

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität zu Lübeck  
Direktor Prof. Dr. med. K. Diedrich

---

**Der Einfluss des endogenen LH-Spiegels auf die  
Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in einem  
künstlichen Zyklus mit Transfer zuvor kryokonservierter  
Eizellen im Rahmen der assistierten Reproduktion.**

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

vorgelegt von  
**Monika Weig**  
aus Pegnitz  
Lübeck 2009

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität zu Lübeck

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med.univ. M.Sc. Georg Griesinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2009

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.07.2009

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach**  
**- Dekan der Medizinischen Fakultät -**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	4
<b>I Einleitung.....</b>	<b>5</b>
I.1 Einführung Reproduktionsmedizin.....	5
I.2 Sterilität und Infertilität .....	7
I.2.1 Definition .....	7
I.2.2 Prävalenz .....	7
I.2.3 Epidemiologie.....	7
I.2.4 Ätiologie.....	8
I.2.5 Ursachen der weiblichen Sterilität .....	8
I.2.6 Störungen der männlichen Fertilität.....	8
I.3 Grundlagen Endokrinologie .....	9
I.3.1 Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse .....	9
I.3.2 Der weibliche Zyklus.....	10
I.4 Die extra-korporale Befruchtung.....	11
I.4.1 Embryonenschutzgesetz .....	11
I.4.2 In-Vitro-Fertilisation – Extra-korporale Reagenzglasbefruchtung .....	12
I.4.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion .....	13
I.5 Kryo-Zyklen .....	13
I.5.1 Kryo-Zyklen in Deutschland.....	14
I.5.2 Kryo-Embryonen-Transfer .....	15
I.5.3 Vorgehen bei Kryo-Embryonen-Transferzyklen am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.....	17
I.6 Die Bedeutung des LH .....	18
I.6.1 Arbeitshypothese.....	20

<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
II.1	Endometriumvorbereitung .....	21
II.2	Kryokonservierung .....	22
II.2.1	Erlanger „offenes Gefriersystem“ .....	22
II.2.2	Vitrifikation von Eizellen im Vorkernstadium .....	23
II.3	Hormonwertbestimmung .....	24
II.4	Datenerhebung.....	24
II.5	Erstellung zweier Datensätze .....	26
II.6	Datenanalyse und Statistik .....	27
II.7	Fallzahlüberlegung .....	28
II.8	Ergebnisdefinitionen .....	28
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
III.1	Demographische Daten.....	30
III.2	Ergebnisse der ersten Kryo-Zyklen pro Patientin .....	32
III.2.1	Hormonwerte und Endometriumhöhe.....	32
III.2.2	Korrelationen des LH-Wertes .....	33
III.2.3	Eigenschaften der Zyklen und Patientinnen in Abhängigkeit vom LH-Wert.....	33
III.2.4	Schwangerschaftswahrscheinlichkeit .....	35
III.2.5	Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom LH-Wert..	36
III.2.6	Fortlaufende Schwangerschaften.....	37
III.3	Ergebnisse für alle Zyklen .....	39
III.3.1	Korrelationen des LH-Wertes .....	39
III.3.2	Eigenschaften der Zyklen und Patientinnen in Abhängigkeit vom LH-Wert.....	40
III.3.3	Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom LH-Wert..	41
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>43</b>
IV.1.1	Hormonwerte und Endometriumhöhe.....	45
IV.1.2	Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom LH-Wert..	47
IV.1.3	Fortlaufende Schwangerschaften.....	47

IV.1.4	Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Embryo Score.....	48
IV.2	Die Bedeutung des LH .....	49
IV.3	Methodische Probleme der Studie .....	50
IV.4	Ausblick.....	52
IV.5	Fazit.....	53
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>54</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>VII</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>64</b>
<b>VIII</b>	<b>Publikation.....</b>	<b>66</b>
<b>IX</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>67</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMI	Body-Mass-Index
$\beta$ -HCG	Beta-Untereinheit des humanen Choriongonadotropins
E <sub>2</sub>	Östradiol
ESchG	Embryonenschutzgesetz
FSH	follikelstimulierendes Hormon
ggfs.	gegebenenfalls
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCG	humanes Choriongonadotropin
HMG	humanes Menopausengonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In-Vitro-Fertilisation
KI	Konfidenzintervall
Kryo-ET	Kryo-Embryonen-Transfer
LH	luteinisierendes Hormon
OR	Odds ratio
s.	siehe
SET	Single-Embryo-Transfer
SSW	Schwangerschaftswoche
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
vs.	versus
2 PN Eizellen	2-Pronukleus-Eizellen

