11,5
BMI MW±SD	24,0 ±6,01	26,0 ±5,5	23,3 ±4,0

**Tabelle 6: Demographische Variablen**

## 4.2 Ursachen der Infertilität

In Tabelle 7 sind die der Infertilität zugrunde liegenden Ursachen für die 3 Auswertungsgruppen (Frisch-ET-Zyklen, Auftauzyklen nach „slow-rate freezing“ und Auftauzyklen nach Vitrifikation) separat aufgeschlüsselt. Die Ursache der Infertilität bestimmt die Indikation für die unterschiedlichen Behandlungsformen der ART.

Unter dem Überbegriff „**weiblichen Ursachen**“ wurden folgende Subursachen zusammengefasst:

- organische Ursachen wie z.B. Tubenpathologien oder Endometriose,
- hormonelle Ursachen wie z.B. das PCO-Syndrom oder ein pathologischer Zyklus,
- psychogene Faktoren sowie
- sonstige Ursachen ( z.B. Spermien-AK, path. Zervixfaktor).

Die „**männlichen Ursachen**“ schließen ein:

- das eingeschränkte Spermogramm (nach WHO-Kriterien 1999),
- die Azoospermie sowie
- weitere Ursachen (z.B. path. Funktionstests) mit ein.

Der Begriff „**gemischtförmige Sterilität**“ umfasst sämtliche Kombinationen der weiblichen und der männlichen Sterilitätsursachen.

	<b>Frisch-ET-Zyklen (n=5597)</b>	<b>Auftauzyklen nach „slow-rate freezing“ (n=986)</b>	<b>Auftauzyklen nach Vitrifikation (n=1103)</b>
Weibliche Ursachen (%)	19,7	20,1	19,0
Männliche Ursachen (%)	55,5	56,7	51,3
Gemischtförmige Sterilität (%)	13,5	15,3	17,7
Idiopathische Sterilität (%)	11,3	7,9	12,0

**Tabelle 7: Ursachen der Infertilität**

In allen 3 Gruppen stellte die männliche Subfertilität die Hauptursache der Infertilität und somit die Hauptbehandlungsindikation dar (55,5% vs. 56,7% vs. 51,3%). In den 3 Gruppen zeigten sich auch für die weiteren Ursachen - weibliche Ursachen, gemischtförmige Sterilität und idiopathische Sterilität - keine signifikanten Unterschiede (Tabelle7).

### 4.3 Reproduktionsbiologische Variablen I

In Tabelle 8 wurden die Auftauzyklen der beiden Kryokonservierungsmethoden einander gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass bezüglich der Gesamtzahl der aufgetauten Vorkernstadien sowie auch zwischen den im Mittel pro Auftauzyklus aufgetauten Vorkernstadien signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen (4.090 vs. 2.628 und 4,15 vs. 2,38

	<b>Auftauzyklen nach „slow-rate freezing“ (n=986)</b>	<b>Auftauzyklen nach Vitrifikation (n=1103)</b>
Anzahl der kryokonservierten Vorkernstadien (n)	3.908	4.479
Anzahl der aufgetauten Vorkernstadien (n)	4.090	2.628
Anzahl der aufgetauten, vitalen Vorkernstadien	2.275	2.450
Anzahl der aufgetauten, vitalen Vorkernstadien nach ICSI (n)	2.068	2.434
Anzahl der aufgetauten, vitalen Vorkernstadien nach IVF (n)	207	16
Überlebensrate (%)	55,62	93,23

**Tabelle 8: Reproduktionsbiologische Variablen 1 a**

Die Überlebensrate wurde als prozentualer Anteil der aufgetauten vitalen 2 PN an der Anzahl, der in der jeweiligen Gruppe insgesamt aufgetauten 2 PN ermittelt. Hier zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (55,62% SK vs. 93,23% V). Des Weiteren fiel bei der Betrachtung der Daten eine deutliche Differenz der nach IVF aufgetauten vitalen Vorkernstadien auf. (207 SK vs.16V).

In Tabelle 9 wurde der Anteil der sich „ideal“ entwickelnden Embryonen an der Zahl der vitalen Vorkernstadien nach dem Auftauen (nach IVF und ICSI) ausgewertet. Auch hier zeigten sich bessere Ergebnisse nach Vitrifikation mit einer höheren Anzahl „idealer“ Embryonen( 66,7% vs. 70,4%).

	„slow-rate freezing“	Vitrifikation
Vitale Vorkernstadien nach Auftauen (n)	2.275	2.450
„Ideale“ Embryonen (n)	1.517	1.725
(% der Vorkernstadien)	66,7	70,4

**Tabelle 9: Reproduktionsbiologische Variablen 1 b**

#### 4.4 Reproduktionsbiologische Variablen II

Tabelle 10 zeigt für alle 3 Gruppen (Frisch-ET, „slow-rate freezing“ und Vitrifikation) die reproduktionsbiologischen Charakteristika ab dem Zeitpunkt des Embryotransfers. Die Implantationsrate in den einzelnen Gruppen wurde als prozentualer Anteil der Fruchthöhlen an der Zahl der transferierten Embryonen ermittelt. Die Anzahl der klinischen Schwangerschaften umfasst alle Schwangerschaftsverläufe, bei denen nach Anstieg des hCGs auf > 6 mU/ml auch eine intrauterine Fruchthöhle und eine positive Herzaktion nachgewiesen werden konnte.

	<b>Frisch-ET Zyklen (n=5597)</b>	<b>Auftauzyklen nach „slow- rate freezing“ (n=986)</b>	<b>Auftauzyklen nach Vitrifikation (n=1103)</b>
Transferierte Embryonen (n)	11700	2253	2278
Implantationsrate (%)	9,76	7,15	11,54
Anzahl klinischer Schwangerschaften (n)	1045	153	223
Schwangerschaftsrate (%)	18,6	15,57	20,22

**Tabelle 10: Reproduktionsbiologische Variablen 2**

Signifikante Unterschiede innerhalb der 3 Gruppen bestehen in der Implantationsrate (9,76% vs. 7,15% vs. 11,54%) sowie in der Rate der klin. Schwangerschaften (18,67% (1045/5597) vs. 15,52%(153/986) vs. 20,22% (223/1103)).

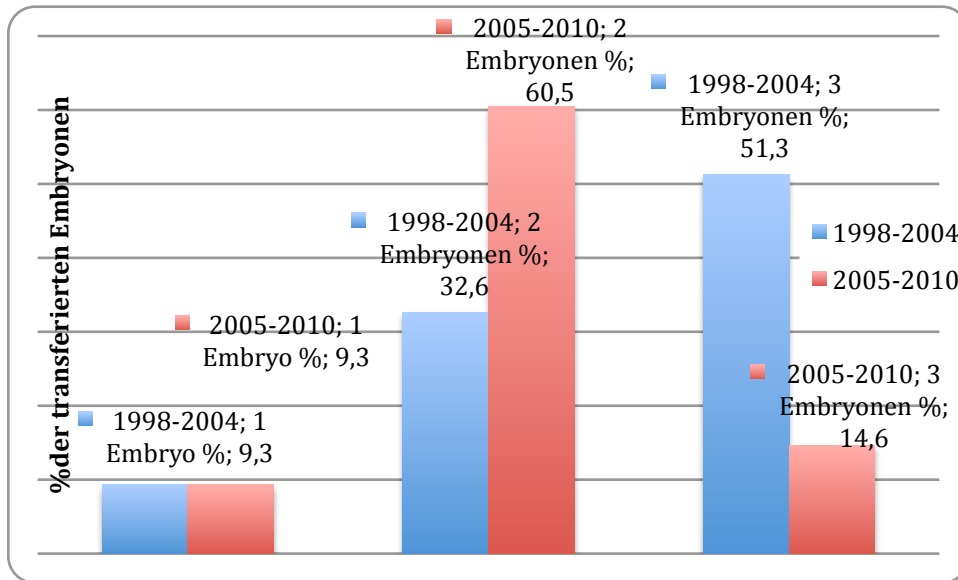
#### **4.5 Transferierte Embryonen im Frisch-ET**

In der Tabelle 11 wurde das Verhältnis der im Frisch-Zyklus transferierten Embryonen dargestellt. Die verglichenen Beobachtungszeiträume entsprechen dem Zeitraum der überwiegend angewendeten Kryokonservierungsmethode:

- 1989-2004: Slow-rate-freezing,
- 2005-2010 Vitrifikation.

Der prozentuale Anteil des Single-Embryotransfers war in beiden Zeitraum identisch mit 9,3%. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Beobachtungszeiträumen zeigten sich jedoch für den prozentualen Anteil des Transfers von 2 Embryonen. Dieser stieg in den Jahren zwischen 1998 und 2004 von 32,6% auf 60,5% in den Jahren 2004- 2010 an.

Noch signifikanter stellte sich der Unterschied für den Transfer von 3 Embryonen dar ( 51,3% SK vs. 14,6% V).



**Tabelle 11: transferierte Embryonen im Frisch-ET**

#### 4.6 Zeitlicher Verlauf der beiden Methoden

In Tabelle 12 wurden die zeitlichen Abläufe der beiden Methoden aufgeschlüsselt und einander gegenübergestellt. Schon in der Äquibrilierungsphase fiel eine Zeitdifferenz zwischen den beiden Methoden auf (9 Minuten vs. 20 Minuten). Während im Rahmen der Vitrifikation die Äquibrilierung in 2 Medien erfolgte [Äquibrilierungs- (ES)und Vitrifikationslösung VS]) wurde für das „slow-rate freezing“ der Einsatz von 3 verschiedenen Medien (I-III) nötig. Da das Einfrieren im Rahmen der Vitrifikation nur durch das Eintauchen in flüssigen Stickstoff erfolgte, der Einfriervorgang im Rahmen des „slow-rate freezing“ aber nach einem speziellen Schema ablief (Lübecker Protokoll s. Kap.3 Material und Methoden) wurde hier die Differenz zwischen dem zeitlichen Ablauf der beiden Methoden noch deutlicher (wenige Sekunden vs. 172 Minuten). Insgesamt zeigte sich, dass die benötigte Zeit für das Slow-rate-freezing dem 19-fachen der für die Vitrifikation benötigten Zeit entsprach (10 min vs. 192 min).

