

Aus der Sektion für gynäkologische Endokrinologie & Reproduktionsmedizin  
der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Griesinger, M. Sc.

---

## **Vergleich zweier Kryokonservierungsmethoden von 2 PN-Eizellen: eine retrospektive Datenanalyse**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
– **Aus der Sektion Medizin** –

vorgelegt von  
**Manja Golakov**  
aus Parchim

Lübeck 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Griesinger, M. Sc.

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. Nat. Timo Gemoll

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2018

Zum Druck genehmigt:

Lübeck, den 26.10.2018

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                     | <b>4</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                     | <b>7</b>  |
| <br>   |           |
| <b>I Einleitung .....</b>  | <b>8</b>  |
| I.1 Einführung in die Reproduktionsmedizin .....                       | 8         |
| I.1.1 Ursachen für unerfüllten Kinderwunsch.....                       | 10        |
| I.1.2 Terminologie und Prävalenz .....                                 | 11        |
| I.2 Embryonenschutzgesetz .....  | 11        |
| I.3 Stellenwert der Kryokonservierung in der Reproduktionsmedizin..... | 12        |
| I.4 Physikalische Grundlagen der Kryokonservierung .....               | 14        |
| I.5 Slow-cooling .....   | 17        |
| I.6 Vitrifikation .....  | 18        |
| I.7 Stellenwert von Vitrifikation und slow-cooling .....               | 19        |
| I.8 Fragestellungen.....   | 23        |
| <br>   |           |
| <b>II Material und Methoden .....</b>                                  | <b>24</b> |
| II.1 Patientinnenkollektiv.....  | 24        |
| II.2 Kontrollierte ovarielle Stimulation und Follikelpunktion.....     | 25        |
| II.3 IVF und ICSI.....   | 26        |
| II.4 Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen .....                         | 27        |
| II.4.1 Vitrifikation.....  | 28        |
| II.4.2 Erwärmung nach Vitrifikation.....                               | 29        |
| II.4.3 Slow-cooling.....   | 30        |
| II.4.4 Auftau nach slow-cooling .....                                  | 31        |
| II.5 Endometriumvorbereitung zur Kryoembryonenübertragung.....         | 31        |
| II.6 Beurteilung der Embryoqualität .....                              | 32        |
| II.7 Durchführung der Embryonenübertragung .....                       | 33        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| II.8       | Fallzahlüberlegung .....   | 33        |
| II.9       | Datenerhebung.....   | 34        |
| II.10      | Erfasste Parameter.....  | 35        |
| II.11      | Ergebnisdefinitionen .....   | 38        |
| II.12      | Statistische Auswertung .....  | 39        |
| <b>III</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>42</b> |
| III.1      | Patientenkollektiv.....  | 42        |
| III.2      | Demografische Daten.....   | 44        |
| III.3      | Reproduktionsbiologische Daten.....                                    | 46        |
| III.4      | Indikation zur assistierten Reproduktion.....                          | 47        |
| III.5      | Inzidenz von „Null überlebten 2 PN-Eizellen“ nach Auftau .....         | 49        |
| III.6      | Ergebnisse der Auftau-/Kryozyklen.....                                 | 50        |
| III.6.1    | Ergebnisse der ersten Auftau-/Kryozyklen .....                         | 51        |
| III.6.2    | Ergebnisse der zweiten Auftau-/Kryozyklen .....                        | 52        |
| III.6.3    | Ergebnisse der dritten Auftau-/Kryozyklen .....                        | 53        |
| III.6.4    | Überlebensraten der Auftauzyklen 4-7 nach Vitrifikation.....           | 53        |
| III.7      | Klinische Ergebnisse der ersten Kryoauftauzyklen.....                  | 54        |
| III.8      | Kumulative Outcomeraten .....  | 55        |
| III.8.1    | Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft.....                      | 55        |
| III.8.2    | Eintritt einer klinischen Schwangerschaft.....                         | 56        |
| III.8.3    | Eintritt einer Lebendgeburt .....                                      | 57        |
| III.9      | Identifikation von Prädiktoren für das Behandlungoutcome .....         | 58        |
| III.9.1    | Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft.....                      | 58        |
| III.9.2    | Eintritt einer klinischen Schwangerschaft .....                        | 58        |
| III.9.3    | Eintritt einer Lebendgeburt .....                                      | 59        |
| III.9.4    | Einschluss von „Art der Kryokonservierung“ erzwungen .....             | 59        |
| III.10     | Subgruppenanalyse der Patientinnen ohne primäre Kryokonservierung..... | 60        |
| <b>IV</b>  | <b>Diskussion .....</b>  | <b>61</b> |
| IV.1       | Zellüberleben nach Auftau kryokonservierter 2 PN-Eizellen.....         | 63        |
| IV.2       | Schwangerschafts- und Geburtenraten nach Kryoübertragung.....          | 68        |
| IV.3       | Einflussfaktoren auf das Behandlungoutcome.....                        | 72        |

|             |                                      |           |
|-------------|--------------------------------------|-----------|
| IV.4        | Methodische Probleme der Studie..... | 76        |
| IV.5        | Fazit.....                           | 78        |
| <b>V</b>    | <b>Zusammenfassung.....</b>          | <b>79</b> |
| <b>VI</b>   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>    | <b>81</b> |
| <b>VII</b>  | <b>Anhang .....</b>                  | <b>88</b> |
| <b>VIII</b> | <b>Danksagung .....</b>              | <b>89</b> |
| <b>IX</b>   | <b>Lebenslauf.....</b>               | <b>90</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Anzahl durchgeführter Kryoauftauzyklen, erfasst im deutschen IVF-Register. ....   | 14 |
| <b>Abbildung 2:</b> Flussdiagramm zur Darstellung der erfassten und ausgewerteten Patientinnen mit Auftau - und Übertragungszyklen für beide Kryokonservierungsmethoden. .... | 43 |
| <b>Abbildung 3:</b> Vergleich vorangegangener Geburten beider Gruppen zum Zeitpunkt der FoPu. ....  | 45 |
| <b>Abbildung 4:</b> Indikationen zur assistierten Reproduktionsbehandlung. ....   | 48 |
| <b>Abbildung 5:</b> Stufendiagramm der kumulativen biochemischen Schwangerschaftsraten in beiden Kryokonservierungsgruppen. ....  | 55 |
| <b>Abbildung 6:</b> Stufendiagramm der kumulativen klinischen Schwangerschaftsraten in beiden Kryokonservierungsgruppen. ....   | 56 |
| <b>Abbildung 7:</b> Stufendiagramm der kumulativen Lebendgeburtenraten in beiden Kryokonservierungsgruppen. ....  | 57 |
| <b>Abbildung 8:</b> Schreiben der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck bezüglich der Meldung über die geplante Promotion. ....  | 88 |

## Tabellenverzeichnis

|  |       |
|--|-------|
| <b>Tabelle 1:</b> Zusammensetzung der zur Vitrifikation verwandten Lösungen. ....  | 28    |
| <b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung der zur Erwärmung nach Vitrifikation verwandten<br>Lösungen.....   | 29    |
| <b>Tabelle 3:</b> Zusammensetzung der zum slow-cooling verwandten Lösungen. ....   | 30    |
| <b>Tabelle 4:</b> Ablauf der slow-cooling Kryokonservierung. ....  | 30    |
| <b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung der zur Erwärmung nach slow-cooling verwandten<br>Lösungen.....  | 31    |
| <b>Tabelle 6:</b> Anteil primär elektiver Kryokonservierungen ohne Frischübertragung<br>gegenüber Patientinnen mit Frischübertragung in beiden Gruppen. .... | 42    |
| <b>Tabelle 7:</b> Demografische Patientinneneigenschaften beider<br>Kryokonservierungsgruppen zum Zeitpunkt der Follikelpunktion. ....                       | 44-45 |
| <b>Tabelle 8:</b> Stimulationsprotokoll und Art der finalen Eizellreifung in beiden<br>Gruppen. ....   | 46    |
| <b>Tabelle 9:</b> Hormonwerte zum Zeitpunkt der Ovulationsauslösung. ....  | 46    |
| <b>Tabelle 10:</b> Resultate der Follikelpunktion, anschließender IVF-/ICSI-Behandlung<br>und Kryokonservierung beider Gruppen. ....                         | 47    |
| <b>Tabelle 11:</b> Männliche und weibliche Behandlungsindikationen zur ART. ....   | 48    |
| <b>Tabelle 12:</b> Anzahl der Auftauversuche mit „null überlebten 2 PN-Eizellen“ beider<br>Gruppen, pro Auftauzyklus und insgesamt. ....                     | 49    |
| <b>Tabelle 13:</b> Merkmale der ersten Auftau-/Kryoübertragungszyklen beider<br>Kryokonservierungsgruppen.....   | 51    |
| <b>Tabelle 14:</b> Merkmale der zweiten Auftau-/Kryoübertragungszyklen beider<br>Kryokonservierungsgruppen.....  | 52    |
| <b>Tabelle 15:</b> Merkmale der dritten Auftau-/Kryoübertragungszyklen beider<br>Kryokonservierungsgruppen.....  | 53    |
| <b>Tabelle 16:</b> Überlebensraten vitrifizierter Vorkernstadien nach Erwärmung in den<br>Auftauzyklen 4-7.....  | 54    |
| <b>Tabelle 17:</b> Behandlungsergebnisse der ersten Kryoembryonenübertragungen ..  | 54    |
| <b>Tabelle 18:</b> Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt  |       |

|   |    |
|---|----|
| einer biochemischen SS innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus). .....  | 58 |
| <b>Tabelle 19:</b> Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt einer klinischen SS innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus). .....   | 58 |
| <b>Tabelle 20:</b> Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt einer Lebendgeburt innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus).....  | 59 |
| <b>Tabelle 21:</b> Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt einer Lebendgeburt innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus – nach Einschluss der Art der Kryokonservierung in das Regressionsmodell). ..... | 59 |
| <b>Tabelle 22:</b> Lebendgeburtenraten im Gruppenvergleich nach Ausschluss der Patientinnen mit primär elektiver Kryokonservierung. ....  | 60 |
| <b>Tabelle 23:</b> Ergebnisse der logistischen Regression in der Subgruppe (abhängige Variable: Eintritt einer Lebendgeburt innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus)..  | 60 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>2 PN-Eizelle</b>   | - 2 Pronukleuseizelle, Eizelle im Vorkernstadium           |
| <b>95 KI</b>          | - 95 % Konfidenzintervall                                  |
| <b>a</b>              | - Jahre  |
| <b>Abb.</b>           | - Abbildung  |
| <b>ART</b>            | - Assistierte reproduktive Technologie                     |
| <b>β-hCG</b>          | - β-Untereinheit des humanen Choriongonadotropins          |
| <b>BMI</b>            | - Body-Mass-Index  |
| <b>COC</b>            | - Cumulus-Oozyten-Komplex                                  |
| <b>CTE</b>            | - Cryo-Technik Erlangen                                    |
| <b>DMSO</b>           | - Dimethylsulfoxid   |
| <b>ESchG</b>          | - Embryonenschutzgesetz                                    |
| <b>ET</b>             | - Embryonentransfer = Embryonenübertragung                 |
| <b>FoPu</b>           | - Follikelpunktion   |
| <b>GnRH</b>           | - Gonadotropin-releasing-hormone                           |
| <b>h</b>              | - Stunden  |
| <b>IE=IU</b>          | - Internationale Einheit = International Unit              |
| <b>IVF</b>            | - In-Vitro Fertilisation                                   |
| <b>ICSI</b>           | - Intrazytoplasmatische Spermieninjektion                  |
| <b>KryoET</b>         | - Kryoembryonentransfer = Kryoembryonenübertragung         |
| <b>LH</b>             | - Luteinisierendes Hormon                                  |
| <b>LN<sub>2</sub></b> | - flüssiger Stickstoff (engl.: liquid nitrogen)            |
| <b>M</b>              | - molar  |
| <b>MII</b>            | - Metaphase-II-Eizelle                                     |
| <b>MW</b>             | - Mittelwert   |
| <b>min</b>            | - Minuten  |
| <b>ml</b>             | - Milliliter   |
| <b>OHSS</b>           | - Ovarielles Überstimulationssyndrom                       |
| <b>OR</b>             | - Wahrscheinlichkeitsverhältnis (engl.: odds ratio)        |
| <b>PCOS</b>           | - PCO-Syndrom, Polyzystisches Ovarialsyndrom               |
| <b>PPD</b>            | - Propandiol   |
| <b>RT</b>             | - Raumtemperatur   |
| <b>sec</b>            | - Sekunde  |
| <b>s.c.</b>           | - subkutan   |
| <b>SD</b>             | - Standardabweichung (engl.: standard deviation)           |
| <b>sET</b>            | - Single-Embryonentransfer (engl.: single embryo transfer) |
| <b>SS</b>             | - Schwangerschaft  |
| <b>SSW</b>            | - Schwangerschaftswoche                                    |
| <b>Tab.</b>           | - Tabelle  |
| <b>vs.</b>            | - versus   |

# I Einleitung

## I.1 Einführung in die Reproduktionsmedizin

Unerfüllter Kinderwunsch stellt besondere Anforderungen an das Gesundheitssystem, medizinisches Personal und die medizinische Forschung. In erster Linie bedeutet er jedoch eine große Herausforderung für betroffene Patientinnen und Patienten. Für sie ergeben sich zugleich emotionale, psychologische, gesundheitliche als auch wirtschaftliche Belastungen und Hindernisse. Die wissenschaftlichen Entwicklungen und Erfolge der letzten Dekaden verdeutlichen die große Bedeutung dieses Bereichs als Schnittpunkt zwischen klinischer Medizin, Grundlagenforschung, humaner Reproduktionsbiologie und psychosozialer Betreuung.

Seit der Geburt von Louise Brown am 25.07.1978, dem ersten durch In-vitro-Fertilisation (IVF) gezeugt und ausgetragenen Menschen, wurden bis heute weltweit über 5 Millionen Kinder nach IVF geboren (Streptoe und Edwards, 1978; ESHRE, 2012). Hierzu werden den Frauen, meist nach medikamentöser Stimulation, durch transvaginale Follikelpunktion (FoPu) Eizellen entnommen. Diese werden im Labor mit Spermien des Partners fertilisiert. Die befruchteten Eizellen werden, nach Übergang in das frühe Embryonalstadium, dann mittels Katheter in den Uterus der Frau übertragen.

Mit der Entwicklung der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) Anfang der 90er Jahre machte die Reproduktionsmedizin einen großen Sprung. Fortan konnte einem noch breiteren Spektrum von Paaren Hilfe angeboten und fortschreitend bessere Behandlungsergebnisse erzielt werden. Patienten mit stark eingeschränkter Spermienqualität und -quantität bietet die direkte Injektion des Spermatozoons in das Ooplasma eine neue Therapieoption mit, im Vergleich zur klassischen IVF, gesteigerten Erfolgsaussichten (Palermo et al., 1992).

Der jüngste Jahresbericht des deutschen IVF-Registers zeigt die zunehmende Inanspruchnahme reproduktionsmedizinischer Maßnahmen und verdeutlicht die gewachsene Bedeutung dieser Disziplin. 2015 verzeichnete das Deutsche IVF-Register 130 teilnehmende reproduktionsmedizinische Zentren. Zum Vergleich waren es 20 Jahre zuvor lediglich 65 Arbeitsgruppen. Laut Bericht des Registers wurden in Deutschland im Jahr 2015 insgesamt 17.215 Kinder nach Zuhilfenahme assistierter reproduktiver Technologien (ART) geboren. Davon wurden allein 3976 Kinder, also beinahe ein Viertel (23,1 %), nach Übertragung zuvor kryokonservierter und aufgewärmter Eizellen im Vorkernstadium (2 PN-Eizelle) geboren (Deutsches IVF-Register, 2015). Diese Eizellen fallen häufig als „Überschuss“ eines Behandlungszyklus an.

Die Kryoembryonenübertragung (KryoET) bietet die Möglichkeit, in einem einzelnen IVF-/ICSI-Zyklus (ohne erneute Stimulationsbehandlung, Eizellentnahme und IVF) eine höhere Schwangerschafts- und Geburtenchance zu erzielen. Neben den gesundheitlichen Vorteilen bietet diese Option für Paare und das Gesundheitswesen auch eine finanzielle Erleichterung, da Kosten und Aufwand von Auftau und Übertragung deutlich geringer sind, als die Kosten einer hormonellen Stimulation, Eizellentnahme und IVF. Besondere Vorteile ergeben sich für Patientinnen mit drohendem ovariellen Überstimulationssyndrom (OHSS) nach Gonadotropinbehandlung. In diesen Fällen werden alle gewonnenen Eizellen, im Sinne einer primär elektiven Kryokonservierung, eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt übertragen (Griesinger et al., 2007). Dadurch werden die ovarielle Überstimulation und die Frühschwangerschaft zeitlich entkoppelt und schwere Überstimulationssyndrome können so regelhaft vermieden werden.

Neben dem KryoET im Rahmen der ART bietet die Kryokonservierung von Zellen und Geweben vielerlei Möglichkeiten zur Optimierung der Therapie in der Reproduktionsmedizin. Beispielhaft sei hier die Re-Transplantation kryokonservierten Ovarialgewebes nach Abschluss einer gonadotoxischen Therapie zu erwähnen (Donnez et al., 2004, Klocke et al., 2015).

Die verschiedenen Wünsche, Hoffnungen aber auch Ängste der Paare anzuerkennen und bestmöglich zu berücksichtigen, ist die Aufgabe des medizinischen Personals. Die Steigerung des Therapieerfolgs im Sinne höherer Geburtenraten muss stetiges Ziel reproduktionsmedizinischer Forschung sein. Gleichzeitig müssen Risiken der Kinderwunschtherapie wie das OHSS oder die Mehrlingsschwangerschaft so gering wie möglich gehalten werden.

### *1.1.1 Ursachen für unerfüllten Kinderwunsch*

Die Ursachen für unerfüllten Kinderwunsch sind oft multifaktoriell und im Einzelfall häufig nicht abschließend zu eruieren. Grundsätzlich werden weibliche und männliche Ursachen unterschieden. Alterungsprozesse der Frau, von denen auch die Ovarien betroffen sind, sind für eine Abnahme der Fruchtbarkeit besonders nach dem 35. Lebensjahr verantwortlich (Schultze-Mosgau et al., 2007). Weitere Ursachen reichen von anatomischen bzw. mechanischen Pathologien, wie Veränderungen der Tuben nach Entzündungen oder Operationen, Myomen oder Endometriosen, über endokrinologische Störungen, wie das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) oder andere Formen des Hyperandrogenismus. Auch immunologische und psychogene Faktoren spielen eine Rolle. Als männliche Ursache findet sich häufig eine Einschränkung des SpermioGRAMMS unterschiedlicher Ausprägung und Genese (Rowe et al., 2000; Habbema et al., 2004). In 40 % der Fälle liegt die Hauptursache beim Mann und in etwa 45 % der Fälle bei der Frau. In 35 % liegen bei beiden Partnern fertilitätsmindernde Faktoren vor. Bei 15 % bleibt die Ursache ungeklärt. Man spricht dann von idiopathischer Sterilität (Schultze-Mosgau et al., 2007).

Aus den Daten des deutschen IVF-Registers 2015 geht hervor, dass die Indikation zur ICSI bei rund 60 % der Paare aufgrund eines eingeschränkten SpermioGRAMMS oder einer Azoospermie gestellt wurde. In fast 60 % der Fälle fand sich zusätzlich eine weibliche Indikation (Deutsches IVF-Register, 2015).

### 1.1.2 Terminologie und Prävalenz

Unerfüllter Kinderwunsch wird in der Literatur mit Begriffen wie „Infertilität“, „Sterilität“ oder auch „Unfruchtbarkeit“ beschrieben. Eine einheitliche Terminologie wird allerdings nicht durchgängig verwendet. Oft ist hierbei keine absolute Unfähigkeit Kinder zu zeugen und auszutragen gemeint, sondern eine verschieden stark ausgeprägte Einschränkung. So findet auch der Begriff „Subfertilität“ häufig Gebrauch. Gnoth et al. schlugen eine Einteilung nach 6, 12, bzw. 48 Monaten ohne Konzeption in „leicht subfertil“, „mäßig bis ernsthaft subfertil“, bzw. „fast vollständig infertil“, vor (Habbema et al., 2004; Gnoth et al., 2005).

Die Inkonsistenz der Definitionen erschwert auch die genaue Einschätzung der weltweiten oder ortsspezifischen Prävalenz des unerfüllten Kinderwunschs. Verschiedene epidemiologische Studien wurden zu diesem Thema durchgeführt. Häufig wurden hierzu 12 oder 24 Monate ungeschützter Verkehr ohne Eintritt einer Schwangerschaft (SS) als entscheidendes Kriterium für die Infertilität gewählt (Zegers-Hochschild et al., 2009).

Nach der Einstufung von Gnoth gelten ca. 20 % der Paare mit Kinderwunsch als leicht subfertil, 10 % als erheblich subfertil und nur 5 % als definitiv infertil (Gnoth et al., 2005). In einer jüngeren Studie von Boivin wird die Prävalenz der Infertilität für Industrieländer zwischen 3,5 % und 16,7 % geschätzt (Boivin et al., 2007).

## 1.2 Embryonenschutzgesetz

Den rechtlichen Rahmen für die Reproduktionsmedizin und den Umgang mit Kryokonservierung bildet in Deutschland das Embryonenschutzgesetz (ESchG). Die extrakorporale Befruchtung einer Eizelle ist hiernach grundsätzlich nur erlaubt, wenn dies zum Zwecke der Herbeiführung einer Schwangerschaft geschieht. Zudem muss die zu befruchtende Eizelle der Frau entstammen, der sie zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt werden soll (§ 1 (1) 2.). Ebenso ist es nicht erlaubt

mehr Eizellen zu befruchten, als der Frau im selben Zyklus übertragen werden sollen (§ 1 (1) 5.). Die Befruchtung gilt als abgeschlossen, wenn es zur Verschmelzung der Vorkerne gekommen ist (Syngamie). Im Sinne des ESchG ist dann aus der sich im Befruchtungsvorgang befindlichen Eizelle ein Embryo entstanden. Die Kryokonservierung überzähliger Eizellen findet in Deutschland aus diesem Grund üblicherweise noch vor Syngamie statt. Erst nach Auftau verschmelzen die Vorkerne und es entsteht der eigentliche Embryo (§ 8 (1)). Es dürfen dann maximal drei Embryonen einzeitig in den Uterus übertragen werden (§ 1 (1) 3.) (Bundesgesetzblatt I, 2011).

### *1.3 Stellenwert der Kryokonservierung in der Reproduktionsmedizin*

Erste wissenschaftliche Berichte zur Kryokonservierung menschlicher Zellen stammen aus dem Jahr 1776. Spallanzani berichtete erstmalig über das Einfrieren und Auftauen von Spermatozoen in Schnee (Spallanzani, 1776). Die konkreten physikalischen Vorgänge und möglichen Schädigungsmechanismen wurden ab der Mitte des letzten Jahrhunderts intensiver erforscht. Hierzu zählt beispielsweise der positive Nutzen eines Gefrierschutzmittels in Form des Glycerols (Polge et al., 1949). Mazur publizierte dazu 1963 seine Ergebnisse und Theorien über die Wirkung des Einfrierprozesses auf Zellen (Mazur, 1963). 1983 konnte zunächst die erste Schwangerschaft eines Menschen nach IVF mit Kryokonservierung eines Embryonen berichtet werden (Trounson und Mohr, 1983). 1984 folgte die erste Geburt (Zeilmaker et al., 1984).

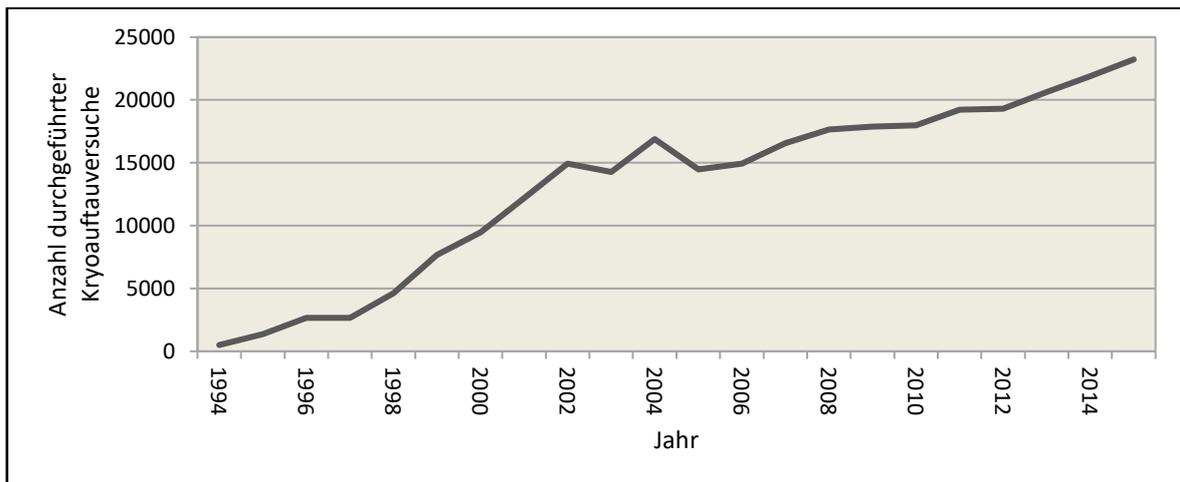
Heutzutage findet die Kryokonservierung in der Reproduktionsmedizin eine Vielzahl von Anwendungen und ist in den IVF-Laboratorien ein gängiges und etabliertes Verfahren. Hieraus resultieren zahlreiche Vorteile.