# I Einleitung

## *1.1 Einführung Reproduktionsmedizin*

Mit der Geburt von Louise Brown 1978 in England begann eine neue Ära der Reproduktionsmedizin. Sie war das erste Kind, das nach einer extrakorporalen Reagenzglas-Befruchtung (In-Vitro-Fertilisation, IVF) lebensfähig zur Welt gebracht wurde (Stephoe und Edwards, 1978). Vier Jahre später, im Jahr 1982, wurde in der Universitätsklinik Erlangen-Nürnberg das erste deutsche Kind nach einer In-Vitro-Fertilisation geboren. Heute gibt es in Deutschland über 100 Zentren, die sich auf Kinderwunschbehandlungen spezialisiert haben und Anlaufstellen für Paare sind, welche ungewollt kinderlos bleiben. In Deutschland sind 1,5 bis 2 Millionen Paare von einem unerfüllten Kinderwunsch betroffen. Das entspricht ungefähr 15 bis 20% aller Paare im reproduktionsfähigen Alter (Ludwig et al., 2006). Aufgabe der reproduktionsmedizinischen Behandlung ist es, „diesen Paaren durch eine individuelle, komplikationsarme und effiziente Behandlung zu einem eigenen Kind zu verhelfen.“ (Schröer et al., 2003). In den entwickelten Ländern entstehen bereits 1 bis 3% aller Neugeborenen durch eine künstliche Befruchtung (Sutcliffe und Ludwig, 2007). Trotz Kritik aus Reihen der Kirche und der Gesellschaft an der Reproduktionsmedizin, nehmen die betroffenen Paare die Möglichkeit der künstlichen Befruchtung dankbar an. Viele haben einen langen Leidensweg hinter sich. Die Diagnose der Sterilität ruft Gefühle wie Schock, Trauer und Wut, aber auch Selbstzweifel und Schuldgefühle hervor (Kowalcek, 1998). Therapievorschläge fallen in dieser Situation auf fruchtbaren Boden und so begeben sich viele betroffene Paare in eine langwierige und oft psychisch sehr belastende Behandlung. Eine Patientin drückt ihre emotionale Lage in einem Tagebucheintrag folgendermaßen aus: „Hoffentlich hat das ganze Leiden denn auch Erfolg. Ohnmacht!“ (Kowalcek, 1998). Neben der psychischen Belastung birgt die Therapie auch medizinische Risiken wie eine erhöhte Prävalenz von Mehrlingsschwangerschaften oder ein Überstimulationssyndrom (Schröer et al, 2003). Die Hoffnungen, die bei den Paaren durch die Behandlung geweckt

werden, können nur bei etwa der Hälfte der Betroffenen erfüllt werden (Meier, 2000).

Während sich schon in den frühen 80er Jahren die Methode der IVF etablierte, wurde im Jahr 1994 die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) eingeführt. Bei der IVF werden der Frau Eizellen im spontanen oder stimulierten Zyklus entnommen. Diese werden mit präparierten Spermien des Partners befruchtet, kultiviert und in den Uterus transferiert. Bei der ICSI wird hingegen ein präpariertes Spermium direkt in das Ooplasma einer entnommenen Eizelle injiziert. Die befruchtete Eizelle wird inkubiert und ebenfalls in den Uterus transferiert. Der Einsatz beider Methoden stieg seit ihrer Erstanwendung bis ins frühe 21. Jahrhundert kontinuierlich an. Im Jahr 2003 erreichten die Behandlungszahlen in Deutschland ihren Höhepunkt. Es wurden 28.058 ICSI- und 51.389 IVF-Behandlungen durchgeführt. Im Jahr 2004 kam es jedoch bei beiden Verfahren der assistierten Reproduktion zu einem starken Einbruch in den Behandlungszahlen. Nur noch 11.848 ICSI-Behandlungen und 25.339 IVF-Behandlungen wurden vorgenommen. Im Vergleich zum Vorjahr halbierte sich die Zahl der Eingriffe also um mehr als die Hälfte (Deutsches IVF-Register, 2005).

Diese Entwicklung ist auf das im Jahr 2004 in Kraft getretene Gesundheitsmodernisierungsgesetz zurückzuführen. Inhalt dieses Gesetzes ist die Einschränkung der Kostenübernahme der IVF- und ICSI-Behandlungen durch die gesetzlichen Krankenkassen auf insgesamt drei Versuche. Die Hälfte der Kosten für diese drei Versuche müssen die Patienten zudem selber tragen. Diese finanzielle Belastung führt dazu, dass viele Patienten die Behandlung trotz vorhandenen Kinderwunsches nicht durchführen lassen können. Auffällig ist jedoch, dass im gleichen Jahr die Anzahl der Kryo-Embryonen-Transfers zunahm - eine kostengünstigere Alternative zu frischen Embryonen-Transfers. Beim Kryo-Embryonen-Transfer werden Oozyten im Vorkernstadium, die bei einer vorhergehenden IVF- oder ICSI-Behandlung eingefroren wurden, aufgetaut und in den Uterus zurückgesetzt (s. Kapitel I.5.2).

## *1.2 Sterilität und Infertilität*

### *1.2.1 Definition*

Die Begriffe Sterilität und Infertilität können in Anlehnung an die angloamerikanische Literatur synonym gebraucht werden. Eine Differenzierung wird hingegen zwischen den Begriffen Subfertilität und Infertilität vorgenommen. Die Autoren Gnoth et al. (2004) schlagen folgendes Klassifikationsschema vor: Paare mit Kinderwunsch gelten nach 6 erfolglosen Zyklen als „leicht subfertil“. Nach 12 erfolglosen Zyklen werden die Paare als „erheblich subfertil“ bezeichnet. Erst nach 48 erfolglosen Monaten werden die Paare als „infertil“ eingestuft.

### *1.2.2 Prävalenz*

Etwa 20% der Paare mit Kinderwunsch werden entsprechend der Definition von Gnoth et al. (2004) als „leicht subfertil“ eingestuft. Ungefähr die Hälfte dieser Paare erreicht in den folgenden 6 Zyklen eine erfolgreiche Schwangerschaft. Folglich gelten ca. 10% der Paare mit Kinderwunsch als „erheblich subfertil“ oder „infertil“. In dieser Patientengruppe kommt es in 50% der Fälle zu einer Spontankonzeption in den folgenden 36 Monaten. Die verbleibenden 5% aller Paare mit Kinderwunsch müssen als „definitiv infertil“ bezeichnet werden und haben nur vereinzelt Aussicht auf eine natürliche Empfängnis (Gnoth et al., 2004).