	Vitrifikation		„slow-rate freezing“	
Äquibrilierung	ES	8 min	Medium I	5 min
	VS	45-60 sec	Medium II	10 min
			Medium III	5 min
Dauer	9 min		20 min	
Einfriervorgang	Eintauchen in LN <sub>2</sub>	wenige sec	Einfrieren nach dem „Lübecker Protokoll“	ca. 172 min
Gesamtdauer	ca. 10 min		ca. 192 min	

**Tabelle 12: Zeitlicher Verlauf des Einfrierens; Vergleich Vitrifikation und Slow-rate-freezing**

Wie in Tabelle 13 dargestellt, unterschieden sich auch die Auftauvorgänge der beiden Verfahren hinsichtlich des benötigten Zeitaufwandes. Während für die Entnahme und die Lokalisation der VK unter dem Stereomikroskop nur sehr geringe Unterschiede von ca. 1,5 min bestanden, zeigte sich für die Inkubationszeit in den unterschiedlichen Medien ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Methoden (4 min Vitrifikation vs. 20 min „slow-rate freezing“).

	Vitrifikation		„slow-rate freezing“	
<b>Entnahme und Lokalisation der VK</b>	Überführen in LN <sub>2</sub>	wenige sec	Beseitigung von N <sub>2</sub> in Raumluft	30 sec
	Überführen in Medium 1 und Kontrolle Stereomikroskop	wenige min	Eisschmelzen im Wasserbad Lokalisation unter Stereomikroskop	ca. 60 sec wenige min
<b>Inkubation</b>	Medium 1 (1,0M Saccharose)	1 min	Medium 1 (0,5 M Saccharose)	10 min
	Medium 2 (0,5 M Saccharose)	3 min	Medium 2 (0,2 M Saccharose)	10 min
<b>Dauer</b>	4 min		20 min	
<b>Spülen</b>	Cleavage Medium	wenige sec	Cleavage Medium	wenige sec
<b>Vitalitätskontrolle</b>	nach 30 min		nach 30 min	

**Tabelle 13: zeitlicher Verlauf des Auftauens, Vergleich Vitrifikation und „slow-rate freezing“**

## 4.7 Behandlungskosten

In Tabelle 14 sind die durchschnittlichen Behandlungskosten für eine ART mittels IVF oder ICSI aufgeführt. Die Stimulationskosten beziehen sich auf eine Stimulation nach dem GnRH-Antagonisten-Protokoll mit einer durchschnittlichen täglichen Gabe von 225 IE Gonal F, der 5-maligen Gabe des GnRH-Antagonisten Cetrotide sowie der einmaligen Gabe von 10.000 IE Predalon. Die Kosten für IVF bzw. ICSI beinhalten sämtliche laborchemische und sonographische Untersuchungen sowie alle erforderlichen Arbeitsschritte im Labor für Reproduktionsmedizin, die Follikelpunktion und den Embryotransfer.

	IVF	ICSI
Hormonelle Stimulation	Ø ca.1.660,- Euro	Ø ca. 1.660,- Euro
Behandlung inkl. Blut- und sonographische Kontrollen, Kosten Reproduktionslabor, Follikelpunktion und Embryotransfer	1.305,50 Euro	2.518,39 Euro
Vollnarkose bei der Follikelpunktion	Ca. 200 Euro	Ca. 200 Euro
Kosten gesamt	2.910 Euro	4.378 Euro

**Tabelle 14: Kosten für die IVF- und ICSI-Behandlung pro Behandlungszyklus**

Die durchschnittlichen Behandlungskosten für die Kryokonservierung bzw. den Embryotransfer nach Kryokonservierung sind in Tabelle 15 dargestellt. Das Einfrieren der Eizellen beinhaltet sowohl den Gefriervorgang selbst (in unserer Klinik ausschließlich durch Vitrifikation) als auch die Gefrierlagerung der Eizellen für mindestens 1 Jahr. Die Schleimhautvorbereitung bezieht sich auf die Zeit bis

zum Zeitpunkt des Embryotransfers und beinhaltet 21 Estradot Pflaster und 3 Stück Crinione 8% Vaginalgel-Applikatoren. Die Kosten für den Embryotransfer sind in Tabelle 14 lediglich für den Transfer eines Embryos dargestellt, so dass es bei Transfer von mehreren Embryonen noch zu einer Steigerung der Gesamtkosten kommen kann.

Vergleicht man die Gesamtkosten zeigt sich, dass im Kryozyklus eine Kostenminderung von bis zu 70% möglich ist.

	<b>Kryokonservierung</b>
Einfrieren der Eizellen	371,29 Euro
Schleimhautvorbereitung vor Transfer	Ca. 42 Euro
Embryotransfer (pro Embryo)	451,96 Euro
Kosten gesamt	865,25 Euro

**Tabelle 15: Kosten für die Kryokonservierung und den nachfolgenden Embryotransfer**

## 5. Beantwortung der Fragestellung

### 1. Welche Rückschlüsse, bezogen auf die Praktikabilität und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, liefert der Methodenvergleich?

Besonders hinsichtlich der Praktikabilität zeigten sich im Vergleich der beiden Methoden deutliche Unterschiede. So ist der zeitliche Aufwand den das „slow-rate freezing“ in Anspruch nimmt im Vergleich zur Vitrifikation deutlich höher. Für die Vitrifikation werden 10 Minuten benötigt während das „slow-rate freezing“ über einen Zeitraum von mehr als 3 h (192 min) abläuft. Auch die Dauer des Auftauens unterscheidet sich zwischen den beiden Methoden (ca. 39 min bei Vitrifikation vs. 55 min bei „slow-rate freezing“).

Der apparative Aufwand unterscheidet sich für beide Verfahren deutlich.

Benötigt man für das „slow-rate freezing“ ein spezielles Einfriergerät (CTE-Einfriergerät „Offenes Gefrier-System“, Cryo-Technik Erlangen), kann bei der Vitrifikation auf ein spezielles Gerät verzichtet werden, da das Kryotop mit den Eizellen direkt in den flüssigen LN<sub>2</sub> getaucht wird. Hierfür werden lediglich die speziellen Kryotops benötigt.

Bezüglich des Kostenaufwandes konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Verfahren festgestellt werden.

Es zeigt sich jedoch, dass die Behandlungskosten im Kryozyklus nur 20-30% der Kosten eines Behandlungszyklus mit IVF oder ICSI und nachfolgendem Frischtransfer ausmachen (865,25 Euro Kryozyklus vs. 2.910-4.378 Euro IVF/ICSI und Frischtransfer).

Vergleicht man die beiden Kryokonservierungsverfahren mit dem Frisch-ET nach IVF oder ICSI zeigen sich besonders für Patientinnen mit einem drohenden Überstimulationssyndrom deutliche Vorteile, da eine Überstimulation durch die Kryokonservierung vermieden werden kann. Zudem wird durch die Kryokonservierung die Chance, pro Stimulationszyklus zu einer Schwangerschaft zu kommen, deutlich erhöht.

## **2. Unterscheiden sich die Überlebensraten der Pronukleuseizellen nach Vitrifikation von denen nach „slow-rate freezing“?**

In der vorliegenden Arbeit können signifikante Unterschiede hinsichtlich des Überlebens der imprägnierten Eizellen festgestellt werden. Von den insgesamt 4.090 mittels „slow-rate freezing“ konservierten und nachfolgend aufgetauten Eizellen im Vorkernstadium überlebten 2.275. Dies entspricht einer Überlebensrate von 55,62%.

Im Vergleich dazu zeigte sich bei den zuvor vitrifizierten 2 PN-Oozyten eine Überlebensrate von 93,23%. d.h. 2450 der 2.628 aufgetauten Eizellen überlebten Vitrifikation und Auftauen.

## **3. Lässt sich eine Abhängigkeit der Überlebensrate der Embryonen von Kofaktoren, wie dem Alter der Patientin oder dem Gewicht der Patientin ableiten?**

Zur Ermittlung einer Abhängigkeit der Überlebensrate der Pronukleusstadien von den genannten Kofaktoren wurde eine multinomiale Regressionsanalyse durchgeführt. Es konnte hierbei keine Abhängigkeit der Überlebensrate der Vorkernstadien von dem Alter der Patientin, dem Gewicht der Patientin oder der Spermienqualität festgestellt werden.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Tatsache zu sehen sein, dass die Überlebensrate nur durch Faktoren in vitro beeinflusst wird und die oben genannten Faktoren daher nur auf den Verlauf in vivo, wie die Implantations- und die Schwangerschaftsrate Einfluss nehmen.

## **4. Finden sich signifikante Unterschiede bezogen auf die Schwangerschaftsrate und die Implantationsrate im Methodenvergleich?**

Die Auswertung der Implantationsraten sowie der Schwangerschaftsraten konnten eine Überlegenheit der Vitrifikation gegenüber dem „slow-rate freezing“ und auch dem Frisch-ET gegenüber deutlich machen.

Es wurden in der Vitrifikationsgruppe insgesamt 2.278 Embryonen transferiert. Sonographisch wurden 236 intrauterine Fruchthöhlen gesehen, sodass sich für die Vitrifikationsgruppe eine Implantationsrate von 11,54% ergibt. Im Vergleich hierzu zeigt sich in der Frisch-ET-Gruppe nur eine Implantationsrate von 9,76%. D.h. es konnten bei Transfer von 11.700 Embryonen nur 1.143 intrauterine Fruchthöhlen dargestellt werden. Die Implantationsrate der Embryonen nach „slow-rate freezing“ schneidet im Gruppenvergleich mit 7,15% am schlechtesten ab. Hier konnten nach Transfer von 2.253 Embryonen nur 161 intrauterine Fruchthöhlen sonographisch nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Implantationsraten spiegeln sich auch in den ermittelten Schwangerschaftsraten wider. Die beste Schwangerschaftsrate konnte auch hier mit 20,22% nach Vitrifikation erzielt werden. Durch Transfer der Embryonen im Punktionszyklus konnten bei 5.597 Zyklen 1.045 klinische Schwangerschaften entsprechend einer Schwangerschaftsrate von 18,6% erreicht werden. Auch bezogen auf die Schwangerschaftsrate zeigen sich nach „slow-rate freezing“ die schlechtesten Ergebnisse. In 986 Auftauzyklen wurden entsprechend einer Schwangerschaftsrate von 15,57% nur 153 klinische Schwangerschaften dokumentiert.