Patientinnen mit erfolgloser Embryonenübertragung nach künstlicher Befruchtung durch IVF oder ICSI haben die Möglichkeit, zuvor überzählig gebliebene und deshalb kryokonservierte, Eizellen im Vorkernstadium aufzutauen und zu übertragen. Diese aufgetauten Eizellen im Vorkernstadium werden in die

Embryonalkultur eingebracht und im Rahmen eines sogenannten „Kryozyklus“ in den Uterus der Patientin eingesetzt. Somit kann durch wiederholte Kryozyklen, hervorgehend aus einer IVF-Behandlung, die Schwangerschaftschance zumindest potentiell erhöht („kumuliert“) werden. Hierbei ist auch die Kostenersparnis der Paare von Bedeutung. Während die Eigenbeteiligung an einer IVF- bzw. ICSI-Behandlung seit dem Gesundheitsmodernisierungsgesetz 2004 für gesetzlich versicherte Paare zwischen 1.500 und 2.000 € liegt, betragen die Gesamtkosten für eine Kryoübertragung (Auftau und Übertragung) zwischen 400 und 500 €, zusätzlich 350 € für die Kryokonservierung (Schultze-Mosgau, 2007; Klett, 2013). Da der Kryozyklus von den Paaren selbst zu finanzieren ist, erfolgt auch keine „Anrechnung“ auf die maximal drei IVF Behandlungszyklen, die von der gesetzlichen Krankenversicherung anteilig finanziert werden.

Im Kryozyklus entfallen auch eine Reihe von Belastungen und Risiken, wie sie typischerweise im IVF Behandlungszyklus auftreten. Im Vorfeld der Kryoembryonenübertragung bedarf es lediglich einer Vorbereitung des Endometriums, wie von Bals-Pratsch mittels transdermalem Östrogen und vaginalem Progesteron beschrieben. Diese ist mit deutlich weniger Nebenwirkungen verbunden als ein „Frischzyklus“ (Bals-Pratsch et al., 1999). Schließlich kann das Risiko einer Mehrlingsschwangerschaft durch das kontrollierte Einfrieren überzähliger 2 PN-Eizellen und der Übertragung möglichst weniger Embryonen reduziert werden, bei gleichzeitiger Nutzung der gesamten Kohorte an verfügbaren Embryonen durch sequentielle Übertragung.

Die Kryokonservierung spielt allerdings nicht mehr nur in der „klassischen“ künstlichen Befruchtung eine Rolle, sondern findet darüber hinaus Einsatz in der Fertilitätsprotektion chronisch kranker Frauen und Männer oder bei Patienten mit bevorstehender gonadotoxischer Therapie. Nicht zuletzt hat die Kryokonservierung von Ovarkortexfragmenten in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. 2004 berichteten Donnez et al. erstmals über die Geburt eines gesunden Mädchens nach Re-Transplantation von gefrorenem Ovarialgewebe (Donnez et al., 2004).



**Abbildung 1:** Anzahl durchgeführter Kryoaufftauzyklen, erfasst im deutschen IVF-Register (Quelle: Jahrbuch des deutschen IVF-Registers, 2015).

Die prospektiven Erhebungen des deutschen IVF-Registers spiegeln die steigende Bedeutung der Kryokonservierung im Rahmen der Kinderwunschbehandlung eindrucksvoll wieder. Abbildung (Abb.) 1 zeigt die stetige Zunahme der in den letzten 20 Jahren erfassten Auftauzyklen nach Kryokonservierung. Im Jahresbericht für 2015 konnte über eine klinische Schwangerschaftsrate von 25,4 % und Lebendgeburtenrate von 17,2 % pro Übertragung aus insgesamt 23.099 Kryoübertragungen (23.266 Kryoaufftauversuchen) berichtet werden. Der Anteil an Kryozyklen machte etwa ein Viertel aller erfassten Behandlungszyklen aus (Deutsches IVF-Register, 2016).

#### *1.4 Physikalische Grundlagen der Kryokonservierung*

Trotz des zunehmenden Gebrauchs und der stetigen Erfolge der Kryoübertragung werden heutzutage noch immer keine reproduzierbaren hundertprozentigen Überlebensraten nach Auftau von Oozyten, Eizellen im Vorkernstadium oder Embryonen erzielt. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass während des Prozesses der Kryokonservierung eine Vielzahl potenziell schädlicher Faktoren auf das Gewebe bzw. die Zellen einwirken. Diese sind thermischer, mechanischer und chemischer Art. Zum besseren Verständnis dieser Vorgänge müssen die grundsätzlichen Abläufe während des Einfrierens einer Zelle verstanden werden.

Beim Einfrieren einer Zelle kommt es in der Regel zunächst extrazellulär zur Eisbildung des Überstands an Medium aus der Zellkultur (zwischen  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Intrazellulär sind niedrigere Temperaturen für die Eisbildung nötig (ab  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Es formt sich somit zu Beginn extrazelluläres Eis (Mazur, 1984). Dadurch wird gleichzeitig ein osmotisches Gefälle von intra- nach extrazellulär ausgebildet. Über diesen Gradienten kommt es im Abkühlprozess zu einer Entwässerung der Zelle, die für ihr Überleben entscheidend ist (Mazur, 1963). Die optimale Einfriergeschwindigkeit ist deshalb für den Erfolg der Kryokonservierung üblicherweise ausschlaggebend.

Probleme durch zu schnelles Einfrieren erwachsen daraus, dass intrazelluläre Eiskristalle gebildet werden. Dies geschieht, wenn die Zelle nicht genug Zeit hat, ihre Flüssigkeit in den Extrazellularraum abzugeben. Mazur postulierte in seiner Arbeit, dass es nach einer Dehydrierung von 90 % der Zelle nicht mehr zur intrazellulären Eisbildung kommt (Mazur, 1963). Die Gefahr besteht dann in der sogenannten Rekristallisation im Rahmen des Auftauprozesses. Auch im weiteren Einfrierprozess, aber besonders während des Auftauens zwischen  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , besitzen die vielen kleinen Eiskristalle eine besonders hohe Oberflächenenergie. Sie neigen deshalb dazu sich zu größeren und somit thermodynamisch stabileren Kristallen umzuformieren, wodurch Zellmembran und -organellen geschädigt werden können (Götz et al., 2008). Durch schnellere Auftaugeschwindigkeiten kann dieses Phänomen umgangen werden (Mazur, 1984).

Bei zu geringen Einfriergeschwindigkeiten können sich ebenfalls Probleme durch die Dehydrierung der Zelle ergeben, wenn diese zu lange dem stark hypertonen Milieu ausgesetzt ist. Mazur beschrieb die Probleme der Zellschrumpfung, die erhöhte Salzkonzentration intrazellulär und den osmotischen Schock den die Zelle während des Auftauprozesses erfahren kann (Mazur, 1970).

In diesem Zusammenhang ist auch das Phänomen des „supercoolings“ zu erwähnen. Kommt es im Abkühlprozess erst bei deutlich tieferen Temperaturen zur

Kristallisation, werden durch die Kristallisationswärme zunächst ein Anstieg und anschließend ein erneut rascher Abfall der Temperatur ausgelöst. Die schnelle Änderung der Temperatur kann den Untersuchungen von Maurer und Whittingham zufolge, durch spontane Eisbildung einen negativen Einfluss auf die Zelle haben (Maurer, 1966; Whittingham, 1977). Das „supercooling“ kann durch eine kontrollierte Induktion der extrazellulären Kristallisation, dem sogenannten „seeding“, verhindert werden. Dies geschieht bei Temperaturen wenig unterhalb des Mediumgefrierpunkts (Leibo und Mazur, 1978). Zum Schutz der Zelle während des Einfrierens und Auftauens ist der Gebrauch von Kryoprotektiva notwendig. Verschiedene Stoffe haben sich hierzu bewährt. Man unterscheidet permeable und nicht-permeable Gefrierschutzmittel.

Eine der Aufgaben von Gefrierschutzmitteln besteht darin, der Zelle möglichst viel Flüssigkeit zu entziehen, um im Einfrierprozess die intrazelluläre Eisbildung zu verhindern und gleichzeitig die Konzentration der umgebenden Flüssigkeit zu verringern. Dies wird durch osmotisch wirksame, nicht-permeable Kryoprotektiva, wie z.B. Saccharose realisiert (McGann, 1978).

Von besonderer Bedeutung sind jedoch die permeablen Kryoprotektiva, wie z.B. das Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylenglycol oder das 1,2-Propandiol (PPD). Die genannten Stoffe sorgen für eine Senkung des Gefrierpunkts wodurch die Zelle länger dehydriert wird, bevor sich Eiskristalle bilden könnten (Mazur, 1984). Ebenso wird durch die hydrophilen Eigenschaften der Stoffe Wasser intrazellulär gebunden und somit verzögert abgegeben, wodurch die hohen intrazellulären Salzkonzentrationen erst bei sehr niedrigen Temperaturen auftreten (Lovelock, 1953). Allerdings können die Kryoprotektiva in zu hoher Konzentration selbst einen schädlichen Einfluss, aufgrund von toxischen oder osmotischen Effekten, ausüben (Vajta et al., 2007).

Die verschiedenen Zellen und Gewebe stellen unterschiedliche Anforderungen an Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit aber auch an Art und Konzentration der Gefrierschutzmittel. Um optimale Bedingungen für eine erfolgreiche

Kryokonservierung und Lagerung in  $-196\text{ °C}$  kaltem Flüssigstickstoff ( $\text{LN}_2$ ) zu schaffen müssen diese berücksichtigt werden. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene Methoden und Protokolle entwickelt, von denen sich heute besonders zwei in der Routine etabliert haben: das sogenannte „slow-cooling“ und die „Vitrifikation“.

### *1.5 Slow-cooling*

Whittingham beschrieb 1972 erstmals die Methode des „langsamen Einfrierens“ im Rahmen der Kryokonservierung von Mäuseembryonen (Whittingham et al., 1972). Zeilmaker konnte 1984 die erste Geburt nach slow-cooling eines menschlichen Embryonen berichten (Zeilmaker et al., 1984). Seither haben sich verschiedene Verfahren zum „langsamen Einfrieren“ von Zellen und Geweben entwickelt. Ihnen gemeinsam ist der kontrollierte Einfrierprozess, der durch fest definierte, niedrige Abkühlgeschwindigkeiten in programmierbaren Apparaturen gekennzeichnet ist. Die vorangehende Äquilibration der Zellen mit vergleichsweise niedrig konzentrierten Kryoprotektiva ist entscheidend zur Dehydrierung und somit zum Schutz der Zelle.

Beispielhaft soll das Prinzip der CTE-880-Gefriereinrichtung (Cryo-Technik, Erlangen, Deutschland), welche im Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck Einsatz fand, beschrieben werden. Es handelt sich um ein vollautomatisches, offenes System. Der Flüssigstickstoff befindet sich hier in einem offenen Behälter, sodass sich oberhalb dessen durch Verdunstung eine Gasphase bildet. Die Temperatur fällt innerhalb dieser Gasphase von Raumtemperatur (RT) bis auf die  $-196\text{ °C}$  des Flüssigstickstoffs ab. Durch das automatische Anheben und Absenken der Gefriergutbehälter, der sogenannten „straws“, wird ein, durch die zuvor bestimmte Kühlrate geregeltes, Einfrierprogramm durchlaufen. Zur Regelung wird die Temperatur innerhalb des gefüllten Röhrchens gemessen und der Ablauf mithilfe eines Computers angepasst. Das vorher beschriebene „seeding“ kann mithilfe einer an den Behältern angebrachten „Geißel“ ebenfalls vollautomatisch ablaufen. Die Einfriergeschwindigkeit beträgt zwischen 0,1 und

1 °C/min bis zu einer Zieltemperatur von -33 °C woraufhin der Behälter nach 30 Minuten direkt in den flüssigen Stickstoff überführt wird (Al-Hasani et al., 1996; Schultze-Mosgau, 2007).

## 1.6 Vitrifikation

1984 wurde die Vitrifikation von Fahy et al. während eines Symposiums zur Organkryokonservierung vorgestellt (Fahy et al., 1984). Rall und Fahy beschrieben 1985 erstmals die erfolgreiche Kryokonservierung vitrifizierter Mausembryonen (Rall und Fahy, 1985). Kuleshova berichtete 1999 über die erste Geburt eines Säuglings nach Embryonenübertragung aus vitrifizierten Eizellen (Kuleshova et al., 1999).

Bei der Vitrifikation werden die zu kryokonservierenden Materialien in ihren Trägern direkt in flüssigen Stickstoff getaucht. Es zeigte sich, dass bei diesem Vorgang die Zellen und ihre umgebene Flüssigkeit, im Gegensatz zur traditionellen langsamen Kryokonservierung, direkt vom flüssigen in einen glasartigen, amorphen Zustand überführt werden. Dies geschieht durch die besonders hohen Abkühlgeschwindigkeiten von etwa 20.000 °C/min, die durch das direkte Eintauchen erreicht werden (Kuwayama et al., 2005a). Der Vorteil liegt darin, dass es statt zur Bildung schädlicher Eiskristalle zu einer Erstarrung (Solidifikation) des Vitrifikationsmaterials kommt. Dies wird, neben der hohen Abkühlgeschwindigkeit, auch durch den Einsatz hochkonzentrierter Kryoprotektiva realisiert. Ethylenglycol und DMSO haben sich hierbei als permeable Kryoprotektiva bewährt. Diese dienen als intrazellulärer Wasserersatz. Zum Schutz vor zytotoxischen Schäden durch besagte Stoffe werden die Zellen zunächst in eine niedrig konzentrierte Lösung (10 % bis 15 %) eingebracht. Daraufhin werden sie in die hoch konzentrierte Vitrifikationslösung eingetaucht (35 % bis 40 %; entspricht etwa 5,5 molar (M)). Zusätzlich muss auf die Einhaltung der minimal notwendigen Einwirkzeit des Kryoprotektivums geachtet werden (Schultze-Mosgau, 2007; Al-Hasani et al., 2011). Zur suffizienten Dehydrierung der Zelle werden nicht-permeable Kryoprotektiva wie z.B. Saccharose verwendet. Der hohe Einsatz von

Kryoprotektiva zusammen mit der extremen Temperatursenkung führt zu einer Viskositätssteigerung der Vitrifikationslösung während des Abkühlens.

Entscheidend für den Erfolg der Vitrifikation ist darüber hinaus ein möglichst kleines Volumen, um die hohe Einfriergeschwindigkeit für das gesamte Vitrifikationsmaterial gleichmäßig zu gewährleisten. Die Auswahl eines geeigneten Trägersystems spielt dabei eine entscheidende Rolle. Gängige Systeme sind beispielsweise der „Cryoloop“, „Cryotip“ und der „Cryotop“. Kuwayama zeigte 2005 besonders gute Ergebnisse für die Vitrifikation von Eizellen mit dem „Cryotop“-System, einem sehr dünnen Kunststoffstreifen. Hierbei wurden Volumina von  $<0,1 \mu\text{l}$  vitrifiziert (Kuwayama et al., 2005; Kuwayama et al., 2005a).

Schließlich ist auch die Dauer des Aufwärmvorgangs entscheidend, da hier das Risiko der Eiskristallbildung weiterhin besteht. Im Rahmen des Auftaus wird das Vitrifikationsmaterial direkt in die aufgewärmte Auftaulösung („Thawing Solution“) überführt. Die Rehydrierung der Zelle geschieht durch absteigende Konzentrationen einer Saccharoselösung um das permeable Kryoprotektivum schrittweise zu entfernen (Isachenko et al., 2004).

Da es sich bei der Vitrifikation nicht um einen Einfrierprozess im eigentlichen Sinne handelt, sondern vielmehr um eine Erstarrung bzw. Verfestigung ist der Begriff „Auftauen“ korrekterweise durch „Erwärmen“ zu ersetzen.

### *1.7 Stellenwert von Vitrifikation und slow-cooling*

Durch die Möglichkeit, die Geburtenrate durch sequentielle Übertragungen von überzähligen Embryonen nach Einfrierung und Erwärmung zu erhöhen, steigt weltweit das Interesse an der Kryokonservierung von Eizellen im Vorkernstadium im Rahmen einer IVF-Behandlung. Voraussetzung dafür ist ein unbeschadetes Überleben der Zellen nach Erwärmung bzw. Auftau. Der Einsatz einer möglichst schonenden Kryokonservierungsmethode unter Beachtung der bekannten Schädigungsmechanismen ist dabei essentiell. Unter Berücksichtigung der

steigenden Inanspruchnahme der Kryoembryonenübertragung ist die stetige Verbesserung dieser Technologien anzustreben.

Das slow-cooling ist bis heute in einer Vielzahl deutscher IVF-Laboratorien Kryokonservierungsmethode der Wahl. Schultze-Mosgau berichtete 2007, dass bei etwa 80 % aller Kryoübertragungen in Deutschland das slow-cooling Verfahren angewandt worden war (Schultze-Mosgau, 2007).

Effektivität und Sicherheit von Kryokonservierungsmethoden ist in den vergangenen Jahren auch international gehäuft Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Es fanden sich deutliche Hinweise für eine Überlegenheit der Vitrifikation in Bezug auf Zellüberleben und Schwangerschaftsraten. Fadini et al. berichteten 2009 von verbesserten Behandlungsergebnissen nach Vitrifikation unbefruchteter Oozyten im Vergleich zum slow-cooling (78,9 % versus (vs.) 57,9 % Überlebensrate) (Fadini et al., 2009). Die Autoren beschrieben darüber hinaus die Schwierigkeit der Oozytenkryokonservierung aufgrund besonderer kryosensitiver Eigenschaften der unbefruchteten Eizelle, wie der hohe intrazelluläre Wasseranteil und die geringe Membranpermeabilität. Die Vitrifikation scheint hier dem slow-cooling deutlich überlegen zu sein (Kuleshova und Lopata, 2002; Ubaldi et al., 2010). Kuleshova berichtete 1999 über die erste Geburt eines Säuglings nach dem Auftau vitrifizierter Oozyten (Kuleshova et al., 1999).

Es liegen prospektiv randomisierte Studien an unbefruchteten Oozyten und Präimplantationsembryonen vor, in denen die Überlegenheit der Vitrifikation gegenüber dem slow-cooling gezeigt werden konnte. Smith et al. verglichen hierzu Überleben und Entwicklung kryokonservierter Eizellen von 30 slow-cooling Patientinnen und 48 Vitrifikationspatientinnen deren überzählige Eizellen randomisiert einer von beiden Kryokonservierungsmethoden zugeführt wurden. Jede Patientin brachte einen Auftauversuch in die Auswertung ein. Es zeigte sich nach Vitrifikation eine signifikant höhere Überlebensrate von 81 % (281/349) gegenüber slow-cooling (67 %, 159/238). Die vitrifizierten Eizellen zeigten ein besseres Entwicklungspotenzial und höhere Fertilisationsraten nach ICSI. Die

Schwangerschaftsraten waren in der Vitrifikationsgruppe ebenso signifikant besser. Pro Auftau-/Aufwärmzyklus ergaben sich klinische Schwangerschaftsraten von 38 % (18/48) im Vergleich zu 13 % (4/30) (Smith et al., 2010).

Fasano et al. untersuchten die Kryokonservierung von Embryonen durch zwei unterschiedliche Vitrifikationsverfahren und slow-cooling. Insgesamt sind 1.055 Embryonen von 420 Patientinnen in 776 Auftauzyklen erwärmt bzw. aufgetaut worden. Das Überleben war nach beiden Vitrifikationsmethoden signifikant höher als nach slow-cooling (89,4 % und 87,7 % vs. 63,8 %). Für die Lebendgeburtenrate wurde allerdings kein signifikanter Unterschied gefunden (7,8 % und 7,5 % vs. 6,1 %). Die Autoren diskutierten als möglichen Einflussfaktor den Single-Embryonentransfer (sET) der, in den meisten Fällen, zur Vermeidung von Mehrlingsschwangerschaften, durchgeführt wurde (Fasano et al., 2014). Balaban et al. verglichen ebenfalls in einer randomisiert kontrollierten Studie das Überleben nach Auftau/Erwärmung von Embryonen. Sie entstammten 120 Frauen, die im Rahmen der IVF-Behandlung ihre überzähligen Embryonen nicht für einen eigenen späteren Kryotransfer kryokonservieren lassen wollten und sie somit der Studie zur Verfügung stellten. Die Ergebnisse zeigten in der Vitrifikationsgruppe ein Überleben von 94,8 % (222/234) gegenüber 88,7 % (206/232) nach slow-cooling. Die Autoren schlussfolgerten daraus eine Überlegenheit der Vitrifikation gegenüber dem slow-cooling, nicht nur bezüglich des Überlebens nach Auftau, sondern ebenfalls hinsichtlich der folgenden Blastozystenentwicklung in vitro. Diese wurde beurteilt anhand der Pyruvat-Aufnahme der Embryonen. Der verringerte Pyruvat-Metabolismus wurde hier als mögliches Zeichen der Zellschädigung durch das slow-cooling interpretiert (Balaban et al., 2008).

Einige prospektive Arbeiten geben Hinweise darauf, dass die Vitrifikation zur Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen ebenfalls das bessere Verfahren darstellt. Kuwayama präsentierte 2005 die Ergebnisse seiner Vergleichsstudie an über 13.000 vitrifizierten Eizellen im Vorkernstadium und Embryonen mit einer 100 % Überlebensrate nach Erwärmung. Die Rate in der slow-cooling Gruppe lag bei 89 % (Kuwayama et al., 2005a). Al-Hasani stellte 2007 die Ergebnisse einer Studie

an 92 Patientinnen vor, deren 2 PN-Eizellen nach dem Protokoll nach Kuwayama vitrifiziert wurden. Den Auftauprozess überlebten 89 % der 339 2 PN-Eizellen. Es wurde eine Schwangerschaftsrate von 36,9 % berichtet. (Al-Hasani et al., 2007). Vier Jahre zuvor wurden am gleichen Institut die Ergebnisse aus 412 Übertragungszyklen von 365 Patienten mit mindestens einem oder mehreren KryoETs nach slow-cooling untersucht. Es wurden klinische Schwangerschaftsraten von 10,2 % je Kryoübertragungszyklus erreicht. Die Ergebnisse der Studie wurden als überzeugend beurteilt und führten am Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck zum Übergang auf die Vitrifikation als Standardverfahren (Schröder et al., 2003). Die Vitrifikation wird als schnelles, sicheres und effektives Verfahren angesehen, das verhältnismäßig leicht durch einen einzigen, gut geschulten Embryologen ohne teure Geräte durchgeführt werden kann (Al-Hasani et al., 2007).

Für die Eizellen im Vorkernstadium sind randomisierte Vergleichsstudien zwischen slow-cooling und Vitrifikation bislang nicht erfolgt. Aus diesem Grund lässt sich keine definitive Aussage über die mögliche Überlegenheit der Vitrifikation von 2 PN-Eizellen treffen. Die Literatur zum Vergleich beider Kryokonservierungsmethoden an Eizellen im Vorkernstadium ist bis heute spärlich. Es fehlt in dem Zusammenhang oft an einer Betrachtung möglicher Einflussfaktoren auf das Behandlungsergebnis. Heterogene Auswertungsmethoden erschweren zudem die Interpretation und die Vergleichbarkeit der Arbeiten.

Mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation soll eine bestehende Lücke in der Frage nach der besseren Kryokonservierungsmethode gefüllt werden. Beim Vergleich der Methoden muss dabei also nicht nur die Überlebensrate, sondern auch das klinische Ergebnis unter Berücksichtigung von relevanten weiteren Einflussfaktoren, untersucht werden. Schließlich war der Effekt auf die Behandlungsergebnisse über mehrere Zyklen zu beschreiben. Diese Ergebnisse könnten weitere Bestrebungen zur Anfertigung einer prospektiv randomisierten Studie zur Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen rechtfertigen und außerdem bei der Konzipierung einer entsprechenden Arbeit hilfreich sein.

## 1.8 Fragestellungen

Die vorangegangenen Ausführungen zeigen die besondere Bedeutung der Kryoembryonenübertragung in der Sterilitätsbehandlung auf. Die bisherigen vergleichenden Untersuchungen zur Frage nach der überlegeneren Kryokonservierungsmethode von 2 PN-Eizellen sollen mit dieser Arbeit ergänzt werden. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien sollen die Auswertungen das Patientenpaar als relevante Bezugsgröße und nicht Kryo-Behandlungszyklen in den Fokus nehmen und darüber hinaus die Ergebnisse unter Berücksichtigung potentiell konfundierende Faktoren analysiert werden.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Wie hoch ist die Inzidenz von „0 überlebten 2 PN-Eizellen“ nach Auftau (slow-cooling) bzw. Erwärmung (Vitrifikation)?
2. Gibt es einen Unterschied in der Überlebensrate nach Auftau von 2 PN-Eizellen zwischen den beiden Kryokonservierungsmethoden bei Betrachtung unabhängiger Ereignisse (nur der jeweils erste, zweite, usw. Kryoauftauzyklus pro eingeschlossenem Patientenpaar).
3. Unterscheiden sich die beiden Methoden bezogen auf das Behandlungsergebnis pro Paar, jeweils für die erste Kryoembryonenübertragung und kumulativ nach allen Übertragungen eines IVF-/ICSI-Zyklus, voneinander? Wie groß ist der Unterschied und wie zuverlässig ist dieser schätzbar?
4. Welche weiteren konfundierenden Faktoren auf das Behandlungsergebnis sind im Rahmen einer logistischen Regression aus den erhobenen Daten zu identifizieren? Welcher residuale Einfluss auf das Behandlungsergebnis durch die Verwendung verschiedener Kryokonservierungsmethoden ist nach Adjustierung für konfundierende Faktoren zu ermitteln?