### *1.2.3 Epidemiologie*

In Deutschland bleiben etwa 1,5 bis 2 Millionen Paare ungewollt kinderlos (Ludwig et al., 2006). Die Inzidenz ist steigend. Als Ursache dafür werden schädliche Umwelteinflüsse, hohe Schadstoffbelastung und veränderte Lebensgewohnheiten der Menschen diskutiert (Ludwig et al., 2006). Insbesondere die Verlegung des Kinderwunsches in eine spätere Lebensphase scheint eine wichtige Ursache für steigende Inzidenzraten zu sein (Dietl, 2001).

### 1.2.4 Ätiologie

Die Ursachen für ungewollte Kinderlosigkeit sind vielfältig. Bei den Frauen gehen die Konzeptionschancen ab dem 35. Lebensjahr durch die biologische Alterung des Ovars sowie Zunahme anderer Sterilitätsursachen wie beispielsweise Adhäsionen nach operativen Eingriffen, Infektionen, Endometriose oder Myome stark zurück. Beim Mann nimmt die Zeugungsfähigkeit erst mit dem 60. Lebensjahr deutlich ab (Schill et al., 1999). Die Ursachen für ungewollte Kinderlosigkeit liegen zu 45% bei der Frau, zu 40% beim Mann und in 15% der Fälle lassen sich keine Ursachen eruieren. Bei 35% der Paare sind Ursachen bei beiden Partnern zu finden (Schultze-Mosgau et al., 2007).

### 1.2.5 Ursachen der weiblichen Sterilität

Die Ursachen der weiblichen Sterilität lassen sich in endokrine, organische und immunologische Störungen unterteilen. Zusätzlich spielt die psychogene Sterilität eine Rolle.

Die endokrinen Störungen machen 40% der Ursachen für die weibliche Sterilität aus. Meist liegt eine Störung auf der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (s. Kapitel 1.3.1) zu Grunde (Schultze-Mosgau et al., 2007). Als organische Störungen können anatomische Fehlbildungen, abgelaufene Entzündungen oder Verletzungen von Zervix, Uterus oder den Tuben zu einem unerfüllten Kinderwunsch führen (Schultze-Mosgau et al., 2007). Eine immunologische Ursache der Sterilität sind Spermienantikörper vom Typ IgA im Zervixmucus (Schultze-Mosgau et al., 2007). Die Endometriose kann über immunologisch-hormonelle Störungen sowie über mechanische Behinderungen die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft negativ beeinflussen (Schultze-Mosgau et al., 2007).

### 1.2.6 Störungen der männlichen Fertilität

Die Ursachen der männlichen Subfertilität lassen sich in verschiedenen Ebenen einordnen. Ursachen für eine primäre Störung der testikulären Funktion sind eine angeborene Anorchie oder eine Anorchie nach Trauma, Torsion, Tumor, Infektion oder Operation. Des Weiteren zählen dazu genetische Störungen, Varikozelen,

Lageanomalien des Hodens sowie Durchblutungsstörungen, Medikamente, Genussgifte, Intoxikationen, die primäre Leydig-Zellinsuffizienz und Stress (Keck et al., 1997; Schultze-Mosgau et al., 2007). Sekundäre Störungen sind sehr selten und lassen sich dann meist auf eine gestörte Hypothalamus - Hypophysen - Funktion zurückführen. Zu den extratestikulären Ursachen gehören Prostatitis, Transport- und Entleerungsstörungen oder Stenosen der ableitenden Samenwege, sowie Allgemeinerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Arteriosklerose (Stauber, 2005; Schultze-Mosgau et al., 2007).

### 1.3 Grundlagen Endokrinologie

Für eine erfolgreiche Reproduktion ist das komplexe Zusammenwirken verschiedener Organsysteme notwendig. Insbesondere sind an einer erfolgreichen Schwangerschaft der Hypothalamus, die Hypophyse, die Ovarien und der Uterus beteiligt. Das Zusammenspiel zwischen den Organsystemen wird über eine hormonelle Steuerung koordiniert (Hornung und Kiesel, 2006). Dieses wird in den folgenden zwei Kapiteln erläutert.

#### 1.3.1 Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Im Folgenden wird zunächst das Zusammenwirken von Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden beschrieben, bevor die Funktion der einzelnen Hormone näher betrachtet wird.

Der Hypothalamus sezerniert das Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) und stimuliert damit die Hypophyse zur Synthese und Sekretion der Gonadotropine FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon). Die Gonadotropine beeinflussen ihrerseits die Gonaden. Die Ovarien reagieren auf die Stimulation durch die Gonadotropine mit der Bildung der Steroidhormone Östrogen und Progesteron, welche über einen Feedbackmechanismus wiederum Einfluss auf die Hormonsekretion im Hypothalamus und in der Hypophyse nehmen können. Es besteht somit ein über Feedbackschleifen sich selbst regulierender Kreislauf (Teschner und Hinrichsen, 2005).