## **5. Lässt sich aus den Ergebnissen der zukünftige Stellenwert für die Kryokonservierung und die Vitrifikation im Vergleich zum Frischtransfer ableiten?**

Da durch das Embryonenschutzgesetz einerseits die Zahl der pro Zyklus transferierten Embryonen auf maximal 3 Embryonen beschränkt ist, zum anderen die Bestrebungen dahin gehen, die Zahl der transferierten Embryonen zu reduzieren, um das Risiko einer Mehrlingsschwangerschaft zu reduzieren, gewinnt die Kryokonservierung zunehmend an Bedeutung. Ziel ist es mit Hilfe einer Optimierung des Verfahrens die kumulative Schwangerschaftsrate pro Follikelpunktion zu steigern.

Die Anforderungen an das Verfahren liegen in einer möglichst hohen Überlebensrate der kryokonservierten 2 PN-Oozyten, einer hohen Implantations- sowie einer hohen Schwangerschaftsrate. Weiterhin sollte die Methode den Zeit-

und den personellen Aufwand möglichst gering halten und ein Höchstmaß an Sicherheit gewährleisten.

Da in Deutschland die Kosten der ART überwiegend von den Patienten selbst getragen werden müssen, ist auch der Kostenaufwand für die Behandlung von großer Bedeutung. Eine Steigerung der kumulativen Schwangerschaftsrate hat somit auch eine Kostenminderung für die Patienten zur Folge da durch den Wegfall einer neuerlichen ovariellen Stimulation im Kryozyklus ein großer Teil der Kosten entfällt.

In der vorliegenden Arbeit konnten für die Methode der Vitrifikation im Vergleich zum „slow-rate freezing“ deutlich bessere Ergebnisse für die Überlebensrate, die Implantationsrate und die Schwangerschaftsrate ermittelt werden (93,23% vs. 55,62%, 11,54 % vs. 7,15%, 20,22% vs. 15,57%) Da die Vitrifikation ohne den Einsatz eines speziellen Gerätes auskommt, scheint der Kostenaufwand für diese Methode im Vergleich geringer zu sein. Der zeitliche Aufwand der Kryokonservierung unterscheidet sich deutlich innerhalb der beiden Methoden. Die Vitrifikation nimmt einen Zeitraum von ungefähr 10 min in Anspruch während das „slow-rate freezing“ sich über einen Zeitraum von > 3h erstreckt. In Zusammenschau aller beurteilten Parameter überwiegen die Vorteile der Vitrifikation deutlich. Eine Verschiebung der Standardbehandlung hin zur Vitrifikation scheint also in Zukunft empfehlenswert.

Die Daten für die Implantationsrate und die Schwangerschaftsrate nach Vitrifikation zeigen auch im Vergleich zwischen Vitrifikation und Frisch-ET bessere Ergebnisse für die Vitrifikation (11,54% vs. 9,76% und 20,22% vs. 18,6%). Als mögliche Ursache hierfür ist die gezielte und verbesserte Vorbereitung des Endometriums im Kryozyklus zu diskutieren. Aufgrund der besseren Implantations- und Schwangerschaftsrate erscheint der Transfer einer geringeren Zahl von Embryonen im Frischzyklus und damit ein vermindertes Risiko einer Mehrlingsgravidität gerechtfertigt.

## 5. Diskussion

Seit der ersten Schwangerschaft nach Transfer zuvor kryokonservierter Embryonen 1983 (Trounson und Mohr 1983) hat die Kryokonservierung in der assistierten Reproduktion zunehmend an Bedeutung gewonnen. Neue Indikationen zur Durchführung einer Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen sind hinzugekommen und zeigen die Entwicklung vom experimentellen Stadium hin zur breiten Anwendung in der klinischen Routine. Dies geht auch deutlich aus den Daten des Deutschen IVF Registers hervor. Laut dem Deutschen IVF Register (2010) hat sich die Zahl der Transferzyklen nach vorheriger Kryokonservierung von Eizellen im Vorkernstadium in den Jahren 1998-2010 mehr als vervierfacht (4.616 vs. 18.939 Zyklen pro Jahr).

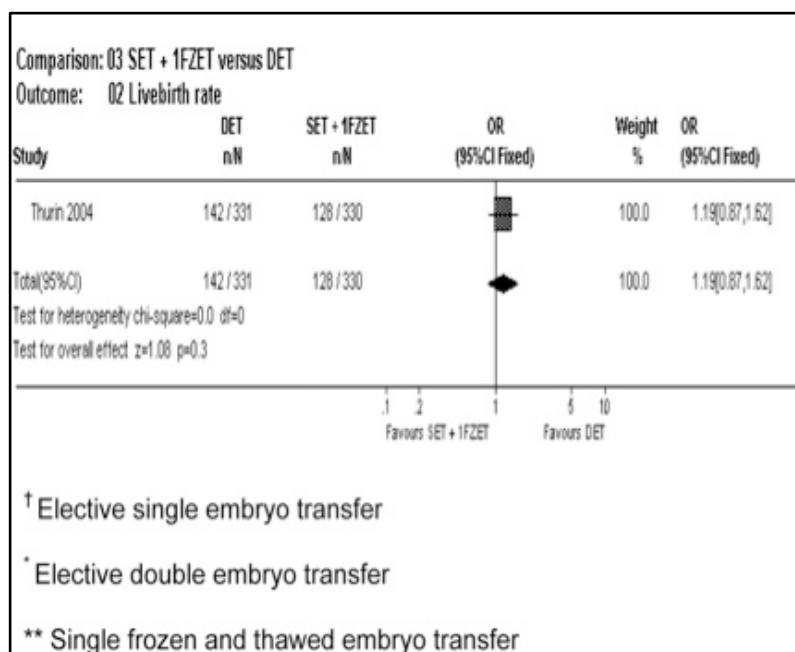
Die zunehmende Anwendung der Techniken der Kryokonservierung ergibt sich aus den vielfältigen Vorteilen, die die Behandlung für die Patientinnen mit sich bringt.

So können nach der gezielten ovariellen Stimulation gewonnene, überzählige imprägnierte Eizellen für einen späteren Transferzyklus konserviert werden. In diesem Transferzyklus kann dann auf eine Stimulationsbehandlung verzichtet werden, sodass nur eine Vorbereitung des Endometriums erforderlich wird. Hierdurch kann die Entwicklungsdesynchronisation bei IVF vermieden werden (Diedrich et al. 1998). Der Endometriumaufbau wird auf diese Weise dem Aufbau im Spontanzklus angeglichen und kann somit zu einer Verbesserung der Implantationsrate führen.

Zweitens kann durch die Steigerung der kumulativen Schwangerschaftsrate pro Follikelpunktion sowohl eine Kosten- als auch eine Morbiditätssenkung erreicht werden (Al-Hasani et al. 2007). Es ergibt sich für Patientinnen mit einem ovariellen Überstimulationssyndrom eine Verbesserung der Schwangerschaftschancen ohne das Risiko einer erneuten Stimulation (Kasum 2010). Bei Patientinnen mit einem drohenden OHSS kann nach Ovulationsauslösung mit einem GnRH-Agonisten und anschließender Kryokonservierung der Vorkernstadien eine Überstimulation in hohem Maße verhindert werden.

Drittens ist ein weiteres wichtiges Ziel der Kryokonservierung in der Reduktion des Risikos einer Mehrlingsgravidität zu sehen. Zwar steigt die Schwangerschaftsrate mit der Anzahl übertragener Embryonen, jedoch wird dieser vermeintliche Erfolg mit einer erhöhten Rate an Mehrlingsschwangerschaften erkauft, wie auch die Daten des Deutschen IVF Registers zeigen. So lag die Drillingsrate nach IVF nach Transfer von 3 Embryonen bei 4,46% (DIR 2010).

Pandian et al. konnten 2005 zeigen, dass bei gleicher Zahl der Embryonen das Mehrlingsrisiko reduziert werden kann, wenn die Zahl der transferierten Embryonen auf 1 Embryo pro Transfer begrenzt wird, die Rate der Lebendgeburten jedoch gleich bleibt (s. Abbildung 9). Die Kryokonservierung bietet hier die Möglichkeit, die überzähligen Embryonen für weitere Transferzyklen zu konservieren.



**Abbildung 9: Vergleich der Lebendgeburtenraten nach sET und 1FZET vs. dET**

Weiterhin besteht für Patientinnen mit einem Malignom durch Kryokonservierung von 2 PN-Oozyten oder ovariellern Gewebe die Möglichkeit einer Fertilitätsprotektion (Beyer et al. 2010).

Gerade diese Indikation zur Durchführung einer Kryokonservierung hat die Technik der Vitrifikation auch unter onkologischen Gesichtspunkten erneut in die

Diskussion gebracht. Die Auswirkungen einer malignen Erkrankung auf die Ovarialfunktion sind in den meisten Fällen direkt durch den Einfluß einer zytotoxischen Therapie bedingt. Hierdurch kommt es zu einer Atresie der heranreifenden Follikel, sodass diese nicht mehr zur Ovulation kommen. Aus diesem Grunde muß den Patientinnen angeboten werden, vor einer Chemotherapie Eizellen oder ovarielles Gewebe zu kryokonservieren.

Nach Empfehlung der Ethikkommission der Amerikanischen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin im Jahre 2005 ist die Aufklärung der Patienten über mögliche Fertilitätseinschränkungen der geplanten zytotoxischen Therapie mit konsekutiver Anbindung an ein reproduktionsmedizinisches Zentrum vor allem durch den Onkologen dringend erforderlich (Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2005).

Dieses breite Spektrum an Indikationen für die Durchführung einer Kryokonservierung verdeutlicht eindringlich die Notwendigkeit einer steten Verbesserung und Qualitätssicherung dieser Methodik. Insgesamt unterscheidet man zwischen zwei Methoden der Kryokonservierung: dem „slow-rate freezing“ und der Vitrifikation. Entscheidende Parameter zur Beurteilung der Qualität, der Reproduzierbarkeit und somit des Erfolges sind

- Überlebensrate der aufgetauten Pronucleusstadien,
- Implantations- und
- Schwangerschaftsrate.

Lange Zeit galt die Technik des „slow-rate freezing“ als Goldstandard der Kryokonservierung. In den letzten Jahren kam jedoch zunehmend die Technik der Vitrifikation zum Einsatz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Methodenvergleich von „slow-rate freezing“ und Vitrifikation.