## II Material und Methoden

### II.1 Patientinnenkollektiv

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Erfassung reproduktionsmedizinischer Daten zum Zwecke der explorativen Datenanalyse. Hierzu wurden alle Paare identifiziert, die am Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck, im Zeitraum zwischen dem 1. Januar 1999 und dem 31. Juli 2011, erstmalig im Rahmen einer IVF- oder ICSI Behandlung eine Kryokonservierung von mindestens einer 2 PN-Eizelle vornehmen ließen. Bei allen Patientinnen bestand die Indikation zur kontrollierten ovariellen Stimulation zur Follikelpunktion mit anschließender IVF bzw. ICSI. Im Zuge dessen wurde mindestens eine überzählige Eizelle im Vorkernstadium mittels slow-cooling oder Vitrifikation kryokonserviert um zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut und in den Uterus übertragen zu werden. Um die Unabhängigkeit der Beobachtungen zu gewährleisten, wurde die Analyse auf den ersten IVF bzw. ICSI-Zyklus mit allen daraus resultierenden Kryoembryonenübertragungen beschränkt. Paare, deren Papierakte nicht im Archiv gefunden werden konnte, wurden wegen unvollständiger Datenlage nicht erfasst. Im Nachhinein aus der Auswertung ausgeschlossen wurden Paare, bei denen im beschriebenen Zeitraum, trotz vorhandener kryokonservierter 2 PN-Eizellen, kein Kryo-Auftauversuch stattgefunden hat.

Vor Beginn der Datenerfassung erfolgte die Anmeldung der Arbeit bei der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck unter dem Aktenzeichen 11-233A.

Die Methoden, die bei der Behandlung der Patientinnen und zur Kryokonservierung angewandt wurden, sollen im Folgenden beschrieben werden.

## II.2 Kontrollierte ovarielle Stimulation und Follikelpunktion

Bei der Mehrzahl der Patientinnen (80 %) wurde das sogenannte Gonadotropin-Releasing-Hormon(GnRH)-Antagonisten Protokoll angewandt. Dazu wurde ab dem zweiten oder dritten Zyklustag täglich mithilfe eines Gonadotropinpräparats, wie Gonal-F® (MerckSerono GmbH, Darmstadt und Genf, Schweiz), Puregon® (Essex Pharma GmbH, München) oder Menogon HP® (Ferring, Kiel), das Heranwachsen mehrerer Eizellen in den Ovarien stimuliert. Die Dosis wurde patientenspezifisch nach Alter und vorherigem Ansprechen auf eine Stimulationsbehandlung bestimmt. Da nicht jede Eizelle den nötigen Reifegrad (Metaphase II (MII)-Eizelle) zur künstlichen Befruchtung hat und nicht zwangsläufig alle Eizellen durch IVF bzw. ICSI befruchtet werden, war das Ziel durch die Punktion möglichst vieler Follikel und Gewinnung möglichst vieler Eizellen beste Voraussetzungen für eine hohe Zahl an 2 PN-Eizellen zu schaffen. Um einen vorzeitigen Eisprung zu verhindern, erhielten die Patientinnen ab dem sechsten Stimulationstag täglich einen GnRH-Antagonisten (Cetrorelix, Cetrotide®, MerckSerono GmbH Darmstadt oder Ganirelix, Orgalutran®, MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar) in der Dosis 0,25 mg verabreicht. Dadurch blieb der regelhafte mittzyklische Anstieg des luteinisierenden Hormons (LH) aus, welcher im natürlichen Zyklus für die Eisprunginduktion verantwortlich ist.

Um den Eisprung vor der geplanten Follikelpunktion gezielt auszulösen bestanden zwei Möglichkeiten: Bei der ersten Variante erfolgte die Induktion durch humanes Choriongonadotropin (hCG) (5.000 oder 10.000 IE (Internationale Einheiten) hCG subkutan (s.c.), Predalon®, Organon, Oss, Niederlande oder Brevactid®, Ferring GmbH, Kiel). Beide hCG-Präparate sind urinären Ursprungs. Seit 2001 wurde auch Ovitrelle® 250 µg s.c. (MerckSerono GmbH, Darmstadt), ein rekombinantes humanes Choriongonadotropin  $\alpha$ , verwendet. Eine zweite Option bot der GnRH-Agonist Triptorelin (Decapeptyl® 0,2 mg, Ferring GmbH, Kiel), welcher die hypophysäre LH-Ausschüttung stimuliert und somit den Eisprung auslöst. Im Regelfall kam es bei letzteren Patientinnen zu einer Kryokonservierung aller Vorkernstadien und zeitlich versetztem KryoET.

Der optimale Zeitpunkt zur hCG-Verabreichung wurde durch regelmäßige sonografische, sowie labormedizinische Kontrollen von Östradiol, Progesteron und LH detektiert. Gleichzeitig konnten hier Anzeichen einer drohenden Überstimulation erkannt werden. In der Praxis wurden mindestens drei Follikel mit jeweils einem Durchmesser  $\geq 17$  mm als wünschenswert für die Ovulationsauslösung angesehen.

Rund 20 % der Patientinnen wurden mittels des sogenannten „langen Protokolls“ stimuliert. Die hypophysäre „Down-Regulation“ erfolgte hier entweder am 21. Tag des vorangegangenen Zyklus durch den GnRH-Agonisten Triptorelin 3,2 mg s.c. (DecapeptylGyn<sup>®</sup>, Ferring GmbH, Kiel) in Depot-Form oder als tägliche Nasensprayapplikation mit Nafarelin 2 mg/ml (Synarela<sup>®</sup> Pfizer Deutschland GmbH, Berlin). Am 14. Tag nach Beginn wurde die suffiziente Down-Regulation sonografisch und labormedizinisch überprüft und anschließend die Stimulation mit Gonadotropinen, wie beschrieben, begonnen. Analog zum Antagonisten-Protokoll wurde der Zeitpunkt zur Ovulationsinduktion eruiert und mit hCG durchgeführt.

Die transvaginale Follikelpunktion fand ca. 36 Stunden (h) nach Ovulationsauslösung statt. Hierzu wurden alle verfügbaren Follikel in beiden Ovarien ultraschallgesteuert punktiert und abgesaugt. Das punktierte Material wurde sofort makroskopisch und stereomikroskopisch untersucht. Die gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe (engl.: cumulus-oocyte-complex; Abk.: COC) wurden in ein Kulturmedium (Fa. Medicult) überführt (jeweils drei bis vier Oozyten pro 5-Milliliter (ml)-Röhrchen in 1 ml Medium) welches konstant bei 37 °C gehalten wurde. Im IVF-Labor wurde im Anschluss der Reifegrad jedes COCs beurteilt.

### *II.3 IVF und ICSI*

Bei ausreichend guter Spermienqualität wurde die IVF als Methode zur Eizellbefruchtung durchgeführt. Die aufbereiteten Spermien wurden zu den reifen MII-

Eizellen gegeben (Van der Ven et al., 1988). Das zugegebene Volumen entsprach einer Spermienkonzentration von  $1 \times 10^5$  progressiv motiler Spermien auf maximal drei Eizellen pro Röhrchen.

Bei stark eingeschränkter Spermienqualität wurde die ICSI zur Fertilisierung angewandt. Dazu wurde aus der aufbereiteten Spermienprobe ein, den Kriterien Morphologie und Motilität zufolge, möglichst optimales Spermium ausgewählt und mit dem Schwanz zuerst in die ICSI-Pipette eingesaugt. Die MII-Eizelle wurde mit der Haltepipette, welche sich wie die ICSI-Pipette in Halterungen des sogenannten Mikromanipulators befand, angesaugt. Die ICSI-Pipette wurde durch die Eimembran gestochen. Daraufhin wurde etwas Zellplasma aspiriert und anschließend das Spermatozoon in der Eizelle abgesetzt (Palermo et al, 1992).

Die Insemination fand zwischen 13 und 14 Uhr statt, sodass am Folgetag gegen 8 Uhr die Oozyten auf Vorkerne untersucht werden konnten. Die Zeitspanne zwischen Bildung und Auflösung der Vorkerne beträgt 16 bis 20 Stunden. Eizellen im Vorkernstadium die nicht für den FrischET vorgesehen waren, wurden in Kulturmedium (SAGE, über Fa. KB-Biosystems) bis zur Kryokonservierung aufbewahrt. Eizellen mit keinem PN, 1 PN und  $\geq 3$  PN, sowie degenerierte Eizellen wurden verworfen. Die maximal drei 2 PN-Eizellen, die für den FrischET vorgesehen waren, wurden für zumindest weitere 24 Stunden inkubiert. Die Qualität der Eizellen im Vorkernstadium wurde nach der Systematik von Scott und Smith beurteilt, um die besten für den FrischET zu identifizieren (Scott und Smith, 1998).

#### *II.4 Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen*

Alle überzähligen 2 PN-Eizellen, die weder für den FrischET verwendet noch verworfen werden sollten, wurden mit einem der nachfolgenden Verfahren kryokonserviert und in dieser Form bis zum KryoET in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Lagerung erfolgte getrennt nach Methode in separaten Kryo-Containern.

Ab 2004 wurde im Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck vereinzelt die Vitrifikation anstelle des slow-cooling eingesetzt. Seit dem 16.06.2005 wurde ausschließlich die Vitrifikation nach dem Protokoll von Kuwayama et al. zur Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen angewendet (mit zwei Ausnahmen im Rahmen einer Studie) (Kuwayama et al., 2005; Kuwayama et al., 2005a).

#### II.4.1 Vitrifikation

Alle überzähligen 2 PN-Eizellen wurden in „Center-Well“-Schalen (maximal sechs pro Schale) mit 0,3 ml Äquilibriumslösung (Tabelle (Tab.) 1) überführt und dort für mindestens 8 Minuten (min) bei RT inkubiert. Hier wird zunächst ein Schrumpfen, dann eine Volumenzunahme (Reexpansion) der Zelle beobachtet. Nachdem diese mindestens 80 % ihres Ursprungsvolumens erreichten, wurden jeweils zwei in eine, mit 0,7 ml Vitrifikationslösung (Tab. 1) vorbefüllten „Center-Well“-Schale überführt. Hier wurden sie für 45 – 60 Sekunden (sec) bei RT inkubiert bevor jeweils maximal zwei (selten drei) Eizellen im Vorkernstadium möglichst nahe der „Cryotop“-Spitze aufgebracht wurden. Um möglichst wenig der Vitrifikationslösung aufzunehmen, benutzte man eine besonders englumige Transferpipette. Sofort im Anschluss wurden die beladenen „Cryotops“ in einen mit LN<sub>2</sub> gefüllten Styroporbehälter getaucht. Hier wurden blaue Schutzhüllen über die Spitze des „Cryotops“ geschoben. Die „Cryotops“ wurden in sogenannte „Goblets“ geschoben. Dies sind spezielle Plastikröhrchen die, an Aluminiumhängern befestigt, als LN<sub>2</sub>-Reservoir dienen. Die „Cryotops“ und Aluminiumhänger wurden mit den Patientendaten beschriftet und in Kryo-Container eingelagert.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der zur Vitrifikation verwandten Lösungen.

|                      |   |
|----------------------|---|
| Äquilibriumslösung   | 7,5 % Ethylenglycol<br>7,5 % DMSO                   |
| Vitrifikationslösung | 15 % Ethylenglycol<br>15 % DMSO<br>0,5 M Saccharose |

### II.4.2 Erwärmung nach Vitrifikation

Bei geplantem KryoET, wurde das Labor mindestens 48 Stunden zuvor informiert um den Aufbewahrungsort zu ermitteln und die Erwärmung vorzubereiten. Zuerst wurden die entsprechenden Aluminiumhänger aus dem Kryo-Container in einen mit LN<sub>2</sub> gefüllten Styroporbehälter überführt und die blaue Schutzkappe vom „Cryotop“ entfernt. Das „Cryotop“ wurde als nächstes in eine „Center-Well“-Schale, die auf 37 °C erwärmte 1 M Saccharoselösung enthielt, eingetaucht. Nun wurden die kryokonservierten Eizellen im Vorkernstadium für höchstens eine Minute in der „Thawing Solution“ (Tab. 2) inkubiert. Dabei wird ein Zellschrumpfen beobachtet. Im Anschluss wurde das Material in der „Diluent Solution“ (Tab. 2) für weitere drei Minuten inkubiert. Hierbei schwillt die Zelle an und schrumpft erneut. Zuletzt wurden die Zellen mit den „Washing Solutions“ (Tab. 2) gespült. Ca. 30 min nach der Erwärmung wurden die Eizellen im Vorkernstadium unter dem Stereomikroskop auf Vitalität überprüft. Falls mehr 2 PN-Eizellen aufgetaut wurden und nach Auftau vital waren als für die Übertragung vorgesehen waren, konnte eine Revitrifikation vorgenommen werden. Alle zur Übertragung vorgesehenen Eizellen im Vorkernstadium wurden bis zum nächsten Tag des KryoETs in frischem Medium weiterkultiviert.

In 38 Fällen (32 Patientinnen) wurden die Eizellen im Vorkernstadium nach Erwärmung bis zum sogenannten Blastozystenstadium weiterkultiviert. Da nicht alle 2 PN-Eizellen ein ausreichendes Entwicklungspotential besitzen, wurden in der Regel jeweils vier bis sechs aufgewärmt und ab Tag zwei nach Erwärmung in einem speziellen Blastozysten-Medium (SAGE, Fa. KB Biosystem) weiterkultiviert. An Tag vier nach Erwärmung, entsprechend Tag fünf der Präimplantationsentwicklung, wurde die Qualität der Blastozysten beurteilt und anschließend die Embryonenübertragung durchgeführt. Embryonen, die das Blastozystenstadium infolge eines Teilungsarrests nicht erreichten, wurden verworfen.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der zur Erwärmung nach Vitrifikation verwandten Lösungen.

|                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| Thawing Solution         | 1 M Saccharose   |
| Diluent Solution         | 0,5 M Saccharose |
| Washing Solution 1 und 2 | Kulturmedium     |

### II.4.3 Slow-cooling

Die slow-cooling Kryokonservierung wurde mithilfe der CTE-880-Gefriereinrichtung durchgeführt. Das Gerät bedient sich des „Offenen Gefrier-Systems“, welches in Kapitel I.5. beschrieben wurde.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der zum slow-cooling verwandten Lösungen.

|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| Kryomedium 1 | 0,5 M PPD                             |
| Kryomedium 2 | 1,5 M PPD-Lösung                      |
| Kryomedium 3 | 1,5 M PPD-Lösung mit 0,1 M Saccharose |

Zunächst wurden jeweils zwei bis drei 2 PN-Eizellen aus dem Kulturmedium in eine vorbereitete „Center-Well“-Schale mit Kryomedium 1 (Tab. 3) überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Inkubation der Eizellen für weitere 10 min in Kryomedium 2 (Tab. 3). Zuletzt wurden sie in Kryomedium 3 (Tab. 3) überführt, dort gespült und auf „Ministraws“ (Mika Company, Rosenheim, Deutschland) umgesetzt, welche mit einer Metallkugel verschlossen wurden. Die „Straws“ wurden vorher mit Kryomedium 3 (Tab. 3) befüllt und am Ende der Geißel verschweißt. Ein Referenzstraw wurde auf den Messfühler der CTE-Einheit geschoben und anschließend das mit Eizellen beladene „Straw“ in die Gefriereinrichtung eingebracht. Nach insgesamt 5-minütiger Inkubation in Kryomedium 3 startete der automatisierte Einfriervorgang in der Gefriereinrichtung nach dem Abkühlschema in Tabelle 4. Die „Straws“ wurden hierbei schrittweise in den flüssigen Stickstoff abgesenkt und dabei bis auf -33 °C abgekühlt. Nach 30 min bei -33 °C wurden die „Straws“ mit einer großen Metallpinzette aus dem CTE-LN<sub>2</sub>-Tank geholt und zur Lagerung in LN<sub>2</sub>-Behälter umgesetzt (Al-Hasani und Ludwig, 1996).

**Tabelle 4:** Ablauf der slow-cooling Kryokonservierung.

| Rampe | Temperaturbereich                                      | Kühlgeschwindigkeit in °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     | „Self-Seeding“ bei -7 °C                               |                               |
| 7     | -7 °C bis -33 °C                                       | 0,3                           |
| 9     | 30 min bei -33 °C, dann Übertragung in LN <sub>2</sub> |                               |

#### II.4.4 Auftau nach slow-cooling

Das aufzutauende „Straw“ wurde mit der Pinzette aus dem Kryotank geholt und in einem mit LN<sub>2</sub> gefüllten Behälter zwischengelagert. Zunächst wurde das „Straw“ ca. 30 sec in Raumluft gehalten. Stickstoff in schlecht versiegelten „Straws“ konnte so entweichen. Anschließend wurde das „Straw“ für ca. 60 sec in destilliertem Wasser bei 37 °C erwärmt. Zur Öffnung der „Straws“ bestanden zwei Möglichkeiten.

Bei der ersten Variante wurde zunächst die Seite des „Straws“, die mit der Metallkugel verschlossen wurde, ebenso wie ein Teil der Geißel, aufgeschnitten. Es wurde dann mit einer 1-ml-Spritze Auftaumedium 1 (Tab. 5) durch die Geißel gespritzt, wobei die austretende Flüssigkeit am Strawende aufgefangen wurde.

Für die zweite Methode wurden beide Seiten des „Straws“ komplett abgeschnitten und der Inhalt in eine Plastikschaale geschüttet. Es wurde sofort stereomikroskopisch auf das Vorhandensein der Eizellen im Vorkernstadium untersucht. Diese wurden für 10 min in Auftaumedium 1 übertragen und bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden sie für 10 min bei 37 °C in Auftaumedium 2 (Tab. 5) überführt. Alle 2 PN-Eizellen wurden zuletzt mehrfach in Kulturmedium gespült und über Nacht zur Übertragung im Inkubator weiterkultiviert. Die Vitalität der 2 PN-Eizellen wurde 30 min nach der Auftauprozedur überprüft.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der zur Erwärmung nach slow-cooling verwandten Lösungen.

|                |                  |
|----------------|------------------|
| Auftaumedium 1 | 0,5 M Saccharose |
| Auftaumedium 2 | 0,2 M Saccharose |

#### II.5 Endometriumvorbereitung zur Kryoembryonenübertragung

Die Patientinnen starteten selbstständig die Vorbereitung zum KryoET am ersten Zyklustag. Die Vorbereitung des Endometriums auf die Kryoübertragung erfolgte nach dem im Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck etablierten, und exklusiv verwendeten Protokoll. Ab Behandlungs-, bzw. Zyklustag eins klebten die Patientinnen ein Estradot® 100 Pflaster (Novartis Pharma GmbH, Nürnberg), das

an jedem zweiten Abend durch ein neues ersetzt wurde. Es handelt sich hierbei um ein Östrogenpräparat, durch das der Aufbau des Endometriums stimuliert und der Eisprung unterdrückt wird. An Tag 7 wurde die Dosis auf zwei und an Tag 11 auf vier zu klebende Pflaster erhöht. Am 14. - 15. Zyklustag wurde ein Ultraschall- und Hormonmonitoring (Östradiol, Progesteron, LH) vorgenommen. Hierbei wurde eine Follikelreifung ausgeschlossen und der suffiziente Endometriumaufbau kontrolliert. Ab dem 15. Zyklustag wurde mit der zusätzlichen täglichen Gabe eines vaginalen Progesteronpräparats begonnen (Crinone® Gel 8 %, MerckSerono). Am 17. Zyklustag erfolgte die Embryonenübertragung der tags zuvor aufgetauten 2 PN-Eizellen (Bals-Pratsch et al., 1999).

Die Substitution mit zwei Pflastern alle zwei Tage und einmal täglich das Progesteronpräparat wurde bis zum Schwangerschaftstest, an Tag 12 nach der Übertragung fortgeführt. Da die Übertragung in einem artifiziellen Zyklus ohne Ovulation, somit ohne Corpus luteum graviditatis, stattfand wurde die Medikation bei Schwangerschaftseintritt für 8 Wochen fortgesetzt, um einen Abort zu verhindern. Bei der Blastozystenübertragung fand die Kryovertragung entsprechend der verlängerten Kulturzeit der Embryonen an Zyklustag 20 oder 21 statt.

## *II.6 Beurteilung der Embryoqualität*

Eine halbe Stunde vor jeder Frisch- und Kryovertragung wurde eine Beurteilung der Embryonenqualität durch den Embryologen vorgenommen. Dazu wurden zum einen die Anzahl der entwickelten Blastomeren und zum anderen der prozentuale Anteil der Zellfragmentation angegeben (Schema nach Steer et al.) (Steer et al., 1992).

Dabei wurden folgende Kategorien unterschieden:

- Grad A: 0 % Fragmentation
- Grad B: > 0 %, ≤ 20 % Fragmentation
- Grad C: > 20 %, ≤ 50 % Fragmentation
- Grad D: > 50 % Fragmentation

Die Anzahl der Blastomeren wurde dem Fragmentationsgrad vorangestellt. Die genutzte Dokumentationssoftware MeditexIVF erfasste die Embryoqualität als „ideal“ oder „nicht ideal“. Hier entsprachen die Kategorien A und B der Angabe „ideal“ und die Kategorien C und D dem Eintrag „nicht-ideal“. Für die Arbeit wurde die Unterscheidung zwischen „idealem“ und „nicht-idealem“ Embryo übernommen.

### *II.7 Durchführung der Embryonenübertragung*

Frischembryonenübertragungen fanden in der Regel ca. 48 Stunden nach IVF/ICSI statt. Die KryoETs fanden etwa 24 Stunden nach Erwärmung bzw. Auftau statt. Zum Zeitpunkt des Embryonentransfers bzw. der Embryonenübertragung (ET) hatten die Embryonen üblicherweise das Zwei- bis Achtzellstadium erreicht.

Frisch- und Kryoübertragungen wurden gleichermaßen bei der wachen Patientin in Steinschnittlage durchgeführt. Dazu wurde nach Einstellung der Portio der flexible Führungskatheter unter transabdomineller Ultraschallkontrolle in den Zervikalkanal eingeführt. Währenddessen belud der Embryologe den Transferkatheter (Cook®, Aachen, Deutschland) mit den Embryonen, ca. 7-8 µl Medium und etwas Luft. Die Embryonen wurden dann in das Cavum uteri eingespült. Alle Katheter wurden auf verbliebene Embryonen kontrolliert, um gegebenenfalls eine erneute Übertragung durchzuführen. Bei der Blastozystenübertragung wurde ein Transferkatheter mit einem Durchmesser von  $\geq 200$  µm benutzt.

### *II.8 Fallzahlüberlegung*

Die Schätzung der benötigten Fallzahl, um relevante Veränderungen des primären Ergebnisparameters, der Überlebensrate von 2 PN-Eizellen nach Auftau, verlässlich zu messen, wurde a-priori durchgeführt. Als Grundlage diente eine vorangegangene retrospektive Arbeit, die einen Unterschied der Überlebensrate von ca. 25 % zugunsten der Vitrifikation zeigte (Schultze-Mosgau, 2007). Um Unterschiede in der Überlebensrate bis zu einer Größenordnung von 5 %, mit einem alpha-Fehler von 5 % und einer Teststärke von 80 %, nachzuweisen, ist

eine Gruppengröße von jeweils 252 ausreichend. Dies gilt unter der Annahme einer Standardabweichung (SD) von 20 % und einer erwarteten Überlebensrate von etwa 90 %.

## *II.9 Datenerhebung*

Die Identifikation der einzuschließenden Patientinnen geschah mithilfe des am Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck benutzten Datenbankprogramms MeditexIVF® (früher: RecDateAdvance®). Es handelt sich um ein elektronisches Datenbanksystem zur Erfassung reproduktionsmedizinisch relevanter Patienten- und Behandlungsinformationen. Es bietet darüber hinaus die Möglichkeit zur Abfrage und Auswertung von Daten nach gewünschten Suchkriterien.