GnRH wird pulsatil alle 60 bis 120 Minuten sezerniert und gelangt über das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem zur Hypophyse. Kommt es statt der pulsatilen Sekretion von GnRH zu einer kontinuierlichen Freisetzung, werden die Gonadotropine zuerst vermehrt ausgeschüttet, bevor es zu einem Sekretionsabfall kommt, welcher eine ausbleibende ovarielle Hormonproduktion zur Folge hat. Dieser Mechanismus ist therapeutisch nutzbar (Teschner und Hinrichsen, 2005).

Die Funktion des FSH besteht darin, das Wachstum der Follikel zu fördern und die Granulosazellen der Follikel zur Produktion von Östrogen aus Androgenen zu stimulieren. Zusammen mit LH steuert es zudem die Eizellreifung vom Primärfollikel bis zum Tertiärfollikel. In den Thekazellen der Follikel unterstützt LH die Bildung von Androgenen für die Östrogensynthese (Felberbaum et al., 2007). LH stimuliert zudem die Progesteronproduktion im Tertiärfollikel und im Corpus luteum. Die LH-Konzentration steigt mittzyklisch bis auf das zehnfache an. 10 bis 12 Stunden nach diesem so genannten LH-Peak erfolgt die Ovulation (Teschner und Hinrichsen, 2005).

Östrogen und Progesteron sind Steroidhormone. Es gibt verschiedene natürliche Formen von Östrogenen. Das Östradiol ( $E_2$ ) ist davon die biologisch aktivste Substanz. Es sorgt für die Reifung der weiblichen Geschlechtsorgane und die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Am Uterus bewirkt es die Proliferation einer neuen Schleimhaut. Progesteron, das Gelbkörperhormon, sorgt hingegen für die sekretorische Umwandlung des Endometriums des Uterus. Des Weiteren bedingt es den postovulatorischen Verschluss des Muttermundes und die Abnahme der Menge und Spinnbarkeit des Zervixschleimes (Teschner und Hinrichsen, 2005).

### *1.3.2 Der weibliche Zyklus*

Der Zyklus der Frau lässt sich in verschiedene Phasen gliedern. Am 1. Zyklustag setzt die Menstruationsblutung ein. Gleichzeitig beginnt die Follikelphase, die zwischen 7 und 21 Tagen andauert, im Mittel etwa 14 Tage. In dieser proliferativen Phase wird die Uterusschleimhaut aufgebaut. Im Ovar wachsen unter dem Einfluss von FSH die Follikel heran. Einer dieser Follikel wird dominant und bildet vermehrt Östrogene. Besonders am 12. und 13. Tag steigt die

Östrogenproduktion an und löst damit den LH-Peak aus, auf den die Ovulation folgt. Nach der Ovulation bildet sich zuerst aus Restbestandteilen des Follikels das Corpus rubrum, aus welchem sich unter LH-Einfluss das Corpus luteum, der Gelbkörper, entwickelt. Dementsprechend wird die Zeit vom 14. bis zum 28. Tag als Lutealphase bezeichnet. Wenn diese verkürzt ist, ist davon auszugehen, dass keine Ovulation stattgefunden hat. Im Uterus kommt es während der Lutealphase durch die Sekretion der Drüsen des Endometriums zur Vorbereitung auf die Nidation. Im Falle einer ausbleibenden Befruchtung bewirken Progesteron und Östrogen in der Lutealphase eine Hemmung der GnRH-Ausschüttung und führen damit die Rückbildung des Corpus luteums herbei (Silbernagl und Despopoulos, 2003).

#### *1.4 Die extra-korporale Befruchtung*

Nach Scheitern von medikamentösen und chirurgischen Behandlungsversuchen zur Behebung von Sterilitätsursachen, ist die extra-korporale Befruchtung der nächste Schritt in der Kinderwunschbehandlung. Die Befruchtung der Eizelle findet in diesem Fall außerhalb des weiblichen Körpers statt.

Die künstliche Befruchtung unterliegt in Deutschland dem Embryonenschutzgesetz. Dieses Gesetz sowie die beiden am häufigsten durchgeführten Verfahren der künstlichen Befruchtung, In-Vitro-Fertilisation (IVF) und Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI), sollen in diesem Kapitel erläutert werden.

##### *1.4.1 Embryonenschutzgesetz*

In Deutschland wird die Reproduktionsmedizin sowohl in der Forschung als auch bei der Behandlung von Patienten durch das Embryonenschutzgesetz (ESchG) geregelt. Dieses durch den Deutschen Bundestag verabschiedete Gesetz trat am 1.1.1991 in Kraft.

Laut Gesetzestext gilt die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an als Embryo, sowie jede vom Embryo entnommene totipotente Zelle (§8 (1)). Für das Durchführen einer künstlichen

Befruchtung wird im Gesetzestext festgelegt, dass innerhalb eines Zyklus nicht mehr als drei Embryonen auf eine Frau übertragen werden dürfen (§1 (1) 3.) und dass nicht mehr Eizellen befruchtet werden dürfen als innerhalb eines Zyklus transferiert werden sollen (§1 (1) 5.). Für Zuwiderhandlungen gegen diese Regeln sind Gefängnisstrafen vorgesehen (Bundesgesetzblatt I, 1990).