Nach fast 6-jährigem routinemäßigem Einsatz der Technik der Vitrifikation in unserem Labor, liegen ausreichende Daten vor, die eine aussagekräftige und durch ihre Anzahl auch vergleichbare Analyse beider Methoden erlauben.

Schädigungen der Zellen werden im Rahmen des „slow-rate freezing“ durch intra- und extrazelluläre Kristallbildung, im Rahmen der Vitrifikation durch hohe Konzentrationen des Gefrierschutzmittels sowie durch Verunreinigungen durch direkten Kontakt zu dem flüssigen Stickstoff diskutiert (Fabbri et al. 2001, Bielanski et al. 2003). In einer Reihe von Publikationen sind die beiden derzeit gängigen Methoden der Kryokonservierung hinsichtlich der Überlebensraten, der Implantationsraten sowie der Anzahl der klinischen Schwangerschaften untersucht und beschrieben worden. In vielen dieser Arbeiten wird über die Kryokonservierung von Embryonen berichtet, welche in Deutschland jedoch durch das Embryonenschutzgesetz untersagt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Verbesserung der Überlebensrate der 2PN-Oozyten nach Vitrifikation im Vergleich zur Überlebensrate nach „slow-rate-freezing festgestellt werden (93% vs. 56%). Im Vergleich zu einer 3-jährigen Studie in unserer Klinik, die den Zeitraum 2004-2006 umfasste (Al-Hasani et al. 2007), konnte seither sogar eine Steigerung der Überlebensrate der 2 PN-Oozyten beobachtet werden (89% vs. 93%). Die Gründe für die Steigerung können zum Einen in der deutlich größeren Anzahl an ausgewerteten Zyklen ( 103 vs. 1.103) und zum anderen in der zunehmenden Erfahrung und Routine der Mitarbeiter in Durchführung der Methode liegen. Auch die weitere Entwicklung der Vorkernstadien nach dem Auftauen zeigte bessere Ergebnisse nach der Vitrifikation. So entwickelten sich aus den zuvor vitrifizierten aufgetauten 2 PN-Oozyten in 70,4% „ideale“ Embryonen, aus den mittels „slow-rate freezing“ konservierten und aufgetauten Vorkernstadien zu 66,7% „ideale“ Embryonen.

Loutradis et al. konnten in einer 2008 erstellten Metaanalyse von 5 Studien ebenfalls eine Überlegenheit von Vitrifikation zum „slow-rate freezing“ hinsichtlich der Überlebensrate sowohl für Vorkernstadien als auch für Blastozysten feststellen (OR 15,57 und OR 2,20). Auch Balaban und Mitarbeiter konnten in einer randomisierten Studie von insges. 466 kryokonservierten Embryonen, von denen 234 vitrifiziert und 232 mittels „slow-rate freezing“ konserviert wurden, eine verbesserte Überlebensrate der kryokonservierten Embryonen verzeichnen (94,8% vs 88,7%; Balaban et al. 2008).

Die Implantationsrate der Embryonen nach Vitrifikation stellt sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich sowohl zu derjenigen nach „slow-rate freezing“ als auch zu derjenigen im Frisch-ET mit deutlich besseren Ergebnissen dar (11,54 vs. 7,15 vs. 9,76).

Antinori et al. (2007) beobachteten nach dem Auftauen 330 zuvor vitrifizierter Metaphase-II-Oozyten eine Überlebensrate von 99,4%. Nach der Fertilisierung der Oozyten mittels ICSI wurden 295 Embryonen im 6- bis 8-Zell-Stadium transferiert. Hiernach wurde eine Implantationsrate von 13,2% beobachtet. Im Rahmen dieser Studie wurde ebenfalls der Frischtransfer von durchschnittlich 2,8 Embryonen pro Patientin bei insgesamt 248 Patientinnen ausgewertet. Auch hier zeigte sich, wie in der vorliegenden Arbeit, eine geringere Implantationsrate als nach Transfer zuvor vitrifizierter Eizellen (10,3% vs. 13,2%).

Smith et al. lieferten zur Frage der Überlebensraten der Zygoten nach Kryokonservierung 2010 einen weiteren wichtigen Beitrag. Die Gruppe führte eine prospektive Studie durch, um die Überlebensraten der imprägnierten Eizellen nach Kryokonservierung und die klinischen Schwangerschaftsraten zu untersuchen. Die imprägnierten Eizellen wurden hierzu in zwei Gruppen unterteilt, um entweder nach der Methode des „slow-rate freezing“ oder der Methode der Vitrifikation kryokonserviert zu werden. Insgesamt konnten 30 Auftauzyklen nach „slow-rate freezing“ (238 Zygoten) mit 48 Auftauzyklen nach Vitrifikation (349 Zygoten) untersucht werden. Die Arbeit von Smith et al. zeigte, dass die Überlebensraten der imprägnierten Eizellen nach Auftauvorgang bei Vitrifikation mit 84 % gegenüber 71% bei „slow-rate freezing“ höher waren ( $p < 0.001$ ). Weiterhin lag die klinische Schwangerschaftsrate in der Vitrifikationsgruppe mit 38% über einer 13% Schwangerschaftsrate nach „slow-rate freezing“. Auch diese Ergebnisse zeigten statistische Signifikanz. Smith et al. schlossen, dass die Vitrifikation eine effiziente Methode der Kryokonservierung mit reproduzierbaren Ergebnissen darstellt.

Obwohl auch diese Arbeit den Erfolg der Vitrifikation deutlich belegt, wird die wissenschaftliche Problematik deutlich. Die international uneinheitliche Gesetzgebung zur Reproduktionsmedizin spiegelt sich in den Studien wider. So nutzen die verschiedenen Zentren Embryonen oder 2 PN-Eizellen in Abhängigkeit

ihrer Möglichkeiten. Unbeantwortet bleibt daher die Frage nach dem Einfluss der Zellart auf Überlebens-, Implantations- und Schwangerschaftsrate. Tabelle 15 zeigt aktuelle und noch nicht abgeschlossene Studien zur Vitrifikation.

Eine weitere wichtige Frage ist die nach einer möglichen Abhängigkeit der Überlebensrate der 2 PN-Eizellen von Faktoren wie dem Alter der Patientin und ihrem Gewicht. Wir führten hierzu eine multinomiale logistische Regressionsanalyse durch.

Insgesamt konnten wir in unserem Kollektiv keine Abhängigkeit der Überlebensrate der 2PN Eizellen nach Vitrifikation von den untersuchten Faktoren nachweisen. Ein möglicher Grund mag daran liegen, dass diese Faktoren nicht in vitro, sondern nur in vivo in Bezug auf Implantation und Schwangerschaftsrate eine Rolle spielen. Beyer et al. konnten 2010 diesen Zusammenhang in ihrer Arbeit durch eine Regressionsanalyse belegen. Hierbei wurde die klinische Schwangerschaftsrate untersucht. Besonders das Alter der Patienten zeigte einen signifikanten Einfluss auf die klinische Schwangerschaftsrate (Beyer et al. 2010).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Kinderwunschbehandlung mit Kryotransfer durch Vitrifikation unter den beschriebenen Kriterien gute und reproduzierbare Überlebens-, Implantations- und Schwangerschaftsraten erzielt. Hierbei können wir Ergebnisse anderer Studiengruppen bestätigen. Insgesamt schauen wir heute auf eine uneinheitliche Studienlage bezogen auf die untersuchten Parameter, was jedoch hauptsächlich durch international unterschiedliche Gesetzeslagen bedingt ist. In unserem reproduktionsbiologischen Labor hat sich der Wechsel von der Methode des „slow-rate freezing“ hin zur Vitrifikation als Goldstandard bereits vollzogen. Es bleibt abzuwarten, welchen Rückhalt die Vitrifikation international findet.

<b>Autor, NCT-Nummer</b>	<b>Zeitraum</b>	<b>Englischer Titel</b>	<b>Deutsche Erläuterung</b>
Hershlag et al. NCT01232972	Oktober 2010 bis Dezember 2020	„Oocyte cryopreservation“	einarmige Untersuchung der Schwangerschaftsrate nach Vitrifikation/Auftauvorgang von 2 PN Eizellen nach IVF/ICSI
Scott et al. NCT01223118	August 2010 bis August 2013	“Evaluation of the impact of vitrification on the reproductive performance and potential of human oocytes”	Zweiarmige Studie, Frischtransfer und Kryotransfer nach Vitrifikation/ Auftauvorgang nach IVF/ICSI, in beiden Armen Durchführung der Präimplantationsdiagnostik
Beyer et al. NCT01088425	März 2010 bis März 2017	“Maternal pregnancy and neonatal outcome after assisted reproduction. comparison of vitrification vs. spontaneous conception”	Zweiarmige Studie, Vitrifikation/Auftauvorgang von 2 PN Eizellen, Zellüberlebensraten, Schwangerschaftsraten, prä- und postnatale Entwicklung im Vergleich zur Spontankonzeption

**Tabelle 16: Übersicht über aktuelle noch nicht abgeschlossene Studien zur Vitrifikation (aus „clinicaltrials.gov“; der US- Amerikanischen Datenbank für klinische Studien).**

## 7.Zusammenfassung

Seit der Geburt des ersten Kindes nach In-vitro-Fertilisation (IVF) und nachfolgendem Embryotransfer (ET) 1978 werden vermehrt Techniken der assistierten Reproduktion (ART) eingesetzt (Stephoe und Edwards, 1978, Edwards und Steptoe,1981). Im Jahr 2010 wurden in Deutschland 77.904 Behandlungszyklen durch das Deutsche IVF-Register dokumentiert (DIR 2010). In diesem Zusammenhang haben auch die Verfahren der Kryokonservierung an Bedeutung gewonnen. Trounson und Mohr berichteten 1983 über die erste Schwangerschaft nach Kryokonservierung und Wiederauftauen eines 8-zelligen Embryos. Die erste Geburt eines Kindes nach Kryokonservierung und Wiederauftauen des Embryos konnten Zeilmaker et al. 1984 verzeichnen. Seither etablierten sich die Verfahren der Kryokonservierung in der klinischen Routine zunehmend.

Vorteile der Kryokonservierung liegen in einer Steigerung der Schwangerschaftsrate pro Follikelpunktion, der Senkung der Behandlungskosten sowie einer Verminderung der psychischen und physischen Belastung der Patientinnen. Des weiteren können auf diese Weise Eizellen bei einer drohenden ovariellen Überstimulation (OHSS) erhalten werden, in einem spontanen oder leicht stimulierten Zyklus transferiert und so auch die Entwicklungsdesynchronisation bei IVF vermieden werden (Diedrich et al. 1998).