Folgende Kriterien wurden in die Suchabfrage integriert:

- Datum der Follikelpunktion nach dem 31.12.1998 und vor dem 01.08.2011
- Therapieart ICSI, IVF oder ICSI und IVF
- Anzahl kryokonservierter 2 PN-Eizellen  $\geq 1$

Die Ergebnisabfrage aus MeditexIVF® wurde um anamnestische und reproduktionsbiologische Parameter ergänzt (siehe Kapitel II.10). Die MeditexIVF® Abfrage wurde in einer Excel Tabelle (Microsoft Office Excel 2007) ausgegeben. Diese enthielt eine Liste aller Patientinnen mit ihren durchgeführten IVF-/ICSI-Behandlungen, bei denen mindestens eine überzählige 2 PN-Eizelle im Anschluss kryokonserviert wurde. Die Tabelle wurde auf wiederholte IVF-/ICSI-Zyklen pro Patientin untersucht. Diese Zyklen wurden entfernt, sodass jede Patientin nur mit ihrer ersten IVF-/ICSI-Behandlung zur Auswertung kam. Die Excel Tabelle wurde in ein SPSS File (SPSS Version 21 und 22) überführt, in welchem die weitere Datensammlung und -analyse erfolgte. Zur Wahrung des Datenschutzes wurden alle Patientinnen durch eine Patientenummer reversibel verblindet. Um das kumulative Outcome auswerten zu können wurde ein „follow-up“ von 1,5 Jahren für die zuletzt erfassten Patientinnen aufgezeichnet.

Die Ergänzung aller fehlenden Daten erfolgte aus dem MeditexIVF® und der Patientenakte in Papierform. Fehlende Hormonwerte wurden aus Laborbüchern des Hormonlabors übernommen. Des Weiteren wurden Informationen aus den Behandlungstabellen des IVF-Labors gewonnen.

Alle Daten wurden in einer SPSS Datei erfasst. Eine Zeile entsprach hier einem Behandlungszyklus, bzw. einer Embryonenübertragung. Zur Auswertung wurden mehrere Datensätze erstellt. Zunächst wurden die Frischübertragungen aus dem Datenblatt entfernt. Es entstand ein Datensatz mit ausschließlich allen Kryoembryonenübertragungen jeder Patientin. Es wurden daraufhin für jeden Rang des KryoETs ein Datensatz erstellt (respektive alle ersten, zweiten, etc. KryoETs). Zuletzt wurde mithilfe der „Umstrukturieren“-Funktion von SPSS ein Datenblatt erstellt in dem jeder Datensatz einer Patientin und den Informationen ihres gesamten IVF-/ICSI-Zyklus entsprach.

## *II.10 Erfasste Parameter*

Für die Analyse wurden alle potenziell relevanten demografischen und anamnestischen Einflussparameter jedes Patientenpaars erfasst. Folgende demografische Variablen wurden erfasst (Erfassung zum Zeitpunkt der Follikelpunktion):

- Alter der Patientin und Alter des Partners in Jahren (a)
- Größe in cm, Gewicht in kg und Body-Mass-Index (BMI) kg/m<sup>2</sup> der Patientin
- Nikotinkonsum der Patientin (Zigaretten pro Tag)
- Parität (nein/ ja mit gleichem Partner/ ja mit anderem Partner)
- Dauer des Kinderwunschs in Monaten
- Indikation zur ICSI/IVF (siehe Kapitel III.4)
- Anzahl an vorausgegangenen Stimulationsbehandlungen zur IVF oder ICSI
- Anzahl an bereits durchgeführten Embryonenübertragungen

Darüber hinaus wurden folgende reproduktionsbiologische Parameter zu den jeweiligen IVF-/ICSI-Zyklen und allen dazugehörigen KryoETs erfasst. Das Ergebnis jeder Behandlung wurde ebenfalls aufgezeichnet (siehe Kapitel II.11).

- IVF oder ICSI durchgeführt
- Stimulationsprotokoll (GnRH-Antagonist/ GnRH-Agonist/ andere)
- Gonadotropin (Gonal-F/ Menogon/ Puregon)
- Trigger zur finalen Eizellreifung (hCG 5.000/ 10.000IE/ Ovitrelle/ GnRH-Agonist)
- Östradiol- und Progesteronpeak bei Ovulationsinduktion in pg/ml und ng/ml
- Datum der Follikelpunktion
- Anzahl der punktierten Eizellen
- Anzahl der Eizellen im MII-Stadium
- Anzahl der zu ICSI und/oder IVF zugeführten Eizellen
- Gesamtzahl an Eizellen, die der ICSI und/oder IVF zugeführt wurden
- Aus IVF und/oder ICSI hervorgehende 2 PN-Eizellen
- Gesamtzahl an 2 PN-Eizellen aus ICSI und IVF
- Anzahl aller kryokonservierten 2 PN-Eizellen aus ICSI und/oder IVF
- Gesamtzahl an kryokonservierten 2 PN-Eizellen aus ICSI und IVF
- Rang der Kryoembryonenübertragung (0=Frischembryonenübertragung)
- Anzahl der aufgetauten und überlebten 2 PN-Eizellen pro Übertragung
- Gesamtzahl der aufgetauten 2 PN-Eizellen pro Patientin
- Gesamtzahl der überlebten 2 PN-Eizellen pro Patientin
- Art der Kryokonservierung (slow-cooling/ Vitrifikation)
- primär elektive Kryokonservierung aller 2 PN-Eizellen oder FrischET
- Zahl an vorausgegangenen Embryonenübertragungen zum Zeitpunkt des ETs
- Tag der Präimplantationsentwicklung der Embryonen am Übertragungstag
- Anzahl der übertragenen Embryonen pro Übertragung
- Anzahl idealer übertragener Embryonen pro Übertragung
- Anzahl nicht- idealer übertragener Embryonen pro Übertragung
- Anzahl aller durchgeführten KryoETs pro Patientin

- Anzahl aller übertragener Embryonen in allen KryoETs
- Anzahl an übertragenen Embryonen in allen ETs (Frisch und KryoET)
- $\beta$ -hCG-Wert zum Zeitpunkt des Schwangerschaftstest
- Outcome des FrischET in diesem IVF-/ICSI-Zyklus  
(0=FrischET nicht erfolgt)
- Outcome dieser Embryonenübertragung  
(siehe Ergebnisdefinitionen, Kapitel II.11)
- Blastozystenkultur- und übertragung nach Auftau bzw. Erwärmung (ja/ nein)

Des Weiteren wurden folgende Informationen aus den bereits erfassten Parametern errechnet und als neue Variable im SPSS Dokument generiert.

- Befruchtungsrate nach IVF/ICSI
- Überlebensrate der 2 PN-Eizellen pro Auftauversuch
- Überlebensrate aller 2 PN-Eizellen pro IVF/ICSI-Zyklus
- Kumuliertes Outcome der Patientin im gesamten ICSI-/IVF-Zyklus

## II.11 Ergebnisdefinitionen

### Überlebensraten nach Auftau

Die Überlebensrate nach Erwärmung bzw. Auftau wurde definiert als Anteil aller vitalen 2 PN-Eizellen nach Auftau an allen für diesen KryoET aufgetauten 2 PN-Eizellen in Prozent.

### Finale Behandlungsergebnisse

Für jede Frisch- und Kryoembryonenübertragung wurde das Behandlungsergebnis erfasst. Folgende Ergebnisse wurden unterschieden.

- Eine biochemische Schwangerschaft lag vor wenn ein Serum-Schwangerschaftstest ab dem 12. Tag nach ET einen hCG-Wert  $> 6\text{mU/ml}$  anzeigte.
- Das Vorhandensein einer sonografisch darstellbaren Fruchthöhle mit Nachweis des fetalen Herzschlags wurde als klinische Schwangerschaft definiert.
- Eine Schwangerschaftsdauer  $>10$ . SSW wurde als fortlaufend bezeichnet.
- Ein Schwangerschaftsende nach der 12. SSW und vor Lebensfähigkeit des Fetus wurde als Spätabort definiert.
- Die Geburt (zumindest) eines lebenden Neugeborenen wurde als Lebendgeburt definiert.

### Kumulative Schwangerschafts- und Geburtenraten

Zur Berechnung der kumulativen Raten wurden für jeden Übertragungszyklus (FrischET, erster KryoET, etc.) die Anzahl der Patientinnen erfasst, die in diesem Zyklus mindestens den gefragten Behandlungsergebnis erreicht haben. Dies wurde errechnet für die Ergebnisse biochemische Schwangerschaft, klinische Schwangerschaft und Lebendgeburt. Sobald eine Patientin das entsprechende Ergebnis erreicht hatte, wurde sie im darauffolgenden Übertragungszyklus nicht mehr gezählt auch wenn sie das Outcome ein zweites Mal erreichte. Die

Häufigkeiten wurden addiert und relativ zur Patientinnenanzahl der jeweiligen Kryokonservierungsgruppe in Prozent angegeben.

Außerdem wurden die entsprechenden Raten nochmals ausschließlich für den ersten Kryoauftauversuch jeder Patientin errechnet.

## *II.12 Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 21 und 22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics, Version 21.0./22.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Die Normalverteilung intervallskalierter und quantitativer Variablen wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest geprüft.

Für metrische Variablen wurden Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) berechnet. Für kategoriale Variablen wurden prozentuale Häufigkeiten angegeben. Mit der Confidence Interval Analysis Software, CIA<sup>®</sup> 2.1.1, 2000 wurde jeweils das 95 % Konfidenzintervall (95 KI) bzw. das 95 % KI der Differenz zweier Häufigkeiten berechnet. Die Mittelwerte zweier metrischer, nicht-normalverteilter Variablen wurden mittels U-Test nach Mann & Whitney für unverbundene Stichproben verglichen. Die Mittelwerte zweier metrischer, normalverteilter Variablen wurden mittels t-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Der Vergleich der Verteilung zweier Häufigkeiten wurde mittels Chi-Quadrat Test durchgeführt. Ebenfalls zur Anwendung kam hier der Fisher's Exact Test wenn mehr als 20 % der erwarteten Häufigkeiten kleiner als 5 waren.

Zur Identifikation von Einflussfaktoren (unabhängige Variablen) auf die Eintrittswahrscheinlichkeit eines Therapieoutcomes (abhängige Variable) wurde eine binär logistische Regression in SPSS durchgeführt. Dazu wurde der Therapieerfolg betrachtet, den das Paar in allen ETs des IVF-/ICSI-Zyklus kumuliert erreichte.

Folgende abhängige Variablen wurden hierzu jeweils dichotom codiert:

- Eintritt mindestens einer biochemischen Schwangerschaft (ja/ nein)
- Eintritt mindestens einer klinischen Schwangerschaft (ja/ nein)
- Eintritt mindestens einer Lebendgeburt (ja/ nein)

Die unabhängigen Variablen wurden schrittweise mit der Vorwärts-Wald-Methode eingeschlossen. Nach jeder Variable wurde hierbei geprüft, ob diese einen signifikanten Beitrag zum Regressionsmodell leistet. Ausschließlich statistisch signifikante Einflussfaktoren werden in den Ergebnissen dargestellt. Als unabhängige Variablen wurden zum einen aus der Literatur bekannte Einflussfaktoren gewählt noch weitere wurden mittels univariater Analyse mit den zuvor genannten Signifikanztests identifiziert. Die Anpassungsgüte des Regressionsmodells wurde mittels Hosmer-Lemeshow-Test beurteilt.

Folgende unabhängige Variablen wurden in die Analyse gegeben:

- Alter von Patientin und Partner
- Größe, Gewicht und BMI der Patientin
- Dauer des Kinderwunsches in Monaten
- Nikotinkonsum der Patientin (Zigaretten pro Tag)
- Anzahl vorausgegangener Stimulationsbehandlungen zur IVF/ICSI (n)
- Anzahl vorausgegangener Embryonenübertragungen (n)
- Blastozystenkultur nach Auftau stattgefunden (nein/ja)
- primär elektive Kryokonservierung oder Kryokonservierung nach FrischET
- Art der Kryokonservierung (slow-cooling/ Vitrifikation)
- Anzahl punktierter Eizellen (n)
- Stimulationsprotokoll (Antagonist/Agonist)

Zuletzt wurde untersucht wie sich der Einfluss der unabhängigen Variablen auf die Lebendgeburtenwahrscheinlichkeit verändert, wenn die Aufnahme der „Art der Kryokonservierung“ in das Regressionsmodell erzwungen wird. Hierzu wurde die Variable in einem ersten Block in das Modell eingeschlossen. Anschließend wurden alle weiteren unabhängigen Variablen schrittweise mittels Vorwärts-Wald-Methode in einen zweiten Block aufgenommen. Als Ergebnis wurden die Odds ratios (OR) zwischen der jeweiligen unabhängigen Variable und dem Behandlungsergebnis dargestellt.

Die Grafiken wurden in Microsoft Office Excel 2007 und LibreOffice Calc 4.2 erstellt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant gewertet. Eine Korrektur für multiples Testen wurde nicht durchgeführt.

Nach der statistischen Auswertung erfolgte eine Besprechung der gewählten Analyseverfahren, der Ergebnisse und der Interpretation der Daten aus statistischer Sicht im Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck (Dr. rer. hum. biol. Claudia Hemmelmann).

#### Umgang mit fehlenden Werten

Um zu vermeiden, dass jeder Fall mit mindestens einem fehlenden Variablenwert aus der Regressionsanalyse ausgeschlossen wird, wurde vor Durchführung der Regressionsanalyse ein weiterer Datensatz erstellt, in dem fehlende Werte ersetzt wurden. Die Substitution der Inhalte geschah je nach Skalenniveau der Variable (nominalskaliert, ordinalskaliert oder intervallskaliert) durch, für die jeweilige Kryokonservierungsgruppe ermittelten, Mittelwerte, Mediane oder Modalwerte.

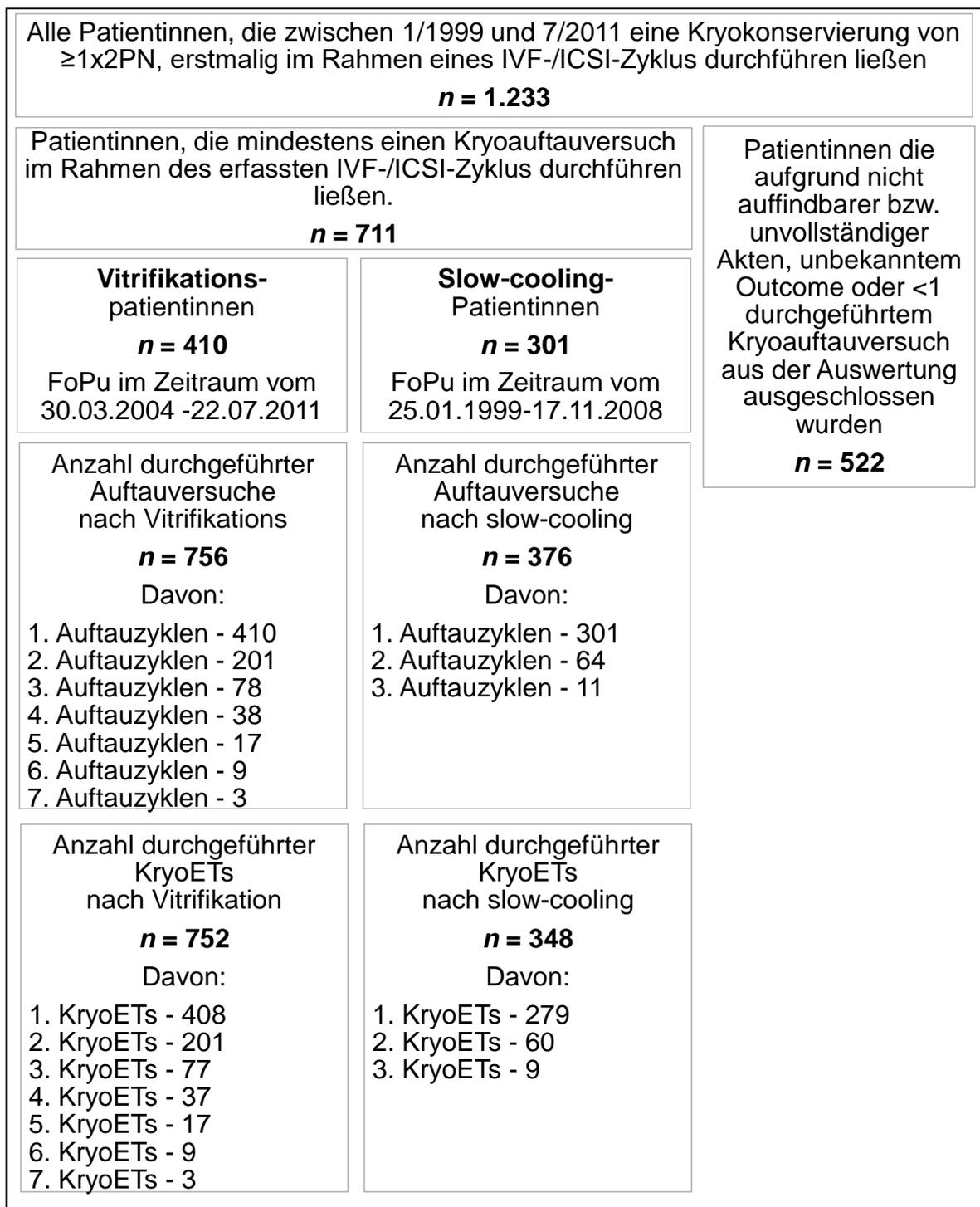
### III Ergebnisse

#### III.1 Patientenkollektiv

Es wurden 1.233 Patientinnen identifiziert, die die genannten Einschlusskriterien erfüllen. 522 Patientinnen wurden aufgrund unvollständiger Akten, unbekanntem Therapieausgang und nicht durchgeführtem Kryoauftau aus der Auswertung genommen. Insgesamt gelangten 711 Patientinnen, welche erstmals im Zeitraum vom 01.01.1999 bis zum 31.07.2011 eine IVF/ICSI mit Kryokonservierung mindestens einer 2 PN-Eizelle und mindestens einem Kryoauftau durchführen ließen, zur Auswertung. Bei 301 Patientinnen wurde die Kryokonservierung mittels slow-cooling durchgeführt (25.01.1999-17.11.2008). Die Eizellen im Vorkernstadium der übrigen 410 Patientinnen wurden vitrifiziert (30.03.2004-22.07.2011). In der slow-cooling Gruppe wurden pro Patientin maximal drei konsekutive Kryoauftauversuche durchgeführt. In der Vitrifikationsgruppe waren es 7. Aus einigen Auftauvorgängen gingen keine vitalen 2 PN-Eizellen hervor, was die unterschiedliche Anzahl der Auftauversuche- und KryoET-Zyklen erklärt (Abb. 2). Die erfassten Kryoembryonenübertragungen in der slow-cooling Gruppe wurden zwischen dem 24.4.1999 und 13.07.2009 durchgeführt. 298 Patientinnen dieser Gruppe hatten vor der ersten Kryoembryonenübertragung eine Frischübertragung. Bei 3 Patientinnen wurden primär alle 2 PN-Eizellen eingefroren. 121 Patientinnen der Vitrifikationsgruppe ließen primär alle 2 PN-Eizellen einfrieren. Bei 289 der 410 Patientinnen in dieser Gruppe wurde eine Frischembryonenübertragung vor der ersten Kryoembryonenübertragung durchgeführt (Tab. 6).

**Tabelle 6:** Anteil primär elektiver Kryokonservierungen ohne Frischübertragung gegenüber Patientinnen mit Frischübertragung in beiden Gruppen.

|   | <b>Vitrifikation</b> <i>n</i> =410<br><i>n</i> (%) | <b>Slow-cooling</b> <i>n</i> =301<br><i>n</i> (%) |
|---|--|---|
| Kryokonservierung aller 2 PN-Eizellen nach FrischET | 289 (70,5)   | 298 (99,0)  |
| Primär elektive Kryokonservierung ohne FrischET     | 121 (29,5)   | 3 (1,0)   |



**Abbildung 2:** Flussdiagramm zur Darstellung der erfassten und ausgewerteten Patientinnen mit Auftau- und Übertragungszyklen für beide Kryokonservierungsmethoden.

### III.2 Demografische Daten

Beide Gruppen wurden bezüglich demografischer Eigenschaften der Paare zum Zeitpunkt der Follikelpunktion verglichen. Die Werte in Klammern zeigen im Folgenden zunächst die Vitrifikationsgruppe, dann die slow-cooling Gruppe an.

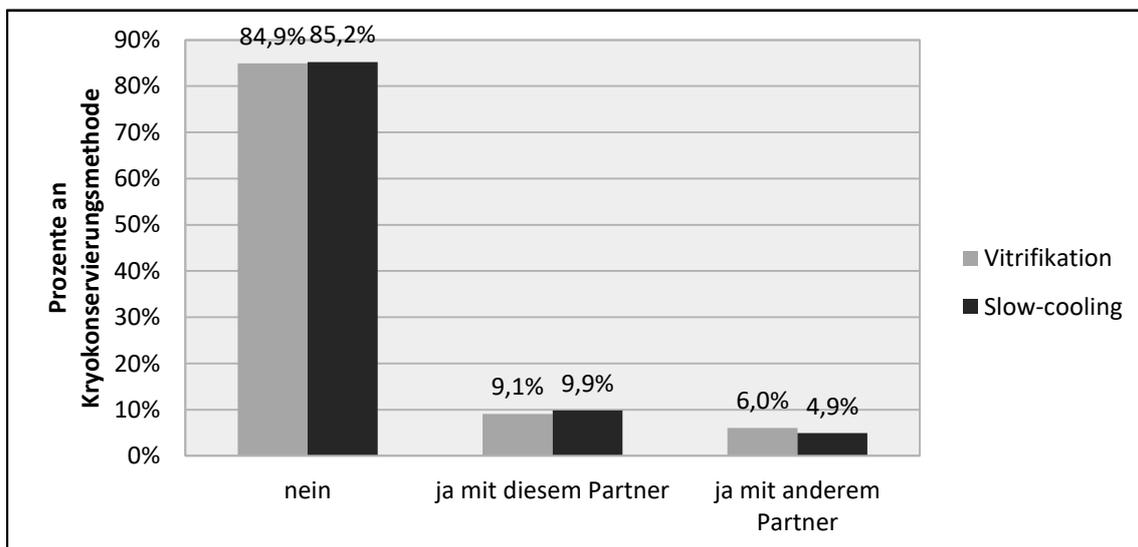
Insgesamt wurden die Daten von Patientinnen im Alter zwischen 19 und 43 Jahren erfasst. Das Alter der Patientinnen der Vitrifikationsgruppe zum Zeitpunkt der FoPu liegt im Mittel bei 32,8, in der slow-cooling Gruppe bei 31,7 Jahren ( $p < 0,01$ ). Weiterhin zeigen sich signifikante Unterschiede im mittleren Alter des Partners (36,6 Jahre vs. 34,9 Jahre), der Größe der Patientin (169 cm vs. 168 cm), der Dauer des Kinderwunschs (46 vs. 51 Monate), der Anzahl vorangegangener Stimulationsbehandlungen zur IVF/ICSI (0,5 vs. 0,8), dem Nikotinkonsum (4,4 vs. 4,3 Zigaretten pro Tag), sowie der Anzahl zuvor durchgeführter ETs (1,3 vs. 2,0).

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen findet sich bezüglich des mittleren Gewichts (67,2 kg vs. 67,3 kg) und des BMI-Werts der Patientin (23,7 kg/m<sup>2</sup> vs. 24,0 kg/m<sup>2</sup>). In Tabelle 7 sind die Ergebnisse veranschaulicht. Sie zeigt ebenfalls die jeweils fehlenden Werte für einzelne Variablen. Beide Gruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich vorangegangener Geburten (Abb. 3).

**Tabelle 7:** Demografische Patientinneneigenschaften beider Kryokonservierungsgruppen zum Zeitpunkt der Follikelpunktion.

| Patientenvariablen zum Zeitpunkt der Follikelpunktion | Vitrifikation<br>(n=410)                                     | Slow-cooling<br>(n=301)       | p     |
|---|--|-------------------------------|-------|
|   | Mittelwert ± Standardabweichung<br>[95 % Konfidenzintervall] |                               |       |
| Alter der Patientin (a)                               | n=410<br>32,8±4,4 [32,4-33,3]                                | n=301<br>31,7±4,3 [31,2-32,1] | <0,01 |
| Alter des Partners (a)<br>*5 fehlende Werte           | n=409<br>36,6±5,8 [36,1-37,2]                                | n=297<br>34,9±5,5 [34,3-35,5] | <0,01 |

|  |                                       |                                       |       |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|
| Größe der Patientin (cm)<br>*4 fehlende Werte  | $n=408$<br>168,5±6,4<br>[167,9-169,2] | $n=299$<br>167,5±6,5<br>[166,8-168,2] | 0,03  |
| Gewicht der Patientin (kg)<br>*3 fehlende Werte  | $n=408$<br>67,2±11,9<br>[66,0-68,3]   | $n=300$<br>67,3±12,5<br>[65,9-68,7]   | 0,99  |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )<br>*4 fehlende Werte  | $n=408$<br>23,7±4,0 [23,3-24,0]       | $n=299$<br>24,0±4,0 [23,5-24,4]       | 0,14  |
| Dauer des Kinderwunschs (Monate)<br>*14 fehlende Werte                                 | $n=407$<br>45,6±27,4<br>[42,9-48,3]   | $n=290$<br>50,7±32,4<br>[47,0-54,5]   | 0,02  |
| Anzahl vorangegangener Stimulationsbehandlungen zur IVF/ ICSI (n)<br>*1 fehlender Wert | $n=410$<br>0,5±1,0 [0,4-0,6]          | $n=300$<br>0,8±1,1 [0,7-0,9]          | <0,01 |
| Nikotinkonsum (Zigaretten/Tag)<br>*23 fehlende Werte                                   | $n=405$<br>4,4±15,1 [3,0-5,9]         | $n=283$<br>4,3±12,4 [2,8-5,8]         | 0,03  |
| Anzahl zuvor durchgeführter ETs (n)<br>*2 fehlende Werte                               | $n=410$<br>1,3±1,2 [1,2-1,4]          | $n=299$<br>2,0±1,4 [1,8-2,1]          | <0,01 |



**Abbildung 3:** Vergleich vorangegangener Geburten beider Gruppen zum Zeitpunkt der FoPu ( $p>0,5$ ).

### III.3 Reproduktionsbiologische Daten

Patientinnen beider Gruppen wurden häufiger nach dem Antagonisten-Protokoll stimuliert (93,4 % und 62,1 %). Zur finalen Eizellreifung kam in beiden Gruppen hCG häufiger zur Anwendung als GnRH-Agonisten (76,3 % und 96,3 %) (Tab.8).