#### 1.4.2 In-Vitro-Fertilisation – Extra-korporale Reagenzglasbefruchtung

Bei der In-vitro-Fertilisation (IVF) werden aus den sprungreifen Follikeln ultraschallgesteuert Eizellen punktiert. Diese werden im Labor mit Spermatozoen zusammengebracht und später in den Uterus transferiert. Dieses Verfahren wurde erstmals im Jahr 1978 von Steptoe und Edwards publiziert. Das methodische Vorgehen kann in vier Phasen eingeteilt werden. Zuerst erfolgt die ovarielle Stimulation, dann die Follikelpunktion, die In-vitro-Kultivierung und zuletzt der Embryo-Transfer.

Vor der Punktion wird das Ovar stimuliert, um die Möglichkeit zu erhöhen, gleichzeitig mehrere Eizellen punktieren zu können. Verschiedene Protokolle liegen für die Durchführung der Stimulation vor. Beispielsweise kann mit GnRH-Agonisten die Funktion der Hypophyse eingestellt werden, so dass eine vorzeitige Ovulation verhindert wird. Das Follikelwachstum kann künstlich durch humanes menopausales Gonadotropin (HMG) oder FSH stimuliert und gleichzeitig zeitlich synchronisiert werden. Der weitere Verlauf der IVF wird dadurch genauer planbar. Wenn die Follikel eine bestimmte Größe erreicht haben, wird durch Gabe von  $\beta$ -HCG (humanes Choriongonadotropin) die Ovulation ausgelöst. Daraufhin wird ultraschallgesteuert transvaginal das Ovar punktiert und der Inhalt mehrerer Follikel abgesaugt. Die extrahierten Eizellen werden in Kulturschalen mit speziellem Medium inkubiert. Aufbereitete Spermien werden nach 3 bis 6 Stunden Inkubationszeit zu den Eizellen gegeben. Nach 16 bis 20 Stunden werden mit Hilfe des Mikroskops Eizellen im Vorkernstadium identifiziert. Drei davon werden zu Embryonen weiterentwickelt und nach 40 bis 48 Stunden im 4- bis 8-Zellstadium in die Gebärmutter transferiert. Alle weiteren Eizellen können im Vorkernstadium kryokonserviert werden. Die Embryonen werden unter sterilen Bedingungen mit

einem dünnen Katheter ins cavum uteri eingebracht. Zur Unterstützung der Gelbkörperphase erhält die Patientin Progesteron oder  $\beta$ -HCG (Stauber, 2005).

#### *1.4.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion*

Liegt die Sterilitätsursache an der Spermienqualität oder der Spermienanzahl des Mannes, so führt die IVF-Behandlung oft nicht zum gewünschten Erfolg. 1992 wurde von einer belgischen Arbeitsgruppe daher ein Verfahren entwickelt, das eine erfolgreiche extra-korporale Befruchtung bei männlicher Subfertilität ermöglicht, die sogenannte Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) (Palermo et al., 1992). Das Verfahren beruht darauf, dass ein Spermium direkt in eine Eizelle injiziert wird, ohne diese dabei zu schädigen. Daraus ergeben sich zwei Vorteile. Zum einen werden nicht wie bei der IVF mehrere hunderttausend Spermatozoen benötigt, sondern ein einziges vitales Spermatozoon reicht zur Befruchtung aus. Zum anderen wird die Barriere des Eindringens des Spermiums in das Zytoplasma entfernt, die bei schlechter Spermienqualität die Ursache für das letztliche Scheitern der Befruchtung darstellen kann. Bei der ICSI wird ein Spermium direkt in das Ooplasma der Eizelle eingebracht. Hierzu wird eine Eizelle gewählt, deren Polkörper sichtbar sind, und die Samenfäden werden mit einer feinen Glaspipette direkt in das Ooplasma injiziert. Die Vorbehandlung der Patientin ist identisch zur Phase 1 der IVF-Methode (Stauber, 2005). Für die Befruchtung können auch epididymale, testikuläre oder kryokonservierte Spermien verwendet werden (Ludwig und Diedrich, 2003).

#### *1.5 Kryo-Zyklen*

Schon wenige Jahre nach der Geburt von Louise Brown, des ersten mit Hilfe der IVF-Methode geborenen Menschen, berichteten Trounson und Mohr (1983) von der Geburt eines Kindes nach Kryokonservierung (Gefrierlagerung) von menschlichen Präimplantationsembryonen. Die Autoren hatten die im Rahmen einer IVF-Behandlung in Überzahl entstandenen Embryonen einer Patientin kryokonserviert (gefrierengelagert), in einem späteren Zyklus aufgetaut und in den Uterus transferiert. Dieses Verfahren bot eine Lösung für das Problem, dass bei

der IVF zumeist mehr Embryonen entstehen als im Laufe eines Zyklus transferiert werden sollen. Überzählige Embryonen können für den späteren Transfer in die Gebärmutter gefriergelagert werden. Zum einen kann durch die Kryokonservierung die Effektivität eines IVF-Behandlungszyklus erhöht werden, indem das Schwangerschaftspotential überzähliger Embryonen genutzt wird. Zum anderen kann durch dieses Vorgehen das Risiko von Mehrlingsschwangerschaften, die im Gefolge eines einzeitigen Transfers mehrerer Embryonen nach IVF entstehen, reduziert werden. Diese Reduktion von Mehrlingsschwangerschaften ist eines der wichtigsten Anliegen der modernen Reproduktionsmedizin (Cohen et al., 1998). Eine Mehrlingsschwangerschaft stellt sowohl für die Mutter, als auch für die Kinder eine Gefährdung dar (Ludwig et al., 2004). Um die Mehrlingsschwangerschaft gänzlich zu vermeiden, wäre der Transfer nur eines Embryos pro Zyklus (single embryo transfer, SET) wünschenswert, wie es in den nordeuropäischen Ländern zum großen Teil schon üblich ist (Griesinger, 2008). Dies hat zwar für den einzelnen Transfer eine verringerte Lebendgeburtrate zur Folge, wenn man aber zwei SETs mit einem Doppel-Embryonen-Transfer vergleicht, ist die Lebendgeburtrate beim SET nur geringfügig geringer und muss gegen die Vorteile von Einzelschwangerschaften gegenüber Mehrlingsschwangerschaften abgewogen werden (Thurin et al., 2004).