Lange Zeit galt die Technik des langsamen Gefrierens, des „slow-rate freezing“ als Methode der Wahl. Hierbei werden die Zellen mit niedrigen Kühlraten von 0,3°C/Minute bis zu 0,5°C/Minute abgekühlt. Um die Bildung von intrazellulären Eiskristallen zu vermindern, werden die Zellen mit Hilfe eines Kryoprotektivums dehydriert. Nachteile dieses Verfahrens sind in dem hohen Zeitaufwand, den hohen Kosten durch den Einsatz teurer, computergesteuerter Geräte und der Gefahr physikalischer Schädigungen der Zelle durch intrazelluläre Eiskristallbildung zu sehen (Zech et al. 2002). In den letzten Jahren kam es zu einem zunehmenden Einsatz des Verfahrens der Vitrifikation. Diese ultrarapide

Einfriermethode ermöglicht das kristallisationsfreie Einfrieren biologischen Materials ohne Anwendung programmierbarer Einfriergeräte. Hierbei wird die Zelle sehr hohen Konzentrationen eines oder mehrerer Kryoprotektiva ausgesetzt und durch sehr hohe Kühlraten von  $-15.000^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$  bis zu  $-30.000^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$  extrem schnell auf eine Temperatur von  $-196^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Es kommt dabei zu einer extremen Zunahme der Viskosität der Vitrifikationslösung, sodass die Zelle direkt in einen amorphen, glasartigen Zustand übergeht. In einer retrospektiven Auswertung reproduktionsbiologischer und klinischer Daten von 245 Patientinnen der Sterilitätssprechstunde der Universitätsfrauenklinik Lübeck konnte eine Überlegenheit der Vitrifikation hinsichtlich der Überlebensrate der Vorkernstadien, einer höheren Anzahl idealer Embryonen pro Transfer sowie einer besseren Implantationsrate gezeigt werden (Schultze-Mosgau 2007).

In der vorliegenden Arbeit soll nun überprüft werden, ob diese Ergebnisse auch über einen längeren Beobachtungszeitraum für ein deutlich größeres Patientenkollektiv reproduzierbar sind und sich daraus neue Empfehlungen für die Kryokonservierung ergeben.

Es handelt sich um eine retrospektive Auswertung der reproduktionsbiologischen Daten der Patientinnen, die sich in dem Zeitraum von 1998-2010 in der Kinderwunschsprechstunde der Universitätsfrauenklinik Lübeck in Behandlung befanden. Des Weiteren werden in der Arbeit auch die Behandlungskosten sowie der zeitliche Aufwand der beiden Methoden herausgearbeitet und miteinander verglichen.

Im Rahmen der Dissertation werden die Daten der Patientinnen, deren Eizellen mittels „slow-rate freezing“ kryokonserviert wurden, mit denen der Patientinnen, bei denen die Kryokonservierung der Vorkernstadien mittels Vitrifikation erfolgte miteinander verglichen und Unterschiede bzgl. der Überlebensraten der Vorkernstadien, des Verhältnisses idealer/nicht idealer Embryonen, der Implantationsrate sowie der Anzahl der klinischen Schwangerschaften herausgestellt. Die Slow-cooling-Gruppe umfasst 986 Auftauzyklen in dem Zeitraum vom 01.01.1998 bis zum 31.12.2004. Die Vitrifikationsgruppe umfasst 1103 Auftauzyklen in dem Zeitraum 15.06.2005 bis 31.12.2010. Abschließend

wurden die Implantationsrate und die Anzahl der klinischen Schwangerschaften der beiden Kryokonservierungsgruppen mit denen nach Transfer frischer Embryonen verglichen. Diese Daten umfassen 5597 Zyklen in einem Zeitraum von 12 Jahren (1998 -2010).

Hinsichtlich der Überlebensrate der kryokonservierten Vorkernstadien zeigt sich eine signifikant bessere Überlebensrate der zuvor vitrifizierten Eizellen gegenüber den nach der „slow-rate freezing“ Methode konservierten Eizellen (93,23% vs. 55,62%).

Auch für die Implantationsrate zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Methoden [11,54% (V) vs. 7,15 (SK)]. Vergleicht man die Implantationsrate nach Vitrifikation mit derjenigen nach Transfer der frischen Embryonen stellt sich hier ein signifikanter Unterschied zu Gunsten der Vitrifikation dar [9,76%(F-ET) vs. 11,54%(V)]. Bei der Rate der klinischen Schwangerschaften bezogen auf die Behandlungszyklen schneidet die „slow-rate freezing“-Gruppe deutlich schlechter als die beiden Vergleichsgruppen ab [15,5% (SK) vs. 21,1% (V) vs. 18,6% (F-ET)]. Auch hier zeigen sich bessere Ergebnisse für die Vitrifikation als für den Frisch-ET.

Unter Berücksichtigung aller beurteilten Parameter erscheint die Vitrifikation den Anforderungen, die an die Methode der Kryokonservierung gestellt werden, besser zu entsprechen als das „slow-rate freezing“. Eine Verschiebung des Goldstandards zu Gunsten der Vitrifikation sollte daher in Erwägung gezogen werden.

## 8. Literaturverzeichnis

Albano C, Felberbaum R, Smitz J, Riethmüller-Winzen H, Engel J, Diedrich K, Devroey P (2000) Controlled ovarian stimulation with HMG: Results of a prospective randomized phase III European study comparing the GnRH-antagonist Cetrorelix (Cetrotide) and the GnRH-agonist Buserelin. Hum Reprod. 15:526-531

Al-Hasani S, Trotnow S, Köhnlein M (1983) Kryokonservierung von Mäuseembryonen nach dem Zweistufen-Verfahren im automatisierten "Offenen System" Zuchthygiene 18: 7-13

Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H (1987) Cryopreservation of human oocytes. Hum Reprod 1, 695-700

Al-Hasani S, Küpker W, Baschat AA et al. (1995) Mini-Swim-Up: a new technique of sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet 12: 1-6

Al-Hasani S., Ludwig M (1996) Kryokonservierung von Oozyten im Vorkernstadium. Gynäkologe 29: 474-486

Al-Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A (2007a) Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? RBMOonline 14: 288-293

Al-Hasani S, Ozmen B (2007b) Vitrification The slow revolution of rapid freezing. Focus on Reproduction 2:22-23

Ali Mansoori G (1975) Kinetics of water loss from cells at subzero centigrade temperatures. Cryobiology 12: 34-45

Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S (2007) Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. Reprod Biomed Online 14: 72-79

Arce JC (2006) interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Hum Reprod.* 21 (8):2141-2148

Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larmann MG, Hamilton R, Gardner DK (2008) A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum. Reprod.* 23: 1976-1982

Barnett RE (1978) The effects of dimethyl sulphoxide and glycerol on Na-K-ATPase and membrane structure. *Cryobiology* 15: 227-229

Beyer DA, Amari F, Kavallaris A, Al Hasani S, Diedrich K (2010) Fertilitätserhalt bei Patienten mit malignen Erkrankungen. *Onkologe* 16:1009-1020

Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. (2003) Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 46(2):146-52.

Burgus R, Butcher M, Amoss M et al. (1972) Primary structure of ovine hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Proc Natl Acad Sci USA* 69:278-282

Chang MC (1947) Normal development of fertilized rabbit ova stored at a low temperature of several days. *Nature* 159:602-603

Chang MC (1948) Transplantation of fertilized rabbit ova: the effect on viability of age, in vitro storage period and storage temperature. *Nature* 161:978

Chen C 1986 Pregnancy after human oocytes cryopreservation, *Lancet* 1, 884-886

Deutsches IVF Register – DIR (2010) Jahrbuch des Deutschen IVF Registers 2010. [[www.deutsches-ivf-register.de](http://www.deutsches-ivf-register.de)]

Diedrich K, Weiss J.M., Felberbaum R(1998) In-vitro-Fertilisation. In: Diedrich K (Hrsg) *Weibliche Sterilität Ursachen, Diagnostik und Therapie*, 1.Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 384-404

Diedrich K, Felberbaum R, Griesinger G, Hepp H, Kreß H, Riedel U (2008) Reproduktionsmedizin im internationalen Vergleich. Gutachten im Auftrag der Friedrich-Ebert-Stiftung. Friedrich-Ebert-Stiftung, Berlin, S. 8-32

Edwards RG, Steptoe PC (1981) Test tube babies. *Nature (London)* 293: 253

Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS et al. (2000) Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 15: 905-910

Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2005) Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril* 83: 1622-1628

Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C.(2001) Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod.*16(3):411-6.

Fahy GM, McFarlane DR, Angell CA et al. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21 407-426

Feichtinger W (1991) Environmental factors and fertility. *Hum Reprod* 6:1170-1175

Felberbaum RE, Reissmann T, Küpker W, Bauer O, Al-Hasani S, Diedrich C, Diedrich K (1995) Fertilization rate and amount of human menopausal gonadotropin needed in controlled ovarian hyperstimulation under low-dose gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. *Hum Reprod* 10:8

Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ et al. (1988) Fertilization of human oocytes by sperm of infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 50:68-73

Griesinger G (2006) Optimierung der ovariellen Stimulation zur IVF im GnRH-Antagonisierten Protokoll, Med Habil Schr Univ Lübeck

Hoepfner A-S, Bals-Pratsch M, Diedrich K (2000) Höhere Erfolgsrate beim Kryotransfer im künstlichen Zyklus mit transdermaler Östradiol- und vaginaler

Progesterongabe als in stimulierten Zyklen. J Fertil Reprod 10, 8-13.