**Tabelle 8:** Stimulationsprotokoll und Art der finalen Eizellreifung in beiden Gruppen.

|  |                        | <b>Vitrifikation</b><br><i>n</i> (%) | <b>Slow-cooling</b><br><i>n</i> (%) |
|--|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Stimulationsprotokoll  | Antagonisten-Protokoll | 383 (93,4)                           | 187 (62,1)                          |
|  | Agonisten-Protokoll    | 27 (6,6)                             | 114 (37,9)                          |
| Finale Eizellreifung<br>* 2 fehlende Werte in der Vitrifikationsgruppe | hCG                    | 311 (76,3)                           | 290 (96,3)                          |
|  | GnRH-Agonist           | 97 (23,7)                            | 11 (3,7)                            |

Die mittlere Östradiolkonzentration beider Gruppen zum Zeitpunkt der Eisprungauslösung unterscheidet sich nicht signifikant voneinander (2.780,2 pg/ml vs. 2.668,6 pg/ml;  $p=0,86$ , wie in Tabelle 9 gezeigt wird.

In 96 Fällen waren die Progesteronwerte nicht zu erfassen. Die auswertbaren Patientinnen zeigten im Mittel in der Vitrifikationsgruppe Werte von 1,2 ng/ml und 1,1 ng/ml in der slow-cooling Gruppe. Die Differenz ist bei einem  $p$ -Wert von 0,02 signifikant zwischen den beiden Gruppen (Tab.9).

**Tabelle 9:** Hormonwerte zum Zeitpunkt der Ovulationsauslösung.

| <b>Hormonhöchstwerte zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion</b> | <b>Vitrifikation</b><br>( <i>n</i> =410)                     | <b>Slow-cooling</b><br>( <i>n</i> =301)               | <i>p</i> |
|--|--|---|----------|
|  | Mittelwert ± Standardabweichung<br>[95 % Konfidenzintervall] |   |          |
| Östradiol (pg/ml)<br>*13 fehlende Werte                        | <i>n</i> =400<br>2.780,2±1.739,3<br>[2.609,2-2.951,2]        | <i>n</i> =298<br>2.668,6±1.409,9<br>[2.507,9-2.829,3] | 0,86     |
| Progesteron (ng/ml)<br>*96 fehlende Werte                      | <i>n</i> =400<br>1,2±0,8 [1,2-1,3]                           | <i>n</i> =215<br>1,1±0,5 [1,0-1,1]                    | 0,02     |

Im Mittel wurden bei den Vitrifikationspatientinnen 13,6 Eizellen punktiert. Bei den slow-cooling Patientinnen waren es 14,7 Eizellen. Des Weiteren ergeben sich signifikante Gruppenunterschiede ( $p < 0,01$ ) bezüglich der Anzahl reifer MII-Eizellen (10,6 vs. 11,8), 2 PN-Eizellen (6,9 vs. 8,0) und kryokonservierter 2 PN-Eizellen (5,4 vs. 5,6). Die Fertilisationsraten der Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant (66,9% vs. 65,6;  $p = 0,11$ ). Für eine Vitrifikationspatientin konnte die Anzahl der MII-Eizellen nicht nachvollzogen, sowie die Fertilisationsrate nicht errechnet, werden. Die Ergebnisse der Follikelpunktion und anschließender IVF-/ICSI sind Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10:** Resultate der Follikelpunktion, anschließender IVF-/ICSI-Behandlung und Kryokonservierung beider Gruppen.

| Variablen zum Zeitpunkt der Follikelpunktion bzw. nach IVF/ICSI | Vitrifikation<br>( $n=410$ )                                     | Slow-cooling<br>( $n=301$ )            | $p$   |
|---|--|--|-------|
|   | Mittelwert $\pm$ Standardabweichung<br>[95 % Konfidenzintervall] |  |       |
| Anzahl punktierter Eizellen ( $n$ )                             | 13,6 $\pm$ 6,5 [13,0-14,2]                                       | 14,7 $\pm$ 5,4 [14,1-15,3]             | <0,01 |
| Anzahl MII-Eizellen ( $n$ )<br>*1 fehlender Wert                | $n=409$<br>10,6 $\pm$ 5,4 [10,1-11,2]                            | $n=301$<br>11,8 $\pm$ 5,1 [11,2-12,4]  | <0,01 |
| Anzahl 2 PN-Eizellen ( $n$ )                                    | 6,9 $\pm$ 3,4 [6,6-7,2]  | 8,0 $\pm$ 2,8 [7,6-8,3]                | <0,01 |
| Fertilisationsraten (%)<br>*1 fehlender Wert                    | $n=409$<br>66,9 $\pm$ 20,9 [64,9-68,9]                           | $n=301$<br>65,6 $\pm$ 17,5 [63,6-67,6] | 0,11  |
| Anzahl kryokonservierter 2 PN-Eizellen ( $n$ )                  | 5,4 $\pm$ 3,6 [5,0-5,7]  | 5,6 $\pm$ 2,8 [5,3-5,9]                | <0,01 |

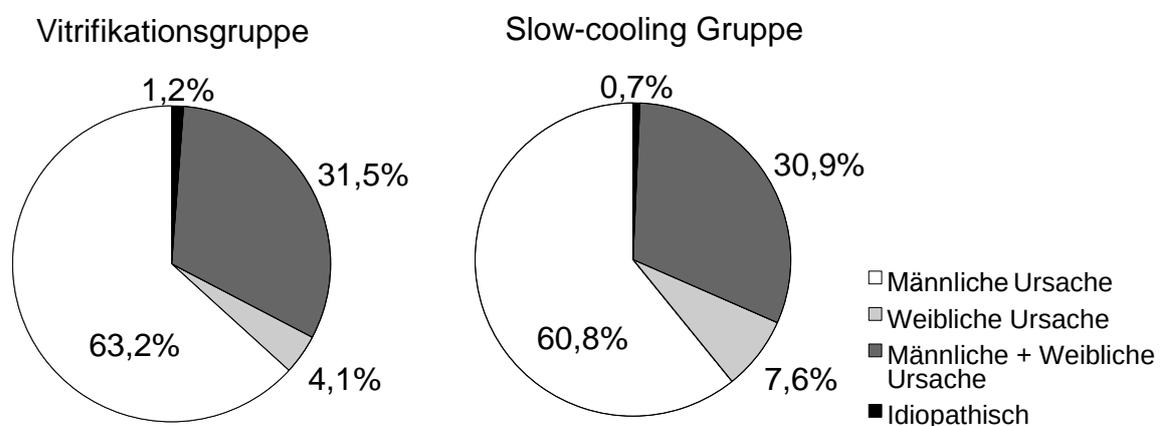
### III.4 Indikation zur assistierten Reproduktion

Die Indikationen wurden in vier Gruppen eingeteilt: „männliche Ursachen“, „weibliche Ursachen“, „männliche und weibliche Ursachen“ und „Idiopathisch“. Tabelle 11 zeigt die Einordnung in „männliche“ und „weibliche“ Ursachen.

**Tabelle 11:** Männliche und weibliche Behandlungsindikationen zur ART.

| männliche Ursachen  | weibliche Ursachen                        |
|---|---|
| - männliche Subfertilität   | - PCO-Syndrom                             |
| - Oligoasthenoteratozoospermie<br>(einzeln oder in Kombination:<br>Oligo-, Astheno-, Teratospermie) | - Tubare Sterilität                       |
| - Azoospermie   | - Hypophysenvorderlappen-<br>insuffizienz |
| - Kryptozoospermie  | - weitere endokrine Störungen der<br>Frau |
| - Aspermie  |   |
| - Anorgasmie/Anejakulation  |   |
| - Kryokonservierung von Sperma<br>aufgrund von Chemotherapie<br>bzw. Radiatio                       |   |

Eine idiopathische Sterilität wurde fünfmal in der Vitrifikationsgruppe und 2-mal in der slow-cooling Gruppe als Indikation angegeben. Die relativen Häufigkeiten in den Kategorien „männliche Ursachen“ (63,2 % vs. 60,8 %), „männliche + weibliche Ursachen“ (31,5 % vs. 30,9 %) und „Idiopathisch“ (1,2 % vs. 0,7 %) unterscheiden sich mit  $p$ -Werten von jeweils größer als 0,5 nicht signifikant zwischen beiden Kryokonservierungsgruppen. Innerhalb der Gruppe „weibliche Ursachen“ findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Vitrifikationsgruppe mit 4,1 % und der slow-cooling Gruppe mit 7,6 % der Patientinnen (Abb.4).

**Abbildung 4:** Indikationen zur assistierten Reproduktionsbehandlung.

### III.5 Inzidenz von „Null überlebten 2 PN-Eizellen“ nach Auftau

In den insgesamt 1.132 durchgeführten Auftauzyklen überlebte in 32 Fällen keine 2 PN-Eizelle den Auftau- bzw. Erwärmungsvorgang. Hier folgte dementsprechend kein KryoET. Das beschriebene „Auftauversagen“ ist in den 376 slow-cooling-Auftauzyklen 28-mal aufgetreten (7,4 % [5,2-10,6]). Bei 756 erfassten Auftauzyklen nach Vitrifikation, wurde dies viermal beobachtet (0,5 % [0,2-1,4]). Die Häufigkeitsverteilungen unterscheiden sich signifikant zwischen beiden Gruppen, sowohl bei Betrachtung der einzelnen Auftauzyklenränge als auch in der Summe aller Auftauzyklen, wie in Tabelle 12 präsentiert ist.

**Tabelle 12:** Anzahl der Auftauversuche mit „null überlebten 2 PN-Eizellen“ beider Gruppen, pro Auftauzyklus und insgesamt.

| Rang des Auftauzyklus | Vitrifikation<br><i>n</i> (%)  | Slow-cooling<br><i>n</i> (%)     | <i>p</i> |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------|
| 1                     | 2/410 (0,5)                    | 22/301 (7,3)                     | <0,01    |
| 2                     | 0/201 (0,0)                    | 4/64 (6,3)                       | 0,03     |
| 3                     | 1/78 (1,3)                     | 2/11 (18,2)                      | 0,04     |
| 4                     | 1/38 (2,6)                     | ---                              | ---      |
| Insgesamt             | 4/756 (0,5)<br>95 KI [0,2-1,4] | 28/376 (7,4)<br>95 KI [5,2-10,6] | <0,01    |

### III.6 Ergebnisse der Auftau-/Kryozyklen

Pro Paar in der Vitrifikationsgruppe wurde die Durchführung von bis zu 7 KryoETs erfasst, während es in der slow-cooling Gruppe maximal drei waren. Im Durchschnitt überwiegt die Anzahl durchgeführter KryoETs in der Vitrifikationsgruppe ( $1,8 \pm 1,2$  [1,7-2,0]) gegenüber der in der slow-cooling Gruppe ( $1,2 \pm 0,6$  [1,1-1,2];  $p < 0,01$ ). Die Summe aller übertragenen Embryonen in KryoETs ist ebenfalls signifikant höher in der Vitrifikationsgruppe ( $3,8 \pm 2,5$  [3,6-4,0] vs.  $2,8 \pm 1,6$  [2,6-3,0];  $p < 0,01$ ). In 24 Fällen konnte bei der Patientin gar kein KryoET durchgeführt werden (Vitrifikation  $n=2$ ; slow-cooling  $n=22$ ), das bedeutet, dass alle verfügbaren 2 PN-Eizellen einer Patientin einem Auftauversuch unterworfen wurden, ohne Überleben von mindestens einer Eizelle. Die Ergebnisse aus den ersten 3 Auftau – und Kryoübertragungszyklen werden im Folgenden zwischen den Gruppen verglichen.

### III.6.1 Ergebnisse der ersten Auftau-/Kryozyklen

Es wurden 711 erste Auftauzyklen erfasst und ausgewertet (410 vs. 301). Darauf folgten 687 erste Kryoembryonenübertragungen (408 vs. 279) (Tab.13).

Pro Auftauversuch wurden bei den Vitrifikationspatientinnen im Mittel weniger 2 PN-Eizellen einem Auftauversuch unterworfen (2,6 vs. 4,3;  $p < 0,01$ ). Der Unterschied bezüglich vitaler 2 PN-Eizellen nach Auftau ist ebenso signifikant (2,4 vs. 2,3;  $p < 0,01$ ).

Die mittlere Überlebensrate von 2 PN-Eizellen nach Auftau ist nach Vitrifikation signifikant höher (94,1 %  $\pm$  15,7 % [92,6-95,6]) als nach slow-cooling (57,4 %  $\pm$  27,4 % [54,3-60,5];  $p < 0,01$ ). Pro durchgeführter Kryoübertragung wurden im Mittel weniger Embryonen nach Vitrifikation übertragen (2,1 vs. 2,4;  $p < 0,01$ ). Die Anzahl idealer übertragener Embryonen pro Kryoübertragung unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (1,5 $\pm$ 0,8 vs. 1,5 $\pm$ 1,1;  $p = 0,82$ ).

**Tabelle 13:** Merkmale der ersten Auftau-/Kryoübertragungszyklen beider Kryokonservierungsgruppen.

| <b>Auftauvariablen<br/>(pro Auftau)</b>       | <b>Vitrifikation<br/>(n=410)</b>                                 | <b>Slow-cooling<br/>(n=301)</b> | <b>p</b> |
|---|--|---------------------------------|----------|
|   | Mittelwert $\pm$ Standardabweichung<br>[95 % Konfidenzintervall] |                                 |          |
| Anzahl aufgetauter 2 PN-Eizellen<br>(n)       | 2,6 $\pm$ 1,0<br>[2,5-2,7]                                       | 4,3 $\pm$ 1,7<br>[4,1-4,5]      | <0,01    |
| Anzahl überlebter 2 PN-Eizellen (n)           | 2,4 $\pm$ 1,0<br>[2,3-2,4]                                       | 2,3 $\pm$ 0,9<br>[2,1-2,4]      | <0,01    |
| Überlebensrate (%)                            | 94,1 $\pm$ 15,7<br>[92,6-95,6]                                   | 57,4 $\pm$ 27,4<br>[54,3-60,5]  | <0,01    |
| <b>KryoET-Variablen<br/>(pro Übertragung)</b> | <b>(n=408)</b>   | <b>(n=279)</b>                  | <b>p</b> |
| Anzahl übertragener Embryonen<br>(n)          | 2,1 $\pm$ 0,4<br>[2,0-2,1]                                       | 2,4 $\pm$ 0,7<br>[2,3-2,5]      | <0,01    |
| Anzahl idealer übertragener<br>Embryonen (n)  | 1,5 $\pm$ 0,8<br>[1,4-1,6]                                       | 1,5 $\pm$ 1,1<br>[1,4-1,7]      | 0,82     |

### III.6.2 Ergebnisse der zweiten Auftau-/Kryozyklen

Insgesamt wurden 265 zweite Auftauzyklen (201 vs. 64) und 261 zweite Kryoübertragungszyklen (201 vs. 60) erfasst, wie Tabelle 14 zeigt.

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der mittleren Anzahl aufgetauter 2 PN-Eizellen (2,4 vs. 3,8;  $p < 0,01$ ), der durchschnittlichen Überlebensrate (96,1 % vs. 61,3 %;  $p < 0,01$ ) und der Anzahl übertragener Embryonen pro Übertragung (2,0 vs. 2,3;  $p < 0,01$ ).

Nicht signifikant ist der Unterschied überlebter 2 PN-Eizellen (2,2 vs. 2,2;  $p = 0,12$ ) und der Anzahl idealer übertragener Embryonen (1,6 vs. 1,3;  $p = 0,08$ ).

**Tabelle 14:** Merkmale der zweiten Auftau-/Kryoübertragungszyklen beider Kryokonservierungsgruppen.

| <b>Auftauvariablen<br/>(pro Auftau)</b>       | <b>Vitrifikation<br/>(n=201)</b>                             | <b>Slow-cooling<br/>(n=64)</b> | <b>p</b> |
|---|--|--------------------------------|----------|
|   | Mittelwert ± Standardabweichung<br>[95 % Konfidenzintervall] |                                |          |
| Anzahl aufgetauter 2 PN-Eizellen<br>(n)       | 2,4±0,9<br>[2,2-2,5]   | 3,8±1,3<br>[3,5-4,1]           | <0,01    |
| Anzahl überlebter 2 PN-Eizellen (n)           | 2,2±0,8<br>[2,1-2,3]   | 2,2±0,9<br>[2,0-2,4]           | 0,12     |
| Überlebensrate (%)                            | 96,1±11,7<br>[94,5-97,7]                                     | 61,3±28,7<br>[54,1-68,5]       | <0,01    |
| <b>KryoET-Variablen<br/>(pro Übertragung)</b> | <b>(n=201)</b>   | <b>(n=60)</b>                  | <b>p</b> |
| Anzahl übertragener Embryonen (n)             | 2,0±0,4<br>[2,0-2,1]   | 2,3±0,7<br>[2,2-2,5]           | <0,01    |
| Anzahl idealer übertragener<br>Embryonen (n)  | 1,6±0,7<br>[1,5-1,7]   | 1,3±1,1<br>[1,0-1,6]           | 0,08     |

### III.6.3 Ergebnisse der dritten Auftau-/Kryozyklen

Es wurden 89 dritte Auftauzyklen (78 vs. 11) und 86 dritte Kryoübertragungen (77 vs. 9) erfasst. Die Ergebnisse sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Ein signifikanter Unterschied zeigt sich hinsichtlich der Anzahl aufgetauter 2 PN-Eizellen (2,4 vs. 4,0;  $p < 0,01$ ), der Überlebensraten nach Auftau (95,8 % vs. 50,0 %;  $p < 0,01$ ) und der Anzahl übertragener Embryonen (2,1 vs. 2,4;  $p = 0,01$ ).

Keinen signifikanten Unterschied zeigt die mittlere Anzahl vitaler 2 PN-Eizellen (2,3 vs. 2,0;  $p = 0,91$ ) und die Anzahl idealer übertragener Embryonen (1,5 vs. 0,9;  $p = 0,07$ ).

**Tabelle 15:** Merkmale der dritten Auftau-/Kryoübertragungszyklen beider Kryokonservierungsgruppen.

| <b>Auftauvariablen<br/>(pro Auftau)</b>       | <b>Vitrifikation<br/>(n=78)</b>                              | <b>Slow-cooling<br/>(n=11)</b> | <b>p</b> |
|---|--|--------------------------------|----------|
|   | Mittelwert ± Standardabweichung<br>[95 % Konfidenzintervall] |                                |          |
| Anzahl aufgetauter 2 PN-Eizellen<br>(n)       | 2,4±0,8<br>[2,3-2,6]   | 4,0±1,3<br>[3,1-4,9]           | <0,01    |
| Anzahl überlebter 2 PN-Eizellen (n)           | 2,3±0,8<br>[2,1-2,5]   | 2,0±1,1<br>[1,3-2,7]           | 0,91     |
| Überlebensrate (%)                            | 95,8±14,4<br>[92,6-99,1]                                     | 50,0±27,6<br>[31,4-68,6]       | <0,01    |
| <b>KryoET-Variablen<br/>(pro Übertragung)</b> | <b>(n=77)</b>  | <b>(n=9)</b>                   | <b>p</b> |
| Anzahl übertragener Embryonen (n)             | 2,1±0,3<br>[2,0-2,2]   | 2,4±0,5<br>[2,0-2,9]           | 0,01     |
| Anzahl idealer übertragener<br>Embryonen (n)  | 1,5±0,7<br>[1,3-1,6]   | 0,9±1,2<br>[0,0-1,8]           | 0,07     |

### III.6.4 Überlebensraten der Auftauzyklen 4-7 nach Vitrifikation

In Tabelle 16 sind die Überlebensraten für die vierten bis siebten Auftauzyklen in der Vitrifikationsgruppe dargestellt (92,5 %, 100 %, 96,3 % und 100 %).

**Tabelle 16:** Überlebensraten vitrifizierter Vorkernstadien nach Erwärmung in den Auftauzyklen 4-7.

|                        | <b>Überlebensrate nach Vitrifikation in Prozent</b><br>MW ± SD [95 % Konfidenzintervall] |
|------------------------|--|
| 4. Auftauzyklen (n=38) | 92,5 ± 20,0 [86,0-99,1]  |
| 5. Auftauzyklen (n=17) | 100,0 ± 0,0  |
| 6. Auftauzyklen (n=9)  | 96,3 ± 11,1 [87,8-104,8]   |
| 7. Auftauzyklen (n=3)  | 100,0 ± 0,0  |

### III.7 Klinische Ergebnisse der ersten Kryoauftauzyklen

Das Therapieoutcome der ersten Kryoauftauzyklen in beiden Gruppen ist in Tabelle 17 gezeigt. Bei 30,2 % aller Vitrifikationspatientinnen wurde mindestens eine biochemische Schwangerschaft nachgewiesen. In der slow-cooling Gruppe waren es 16,9 % ( $p < 0,01$ ). Die Ergebnisse für das Eintreten mindestens einer klinischen Schwangerschaft und Lebendgeburt sind in Tabelle 17 dargestellt. In der Vitrifikationsgruppe zeigen sich jeweils signifikant höhere Raten (16,3 % vs. 10,0 %;  $p = 0,01$  und 14,4 % vs. 7,6 %;  $p = 0,01$ ).

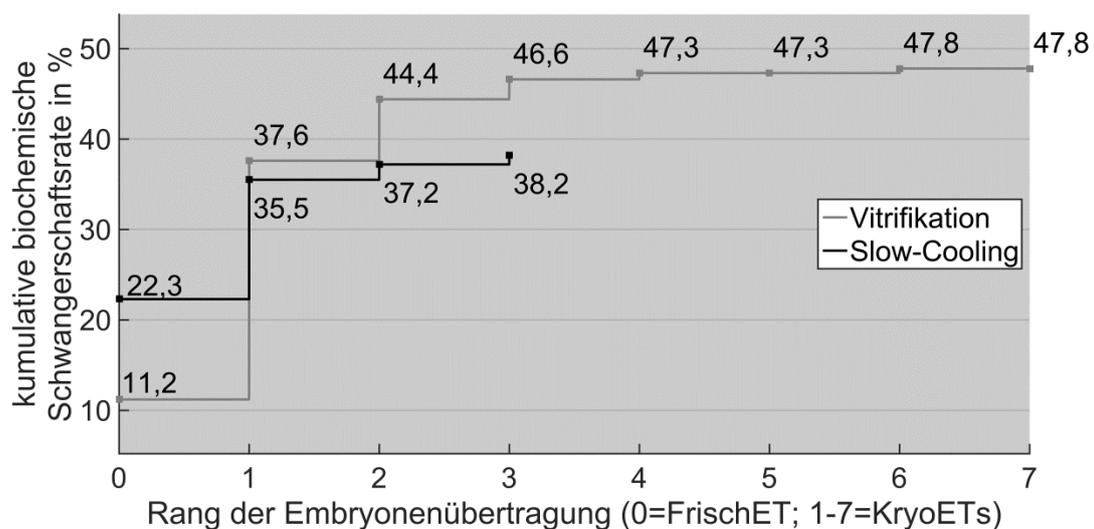
**Tabelle 17:** Behandlungsergebnisse der ersten Kryoembryonenübertragungen (n=711) (Anzahl, relative Häufigkeit in Prozent und 95 % Konfidenzintervall.)

|                 | <b>Gesamt</b><br>(n=711)               | <b>Vitrifikation</b><br>(n=410) | <b>Slow-cooling</b><br>(n=301) | <b>p</b> |
|-----------------|--|---------------------------------|--------------------------------|----------|
|                 | <i>n (%) [95 % Konfidenzintervall]</i> |                                 |                                |          |
| Biochemische SS | 175 (24,6)<br>[21,6-27,9]              | 124 (30,2)<br>[26,0-34,9]       | 51 (16,9)<br>[13,1-21,6]       | <0,01    |
| Klinische SS    | 97 (13,6)<br>[11,3-16,4]               | 67 (16,3)<br>[13,1-20,2]        | 30 (10,0)<br>[7,1-13,9]        | 0,01     |
| Lebendgeburt    | 82 (11,5)<br>[9,4-14,1]                | 59 (14,4)<br>[11,3-18,1]        | 23 (7,6)<br>[5,1-11,2]         | 0,01     |

### III.8 Kumulative Outcomeraten

#### III.8.1 Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft

Ein positiver hCG-Wert wurde bei 11,2 % der Vitrifikationspatientinnen und 22,3 % der slow-cooling Patientinnen nach FrischET nachgewiesen ( $p < 0,01$ ), wie in Abbildung 5 gezeigt. Beide Kurven überschneiden sich im Verlauf zum ersten KryoET und steigen in Bezug auf den Gesamtverlauf hier am größten an. Die Vitrifikationskurve steigt vergleichsweise schneller an (von 11,2 % auf 37,6 % vs. von 22,3 % auf 35,5 %). Beide Kurven steigen bis KryoET 3 an. Da in der slow-cooling Gruppe keine vierten KryoETs stattfanden, ist das Kurvenmaximum mit 38,2 % nach KryoET 3 erreicht. Die kumulative Schwangerschaftsrate der Vitrifikationspatientinnen steigt bis zum dritten KryoET auf 46,6 % an. Sie ist damit signifikant höher ( $p < 0,03$ ; 95 KI der Differenz [1,0-15,6]). Die Vitrifikationskurve steigt an bis zum sechsten KryoET (47,8 %). In den siebten KryoETs ( $n=3$ ) kam es zu keiner biochemischen Schwangerschaft. Insgesamt erreicht die Vitrifikationsgruppe eine signifikant höhere kumulative biochemische Schwangerschaftsrate als die slow-cooling Gruppe (47,8 % [43,0-52,6] vs. 38,2 % [32,9-43,8];  $p=0,01$ ).