### *1.5.1 Kryo-Zyklen in Deutschland*

Die Regelungen des ESchG führen dazu, dass in Deutschland Eizellen, welche sich im Befruchtungsvorgang befinden, aber noch keine Embryonen im Sinne des ESchG sind (2 PN Eizellen), für eine Kryokonservierung verwendet werden. Im Vorkernstadium ist die Eizelle imprägniert und im Befruchtungsvorgang, die Kernverschmelzung (Syngamie) hat jedoch noch nicht stattgefunden. In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass das Entwicklungspotential von Vorkernstadien nach einer Kryokonservierung höher ist als das Potential von Embryonen im frühen Teilungsstadium nach einer Kryokonservierung (Demoulin et al., 1991; Horne et al., 1997; Senn et al., 2000).

Im Vorkernstadium ist eine Auswahl der Oozyten, welche kultiviert und im selben Zyklus transferiert werden sollen, gesetzlich zulässig. Es darf jedoch nicht, wie in

anderen Ländern üblich, eine weitere Auswahl in einem späteren Stadium erfolgen (Steck, 2001), da in diesem Fall Embryonen im Sinne des ESchG ggfs. verworfen oder kryokonserviert werden müssten. Die Auswahl von Eizellen im Vorkernstadium ist eine sehr ungenaue Methode, um jene Keimzellen zu identifizieren, die mit größter Wahrscheinlichkeit zu einer Schwangerschaft führen. Unterschiede im Entwicklungspotential sind zu späteren Stadien der Präimplantationsentwicklung deutlich besser erkennbar. Eine Folge der fehlenden Auswahlmöglichkeiten in fortgeschritteneren Stadien der Entwicklung ist eine geringere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Embryonentransfer in Deutschland im Vergleich zu anderen Ländern. 2005 lag die klinische Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Embryo-Transfer in Deutschland bei 36,77% für IVF und bei 33,57% für ICSI bei Frauen unter 31 Jahren (Deutsches IVF-Register, 2005). In Amerika hingegen lag die Geburtenrate pro Transfer bei Frauen unter 35 Jahren bei 43,2% für IVF (Society for Assisted Reproductive Technology (SART), 2005).

Andererseits führt die fehlende Auswahl aber dazu, dass kryokonservierte Eizellen und frisch zurück gesetzte Eizellen sich nur geringgradig im Entwicklungspotential unterscheiden dürften, unter der Voraussetzung, dass die Gefrierlagerung keine Schädigung verursacht. Durch die Hinzunahme der kryokonservierten Eizellen kann die totale Schwangerschaftswahrscheinlichkeit von 28% auf 35,5% pro Behandlungszyklus mit Eizellentnahme angehoben („kumuliert“) werden (Schröder et al., 2002).

### 1.5.2 Kryo-Embryonen-Transfer

Der Kryo-Embryonen-Transfer kann im Spontanzzyklus, im stimulierten oder artifiziellen Zyklus vorgenommen werden. Voraussetzung für einen Transfer im Spontanzzyklus ist ein ovulatorischer und regelmäßiger Zyklus. Beim Transfer im Spontanzzyklus wird im Rahmen einer Zyklusuntersuchung der LH-Wert erfasst. Zwei Tage nach dem LH-Peak (häufig definiert als LH > 20 mIU/ml) werden die Vorkernstadien aufgetaut und am folgenden Tag transferiert. Die Lutealphase kann anschließend bei Bedarf mit exogenem Progesteron unterstützt werden. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in einer weitgehenden Vermeidung einer

Hormongabe, und damit einem Eingriff in das weibliche Zyklusgeschehen. Ein Nachteil des Transfers im natürlichen Zyklus ist die zeitliche Ungenauigkeit des Transfers, die zu einer hohen Abbruchrate führt (Steck, 2001).

Beim Kryo-Embryonen-Transfer im stimulierten Zyklus wird durch Stimulation der Eisprung herbeigeführt, bzw. das Endometrium auf den Transfer vorbereitet. Als Stimulanzen kommen Clomiphenzitrat oder Gonadotropine in Frage. Wenn die Follikel eine ausreichende Größe erreicht haben und das Endometrium dick genug ist, wird mit Hilfe von humanem Choriongonadotropin (HCG) die Ovulation ausgelöst. Zwei Tage nach der HCG-Gabe werden die Vorkernstadien aufgetaut. Auch bei diesem Vorgehen kann die Lutealphase mit exogenem Progesteron unterstützt werden. Der Transfer im stimulierten Zyklus kommt vorwiegend zur Anwendung bei Patientinnen mit Anovulation. Bei ovulatorischen Patientinnen liegt ein Vorteil dieser Methode in der guten proliferativen Vorbereitung des Endometriums (Steck, 2001). Risiken dieses Verfahrens sind die Gefahr eines Überstimulationssyndroms sowie die finanzielle Belastung durch die Notwendigkeit teurer Medikamente (Sathanandan et al., 1991).