Holte J. et al. (2007) Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. Hum Reprod. 22 (2): 548-557

Horne G, Critchlow JD, Newman MC, Edozien L, Matson PL, Liebermann BA (1997) Aprospective evaluation of cryopresrvation strategies in a two-embryo transfer programme. Hum Reprod 12: 542-547

Kasai M, Mukaida T (2004) Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. Reprod Biomed Online 9, 164-170

Kasum M (2010) New insights in mechanisms for development of ovarian hyperstimulation syndrome. Coll Antropol. 34:1139-43

Küpker W, Al-Hasani S, Bauer O, Diedrich K (1994) Neue Techniken der assistierten Befruchtung. Fertilität 10: 216-220

Küpker W, Al-Hasani S, Diedrich K (1998) Moderne Techniken der assistierten Reproduktion. In: Bender HG, Diedrich K, Künzel W, Endokrinologie und Reproduktionsmedizin III. 4.Aufl.,287-292, Urban & Schwarzenberg, München

Kuleshova LL, Gianaroli L, Magli C (1999) Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. Human Reprod 14:3077-3079

Kuwayama M, Hamano S, Nagai T (1992) Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro.. Journal of Reproduction and Fertility 96, 187-193

Kuwayama M (2001) Vitrification of human oocytes and embryos. IVF update. Tokyo medical view Co: 230-234 (in Japanese)

Lane M, WilliamB, Schooldraft MD(1999) Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique Fertil Steril : 72

1073-1078

Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z (1988) A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril*. 49(5):835-42.

Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H et al. (1987) Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril* 48:637

Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC (1974) Factores affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res* 89: 79-88

Leibo SP, Mazur P (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel JC *Methods in mammalian reproduction*. 178-201, academic Press, New York

Loumaye E (1990) The control of endogenous secretion of LH by gonadotropin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilisation and embryo transfer. *Hum Reprod* 5:557-576

Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC (2008) Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 90:186-193

Lovelock JE (1953) The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10: 414-426

Lovelock JE (1954) Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. *Proc Soc Med* 47: 60-62

Ludwig M, Al-Hasani S, Küpker W, Diedrich K (1998) Kryokonservierung menschlicher Eizellen im Pronukleusstadium: Prinzipien und Ergebnisse. In: Diedrich K, *Weibliche Sterilität Ursachen, Diagnostik und Therapie*. 1. Aufl., 623-629, Springer, Berlin Heidelberg New York

Luyet B, Rapatz G (1970) A review of basic researches on the cryopreservation of red blood cells. *Cryobiology* 6:425-481

Mauerer RR, Hasemann JK (1976) Freezing morula stage rabbit embryos. *Biol Reprod* 14:256-263

Mazur P (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 47:347

Mazur P (1970) Cryobiology. The freezing of biological systems. *Science* 168:939-949

McGann LE (1978) Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology* 15: 382-390

Meryman HT (1956) Mechanism of freezing in living cells and tissues. *Science* 124:515

Muasher SJ, Jones HW (1993) Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 59: 1202-1207

Nakagata N(1989) High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 87:479-483

Nawroth F, Montag M, Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, van der Ven H, Liebermann J (2005) Die Vitrifikation -Eine rationelle und effektive Alternative Zur programmierten langsamen Kryokonservierung im humanen reproduktionsmedizinischen Labor. *Frauenarzt* 46: 214-218

Pak S-J, Warlich J, van Roij TNM (2001) RecDate- eine IT-Lösung für die Dokumentation und Qualitätssicherung reproduktionsmedizinischer Behandlungen. *Zentralblatt für Gynäkologie* 123:482-486

Palermo G, Joris H, Devroey P et al. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic

injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340:17

Pandian Z, Templeton A, Serour G, Bhattacharya S (2005) Number of embryos for transfer after IVF and ICSI: a Cochrane review. Hum Reprod 20(10): 2681-2687

Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration of low temperatures. Nature (London) 164:666

Polge C, Lovelock JE (1952) Preservation of bull semen at -79°C. Vet Rec 64:396

Polge C, Wiladsen SM (1978) Freezing eggs and embryos of farm animals. cryobiology 1:370-373

Rall WF, Fahy GM (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature 313:573-575

Schill T, Strik D, Germer U Sterilität und Infertilität In: Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-TM, Weiss JM (2000) Gynäkologie und Geburtshilfe, 1. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 115-120

Schmutzler RK, Diedrich K (1990) Basic clinical aspects of GnRH-agonists in reproduction. Int J Gynec Obstet 32:311-324

Schultze-Mosgau A (2007) Stellenwert der Vitrifikation und der klassischen Einfriermethode von humanen Vorkernstadien in der Reproduktionsmedizin, Med Habil Schr Univ Lübeck

Senn A, Vozzi C, Chanson A, De Grandi P, Germond M (2000) prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. Fertil Steril 74: 946-952

ShawJM, Kuleshova LL, MacFarlane DR et al.(1997) Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. cryobiology 35: 219-229

Sjöblom P et al. (2006) Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril*. 86(4): 848-861

Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J (2010) Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 94: 2008-2095

Steck T. (2001) Kryokonservierung. In: Steck T.: Praxis der Fortpflanzungsmedizin; Manual für Praxis, Klinik und Labor. Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart. 252-278.

Stephoe PC, Edwards RG (1978) Birth after reimplantation of an human embryo. *Lancet* 11: 366

Testart J, Lasalle B, Belaisch-Allard J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R (1986). High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 46: 281–72.

Trounson A, Mohr L (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305:707

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998) Open pulled straw (OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51: 53-58

Van der Vorst M, Van der Zwalmen P, Standaart V (2001) Blastocyst transfer after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Hum Reprod* 16: 153-154

Vanderzwalmen P, Riedlerl, Stecher A, Zech H, Zech N (1998) Vitrifikation von humanen Embryonen in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium. *J Fertil Reprod* 8: 20-26

Van Verooij GEPM, Aertsen AMHJ, Hax WMA, Ververgaert PHJT, Verhoeven JJ, Van der Vorst HA (1975) Freeze-teching:freezing velocity and crystal size at different locations in samples. *Cryobiology* 12: 46-61

Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS (2005) Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 6:209-218

Weig M (2009) Der Einfluß des endogenen LH-Spiegels auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in einem künstlichen Zyklus mit Transfer zuvor kryokonservierter Eizellen im Rahmen der assistierten Reproduktion, Inauguraldissertation Univ Lübeck

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-296^{\circ}\text{C}$ . *Science* 178:411-414

Whittingham DG (1976) Low temperature storage of mammalian embryos. In: Mühlbock O (ed) *Proc workshop on basic aspects of freeze preservation of mouse strains*. Fischer, Stuttgart, 45-55

Whittingham DG (1977a) Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In: Elliott K, Whealan J (eds) *The freezing of mammalian embryos*. Ciba Foundation Symp 52 (new ser). Elsevier Amsterdam, North-Holland, pp 97-110

Whittingham DG(1977b) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J Reprod Fertil* 49:89-94

Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee H, Halsey JA (1979) Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J Reprod Fertil* 56:11-21

Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moore RM (1974) Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology* 11: 560 (Abstr)

Willadsen SM (1980) Deep freezing of embryos in the large domestic species. *Proc 9th Int Congr Anim Reprod and A.I., Madrid* 2: 255-261

Wilmut I (1972) The low temperature preservation of mammalian embryos. *J Reprod Fertil* 31:513-514

Wilmut I, Rowson LEA (1973) Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vect Rec* 92:686-690

World Health Organization - WHO (1999) WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion, 4.Aufl., Springer Berlin Heidelberg New York

Zech N, Vanderzwalmen P, Stecher A, Zech H (2002) Vitrifikation von der Eizelle bis zur Blastozyste. *J Fertil Reprod* 12:13-18

Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I, Rijkmans C, Drogendijk AC (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 42:293

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Patientenkollektiv .....	22
Abbildung 2: ovarielle Stimulation nach dem GnRH-Antagonisten Protokoll.....	26
Abbildung 3: Ovarielle Stimulation nach dem GnRH-Agonisten-Protokoll, „LH add back“ unter Studienbedingungen .....	27
Abbildung 4: Stickstofftank und "straw" zur Konservierung der Pronukleusstadien .....	32
Abbildung 5: Vitrifikationsprotokoll .....	33
Abbildung 6: a) Eizelle im Vorkernstadium nach Kryokonservierung und Erwärmung und b) 24 h nach erfolgter Teilung .....	36
Abbildung 7: Beurteilung der Embryoqualität modifiziert n. Holte 2007 .....	40
Abbildung 8: Transferkatheter .....	41
Abbildung 9: Vergleich der Lebendgeburtenraten nach sET und 1FZET vs. dET.....	58

## 10.Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Ein- und Ausschlußkriterien.....	23
Tabelle 2	Erhobene Daten.....	25
Tabelle 3	Einfrierprotokoll „ Lübecker Protokoll“ (n. AlHasani 1996).....	31
Tabelle 4	Zusammensetzung der bei der Kryokonservierung verwendeten Lösungen.....	34
Tabelle 5	Zusammensetzung der beim Auftauen verwendeten Lösungen.....	38
Tabelle 6	Demographische Variablen.....	43
Tabelle 7	Ursachen der Infertilität.....	44
Tabelle 8	Reproduktionsbiologische Variablen 1 a.....	45
Tabelle 9	Reproduktionsbiologische Variablen 1 b.....	46
Tabelle 10	Reproduktionsbiologische Variablen 2.....	47
Tabelle 11	Transferierte Embryonen im F-ET.....	48
Tabelle 12	Zeitlicher Verlauf des Einfrierens, Vergleich Vitrifikation und „slow- rate-freezing“.....	49
Tabelle 13	Zeitlicher Verlauf des Auftauens, Vergleich Vitrifikation und „slow- Rate-freezing“.....	50
Tabelle 14	Kosten für die IVF- und ICSI-Behandlung pro Behandlungszyklus..	51
Tabelle 15	Kosten für die Kryokonservierung und den nachfolgenden Embryotransfer.....	52
Tabelle 16	Übersicht über aktuelle noch nicht abgeschlossene Studien zur Vitrifikation (aus „clinicaltrials.gov“; der US- Amerikanischen Datenbank für klinische Studien).....	62

## 11. Abkürzungen

<b>AK</b>	Antikörper
<b>ART</b>	assistierte Reproduktion(stechniken)
<b>BMI</b>	„body mass index“
<b>C</b>	Celsius
<b>COC</b>	Cumulus-Oozyten-Komplexe
<b>COH</b>	kontrollierte ovarielle Hyperstimulation
<b>d</b>	Tag
<b>DIR</b>	Deutsches IVF Register
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>dET</b>	Transfer von 2 Embryonen („double embryo transfer“)
<b>DSS</b>	Dextran Serum Supplement
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EG</b>	Ethylenglykol
<b>ES</b>	Äquibrierungslösung
<b>EschG</b>	Embryonenschutzgesetz
<b>ET</b>	Embryotransfer
<b>F-ET</b>	Transfer frischer Embryonen
<b>1FZET</b>	single frozen and thawed embryo transfer
<b>FSH</b>	follikelstimulierendes Hormon
<b>GnRH</b>	„gonadotropin releasing hormone“
<b>Gy</b>	Gray
<b>h</b>	Stunde
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
<b>HMG</b>	humanes menopausales Gonadotropin
<b>hCG</b>	humanes Choriongonadotropin
<b>ICSI</b>	intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion
<b>IE=IU</b>	Internationale Einheiten
<b>IVF</b>	In-vitro-Fertilisation
<b>IVM</b>	In-vitro-Maturation
<b>J</b>	Jahre
<b>LH</b>	luteinisierendes Hormon
<b>LN<sub>2</sub></b>	flüssiger Stickstoff