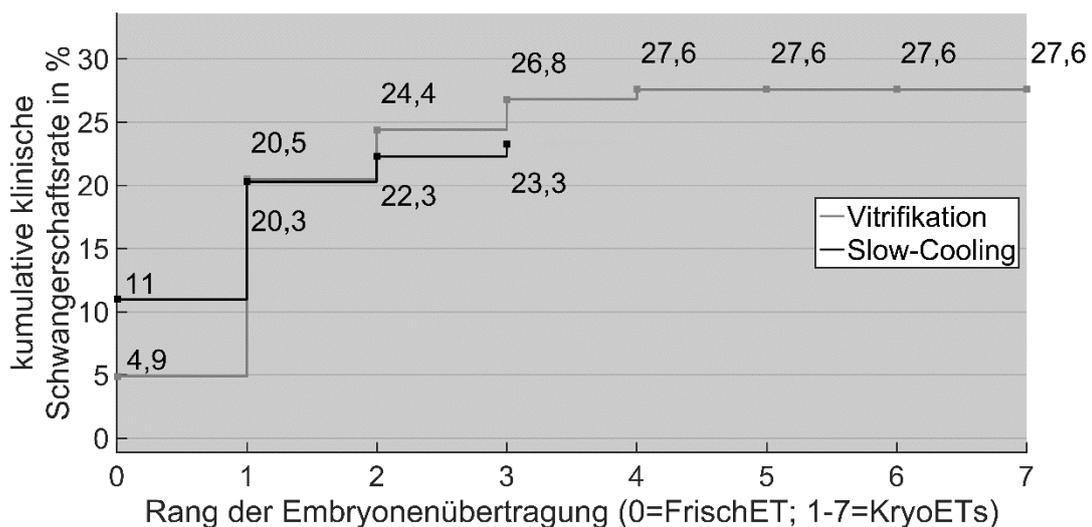


**Abbildung 5:** Stufendiagramm der kumulativen biochemischen Schwangerschaftsraten in beiden Kryokonservierungsgruppen ( $p$  ist jeweils  $< 0,05$ ).

### III.8.2 Eintritt einer klinischen Schwangerschaft

Analog zur vorherigen Darstellung werden in Abbildung 6 die Werte für das Behandlungsergebnis "Eintritt einer klinischen Schwangerschaft" präsentiert.

4,9 % der Vitrifikationspatientinnen (20 von 410) erreichten im FrischET eine klinische Schwangerschaft. In der slow-cooling Gruppe ist der Anteil mit 11,0 % (33 von 301) signifikant höher ( $p < 0,01$ ). Vom FrischET bis zum ersten KryoET ist der Anstieg beider Kurven am größten. Die Kurven überkreuzen sich im Verlauf. Bei Betrachtung der kumulativen Werte nach dem ersten KryoET zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (20,5 % vs. 20,3 %;  $p = 0,94$ ). Die kumulativen Raten nach FrischET und drei durchgeführten KryoETs ergeben keinen signifikanten Unterschied (26,8 % [22,8-31,3] vs. 23,3 %



**Abbildung 6:** Stufendiagramm der kumulativen klinischen Schwangerschaftsraten in beiden Kryokonservierungsgruppen.

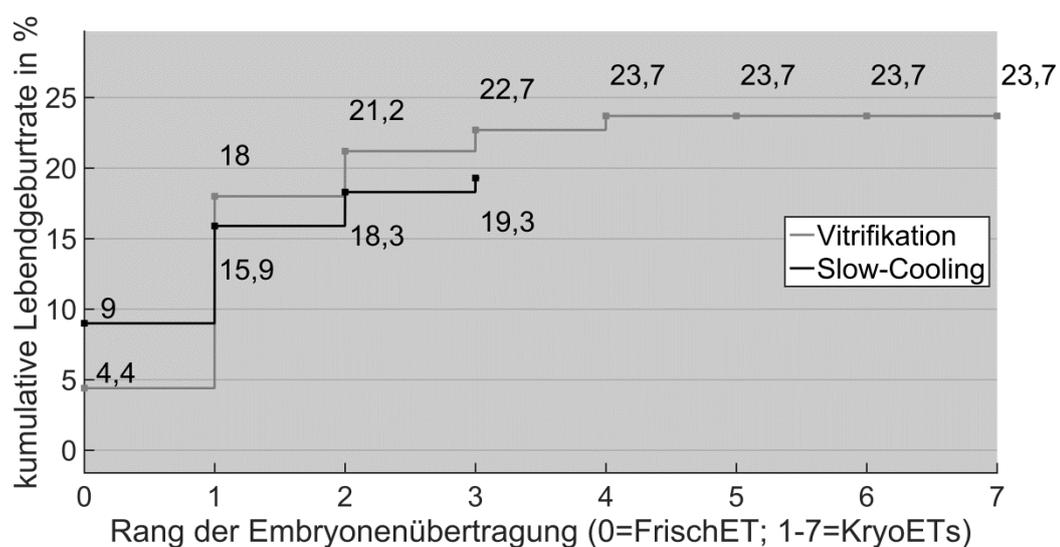
[18,8-28,3];  $p = 0,28$ ; 95 KI der Differenz [-2,9-9,9]). Die Prozentwerte entsprechen in der Vitrifikationsgruppe 110 von 410 Patientinnen. In der slow-cooling Gruppe erreichen bis zum dritten KryoET 70 von 301 Patientinnen mindestens eine klinische Schwangerschaft. Die Kurve der Vitrifikation steigt zum vierten KryoET noch auf 27,6 % [23,5-32,1] (113 von 410 Patientinnen) an. Die Differenz bleibt nicht signifikant ( $p = 0,20$ ).

### III.8.3 Eintritt einer Lebendgeburt

Die Vitrifikationsgruppe zeigt nach FrischET eine signifikant geringere Geburtenrate (4,4 % vs. 9,0 %;  $p=0,01$ ). Zu beachten ist, dass hier die FrischET-Rate bezogen auf die gesamte Kryokonservierungsgruppe errechnet wurde. Wie jedoch schon in Kapitel III.1. gezeigt, wurde dies nicht von jedem Paar durchgeführt. Führt man als Nenner die eigentliche Anzahl an Paaren mit FrischET an, zeigt die slow-cooling Gruppe nicht-signifikant höhere Lebendgeburtstraten im FrischET (18/289; 6,2 % vs. 27/298; 9,1 %;  $p=0,2$ ).

Beide Kurven steigen bis zum ersten KryoET an. Die Vitrifikationskurve kreuzt und übersteigt die slow-cooling Kurve im Verlauf zum ersten KryoET. Zum Zeitpunkt nach durchgeführtem ersten KryoET ergibt sich für die Vitrifikation eine nicht signifikant höhere kumulative Lebendgeburtstratenrate (18,0 % vs. 15,9 %;  $p=0,50$ ). Der Unterschied der kumulativen Lebendgeburtstraten nach drei KryoETs ist nicht signifikant (22,7 % vs. 19,3 %;  $p=0,30$ ; 95 KI der Differenz [-2,7-9,3]) (Abb. 7).

Die Vitrifikationskurve steigt nach vier KryoETs auf 23,7 % [19,8-28,0] an. Stellt man die maximalen kumulativen Lebendgeburtstraten beider Gruppen gegenüber, ergeben sich nach sieben KryoETs höhere Werte für die Vitrifikation (23,7 %; 97 von 410 Patientinnen). In der slow-cooling Gruppe sind es nach maximal drei KryoETs 19,3 % [15,2-24,1] (58 von 301 Patientinnen;  $p=0,16$ ).



**Abbildung 7:** Stufendiagramm der kumulativen Lebendgeburtstraten in beiden Kryokonservierungsgruppen.

### III.9 Identifikation von Prädiktoren für das Behandlungoutcome

Im Folgenden wurde die Regressionsanalyse wie in Kapitel II.12 beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils die unabhängigen Variablen aufgeführt, die in die Regressionsgleichung aufgenommen wurden und somit signifikanten Einfluss auf die Eintrittswahrscheinlichkeit haben. Des Weiteren sind  $p$ -Wert, sowie Odds ratio mit 95 % Konfidenzintervall dargestellt.

#### III.9.1 Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft

Tabelle 18 zeigt die Art der Kryokonservierung mit einer Odds ratio von 1,481 als signifikante Einflussvariable auf die Eintrittswahrscheinlichkeit für eine biochemische Schwangerschaft ( $p=0,01$ ).

**Tabelle 18:** Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt einer biochemischen SS innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus; Modell  $p=0,01$ ; Hosmer-Lemeshow-Test  $p<0,01$ ).

| Abhängige Variable: <b>biochemische Schwangerschaft</b> (0=nein; 1=ja) |      |                      |
|--|------|----------------------|
| Unabhängige Variablen  | $p$  | Odds ratio [95 % KI] |
| Art der Kryokonservierung<br>(0=Referenzkategorie=slow-cooling)        | 0,01 | 1,481 [1,094-2,005]  |

#### III.9.2 Eintritt einer klinischen Schwangerschaft

Einen signifikanten Einfluss auf die Eintrittswahrscheinlichkeit einer klinischen Schwangerschaft zeigt das Alter der Patientin mit einer Odds ratio von 0,96 ( $p=0,04$ ), ebenso wie die primäre Kryokonservierung aller 2 PN-Eizellen (OR 1,62;  $p=0,02$ ). Die Werte sind Tabelle 19 zu entnehmen.

**Tabelle 19:** Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt einer klinischen SS innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus; Modell  $p=0,01$ ; Hosmer-Lemeshow-Test  $p=0,50$ ).

| Abhängige Variable: <b>klinische Schwangerschaft</b> (0=nein; 1=ja)     |      |                      |
|---|------|----------------------|
| Unabhängige Variablen   | $p$  | Odds ratio [95 % KI] |
| Alter der Patientin   | 0,04 | 0,960 [0,924-0,998]  |
| Primäre Kryokonservierung vs. FrischET<br>(Referenzkategorie: FrischET) | 0,02 | 1,620 [1,006-2,462]  |

### III.9.3 Eintritt einer Lebendgeburt

Einen signifikanten Einfluss auf das Eintreten einer Lebendgeburt zeigen in diesem Regressionsmodell das Alter der Patientin mit einer Odds Ratio von 0,943 ( $p=0,01$ ) und die primäre Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen mit einer Odds Ratio von 1,692 ( $p=0,02$ ). Die übrigen Werte sind in Tabelle 20 aufgeführt.

**Tabelle 20:** Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt einer Lebendgeburt innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus; Modell  $p<0,01$ ; Hosmer-Lemeshow-Test  $p=0,56$ ).

| Abhängige Variable: <b>Lebendgeburt</b> (0=nein; 1=ja)                  |      |                      |
|---|------|----------------------|
| Unabhängige Variablen   | $p$  | Odds ratio [95 % KI] |
| Alter der Patientin   | 0,01 | 0,943 [0,905-0,983]  |
| Primäre Kryokonservierung vs. FrischET<br>(Referenzkategorie: FrischET) | 0,02 | 1,692 [1,093-2,621]  |

### III.9.4 Einschluss von „Art der Kryokonservierung“ erzwungen

Wird die Aufnahme der unabhängigen Variable „Art der Kryokonservierung“ in das Regressionsmodell erzwungen, verbleibt lediglich das Alter der Patientin als Prädiktor mit signifikantem Einfluss auf die Lebendgeburtswahrscheinlichkeit mit einer Odds Ratio von 0,938 ( $p<0,01$ ). Die Art der Kryokonservierung zeigt hier einen nicht-signifikanten Einfluss mit einer Odds Ratio von 1,405 ( $p=0,07$ ).

**Tabelle 21:** Ergebnisse der logistischen Regression (abhängige Variable: Eintritt einer Lebendgeburt innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus – nach Einschluss der Art der Kryokonservierung in das Regressionsmodell; Modell  $p<0,01$ ; Hosmer-Lemeshow-Test  $p=0,047$ ).

| Abhängige Variable: <b>Lebendgeburt</b> (0=nein; 1=ja)          |       |                      |
|---|-------|----------------------|
| Unabhängige Variablen   | $p$   | Odds ratio [95 % KI] |
| Alter der Patientin   | <0,01 | 0,938 [0,899-0,978]  |
| Art der Kryokonservierung<br>(0=Referenzkategorie=slow-cooling) | 0,07  | 1,405 [0,968-2,038]  |

### III.10 Subgruppenanalyse der Patientinnen ohne primäre Kryokonservierung

Nach Ausschluss der Paare mit primärer Kryokonservierung wurden die Lebendgeburtenraten im Gruppenvergleich errechnet (Tab. 21), sowie eine erneute Regressionsanalyse (siehe Kapitel III.9.) durchgeführt (Tab. 22).

Kumulativ zeigten sich nach max. 3 KryoETs mehr klinische Schwangerschaften und Lebendgeburten in der Vitrifikationsgruppe (26,3 % vs. 23,8 %;  $p=0,5$  und 22,49 % vs. 19,8 %;  $p=0,42$ ). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

**Tabelle 22:** Lebendgeburtenraten im Gruppenvergleich nach Ausschluss der Patientinnen mit primär elektiver Kryokonservierung (kumulative Rate nach max. 3 KryoETs in beiden Gruppen).

|   | Vitrifikation<br>( $n=289$ ) | Slow-cooling<br>( $n=298$ ) | $p$  |
|---|------------------------------|-----------------------------|------|
| $n$ (%)                                   |                              |                             |      |
| Kumulative klinische Schwangerschaftsrate | 76 (26,3)                    | 71 (23,8)                   | 0,5  |
| Kumulative Lebendgeburtenrate             | 65 (22,5)                    | 59 (19,8)                   | 0,42 |

Das Alter der Patientin zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Lebendgeburt. In der Regressionsanalyse für die klinische Schwangerschaft zeigte keine der Variablen einen signifikanten Einfluss auf die Eintrittswahrscheinlichkeit (Tab. 22).

**Tabelle 23:** Ergebnisse der logistischen Regression in der Subgruppe (abhängige Variable: Eintritt einer Lebendgeburt innerhalb des gesamten IVF-/ICSI-Zyklus; Modell  $p<0,01$ ; Hosmer-Lemeshow-Test  $p=0,44$ ).

| Abhängige Variable: <b>Lebendgeburt</b> (0=nein; 1=ja) |      |                      |
|--|------|----------------------|
| Unabhängige Variablen                                  | $p$  | Odds ratio [95 % KI] |
| Alter der Patientin                                    | 0,01 | 0,942 [0,899-0,987]  |

## IV Diskussion

Die Kryokonservierung überzähliger Eizellen im Vorkernstadium zum Zwecke der Kryoembryonenübertragung zu einem späteren Zeitpunkt ist ein unverzichtbarer Bestandteil der heutigen Reproduktionsmedizin. Das Deutsche IVF-Register berichtete 2015 von insgesamt 23.226 durchgeführten Kryoauftauzyklen, mit stetigem Anstieg in den vergangenen 20 Jahren (Deutsches IVF-Register, 2016). Die Optimierung der Kryokonservierungsmethoden bleibt somit ein stetiges Ziel. Die Vorteile der Kryoembryonenübertragung im Rahmen der assistierten Reproduktion ergeben sich für die Patientin durch die Chance auf Erhöhung der kumulativen Schwangerschaftsrate pro IVF-/ICSI-Zyklus. Gleichzeitig ergeben sich geringere gesundheitliche und finanzielle Belastungen durch die Kryozyklen. Bis dato haben sich zwei Verfahren besonders bewährt und gehören heutzutage zu den Standardverfahren der IVF-Laboratorien weltweit: das traditionelle slow-cooling und die Vitrifikation.

Einige retrospektive und prospektive Arbeiten präsentierten höhere Auftauüberlebensraten nach Vitrifikation von Embryonen oder Eizellen. Bezüglich des klinischen Ergebnisses zeigt sich in der Literatur ein heterogenes Bild. In randomisiert kontrollierten Studien an kryokonservierten unbefruchteten Eizellen und Embryonen konnten Vorteile für die Vitrifikation gezeigt werden. Untersuchungen an Eizellen im Vorkernstadium sind bis heute spärlich. Dies begründet sich in der Tatsache, dass vornehmlich in Deutschland die Kryokonservierung im Stadium der sich in Befruchtung befindlichen Eizelle durchgeführt wird. Im Ausland werden mehrheitlich Embryonen im Furchungs- oder Blastozystenstadium kryokonserviert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich beider Kryokonservierungsmethoden an einem großen Patientinnenkollektiv bei Verwendung von 2 PN-Eizellen. Als primärer Ergebnisparameter wurde das Überleben nach Auftau betrachtet. Sekundärer Ergebnisparameter war die Schwangerschafts- und

---

Lebendgeburtenwahrscheinlichkeit, welche sowohl für alle ersten KryoETs als auch kumulativ pro Patientin bzw. pro IVF-/ICSI-Zyklus nach allen Embryonenübertragungen errechnet wurde. Mögliche konfundierende Faktoren wurden im Rahmen einer Regressionsanalyse erfasst.

Zu diesem Zweck wurde eine retrospektive Datenauswertung von IVF-Behandlungszyklen aus dem Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck der Jahre 1999 bis 2011 durchgeführt. Da eine Patientin häufig mehrere Kryozyklen nach einer IVF-Behandlung durchläuft, bzw. eine Patientin aus mehreren IVF-Zyklen mehrere Kryozyklen kumulieren kann, sind Auswertungen mit der Bezugsgröße „Kryozyklus“ dann irreführend, wenn die gepoolten Beobachtungen keine unabhängigen Ereignisse darstellen und konventionelle Verfahren der statistischen Testung Anwendung finden (Al-Hasani et al., 2007). Die vorliegende Arbeit ist insofern neuartig, als dass pro Paar jeweils nur der erste IVF-/ICSI-Zyklus mit Kryokonservierung und anschließenden Frisch- und KryoETs erfasst und ausgewertet wurde. Weiterhin wurden in den Methodenvergleich der Überlebensraten jeweils nur ein Fall, respektive ein KryoET, pro Patientin in den Vergleich eingeschlossen.

Schließlich ist von Bedeutung, ob in einem FrischET, der regelhaft dem KryoET vorausgeht, eine Schwangerschaft, bzw. Lebendgeburt eintritt, da diese Patientinnen naturgemäß mehrheitlich nicht die gegebenenfalls kryokonservierten 2 PN-Eizellen für eine Übertragung nutzen. Darüber hinaus ist ein Schwangerschaftseintritt im Frischzyklus ein konfundierender Faktor für den weiteren Behandlungsausgang. Aus diesem Grund wurden kumulative Schwangerschafts- und Geburtenraten unter Miteinbeziehung des FrischETs errechnet, um den „tatsächlichen“ Einfluss der Wahl der Kryokonservierungsmethode auf das klinische Ergebnis eines IVF-Zyklus zu messen. Schließlich wurde a-priori beschlossen, eine Subgruppenanalyse unter Ausschluss jener Patientinnen mit primär elektiver Kryokonservierung ebenso durchzuführen, wie in der Regressionsanalyse die primär elektive Kryokonservierung zu berücksichtigen.

Im Untersuchungszeitraum von 12,5 Jahren konnten insgesamt 711 Patientinnen erfasst werden, welche im Rahmen einer IVF-/ICSI-Behandlung erstmals mindestens eine 2 PN-Eizelle einfrieren und im Verlauf zum Zwecke eines KryoET wieder auftauen ließen. Hiervon ließen 410 Paare die Eizellen im Vorkernstadium mittels Vitrifikation und 301 Paare durch slow-cooling kryokonservieren.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Überlebensraten nach Auftau bzw. Erwärmung der 2 PN-Eizellen thematisiert. Im Anschluss wird das klinische Outcome im Sinne der Schwangerschafts- und Geburtenraten diskutiert. Es werden jeweils Vergleiche zu retrospektiven und prospektiven Vergleichsarbeiten an Eizellen im Vorkernstadium angestellt. Außerdem wurden randomisiert kontrollierte Studien zum Vergleich der Kryokonservierung von unbefruchteten Eizellen und Präimplantationsembryonen in die Diskussion einbezogen. Zuletzt erfolgt eine Betrachtung möglicher Einflussfaktoren.

#### *IV.1 Zellüberleben nach Auftau kryokonservierter 2 PN-Eizellen*

Kuwayama verglich 2006 das Überleben von Eizellen im Vorkernstadium nach Vitrifikation mittels „Cryotop“-Verfahren, mit dem traditionellen slow-cooling. In der prospektiven Vergleichsstudie überlebten 100 % (5.881/5.881) der vitrifizierten Eizellen im Vorkernstadium den Auftauprozess. In der slow-cooling Gruppe waren es 89 % (1.730/1.944). Des Weiteren konnte er eine höhere Überlebensrate von Embryonen im 4-Zell Stadium (879/897; 98 %) und Blastozystenstadium (5.695/6.328; 90 %) nach Vitrifikation feststellen. Er betonte in seiner Arbeit besonders die Effizienz, sowie die Praktikabilität und Sicherheit des Verfahrens im Vergleich zum slow-cooling (Kuwayama et al., 2005a).

Al-Hasani und Kollegen untersuchten, ebenfalls im Zuge einer prospektiven Studie, die Behandlungsergebnisse nach 3jähriger Erfahrung mit dem Vitrifikationsverfahren an 92 Patientinnen. Es wurde das hier beschriebene Vitrifikationsprotokoll nach Kuwayama verwendet. Von 339 nach Vitrifikation aufgetauten 2 PN-Eizellen überlebten 89 %. Die Vitrifikation wurde folglich als

zuverlässige und sichere Methode beurteilt, die sowohl bezogen auf das Auftauüberleben als auch das Therapieoutcome bessere Ergebnisse zeigt als das im Zentrum zuvor angewandte slow-cooling (Al-Hasani et al., 2007). Kritikwürdig an den Arbeiten von Kuwayama und Al-Hasani ist, dass Eizellen mehrerer Patientinnen gepoolt wurden und die Auswertung erfolgte, so als ob die Eizellen nicht „verschwistert“ wären. Das Subjekt der Analyse war somit fälschlicherweise die einzelne Eizelle und nicht die Patientin, von der die Eizelle(n) stammten.

Die vorliegende Arbeit zeigte signifikant höhere Überlebensraten nach Vitrifikation pro Patientin und erstem Auftauversuch. Bei Gegenüberstellung der ersten Kryoauftauzyklen betrug die mittlere Überlebensrate pro Auftau von 2 PN-Eizellen 94,1 % nach Vitrifikation. Nach slow-cooling waren es nur 57,4 %. Dieser signifikante Unterschied zugunsten der Vitrifikation findet sich ebenfalls in den zweiten (96,1 % vs. 61,3 %) und dritten Kryoauftauzyklen (95,8 % vs. 50,0 %). In den vierten bis siebten Kryoübertragungen nach Vitrifikation betrugen die Überlebensraten 92,5 %, 100 %, 96,3 % und 100 %. Hierbei handelte es sich allerdings um deutlich kleinere Fallgruppen von jeweils 38, 17, 9 und 3 Kryoauftauversuchen, worunter die Aussagekraft, besonders der 100 % Überlebensraten, mit Sicherheit leidet. Die Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zugunsten der Vitrifikation hinsichtlich des Überlebens nach Auftau/Erwärmung. Die theoretisch-physikalischen Überlegungen (siehe Kapitel I.4.), wonach die Vitrifikation besonders durch ausbleibende Eiskristallbildung das schonendere Verfahren für die Zelle darstellt, passen zu diesen Ergebnissen. Die Ergebnisse bestätigen die zuvor zitierten Arbeiten, die ein besseres Überleben nach Vitrifikation postuliert haben.

Schultze-Mosgau zeigte in seiner Arbeit ebenfalls signifikant höhere Überlebensraten vitrifizierter Eizellen im Vorkernstadium gegenüber dem slow-cooling (89,5 % vs. 62,1 %). Die Daten von 245 Patientinnen mit insgesamt 298 Auftauzyklen wurden dazu untersucht. Die Überlebensraten wurden analog zur aktuellen Arbeit errechnet. Beide Studien wurden am universitären Kinderwunschzentrum Lübeck unter ähnlichen Bedingungen und mittels gleicher

Protokolle und Verfahren durchgeführt Die aktuellen Ergebnisse deuten sogar auf eine Steigerung seit 2007 hin (von 89,5 % auf Werte zwischen 92,5 % und 100 %). Dies könnte auf die zunehmende Routine im Umgang mit dem damals noch neuen Verfahren zurückgeführt werden. Mit der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zur Arbeit von Schultze-Mosgau ein deutlich größeres Studienkollektiv erfasst werden (245 vs. 711 Patientinnen) (Schultze-Mosgau, 2007).