Der artifizielle Zyklus kann bei Patientinnen mit regelmäßigem, unregelmäßigem oder anovulatorischem Zyklusgeschehen angewendet werden (Muasher et al., 1991). Bei dieser Methode wird das Endometrium durch exogene Gabe von transdermalem oder oralem Östradiol proliferiert. Östradiol verhindert über einen negativen Feedbackmechanismus die FSH-Sekretion aus der Hypophyse (s. Kapitel I.3.1), so dass die Follikelreifung und damit eine Ovulation in den Ovarien unterbunden wird. Am 14. Zyklustag werden eine Laborkontrolle sowie eine sonographische Untersuchung durchgeführt, die das Ausbleiben der Ovulation bestätigen soll. Fällt diese Untersuchung tatsächlich negativ aus, wird am folgenden Tag mit der Gabe von oralem oder vaginalem Progesteron zur sekretorischen Transformation des Endometriums begonnen. Am 17. Zyklustag folgt der eigentliche Kryo-Embryonen-Transfer. Östradiol und Progesteron werden mindestens bis zum 29. Tag appliziert, bei Eintreten einer Schwangerschaft wird die Gabe um weitere 8 Wochen verlängert. Der Nachteil dieser medikamentös aufwendigen und langzeitigen Behandlung ist natürlich der hohe Kostenfaktor. Allerdings steht dieser ökonomische Nachteil einer Vielzahl medizinischer Vorteile

gegenüber. So kann der Transfer beispielsweise zeitlich gut geplant werden. Es müssen zudem keine aufwendigen, sequentiellen Zyklusuntersuchungen stattfinden und die Behandlung ist durch die transdermale oder orale Applikationsform gut tolerabel (Hoepfner et al., 2000). Im Vergleich zum Embryonen-Transfer in stimulierten Zyklen ist auch die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in künstlichen Zyklen höher (Hoepfner et al., 2000). Eine Variante des Verfahrens des Embryonen-Transfers im artifiziellen Zyklus besteht darin, vor Beginn der Östradiolsubstitution die Hypophyse durch ein GnRH-Analogon zu supprimieren. Durch diese Maßnahme sinkt die Wahrscheinlichkeit einer unerwünschten spontanen Ovulation trotz exogener Östradiolgabe weiter. Allerdings steigen dadurch die Behandlungskosten weiter an und verschiedene Studien zeigen, dass sich die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten in künstlichen Zyklen mit und ohne vorherige Unterdrückung der Hypophysenaktivität nicht signifikant unterscheiden (Simon et al., 1998; Dal Prato et al., 2002).

### 1.5.3 Vorgehen bei Kryo-Embryonen-Transferzyklen am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

In der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UK-SH) – Campus Lübeck werden seit 1999 alle Kryo-Embryonen-Transfers in einem artifiziellen Zyklus ohne Suppression der Hypophyse durchgeführt (Bals-Pratsch et al., 1999). Die Untersuchung am 14. Tag umfasst die sonographische Bestimmung der Endometriumhöhe, sowie die Messung der Serumkonzentrationen von LH, E<sub>2</sub> und Progesteron. Das Endometrium muss ausreichend hoch ausgebildet sein, damit eine Nidation stattfinden kann, wobei in der Literatur umstritten ist, welcher Schwellenwert hier ausschlaggebend ist. Ein Serum-Progesteron-Wert im Referenzbereich für die Follikelphase bestätigt das Ausbleiben der Ovulation, der Serum-Östradiol-Wert ist Ausdruck der verabreichten Östrogendosis. Aufgrund einer positiven Rückkoppelungswirkung des Serum-Östradiols auf die Hypophyse werden zum Teil sehr hohe Serum-LH-Spiegel am 14. Tag eines artifiziellen Zyklus beobachtet.

## 1.6 Die Bedeutung des LH

De Ziegler schrieb 1991 in einer Veröffentlichung, dass der mittzyklische LH-Anstieg bei Zyklen ohne vorherige Suppression der Hypophyse und Vorbereitung des Endometriums mit Östrogen keinen Einfluss auf die Rezeptivität des Endometriums nehmen könne, da diese ausschließlich von der Wirkung des Progesterons abhängig sei (de Ziegler et al., 1991). Allerdings stellten verschiedene Forschergruppen fest, dass sich im menschlichen Endometrium LH-Rezeptoren befinden (Reshef et al., 1990, Ziecik et al., 1992), so dass neben der indirekten Wirkung des LH über die Steroidhormone entgegen de Zieglers Auffassung auch ein direkter Effekt von LH auf das Endometrium denkbar ist. Diese Vermutung wurde durch die Arbeitsgruppe um Rao bestätigt, die mit LH-Rezeptor-Knockout-Mäusen die Funktionen des luteinisierenden Hormons untersuchten. LH sollte aufgrund dieser Erkenntnisse nicht länger ausschließlich als regulierendes Hormon der Gonaden betrachtet werden (Rao et al., 2001). Sollte LH direkt auf das Endometrium wirken, so könnte es auf diesem Wege auch die Rezeptivität des Endometriums beeinflussen und als ein weiterer Faktor die Implantations- bzw. Schwangerschaftswahrscheinlichkeit beeinflussen. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit dieser Hypothese.