<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>n</b>	Anzahl
<b>N<sub>2</sub></b>	Stickstoff
<b>OHSS</b>	ovarielles Hyperstimulationssyndrom
<b>OPS</b>	„open pulled straw“
<b>PCO</b>	polyzystische Ovarien
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PKD</b>	Polkörperdiagnostik
<b>PPD</b>	Propandiol
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>recFSH</b>	rekombinantes follikelstimulierendes Hormon
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.c.</b>	subcutan
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>sec.</b>	Sekunden
<b>sET</b>	Einzel-Embryotransfer („single embryo transfer“)
<b>SK</b>	„slow cooling“
<b>tgl.</b>	täglich
<b>V</b>	Vitrifikation
<b>2VK=2PN</b>	Eizelle im Vorkernstadium
<b>VS</b>	Vitrifikationslösung
<b>vs.</b>	versus
<b>WHO</b>	World-Health-Organization

# 12. Anhang

## UKL UNIVERSITÄRES KINDERWUNSCHZENTRUM LÜBECK

PROF. DR. KLAUS DIEDRICH PD DR. ASKAN SCHULTZE-MOSGAU PD DR. GEORG GRIESINGER DR. MARION DEPENBUSCH

### Protokoll zum Schleimhautaufbau bei „Kryotransfer“ mit Estradot®

Im Folgenden haben wir Ihnen den Behandlungsplan für Ihren „Kryotransfer“ zusammengestellt. Wenn Unklarheiten auftreten, rufen Sie uns bitte an. Beginnen Sie bitte **ab dem ersten Zyklustag (erster Tag Ihrer Regelblutung) mit den Hormonpflastern**. Die Dosierung der Medikamente entnehmen Sie bitte der Tabelle. Vor Übertragung der Embryonen ist an Tag 14 oder 15 (kein Sonntag) eine Ultraschall- und Blutuntersuchung erforderlich. Dazu melden Sie sich bitte frühzeitig telefonisch **unter 0451 – 500 4418** an. Der Embryotransfer findet individuell unterschiedlich ca. ab dem 16. Zyklustag statt.

Zyklustag	Estradot® 100 Pflaster jeden 2. Abend aufkleben und belassen, bis neues Pflaster geklebt wird	1 Crinone®-Gel jeweils <b>abends</b> vaginal einführen	Kinderwunschsprechstunde
1	1 Pflaster		
2			<b>Terminvereinbarung zum Ultraschall an Tag 14 oder 15</b>
3	1 Pflaster		
4			
5	1 Pflaster		
6			
7	2 Pflaster		
8			
9	2 Pflaster		
10			
11	4 Pflaster		
12			
13	4 Pflaster		
14/15			<b>An einem der Tage Ultraschall + Blutentnahme zwischen 7.00 und 9.00 Uhr in der Kinderwunschsprechstunde</b>
15	3 Pflaster	1x1 abends	<b>Wichtig: Beginnen Sie Crinone immer nur nach dem Ultraschall und ärztlicher Anordnung !</b>
16	3 Pflaster	1x1 abends	<b>Neu: Sie erhalten einen Anruf, wenn das Auftauen nicht erfolgreich gewesen sein sollte</b>
17		1x1 abends	<b>Uni Lübeck: Embryo-Transfer, dazu auf Station 18 melden, Termin wie vereinbart</b>
18	2 Pflaster	1x1 abends	

Jetzt Estradot® 2 Pflaster jeden 2. Tag und Crinone®-Gel 1x täglich fortsetzen bis zum Schwangerschaftstest

<b>12-14 Tage nach dem Transfer</b>	2 Pflaster	1x1 abends	<b>Uni Lübeck: Blutuntersuchung (Schwangerschaftstest) und Rückruf durch uns zur Ergebnisbesprechung im Rahmen der Telefonsprechstunde zwischen 12-15 Uhr</b>
-------------------------------------	------------	------------	---

Das Ergebnis des Schwangerschaftstests besprechen wir mit Ihnen telefonisch im Rahmen eines Rückrufes der Telefonsprechstunde **zwischen 12-15.00 Uhr**:

- Wenn der **Schwangerschaftstest positiv** ist, werden die Medikamente über etwa 8 Wochen fortgesetzt, um das Risiko für eine Fehlgeburt zu reduzieren.
- Bei **negativem Schwangerschaftstest** werden die Medikamente einfach abgesetzt und es tritt in den nächsten Tagen eine Regelblutung ein. Wenn noch befruchtete Eizellen eingefroren sind, können Sie direkt wieder mit dem nächsten Übertragungszyklus anfangen.

Estradot 100 N3 + 2xN1 (40 Stück) Crinone 8% Vaginalgel N2 (24 Stück)

# Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG)

ESchG

Ausfertigungsdatum: 13.12.1990

Vollzitat:

"Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (BGBl. I S. 2228) geändert worden ist"

**Stand:** zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 21.11.2011 | 2228

## Fußnote

(+++ Textnachweis ab: 1.1.1991 +++)

## § 1 Mißbräuchliche Anwendung von Fortpflanzungstechniken

(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer

1. auf eine Frau eine fremde unbefruchtete Eizelle überträgt,
2. es unternimmt, eine Eizelle zu einem anderen Zweck künstlich zu befruchten, als eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen, von der die Eizelle stammt,
3. es unternimmt, innerhalb eines Zyklus mehr als drei Embryonen auf eine Frau zu übertragen,
4. es unternimmt, durch intratubaren Gametentransfer innerhalb eines Zyklus mehr als drei Eizellen zu befruchten,
5. es unternimmt, mehr Eizellen einer Frau zu befruchten, als ihr innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen,
6. einer Frau einen Embryo vor Abschluß seiner Einnistung in der Gebärmutter entnimmt, um diesen auf eine andere Frau zu übertragen oder ihn für einen nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck zu verwenden, oder
7. es unternimmt, bei einer Frau, welche bereit ist, ihr Kind nach der Geburt Dritten auf Dauer zu überlassen (Ersatzmutter), eine künstliche Befruchtung durchzuführen oder auf sie einen menschlichen Embryo zu übertragen.

(2) Ebenso wird bestraft, wer

1. künstlich bewirkt, daß eine menschliche Samenzelle in eine menschliche Eizelle eindringt, oder
  2. eine menschliche Samenzelle in eine menschliche Eizelle künstlich verbringt,
- ohne eine Schwangerschaft der Frau herbeiführen zu wollen, von der die Eizelle stammt.

(3) Nicht bestraft werden

1. in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 1, 2 und 6 die Frau, von der die Eizelle oder der Embryo stammt, sowie die Frau, auf die die Eizelle übertragen wird oder der Embryo übertragen werden soll, und
2. in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 7 die Ersatzmutter sowie die Person, die das Kind auf Dauer bei sich aufnehmen will.

(4) In den Fällen des Absatzes 1 Nr. 6 und des Absatzes 2 ist der Versuch strafbar.

## § 2 Mißbräuchliche Verwendung menschlicher Embryonen

(1) Wer einen extrakorporal erzeugten oder einer Frau vor Abschluß seiner Einnistung in der Gebärmutter entnommenen menschlichen Embryo veräußert oder zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck abgibt, erwirbt oder verwendet, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer zu einem anderen Zweck als der Herbeiführung einer Schwangerschaft bewirkt, daß sich ein menschlicher Embryo extrakorporal weiterentwickelt.

(3) Der Versuch ist strafbar.

### **§ 3 Verbotene Geschlechtswahl**

Wer es unternimmt, eine menschliche Eizelle mit einer Samenzelle künstlich zu befruchten, die nach dem in ihr enthaltenen Geschlechtschromosom ausgewählt worden ist, wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft. Dies gilt nicht, wenn die Auswahl der Samenzelle durch einen Arzt dazu dient, das Kind vor der Erkrankung an einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne oder einer ähnlich schwerwiegenden geschlechtsgebundenen Erbkrankheit zu bewahren, und die dem Kind drohende Erkrankung von der nach Landesrecht zuständigen Stelle als entsprechend schwerwiegend anerkannt worden ist.

### **§ 3a Präimplantationsdiagnostik; Verordnungsermächtigung**

(1) Wer Zellen eines Embryos in vitro vor seinem intrauterinen Transfer genetisch untersucht (Präimplantationsdiagnostik), wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Besteht auf Grund der genetischen Disposition der Frau, von der die Eizelle stammt, oder des Mannes, von dem die Samenzelle stammt, oder von beiden für deren Nachkommen das hohe Risiko einer schwerwiegenden Erbkrankheit, handelt nicht rechtswidrig, wer zur Herbeiführung einer Schwangerschaft mit schriftlicher Einwilligung der Frau, von der die Eizelle stammt, nach dem allgemein anerkannten Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik Zellen des Embryos in vitro vor dem intrauterinen Transfer auf die Gefahr dieser Krankheit genetisch untersucht. Nicht rechtswidrig handelt auch, wer eine Präimplantationsdiagnostik mit schriftlicher Einwilligung der Frau, von der die Eizelle stammt, zur Feststellung einer schwerwiegenden Schädigung des Embryos vornimmt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Tot- oder Fehlgeburt führen wird.