In den vergangenen Jahren wurden auch prospektiv randomisierte Studien zum Vergleich zwischen Vitrifikation und slow-cooling an unbefruchteten Eizellen und Embryonen durchgeführt. Randomisierte Studien an 2 PN-Eizellen fehlen jedoch bisher. In den randomisierten Studien konnte insgesamt eine Überlegenheit der Vitrifikation für das Überleben gezeigt werden. Die Unterschiede hinsichtlich Stimulation, Vitrifikationsprotokoll aber auch Zellentwicklungsstadium erschweren die Vergleichbarkeit mit der aktuellen Arbeit.

Fasano et al. verglichen kürzlich im Rahmen einer prospektiv randomisierten Studie 2 unterschiedliche Vitrifikationsverfahren mit dem traditionellen slow-cooling. Beide Vitrifikationsmethoden ergaben signifikant höhere Überlebensraten von Embryonen als das slow-cooling (89,4 % und 87,7 % vs. 63,8 %) (Fasano et al., 2014).

Balaban et al. verglichen ebenfalls beide Methoden in einer randomisiert kontrollierten Studie an Embryonen. Diese wurden von 120 Frauen gespendet, die im Rahmen ihrer IVF-Behandlung keine überzähligen Embryonen für eine spätere Übertragung kryokonservieren ließen. Die Ergebnisse zeigten in der Vitrifikationsgruppe eine Überlebensrate von 94,8 % (222/234) gegenüber 88,7 % (206/232) nach slow-cooling. Die Forscher schlussfolgerten daraus eine Überlegenheit der Vitrifikation gegenüber dem slow-cooling, nicht nur bezüglich des Überlebens nach Auftau, sondern ebenfalls hinsichtlich der folgenden Blastozystenentwicklung und dem anschließenden Metabolismus, gemessen an der Pyruvat-Aufnahme der Embryonen. Die Überlebensraten nach Vitrifikation, wenn auch hier für Embryonen an Tag 3 und nicht für Vorkernstadien bestimmt,

ähneln der vorliegenden Arbeit. Die höheren Überlebensraten könnten durch die geringere Zellschädigung im Rahmen der Vitrifikation zu erklären sein. Der von Balaban beschriebene reduzierte Pyruvat-Metabolismus der Embryonen nach slow-cooling könnte ein physiologisches Korrelat dieser Schädigung sein und somit eine Erklärung für das reduzierte Entwicklungspotenzial und die niedrigeren Schwangerschaftsraten im Vergleich zur Vitrifikation liefern (Balaban et al., 2008).

Auch Smith et al. präsentierten Ihre Ergebnisse an einem kleinen Patientenkollektiv von 30 slow-cooling Patientinnen und 48 Vitrifikationspatientinnen. Unbefruchtete Eizellen wurden nach Entnahme randomisiert einer Kryokonservierungsmethode zugeführt. Die vitrifizierten Eizellen zeigten signifikant höhere Überlebensraten von 81 % im Vergleich zu 67 %. Jede Patientin brachte nur einen Auftauversuch in die Auswertung ein (Smith et al., 2010).

Es wurde in der vorliegenden Arbeit weiterhin untersucht wie häufig gar keine Eizelle den Auftauvorgang überlebt hat und somit nach diesem Auftau keine Embryonenübertragung durchgeführt werden konnte. Dieses Ereignis fand sich in allen Auftauzyklen insgesamt deutlich häufiger nach slow-cooling (4/756; 0,5 % vs. 28/376; 7,4 %). In der Arbeit von Smith et al. kam es bei 3 Patientinnen in der slow-cooling Gruppe (3/30; 10 %) zu diesem Ereignis. Den betroffenen Paaren standen nach dem Auftauprozess keine Eizellen zur ICSI zur Verfügung. Nach Vitrifikation kam es dazu nicht (Smith et al., 2010). Dieses „Auftauversagen“ stellt für das betroffene Paar eine besondere Belastung dar, da ein begonnener Behandlungszyklus in dem Fall nicht beendet werden kann.

Die erfassten Überlebensraten zwischen 50 % und 61 % in der slow-cooling Gruppe sind insgesamt als niedrig zu beurteilen. Vergleichsweise unbefriedigende Erfolge mit dem Verfahren haben im Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck zu einem Wechsel der Kryokonservierungsmethode geführt. In der Literatur gibt es diesbezüglich ein weites Spektrum von Angaben, welches natürlich durch unterschiedlich angewandte Verfahren, Protokolle und Laborbedingungen, sowie

die Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien bedingt ist. Sie reichen von etwa 60 % bis annähernd 90 % Auftauüberleben nach slow-cooling (Kuwayama et al., 2005a; Schultze-Mosgau, 2007; Balaban et al., 2008; Smith et al., 2010; Fasano et al., 2014). Es ist gleichzeitig festzustellen, dass einige Arbeitsgruppen in ihren Studien sehr wohl zufriedenstellende bis gute Überlebensraten und Behandlungsergebnisse nach slow-cooling präsentieren. Diese Tatsache erklärt, dass es bis heute in einer Vielzahl deutscher IVF-Laboratorien das favorisierte Kryokonservierungsverfahren darstellt. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Vitrifikationsstudien Überlebensraten zwischen 90 % und 100 %. Dies, gemeinsam mit der Praktikabilität der Methode, könnte in Zukunft das Interesse weiterer Kliniken und Labore wecken. Allerdings ist die Überlebensrate nur ein „Surrogatoutcome“ – entscheidend ist die Erzielung einer Lebendgeburt durch einen Kryozyklus. Aus diesem Grund wurde die gegenwärtige Arbeit an einem großen Datensatz unter Einbeziehung der kumulativen Chance auf eine Lebendgeburt durchgeführt.

Besonders für Patientinnen mit nur wenigen punktierten, bzw. kryokonservierten Eizellen ist eine optimale Kryokonservierungsmethode von Bedeutung. Ein hohes Auftauüberleben muss hier durch die beste Kryokonservierungsmethode sichergestellt sein, da generell weniger Eizellen zur Übertragung zur Verfügung stehen. Bezüglich der Qualität der übertragenen Embryonen konnte in der Studie kein Unterschied festgestellt werden. Sie wurde anhand der Anzahl idealer übertragener Embryonen erfasst und unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen.

Fadini et al. berichteten in ihrer retrospektiven Analyse, dass die Embryonen die aus vitrifizierten Eizellen hervorgingen eine signifikant bessere Qualität nach Auftau haben als die, die mittels slow-cooling kryokonserviert wurden. Die höhere Embryonenqualität könnte im Rahmen der geringeren zellulären Schädigung durch Vitrifikation zu erklären sein, was wiederum einen positiven Effekt auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit haben kann. Diese Hypothese konnte mit der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestärkt werden (Fadini et al. 2009).

Die höheren Überlebensraten nach Vitrifikation führen durch die größere Ausbeute an übertragbaren 2 PN-Eizellen auch dazu, dass pro Zyklus weniger Eizellen aufgetaut werden müssen. Es ergeben sich hieraus potenziell eine größere Anzahl möglicher KryoETs. In dieser Arbeit waren es im Mittel 1,8 in der Vitrifikationsgruppe und 1,2 in der slow-cooling Gruppe ( $p < 0,01$ ), respektive eine gesteigerte Ausbeute aus einer Follikelpunktion. So erfolgten im untersuchten Patientenkollektiv maximal drei Kryoübertragungen nach slow-cooling und bis zu 7 Kryoübertragungen nach Vitrifikation. Hieraus ließe sich zumindest theoretisch ein Potenzial für höhere kumulative Schwangerschafts- und Geburtenraten aus einem ICSI-Zyklus ableiten.

Die Summe aller übertragenen Embryonen in KryoETs war ebenfalls signifikant höher in der Vitrifikationsgruppe (3,8 vs. 2,8). Diese Beobachtung ist interessant, da in der Follikelpunktion initial im slow-cooling Kollektiv mehr Eizellen gewonnen werden konnten (13,6 vs. 14,7;  $p < 0,01$ ), jedoch insgesamt weniger kumulativ in KryoETs übertragen wurden. Dabei ist zu beachten, dass sich die Anzahl kryokonservierter 2 PN-Eizellen nur gering zugunsten der slow-cooling Gruppe unterschied (5,4 vs. 5,6;  $p < 0,01$ ). Ursächlich für diese Diskrepanz ist, dass 99 % der slow-cooling Paare einen FrischET durchführen ließen wofür bereits ein gewisser Anteil an punktierten Eizellen verwendet wurde. Bei einer ähnlichen Anzahl kryokonservierter 2 PN-Eizellen erscheint es dann nur logisch, dass die Vitrifikationspatientinnen bei durchschnittlich mehr KryoETs auch ebenso mehr Embryonen kumulativ in Kryoübertragungen eingesetzt haben.

#### IV.2 Schwangerschafts- und Geburtenraten nach Kryoübertragung

Neben dem Vergleich der Überlebensraten war es Ziel der Arbeit, den Unterschied der Schwangerschafts- und Geburtenraten zwischen beiden Kryokonservierungsgruppen zu untersuchen und somit gegebenenfalls herauszuarbeiten, wie groß der Einfluss der Kryokonservierungsmethode auf die klinischen Ergebnisse der IVF-Behandlung ist.

Schröder et al. haben in einer retrospektiven Studie an 2 PN-Eizellen die Schwangerschaftsrate nach Kryoembryonenübertragung mit dem traditionellen slow-cooling ermittelt. Es wurde dabei, wie in der vorgelegten Arbeit, das „Erlanger offene Gefriersystem“ verwendet. Die Untersuchung ergab klinische Schwangerschaftsraten pro Auftau von 10,0 % (10,2 % pro Embryonenübertragung). Nach drei KryoETs wurde eine kumulative Schwangerschaftsrate von 12,5 % ermittelt. Als klinische Schwangerschaft wurde das Vorhandensein einer intrauterinen Fruchthöhle definiert (Schröder et al., 2003).

Al-Hasani et al. präsentierten 5 Jahre später ihre Ergebnisse zur Vitrifikation, ebenfalls am Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck, mit deutlich höheren biochemischen und klinischen Schwangerschaftsraten (Nachweis des fetalen Herzschlags) von 36,9 % und 28,2 % pro Embryoübertragung (Al-Hasani et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Schwangerschaftsraten (biochemische, klinische und Lebendgeburt) pro erster Kryoembryonenübertragung, als auch die kumulativen Raten über den Verlauf aller Embryonenübertragungen einer IVF-Behandlung pro Patientin errechnet. Als klinische Schwangerschaft galt der sonografische Nachweis einer intrauterinen Fruchthöhle mit Herzaktion. Die biochemische Schwangerschaftsrate pro erster Kryoübertragung war in der Vitrifikationsgruppe signifikant größer als in der slow-cooling Gruppe (30,2 % vs. 16,9 %). Gleiches gilt für die klinischen Schwangerschaftsraten (16,3 % vs. 10,0 %). Die Werte sind niedriger als die von Al-Hasani gezeigten. Die niedrigeren Schwangerschaftsraten können unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass in der aktuellen Arbeit das gesamte verfügbare Kollektiv ausgewertet wurde und somit positive Verzerrungen durch eine kleine, positiv selektierte, Stichprobe vermieden wurden. Darüber hinaus wurde die Schwangerschaftsrate mit dem Nenner „Patientin“ und nicht „erfolgttem ET“ errechnet, sodass auch frustrane Auftauversuche die gebotene Berücksichtigung bei der Beurteilung der Methoden finden.

Patientinnen in der vorliegenden Studie erreichten nach Vitrifikation signifikant höhere kumulative biochemische Schwangerschaftsraten als nach slow-cooling (47,8 % vs. 38,2 %). Die Ergebnisse zeigen eine kumulative klinische Schwangerschaftsrate der Vitrifikationsgruppe von 27,6 % nach 7 KryoETs. In der slow-cooling Gruppe ergab sich eine Rate von 23,3 % nach 3 KryoETs. Der Unterschied zeigte jedoch keine statistische Signifikanz ( $p=0,19$ ). Die kumulative Lebendgeburttrate in der Vitrifikationsgruppe war mit 23,7 % höher als in der slow-cooling Gruppe (19,3 %). Der erfasste Unterschied war ebenfalls nicht statistisch signifikant ( $p=0,16$ ). Die Lebendgeburtenrate pro erster Kryoübertragung war signifikant größer nach Vitrifikation (14,4 % vs. 7,6 %).

Die klinischen Behandlungsergebnisse zeigen insgesamt höhere Werte für die Vitrifikationsgruppe. Die Unterschiede sind jedoch, zumindest bezüglich der kumulativen klinischen Schwangerschaftsrate und Lebendgeburttrate, nicht statistisch signifikant. Dies ist vor allem auf den geringen absoluten Unterschied sowie die zu geringe Fallzahl zurückzuführen. Um den bestehenden Unterschied der klinischen Behandlungsergebnisse als statistisch signifikant nachweisen zu können, wäre ein deutlich größeres Fallkollektiv nötig gewesen. Die erfasste Patientengruppe war gleichwohl ausreichend groß, um im vorangegangenen Auswertungsschritt die signifikante Differenz der Überlebensraten nach Auftau zugunsten der Vitrifikation zeigen zu können.

In der Arbeit von Schultze-Mosgau wurde eine kumulative Lebendgeburttrate von 27,3 % nach Vitrifikation und 3 KryoETs berichtet. Diese war signifikant höher als im gegenübergestellten slow-cooling Kollektiv (14,6 %). Im Vergleich zu den Überlebensraten liegen die aktuellen Schwangerschaftsraten darunter, jedoch im angegebenen Konfidenzintervall. Eine mögliche Ursache für die höheren Werte könnte die niedrigere Fallzahl von 88 Vitrifikationspatientinnen sein, welche zufällig höhere Werte begünstigen könnte. Außerdem muss die unterschiedliche Art der statistischen Auswertung beachtet werden. So kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass einzelne Patientinnen in der zitierten Arbeit nach mehr als einem

---

KryoET erfolgreich geboren haben (Schultze-Mosgau, 2007). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen und sorgt somit unter Umständen insgesamt für niedrigere Werte.

Im Vergleich zu den internationalen Arbeitsgruppen fallen die ermittelten Schwangerschaftsraten deutlich geringer aus. Hier ist die landesspezifische Gesetzgebung zu beachten, die in Deutschland die Selektion von Embryonen mit besonders guter Prognose vor der Übertragung verbietet. Dies ist in vielen Ländern gängige Praxis. Im deutschlandweiten Vergleich liegt die ermittelte Geburtenrate nach erstem Kryoauftau in der Vitrifikationsgruppe mit 14,4 % etwas unter den vom deutschen IVF-Register 2015 präsentierten 17,2 %. Die kumulierte Lebendgeburtenrate ist insgesamt höher. Dies entspricht auch den hier gezeigten Ergebnissen. So wurde ebenfalls 2015 pro durchgeführtem ET eine klinische Schwangerschaftsrate von 25,4 % aus 23.099 erfassten Kryoübertragungen präsentiert. Das Register macht diesbezüglich leider keine Unterscheidung zwischen Vitrifikation und slow-cooling. Eine Erhebung dieses Faktors im Rahmen der Datenerfassung des IVF-Registers könnte wichtige Informationen im Vergleich der Kryokonservierungsmethoden liefern. Trotzdem kann gesagt werden, dass die hier präsentierten kumulativen Ergebnisse für die Vitrifikation mindestens denen des IVF-Registers entsprechen. Dabei ist wichtig, dass dort wiederum keine kumulativen Werte abgebildet werden (Deutsches IVF-Register, 2016).

Smith et al. konnten in ihrer randomisierten Vergleichsstudie an unbefruchteten Eizellen neben den guten Überlebensraten auch zeigen, dass die vitrifizierten Oozyten in der weiteren Entwicklung und Befruchtung nach ICSI ein überlegenes Potenzial haben. Bezüglich der Schwangerschaftsraten nach ET waren die Vitrifikationsergebnisse signifikant besser. Pro Aufwärmzyklus ergaben sich klinische Schwangerschaftsraten von 38 % nach Vitrifikation im Vergleich zu 13 % nach slow-cooling (Smith et al., 2010).

In der Arbeit von Balaban et al. wurde an einer Gruppe von 73 Patientinnen das klinische Outcome nach Kryoembryonenübertragung nach Vitrifikation von

Präimplantationsembryonen (Tag-3 Embryonen) untersucht. Es zeigte sich eine klinische Schwangerschaftsrate (Nachweis der Herzaktion) von 49,3 %. Es wurden 8 Geburten erfasst (11,0%). Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass durch die geringere zelluläre Schädigung im Rahmen der Vitrifikation ein höheres Entwicklungspotenzial der Embryonen und anschließend bessere klinische Ergebnisse erzielt werden können und daher das Verfahren als Standardverfahren für die Embryonenkryokonservierung in Betracht gezogen werden sollte. Zur Beurteilung der Schwangerschaftsraten ist zu beachten, dass in der untersuchten Gruppe durchschnittlich 2,6 Embryonen pro ET in den Uterus übertragen wurden und auch weitere positive Verzerrungen der Schwangerschaftsrate nicht ausgeschlossen werden können (Balaban et al., 2010). In der vorliegenden Studie waren in der Vitrifikationsgruppe durchschnittlich 2,1, 2,0 und 2,1 Embryonen in den ersten, zweiten und dritten Kryo-Zyklen pro ET übertragen worden.

Ubaldi et al. führten eine prospektive Studie zur kumulativen fortlaufenden Schwangerschaftsrate ( $\geq 20$ . SSW) nach Frisch- und Kryoübertragung von vitrifizierten Oozyten durch. Es wurden 182 Patientinnen mit jeweils einem ICSI-Zyklus, dazu 104 erste und 11 zweite Aufwärmzyklen, untersucht. Jede Patientin machte initial einen FrischET. Die kumulative fortlaufende Schwangerschaftsrate pro Patientin betrug 53,3 %. Frauen über 40 Jahre zeigten niedrigere Raten (Ubaldi et al., 2010).

### *IV.3 Einflussfaktoren auf das Behandlungoutcome*

Für den Erfolg einer Kryoembryonenübertragung sind neben den in-vitro Bedingungen im Labor auch patienten- und therapiespezifische Faktoren verantwortlich, die in die aktuelle Arbeit nicht eingeflossen sind. Dazu zählen individuelle Lebensgewohnheiten der Patientinnen sowie Vorerkrankungen und psychische Belastungssituationen die das Ergebnis der Kinderwunschtherapie beeinflussen könnten. Des Weiteren können Faktoren eine Rolle spielen, die in der regelhaften Diagnostik nicht erfasst sind oder bis heute nicht suffizient untersucht werden können, wie z.B. veränderte Progesteronrezeptoren, eine

---

Störung der Zilienmotilität und Uterusperistaltik sowie unbekannte genetische Faktoren, welche neben den gesicherten Hauptursachen die Fertilität grundlegend beeinflussen (Ludwig et al., 2013).

Die Indikation zur ART wurde im untersuchten Patientenkollektiv in 62,2 % aufgrund von männlichen Pathologien gestellt. In 31,2 % war es eine Kombination aus männlichen und weiblichen Ursachen. Es gab diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen Vitrifikation und slow-cooling Gruppe. Diesbezüglich handelt es sich also um ähnliche Gruppen. Pathologien der Frau waren in 5,6 % der Fälle ursächlich für die IVF-Behandlung. Mit 7,6 % war dies häufiger in der slow-cooling Gruppe zu finden (zum Vergleich nur 4,1 % in der Vitrifikationsgruppe). Die Verteilung der Indikationen stimmt mit anderen Untersuchungen dieser Art überein. Es handelt sich um ein durchschnittliches Patientenkollektiv der Kinderwunschsprechstunde (Schultze-Mosgau, 2007; Deutsches IVF-Register, 2015).

Um eine möglichst valide Aussage über den Einfluss der Kryokonservierungsmethode auf das Behandlungsergebnis treffen zu können, wurden eine große Zahl zur Verfügung stehender Behandlungsdaten ausgewertet. Somit konnte auch eine Untersuchung von möglicherweise konfundierenden Faktoren vorgenommen werden. Von besonderem Interesse waren der Einfluss einer primär elektiven Kryokonservierung sowie die Blastozystenübertragung. Bekannte Einflussfaktoren wie das Alter der Frau wurden ebenso in Betracht gezogen wie die Art der Kryokonservierung. Die binär logistische Regression wurde für die Eintrittswahrscheinlichkeiten einer „biochemischen Schwangerschaft“, „klinischen Schwangerschaft“ und „Lebendgeburt“ durchgeführt. Es wurden hierbei das beste Outcome eines gesamten IVF-/ICSI-Zyklus, inklusive aller Frisch- und Kryoembryonenübertragungen, betrachtet.

Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Kryokonservierungsmethode auf den Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft (OR 1,481). Der Gebrauch der Vitrifikation korreliert mit einer 48 % höheren Chance auf den Eintritt einer

biochemischen Schwangerschaft gegenüber dem slow-cooling.

Dieser Zusammenhang wurde allerdings weder für den Eintritt einer klinischen Schwangerschaft noch Lebendgeburt festgestellt. Gleichwohl war die Effektrichtung und -größe des Einflusses der Vitrifikation auf die Erzielung einer Lebendgeburt in der Regressionsanalyse ähnlich der Effektrichtung und -größe zur Erzielung einer biochemischen Schwangerschaft.

Eine Ursache für die häufigere Implantation von Embryonen ohne weitere Entwicklung könnte theoretisch darin begründet sein, dass das slow-cooling Verfahren einen „Selektionsdruck“ auf das Gefriergut ausübt. Mit anderen Worten, eine 2 PN-Eizelle, die das slow-cooling Verfahren erst einmal überlebt hat, wird auch eher zu einer Lebendgeburt führen. Darüber hinaus kann natürlich spekuliert werden, dass Patientenfaktoren, die in dieser Studie nicht oder nicht hinlänglich erfasst wurden, die Beobachtung begründen.

Bei den bekannten und vollständig erfassten Einflussfaktoren zeigte die logistische Regression einen signifikanten Einfluss des Patientinnenalters ( $OR=0,960$ ) und der primären Kryokonservierung aller 2 PN-Eizellen ( $OR=1,620$ ) auf die Eintrittswahrscheinlichkeit einer klinischen Schwangerschaft. Beide Variablen wurden ebenso als konfundierende Faktoren auf die Eintrittswahrscheinlichkeit einer Lebendgeburt erkannt ( $OR=0,943$  und  $OR=1,692$ ). Patientinnen die primär alle 2 PN-Eizellen kryokonservieren ließen, ohne initiale Frischübertragung, zeigten eine 62 bzw. 69 % höhere kumulative Wahrscheinlichkeit für den Eintritt einer klinischen Schwangerschaft bzw. Lebendgeburt.

Das Auftreten des ovariellen Überstimulationssyndroms wurde in der Arbeit nicht erfasst. Es ist zu mutmaßen, dass bei einem Großteil der Patientinnen deren 2 PN-Eizellen primär kryokonserviert wurden ein drohendes OHSS vorlag. Bei diesen Patientinnen handelt es sich häufig um junge Patientinnen mit einer guten Schwangerschaftsprognose. Weiterhin könnte der zeitliche Zusammenhang mit der ovariellen Stimulation einen negativen Effekt auf Implantation und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in der Frischübertragung haben (Griesinger et al., 2007).

Eine Subgruppenanalyse der Patientinnen mit FrischET ( $n=289$  vs.  $n=298$ ) ergab kumulative Schwangerschafts- und Lebendgeburtenraten die in der Vitrifikationsgruppe nicht signifikant größer waren (26,3 % vs. 23,8 % und 22,5 % vs. 19,8 %). Die Regressionsanalyse zeigte hier ebenfalls einen geringen Einfluss des Patientinnenalters auf die Lebendgeburtswahrscheinlichkeit (OR=0,942;  $p=0,01$ ). Das steigende Alter ist ein, in der Wissenschaft bekannter negativer Einflussfaktor auf die Fertilität von Frauen. Dies bestätigen die Ergebnisse der Regression (Schultze-Mosgau et al., 2007). Die Kryokonservierungsmethode zeigte auch in der Subgruppe keinen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Schwangerschaftseintritts oder der Geburt. Der fehlende Einfluss der Kryokonservierungsmethode in der Regression ist in Zusammenschau mit dem statistisch nicht signifikanten Unterschied der Schwangerschafts- und Geburtenraten beider Gruppen durchaus schlüssig.

Nach erzwungener Aufnahme der Kryokonservierungsmethode in die Regressionsanalyse zeigte sich ebenso das Alter der Frau als signifikante Einflussvariable auf das Eintreten einer Lebendgeburt (OR 0,938). Für die Art der Kryokonservierung ergibt sich dabei eine Odds ratio von 1,405. Dies bedeutet für das untersuchte Patientinnenkollektiv eine 40,5 % höhere Wahrscheinlichkeit im gesamten IVF-Zyklus nach Vitrifikation eine Lebendgeburt zu erreichen, gegenüber den Patientinnen nach slow-cooling. Dieser Einfluss zeigte jedoch, wie zuvor die kumulative Lebendgeburtenrate, keine statistische Signifikanz ( $p=0,07$ ).