(3) Eine Präimplantationsdiagnostik nach Absatz 2 darf nur

1. nach Aufklärung und Beratung zu den medizinischen, psychischen und sozialen Folgen der von der Frau gewünschten genetischen Untersuchung von Zellen der Embryonen, wobei die Aufklärung vor der Einholung der Einwilligung zu erfolgen hat,
2. nachdem eine interdisziplinär zusammengesetzte Ethikkommission an den zugelassenen Zentren für Präimplantationsdiagnostik die Einhaltung der Voraussetzungen des Absatzes 2 geprüft und eine zustimmende Bewertung abgegeben hat und
3. durch einen hierfür qualifizierten Arzt in für die Präimplantationsdiagnostik zugelassenen Zentren, die über die für die Durchführung der Maßnahmen der Präimplantationsdiagnostik notwendigen diagnostischen, medizinischen und technischen Möglichkeiten verfügen,

vorgenommen werden. Die im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik durchgeführten Maßnahmen, einschließlich der von den Ethikkommissionen abgelehnten Fälle, werden von den zugelassenen Zentren an eine Zentralstelle in anonymisierter Form gemeldet und dort dokumentiert. Die Bundesregierung bestimmt durch Rechtsverordnung mit Zustimmung des Bundesrates das Nähere

1. zu der Anzahl und den Voraussetzungen für die Zulassung von Zentren, in denen die Präimplantationsdiagnostik durchgeführt werden darf, einschließlich der Qualifikation der dort tätigen Ärzte und der Dauer der Zulassung,
2. zur Einrichtung, Zusammensetzung, Verfahrensweise und Finanzierung der Ethikkommissionen für Präimplantationsdiagnostik,
3. zur Einrichtung und Ausgestaltung der Zentralstelle, der die Dokumentation von im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik durchgeführten Maßnahmen obliegt,
4. zu den Anforderungen an die Meldung von im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik durchgeführten Maßnahmen an die Zentralstelle und den Anforderungen an die Dokumentation.

(4) Ordnungswidrig handelt, wer entgegen Absatz 3 Satz 1 eine Präimplantationsdiagnostik vornimmt. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße bis zu fünfzigtausend Euro geahndet werden.

(5) Kein Arzt ist verpflichtet, eine Maßnahme nach Absatz 2 durchzuführen oder an ihr mitzuwirken. Aus der Nichtmitwirkung darf kein Nachteil für den Betroffenen erwachsen.

(6) Die Bundesregierung erstellt alle vier Jahre einen Bericht über die Erfahrungen mit der Präimplantationsdiagnostik. Der Bericht enthält auf der Grundlage der zentralen Dokumentation und anonymisierter Daten die Zahl der jährlich durchgeführten Maßnahmen sowie eine wissenschaftliche Auswertung.

#### **§ 4 Eigenmächtige Befruchtung, eigenmächtige Embryoübertragung und künstliche Befruchtung nach dem Tode**

(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer

1. es unternimmt, eine Eizelle künstlich zu befruchten, ohne daß die Frau, deren Eizelle befruchtet wird, und der Mann, dessen Samenzelle für die Befruchtung verwendet wird, eingewilligt haben,
2. es unternimmt, auf eine Frau ohne deren Einwilligung einen Embryo zu übertragen, oder
3. wissentlich eine Eizelle mit dem Samen eines Mannes nach dessen Tode künstlich befruchtet.

(2) Nicht bestraft wird im Fall des Absatzes 1 Nr. 3 die Frau, bei der die künstliche Befruchtung vorgenommen wird.

#### **§ 5 Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen**

(1) Wer die Erbinformation einer menschlichen Keimbahnzelle künstlich verändert, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer eine menschliche Keimzelle mit künstlich veränderter Erbinformation zur Befruchtung verwendet.

(3) Der Versuch ist strafbar.

(4) Absatz 1 findet keine Anwendung auf

1. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer außerhalb des Körpers befindlichen Keimzelle, wenn ausgeschlossen ist, daß diese zur Befruchtung verwendet wird,
2. eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer sonstigen körpereigenen Keimbahnzelle, die einer toten Leibesfrucht, einem Menschen oder einem Verstorbenen entnommen worden ist, wenn ausgeschlossen ist, daß
  - a) diese auf einen Embryo, Foetus oder Menschen übertragen wird oder
  - b) aus ihr eine Keimzelle entsteht,sowie
3. Impfungen, strahlen-, chemotherapeutische oder andere Behandlungen, mit denen eine Veränderung der Erbinformation von Keimbahnzellen nicht beabsichtigt ist.

#### **§ 6 Klonen**

(1) Wer künstlich bewirkt, daß ein menschlicher Embryo mit der gleichen Erbinformation wie ein anderer Embryo, ein Foetus, ein Mensch oder ein Verstorbener entsteht, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer einen in Absatz 1 bezeichneten Embryo auf eine Frau überträgt.

(3) Der Versuch ist strafbar.

#### **§ 7 Chimären- und Hybridbildung**

(1) Wer es unternimmt,

1. Embryonen mit unterschiedlichen Erbinformationen unter Verwendung mindestens eines menschlichen Embryos zu einem Zellverband zu vereinigen,

2. mit einem menschlichen Embryo eine Zelle zu verbinden, die eine andere Erbinformation als die Zellen des Embryos enthält und sich mit diesem weiter zu differenzieren vermag, oder
  3. durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Tieres oder durch Befruchtung einer tierischen Eizelle mit dem Samen eines Menschen einen differenzierungsfähigen Embryo zu erzeugen,
- wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer es unternimmt,

1. einen durch eine Handlung nach Absatz 1 entstandenen Embryo auf
  - a) eine Frau oder
  - b) ein Tierzu übertragen oder
2. einen menschlichen Embryo auf ein Tier zu übertragen.

### **§ 8 Begriffsbestimmung**

(1) Als Embryo im Sinne dieses Gesetzes gilt bereits die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an, ferner jede einem Embryo entnommene totipotente Zelle, die sich bei Vorliegen der dafür erforderlichen weiteren Voraussetzungen zu teilen und zu einem Individuum zu entwickeln vermag.

(2) In den ersten vierundzwanzig Stunden nach der Kernverschmelzung gilt die befruchtete menschliche Eizelle als entwicklungsfähig, es sei denn, daß schon vor Ablauf dieses Zeitraums festgestellt wird, daß sich diese nicht über das Einzellstadium hinaus zu entwickeln vermag.

(3) Keimbahnzellen im Sinne dieses Gesetzes sind alle Zellen, die in einer Zell-Linie von der befruchteten Eizelle bis zu den Ei- und Samenzellen des aus ihr hervorgegangenen Menschen führen, ferner die Eizelle vom Einbringen oder Eindringen der Samenzelle an bis zu der mit der Kernverschmelzung abgeschlossenen Befruchtung.

### **§ 9 Arztvorbehalt**

Nur ein Arzt darf vornehmen:

1. die künstliche Befruchtung,
2. die Präimplantationsdiagnostik,
3. die Übertragung eines menschlichen Embryos auf eine Frau,
4. die Konservierung eines menschlichen Embryos sowie einer menschlichen Eizelle, in die bereits eine menschliche Samenzelle eingedrungen oder künstlich eingebracht worden ist.

### **§ 10 Freiwillige Mitwirkung**

Niemand ist verpflichtet, Maßnahmen der in § 9 bezeichneten Art vorzunehmen oder an ihnen mitzuwirken.

### **§ 11 Verstoß gegen den Arztvorbehalt**

(1) Wer, ohne Arzt zu sein,

1. entgegen § 9 Nr. 1 eine künstliche Befruchtung vornimmt,
2. entgegen § 9 Nummer 2 eine Präimplantationsdiagnostik vornimmt oder
3. entgegen § 9 Nummer 3 einen menschlichen Embryo auf eine Frau überträgt,

wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Nicht bestraft werden im Fall des § 9 Nr. 1 die Frau, die eine künstliche Insemination bei sich vornimmt, und der Mann, dessen Samen zu einer künstlichen Insemination verwendet wird.

### **§ 12 Bußgeldvorschriften**

(1) Ordnungswidrig handelt, wer, ohne Arzt zu sein, entgegen § 9 Nummer 4 einen menschlichen Embryo oder eine dort bezeichnete menschliche Eizelle konserviert.

(2) Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße bis zu zweitausendfünfhundert Euro geahndet werden.

### **§ 13 Inkrafttreten**

Dieses Gesetz tritt am 1. Januar 1991 in Kraft.

## 13. Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Daniel A. Beyer Oberarzt der Frauenklinik und Doktorvater dieser Arbeit für das Überlassen des Dissertationsthemas und für die Betreuung bei dem Erstellen der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Klaus Diedrich, ehem. Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, danken, der durch seine unerschütterliche Zuversicht und die stetigen Motivationsanstöße tatkräftig zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrug.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeitern des IVF Labors, die mir jederzeit den Zugang zum Labor ermöglichten und stets bereit waren, meine zahlreichen Fragen zu beantworten.

Ganz besonders danke ich an dieser Stelle Frau Dr. rer. nat. Beate Schöpfer. Ihre fachkompetente, geduldige Hilfe und Unterstützung bei der Erhebung und Sammlung der Daten hat entscheidend zur Entstehung der Dissertation beigetragen.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meinem Mann, Timm, für Ihre Geduld und Unterstützung während der vergangenen Jahre.

## 14. Curriculum vitae

### **Name:**

Julia Klett, geb. Aechter

### **Geburtsdatum:**

24.03.1972

### **Geburtsort:**

Lübeck

### **Schulbildung:**

1978-1982 Grundschule Groß Grönau

1982-1984 Johanneum zu Lübeck

1984-1992 Clara-Fey-Gymnasium Bonn, Abitur

### **Studium:**

1995-1998 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität,  
Göttingen

1998-1999 Studium der Humanmedizin an der Karl-Franzens-Universität, Graz

1999-2004 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität  
Göttingen

2003-2004 Praktisches Jahr in der Universitätsklinik Göttingen,  
Fachbereiche: gastro-enterologische Onkologie, Unfallchirurgie,  
diagnostische Radiologie, Strahlentherapie

2004 Approbation als Ärztin

### **Berufspraxis:**

2006-2011: Weiterbildung zur Fachärztin für Innere und Allgemeinmedizin in den  
Fachbereichen:

Orthopädie, Innere Medizin, Rehabilitative Medizin: *Asklepiosklinik am Kurpark*,  
Bad Schwartau

Chirurgie: *Chirurgische Praxis Osterstrasse*, Hamburg

Allgemeinmedizin: *Arztpraxis am Michel*, Hamburg

Frauenheilkunde und Geburtshilfe: *Universitätsklinik Lübeck*  
Seit 2012 Weiterbildung zur Fachärztin für Arbeitsmedizin:  
*ias AG, Hamburg*

**Dissertation:**

05/2011-09/2011 Erhebung der Daten

10/2011-10/2012 statistische Auswertung der Daten und Erstellung der  
Dissertation