Es ist festzustellen, dass trotz der nachweislich höheren Kryoüberlebensraten in der Vitrifikationsgruppe kein signifikanter Unterschied in den klinischen Behandlungsergebnissen gezeigt werden konnte. Auch wenn dieses Ergebnis prima-vista unplausibel erscheint, so gibt es doch inzwischen weitere Daten die zeigen, dass auch in der Situation des FrischET die Zahl der verfügbaren Eizellen keinen unmittelbaren Einfluss auf das Ergebnis der Frisch-IVF haben (Fatemi et al., 2012). Mit anderen Worten reichen möglicherweise wenige Eizellen (respektive ETs) bei der Mehrzahl der Patientinnen aus, um entweder die Schwangerschaft zu erzielen, bzw. eine prognostisch ungünstige Subgruppe zu schaffen, die auch

durch eine Vielzahl von ETs nicht schwanger wird. Gleichwohl konnten nach Vitrifikation 1,14- bis 1,23fach höhere kumulative Lebendgeburtenraten erfasst werden als nach slow-cooling.

#### *IV.4 Methodische Probleme der Studie*

Aufgrund des Charakters der Arbeit als retrospektive Studie erlaubt die Interpretation der ermittelten Werte grundsätzlich keine Aussage über eine Kausalität zwischen Kryokonservierungsmethode und Überlebens- oder Schwangerschaftsraten. Sie zeigt lediglich die Korrelation zwischen den Werten an. Die Ergebnisse können nur als Hinweis zur Beantwortung der Fragestellungen verstanden werden, sind jedoch nicht beweisend.

Die Interpretation der Ergebnisse wird zusätzlich durch die zum Teil heterogenen Patientengruppen erschwert. Das slow-cooling Kollektiv scheint zumindest im Durchschnitt bessere Grundvoraussetzungen zu zeigen (jüngere Patientinnen und Partner, niedriger Zigarettenkonsum). Dies sind bekannte, die Fertilität beeinflussende Faktoren. Allerdings haben sie im Mittel eine etwas längere Kinderwunschdauer sowie mehr vorangegangene Stimulationsbehandlungen). Dies könnte ebenfalls die besseren Ergebnisse der Frischembryonenübertragungen erklären, der bei 289 (70,5 %) Vitrifikationspatientinnen und 298 (99,0 %) slow-cooling Patientinnen dem ersten KryoET vorausgegangen sind. Die Patientinnen der slow-cooling Gruppe zeigten höhere Lebendgeburten im FrischET (18/289; 6,2 % vs. 27/298; 9,1 %). Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant ( $p=0,2$ ). Die Unterschiede der Gruppen führen sich in den Resultaten der Follikelpunktion und IVF/ICSI fort. Hier konnten bei den slow-cooling Patientinnen im Mittel mehr Eizellen punktiert und letzten Endes mehr 2 PN-Eizellen kryokonserviert werden. Man könnte hier schlussfolgern, dass sich bei gleichen Grundvoraussetzungen oder Angleichung der Gruppen, die Differenz der klinischen Erfolgsraten zugunsten der Vitrifikation vergrößern würde. Dies könnte begründen, warum die Vitrifikation im klinischen Outcome dem slow-cooling in den univariaten Analysen nicht mit statistischer Signifikanz überlegen ist.

Es ist zudem so, dass der Unterschied bei der erfassten Fallzahl zu gering ist um statistisch signifikant zu sein. So war es am Ende der Datenerfassung nötig 522 Patientinnen, welche initial die Einschlusskriterien erfüllten, aus der Auswertung auszuschließen. Gründe hierfür waren nicht vorhandene Papierakten, nicht durchgeführte Kryoübertragungen trotz Kryokonservierung und unbekannte Behandlungsausgänge. Es ist davon auszugehen, dass es sich zum größten Teil um slow-cooling Patientinnen handelt, da die älteren Daten deutlich lückenhafter waren. Dies könnte zu einer zufälligen Verzerrung der Ergebnisse führen, während eine systematische Verzerrung eher unwahrscheinlich ist. Datensätze mit vereinzelt fehlenden Variablen wurden in der Auswertung belassen. Für die Regressionsanalyse wurden hier fehlende Werte, wie beschrieben, ersetzt. Durch die Sammlung von Daten aus den vergangenen 12 Jahren ergab sich grundsätzlich das Risiko unvollständiger Datensätze. Die Nachteile der retrospektiven Datenerhebung kommen hier zum Tragen.

Weiterhin geschah die Durchführung sowie Dokumentation der Behandlungen nicht durch die Doktorandin. Daraus ergeben sich potentiell unerkannte Fehlerquellen, welche die Aussagekraft der Ergebnisse schwächt. Gleichzeitig kann bei der Erfassung patientenspezifischer Variablen, besonders aus dem selbstauszufüllenden Anamnesebogen, eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine Erinnerungsverzerrung der Patienten selbst stattgefunden haben. Zuletzt können individuelle Unterschiede bei der Durchführung des Substitutionsschemas zur Endometriumvorbereitung auf die Kryoübertragung zur Beeinflussung der Behandlung führen, die im Nachhinein nicht nachzuvollziehen sind.

---

## IV.5 Fazit

Obwohl für die Vitrifikationsgruppe signifikant höhere Überlebensraten nach Auftau bzw. Erwärmung von 2 PN-Eizellen festgestellt werden konnten, ergab sich, unter Berücksichtigung konfundierender Faktoren, kein statistisch signifikanter Unterschied der kumulativen klinischen Schwangerschafts- und Lebendgeburtenrate zwischen beiden Gruppen. Ein Trend zu höheren Schwangerschafts- und Lebendgeburtenraten war allerdings gegeben, aber die Fallzahl in der vorliegenden Arbeit war zu gering, um die gemessenen Effekte mit statistischer Signifikanz nachweisen zu können. Im Ergebnis bedeutet dies aber auch, dass durch höherer Überlebensraten nach Auftau keine starken Änderungen der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit erwartbar sind. Dies ist konkordant mit Beobachtungen aus verschiedenen IVF-Registern, die – trotz internationaler Ausweitung des Einsatzes der Vitrifikation in den vergangenen Jahren – keinen deutlichen Anstieg der Schwangerschaftsraten in den Kryozyklen berichtet haben.

Die Studie kann aufgrund ihres Charakters als retrospektive Datenauswertung keinen Beweis für die Über- oder Unterlegenheit einer Methode liefern. Zur genaueren Bestimmung der erzielbaren Unterschiede im klinischen Outcome durch Wahl der Kryokonservierungsmethode wäre eine randomisiert kontrollierte Vergleichsstudie an 2 PN-Eizellen anzustreben, in der alle bekannten wie auch unbekannt konfundieren Faktoren zwischen den Untersuchungsgruppen durch die Randomisierung gleich verteilt sind. Für die Kryokonservierung unbefruchteter Eizellen und Präimplantationsembryonen ist dies bereits geschehen.

Die hier ermittelten Effektstärken bezüglich Schwangerschafts- und Geburtenraten könnten in der Planung einer prospektiv randomisierten Studie zur Fallzahlplanung hilfreich sein. Die Ergebnisse einer solchen Arbeit könnten in Zukunft dazu führen, dass sich das nachweislich bessere Verfahren in IVF-Laboren, mit standardisierten Kryokonservierungsprotokollen durchsetzt mit dem Ziel eine einheitliche Versorgung der Kinderwunschpatientinnen zu gewährleisten.

## V Zusammenfassung

Den IVF-Laboren stehen zur Kryokonservierung von 2 PN-Eizellen im Rahmen der assistierten Reproduktion heute im Wesentlichen zwei Methoden zur Verfügung: das traditionelle slow-cooling und die Vitrifikation, welche die Gefahr der Eiskristallbildung und somit Zellschädigung durch extrem schnelle Abkühlgeschwindigkeiten umgeht.

Die vorliegende retrospektive Arbeit vergleicht beide Methoden anhand der Behandlungsergebnisse eines großen Patientinnenkollektivs.

Die Daten von 711 Patientinnen, die am Universitären Kinderwunschzentrum Lübeck, zwischen 1/1999 und 7/2011, erstmalig im Rahmen einer IVF- oder ICSI-Behandlung mindestens eine Eizelle im Vorkernstadium kryokonservieren ließen, wurden analysiert (410 Vitrifikation vs. 301 slow-cooling). Bei allen wurde eine ovarielle Stimulation zur Follikelpunktion und IVF/ICSI durchgeführt. Alle resultierenden Embryonenübertragungen wurden erfasst. Es wurde initial eine Frischübertragung durchgeführt oder primär alle Eizellen im Vorkernstadium für eine spätere Übertragung kryokonserviert. Kryoübertragungen fanden nach Endometriumvorbereitung mit transdermale Östrogen und vaginalem Progesteron statt. Die Gruppen wurden auf Unterschiede der erhobenen demographischen und Behandlungsvariablen, Auftauüberlebensraten, sowie kumulativer Schwangerschafts- und Lebendgeburtenraten untersucht. In einer logistischen Regression wurde der Einfluss konfundierender Faktoren untersucht. Die mittlere Auftauüberlebensrate der ersten (94,1 % vs. 57,4 %), zweiten (96,1 % vs. 61,3%) und dritten Auftauzyklen (95,8 % vs. 50,0 %), ist signifikant höher nach Vitrifikation. Die Vitrifikationsgruppe zeigt signifikant höhere kumulative biochemische Schwangerschaftsraten (47,8 % vs. 38,2 %). Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant in der kumulativen klinischen Schwangerschafts- und Lebendgeburtenrate (27,6 % vs. 23,3 % und 23,7 % vs. 19,3 %). Die entsprechenden Raten pro erster Übertragung waren signifikant größer nach Vitrifikation (30,2 % vs. 16,9 %; 16,3 % vs. 10,0 %; 14,4 % vs. 7,6 %). Die Regression ergab einen signifikanten Einfluss der

Kryokonservierungsmethode auf den Eintritt einer biochemischen Schwangerschaft (OR=1,481). Die Methode zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die klinische Schwangerschafts- oder Lebendgeburtswahrscheinlichkeit. Diese war größer nach elektiver Kryokonservierung aller Eizellen im Vorkernstadium (OR=1,620 und OR=1,692;  $p=0,02$ ). Die Ergebnisse ändern sich nicht wesentlich bei Berücksichtigung dieses Faktors in einer entsprechenden Subgruppenanalyse. Nach forcierter Aufnahme der Kryokonservierungsmethode in die Regressionsanalyse zeigt sich für die Vitrifikation eine 40,5 % erhöhte Lebendgeburtenwahrscheinlichkeit im Vergleich zum slow-cooling. Diese klinischen Resultate zeigen entsprechend den kumulativen Raten keine statistische Signifikanz.

Der retrospektive Charakter der Arbeit verbietet die Interpretation der Werte im Sinne eines Kausalzusammenhangs. Mögliche Einflussvariablen wurden im Rahmen der Regression allerdings berücksichtigt. Jedoch erschweren weitere Faktoren, wie die heterogenen Gruppen, die Interpretation der Werte und schwächen somit die Aussagekraft. Die höheren Überlebensraten gehen nicht automatisch mit höheren klinischen Erfolgsraten einher. Dennoch bieten sie die Möglichkeit zu mehreren Kryoübertragungen aus einer Stimulation. Patientinnen mit einer geringen Anzahl kryokonservierter Eizellen bietet sie die größtmögliche Sicherheit auf eine hohe Ausbeute vitaler Eizellen im Vorkernstadium zur Übertragung. Dieser Vorteil sowie die schnelle Anwendung macht die Vitrifikation zum zu bevorzugenden Verfahren. Die Effektstärke des klinischen Unterschieds ist unter Umständen zu klein um statistische Signifikanz zu zeigen. Die ermittelten Werte könnten zur Konzipierung einer folgenden randomisierten Studie von Nutzen sein. Diese wäre nötig um die Überlegenheit einer Methode final zu klären.

## VI Literaturverzeichnis

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

Al-Hasani S., Ludwig M., Gagsteiger F., Küpker W., Sturm R., Yilmaz A., Bauer O., Diedrich K. (1996) Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization. *Human reproduction* **11**, 604-607.

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

Al-Hasani S., Schöpfer B., Schultze-Mosgau A., Griesinger G., Diedrich K. (2011) Vitriifikation mit dem Cryotop-Verfahren. *Gynäkologische Endokrinologie* **9**, 219-222.

Balaban B., Urman B., Ata B., Isiklar A., Larman M., Hamilton R., Gardner D. (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. *Human Reproduction* **23**, 1976-1982.

Bals-Pratsch M., Al-Hasani S., Schöpfer B., Diedrich C., Hoepfner A.-S., Weiss J., Küpker W., Felberbaum R., Ortmann O., Bauer O., Dietrich K. (1999) A simple, inexpensive and effective artificial cycle with exogenous transdermal oestradiol and vaginal progesterone for the transfer of cryopreserved pronucleated human oocytes in women with normal cycles. *Human Reproduction* **14**, 222-230.

Boivin J., Bunting L., Collins J. A., Nygren K. G. (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction* **22**, 1506-1512.

Bundesgesetzblatt I, Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG) vom 13. Dezember 1990, 2746-2748, geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (Bundesgesetzblatt I, 2011, 2228).

Deutsches IVF-Register D.I.R. (2015) - Deutsches IVF-Register Jahrbuch 2015. <http://www.deutsches-ivf-register.de/perch/resources/downloads/dir-2015d.pdf> (Zugriff: 18.01.2018).

Deutsches IVF-Register D.I.R. (2016) - Deutsches IVF-Register Jahrbuch 2016. <http://www.deutsches-ivf-register.de/perch/resources/downloads/dirjahrbuch2016d.pdf> (Zugriff: 28.01.2018).

Donnez J., Dolmans M.-M., Demylle D., Jadoul P., Pirard Cé., Squifflet J., Martinez-Madrid B., Van Langendonck A. (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet* **364**, 1405-1410.

ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embryology (2012). <https://www.eshre.eu/sitecore/content/Home/Press%20Room/Press%20releases/Press%20releases%20ESHRE%202012/5%20million%20babies> (Zugriff: 09.12.2015)

Fadini R., Brambillasca F., Renzini M. M., Merola M., Comi R., De Ponti E., Dal Canto M. (2009) Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reproductive biomedicine online* **19**, 171-180.

Fahy G. M., MacFarlane D., Angell C., Meryman H. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* **21**, 407-426.

Fasano G., Fontenelle N., Vannin A.-S., Biramane J., Devreker F., Englert Y., Delbaere A. (2014) A randomized controlled trial comparing two vitrification methods versus slow-freezing for cryopreservation of human cleavage stage embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics* **31**, 241-247.

Fatemi H. M., Doody K., Griesinger G., Witjes H. & Mannaerts B. (2012) High ovarian response does not jeopardize ongoing pregnancy rates and increases cumulative pregnancy rates in a GnRH-antagonist protocol *Human Reproduction, ESHRE* **28**, 442-452.

Gnoth C., Godehardt E., Frank-Herrmann P., Friol K., Tigges Jü., Freundl G. (2005) Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human Reproduction* **20**, 1144-1147.

Götz W., Mandler N., Lange R. (2008) Homograft Bank in der Herzchirurgie. In: Wintermantel E., Ha S.-W. (Herausgeber), *Medizintechnik: Life Science Engineering*. 4. Auflage, *Springer-Verlag*, Berlin. 1163-1173.

Griesinger G., Von Otte S., Schroer A., Ludwig A., Diedrich K., Al-Hasani S., Schultze-Mosgau A. (2007) Elective cryopreservation of all pronuclear oocytes after GnRH agonist triggering of final oocyte maturation in patients at risk of developing OHSS: a prospective, observational proof-of-concept study. *Human Reproduction* **22**, 1348-1352.

Habbema J. D. F., Collins J., Leridon H., Evers J. L., Lunenfeld B., te Velde E. R. (2004) Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Human Reproduction* **19**, 1497-1501.

Isachenko V., Montag M., Isachenko E., Nawroth F., Dessolet S., Van der Ven H. (2004) Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration. *Human Reproduction* **19**, 660-665.

Klett J. (2013) Kryokonservierung von Pronukleusstadien an der Universitätsfrauenklinik zu Lübeck der Jahre 1998 bis 2010: ein Methodenvergleich. *Med. Diss.* Lübeck.

Klocke S., Bündgen N., Köster F., Eichenlaub-Ritter U., Griesinger G. (2015) Slow freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Archives of gynecology and obstetrics, Springer* **291**, 419-426.

Kuleshova L. L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A., Trounson A. (1999) Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction* **14**, 3077-3079.

Kuleshova L. L. und Lopata A. (2002) Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and sterility* **78**, 449-454.

Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S. P. (2005) Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online* **11**, 300-308.

Kuwayama M., Vajta G., Ieda S., Kato O. (2005a) Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive biomedicine online* **11**, 608-614.

Leibo S. und Mazur P. (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel J. C. (Herausgeber), *Methods in mammalian reproduction*, Academic Press New York 179-201.

Lovelock J. E. (1953) The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing (Abstract). *Biochimica et biophysica acta* **10**, 414-426.

Ludwig M., Diedrich K., Nawroth F. (2013) Was ist »Sterilität? -- eine Begriffsbestimmung. In: Diedrich K., Ludwig M., Griesinger G. (Herausgeber), *Reproduktionsmedizin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-7.

Maurer R. R. (1966) Repeated superovulation and ovum transfer and the survival of transferred ova and newborn in the rabbit. *Thesis*, Cornell University, Ithaca, New York.

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

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

Mazur P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **247**, C125-C142.

McGann L. E. (1978) Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents (Abstract). *Cryobiology* **15**, 382-390.

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A. C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte (Abstract). *The Lancet* **340**, 17-18.

Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **164**, 666.

Rall W. F. und Fahy G. M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification (Abstract). *Nature* **313**, 573-575.

Rowe P. J., Comhaire F. H., Hargreave T. B., Mahmoud A. M. A. (2000) Objective criteria for diagnostic categories in the standardized management of male infertility. In: Rowe, P. J., Comhaire, F. H. (Herausgeber), WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. *Cambridge University Press*, 37-59.

Schröder A., Banz C., Katalinic A., Al-Hasani S., Weiss J., Diedrich K., Ludwig M. (2003) Counselling on cryopreservation of pronucleated oocytes. *Reproductive biomedicine online* **6**, 69-74.

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

Schultze-Mosgau A., Schill T., Strik D., Germer U. (2007) Sterilität und Infertilität. In: Dietrich K., Schultze-Mosgau A., Holzgreve W., Jonat W., Schneider K.-T. M.,

Weiss J.M. Gynäkologie und Geburtshilfe (Herausgeber), Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage, *Springer Medizin Verlag Berlin Heidelberg*, 97-122.

Scott L. A. und Smith S. (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Human Reproduction* **13**, 1003-1013.

Smith G. D., Serafini P. C., Fioravanti J., Yadid I., Coslovsky M., Hassun P., Alegretti J. R., Motta E. L. (2010) Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertility and sterility* **94**, 2088-2095

Spallanzani L. (1776) Opuscoli di fiscal e vegetabile. Opuscolo II. Osservazioni e esperienze intorno ai vermicelli spermatici dell' homo e degli animali. (Observations upon the spermatozoa of humans and animals). *Modena*, 1776.

Steer C. V., Mills C. L., Tan S. L., Campbell S., Edwards R. G. (1992) The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer program. *Human Reproduction* **7**, 117-119.

Steptoe P. C. und Edwards R. G. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* **312**, 366.

Trounson A. und Mohr L. (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* **305**, 707-709.

Ubaldi F., Anniballo R., Romano S., Baroni E., Albricci L., Colamaria S., Capalbo A., Sapienza F., Vajta G., Rienzi L. (2010) Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Human reproduction* **25**, 1199-1205.

Vajta G., Kuwayama M., Vanderzwalmen P. (2007) Disadvantages and benefits of vitrification. In: Tucker M., Liebermann J. (Herausgeber), Vitrification in assisted reproduction: a user's manual and trouble shooting guide. *Informa Healthcare United Kingdom*, 33-44.

Van der Ven H., Jeyendran R. S., Al-Hasani S., Tünnerhoff A., Hoebbel K., Diedrich K., Krebs D., Perez-Pelaez S. (1988) Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF (Abstract). *Human Reproduction* **3**, 85-88.

Whittingham D. (1977) Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In: Elliot K., Whelan J. (Herausgeber), The freezing of mammalian embryos, *Ciba Foundation Symposium* **52**, 97-107.

Whittingham D., Leibo S., Mazur P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C (Abstract). *Science* **178**, 411-414.

Zegers-Hochschild F., Adamson G. D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E., Vanderpoel S. (2009) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and sterility* **92**, 1520-1524.

Zeilmaker G. H., Alberda A. T., Van Gent I., Rijkmans C., Drogendijk A. C. (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and sterility*, **42**, 293-296.

## VII Anhang



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn  
Prof. Dr. med. Georg Griesinger  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

im Hause

### Ethik-Kommission

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe  
Stellv. Vorsitzender  
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler  
Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann  
Tel.: +49 451 500 4639  
Fax: +49 451 500 3026  
janine.erdmann@medizin.uni-  
luebeck.de

Aktenzeichen: 11-233A

Datum: 23. November 2011

### Vergleich zweier Kryokonservierungsmethoden von 2 PN Eizellen. Eine retrospektive, multivariate Auswertung

Hier: Anzeige – Schreiben vom 17. November 2011

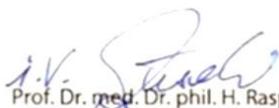
Sehr geehrter Herr Prof. Griesinger,

Ihre Doktorandin, Frau Manja Golakov, informiert mit Schreiben vom 17. November 2011 über das geplante Vorhaben.

Die Ethik-Kommission nimmt das von Ihnen in Ihrem Anschreiben beschriebene Vorhaben zur Kenntnis. Eine Behandlung im normalen Antragsverfahren wird nicht für notwendig erachtet.

Mit freundlichem Gruß bin ich

Ihr

  
Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe  
Vorsitzender

**Abbildung 8:** Schreiben der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck bezüglich der Meldung über die geplante Promotion.

## VIII Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Georg Griesinger für das Überlassen und die Betreuung der Arbeit. Besonders aber möchte ich mich bedanken für die konstruktiven Ratschläge und Diskussionen, die zu jeder Zeit möglich waren. Die mir entgegengebrachte Geduld und Motivation machte mir die Anfertigung der Dissertation möglich.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des IVF-Labors, des Kinderwunschzentrums und der Poliklinik der Universitätsfrauenklinik für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, sowie der Hilfe jederzeit Zugang zu den erforderlichen Akten und Ordnern zu bekommen. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Beate Schöpfer für die Einarbeitung in die Datenbanken, die Unterstützung bei der Datensammlung und geduldigen Erläuterungen aller Abläufe.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Claudia Hemmelmann aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik für die hilfreiche Einordnung und Interpretation meiner Resultate.

Dank gilt auch meiner Familie. Insbesondere meiner Schwester Laura sowie meiner Uroma Lisa danke ich für die liebevoll drängende Unterstützung.

Ich danke meinen lieben Freundinnen Kristin und Lisanne für die fantastische Zeit im schönen Lübeck und Natascha auch für das Lesen der Arbeit.

Zuletzt danke ich meinem Freund Philipp. Ich danke dir für die wissenschaftliche, mathematische und technische Hilfe - besonders aber kann ich dir nicht genug danken für das ständige und unermüdliche Mut machen.

## IX Lebenslauf

Name Manja Golakov  
 Geburtstag 14.05.1989  
 Geburtsort Parchim



### Schulbildung

1995-1999 Grundschule Balow  
 1999-2005 Friedrich-Rohr Gymnasium in Grabow  
 2005-2008 Goethe-Gymnasium in Ludwigslust (Abitur)

### Studium

2008-2015 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
 2010 Physikum  
 2014-2015 Praktisches Jahr:  
 Sana Klinik Lübeck, Innere Medizin und Chirurgie  
 Kantonsspital Baden, Schweiz, Gynäkologie und Geburtshilfe  
 02.06.2015 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 Bis 09/2016 Promotionssemester an der Universität zu Lübeck

### Beruf

10/2016-aktuell Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe in der  
 Frauenklinik der Sana Hanse Klinik Wismar

### Zeitraum der Dissertation

11/2011 Annahme der Doktorarbeit  
 06/2012-05/2014 Datenerfassung und –auswertung  
 09/2015-04/2018 Verfassen und Korrektur der Dissertation

### **Publikationen**

Golakov M., Depenbusch M., Schultze-Mosgau A., Schoepper B., Hajek J., Neumann K., Griesinger G. (2018) What is the net effect of introducing vitrification for cryopreservation of surplus 2PN oocytes in an IVF program? *Archives of gynecology and obstetrics*, **297(2)**, 529-537.

Golakov M., Schultze-Mosgau A., Depenbusch M., von Horn K., Al-Hasani S., Schöpfer B., Griesinger G. (2013) Vergleich zweier Kryokonservierungsmethoden von 2 PN-Eizellen. 5. DVR-Kongress, Münster, Abstract/Poster.