Tesarik (2003) verglich in einer Interventionsstudie Implantationsraten von Zyklen mit und ohne vorherige Hypophysensuppression und applizierte jeweils der Hälfte einer Patientengruppe in der Mitte des Zyklus HCG. Dieses bindet genau wie LH am LH-Rezeptor, allerdings mit einer höheren Affinität (Huhtaniemi und Catt, 1981), und kann deshalb die Wirkung von LH imitieren. Das Ergebnis der Studie war, dass sich die Implantationsraten in der Subgruppe mit supprimierter Hypophyse signifikant unterschieden, je nachdem ob zusätzlich HCG gegeben wurde oder nicht. Bei den Patientinnen, die also keinen physiologischen mittzyklischen LH-Anstieg hatten, aber in der Mitte des Zyklus HCG erhielten, konnte die Implantationsrate signifikant erhöht werden gegenüber Patientinnen ohne HCG-Gabe. Das Besetzen des LH-Rezeptors hatte demzufolge eine positive Wirkung auf die Implantationsrate. Bei Patientinnen, die ausschließlich mit

Steroidhormonen auf den Transfer vorbereitet wurden, konnte HCG keinen Unterschied bewirken. Die Rezeptoren waren in diesem Fall vermutlich schon durch LH besetzt.

El-Toukhy stellte eine signifikante Verbesserung der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit nach Suppression der Hypophyse im Vergleich eines ausschließlich durch Gabe von Steroidhormonen vorbereiteten Endometriums fest (El-Toukhy et al., 2004). Der Autor hält es für möglich, dass ungeplante LH-Anstiege bei fehlender Unterdrückung der Hypophyse das Zeitfenster der Implantation ungünstig beeinflussen. Ein Einfluss von LH auf das Endometrium und damit eine Auswirkung auf die Implantations- und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit scheint auf Grund dieser Studien denkbar.

Kolibianakis und Kollegen (2006) verglichen systematisch sechs Studien, die sich mit der Frage beschäftigten, ob der endogene LH-Wert einen Einfluss auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in stimulierten IVF-Zyklen mit Verwendung eines GnRH-Analogons zur Supprimierung der Hypophyse hat. In vier retrospektiven Studien konnte kein Zusammenhang gefunden werden. In zwei prospektiven Studien waren hohe endogene LH-Werte mit niedriger Schwangerschaftswahrscheinlichkeit assoziiert. Die Rolle von endogenem LH als prognostischem Faktor ist auf Grund dieser Datenlage also weiterhin auch im stimulierten Zyklus unklar.

Es gibt bislang keine Untersuchungen dazu, ob Patientinnen mit besonders hohen oder niedrigen LH-Werten eine vom Mittelwert deutlich abweichende Schwangerschaftswahrscheinlichkeit zeigen. Dementsprechend kann dem LH-Wert bisher keine prädiktive Bedeutung beigemessen werden. Sollte jedoch gezeigt werden, dass relativ hohe oder niedrige LH-Werte mit einer geringeren Schwangerschaftswahrscheinlichkeit assoziiert sind, so könnte bei bestimmten Patientinnen durch Pharmakotherapie eine Normalisierung des LH-Wertes versucht werden, um die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit zu steigern. Darüber hinaus könnte der endogene LH-Wert auch dazu dienen, die individuelle Konzeptionswahrscheinlichkeit im jeweiligen Behandlungszyklus einzuschätzen.

### *1.6.1 Arbeitshypothese*

Aufgrund der oben angeführten Literatur wird in der vorliegenden Untersuchung ein Zusammenhang zwischen dem endogenen LH-Wert am 14. Zyklustag und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in einem künstlichen Kryo-Zyklus ohne Suppression der Hypophyse hypothetisiert.

## II Material und Methoden

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine klinische Kohortenstudie, die die Kriterien einer prospektiven Studie erfüllt. Es wurden die Daten aller Patientinnen in die Studie aufgenommen, welche im Zeitraum von Januar 1999 bis November 2005 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UK-SH), Campus Lübeck mit einem künstlichen Zyklus (Bals-Pratsch et al. 1999) auf den Embryonen-Transfer vorher kryokonservierter Vorkernstadien vorbereitet wurden. Die Daten wurden prospektiv erfasst und in einer Datenbank gespeichert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck geprüft und genehmigt (Aktenzeichen 06-062).

### *II.1 Endometriumvorbereitung*

Das Endometrium wird mit einem künstlichen Zyklus auf den Transfer von befruchteten Eizellen im Vorkernstadium vorbereitet, die zuvor kryokonserviert wurden. Dazu erhalten die Patientinnen eine sequentielle Östrogen-Gestagen-Behandlung mit einem transdermalen Östradiolpräparat und einem vaginalen Progesteron-Gel (Bals-Pratsch et al., 1999).

Am ersten Tag des Menstruationszyklus wird mit der Vorbereitung begonnen. Die Patientinnen erhalten ein Östradiolpflaster (Estraderm TTS 100<sup>®</sup>; Novartis, Wehr, Deutschland), welches jeden zweiten Abend durch ein Neues ersetzt wird. Am 7. Zyklustag wird die Dosis verdoppelt. Die Patientinnen erhalten nun im gleichen Zeitabstand jeweils die doppelte Menge an Pflastern. Am Abend des 11. und 13. Tages werden vier Pflaster appliziert. Am 14. Zyklustag werden per Ultraschall und Blutentnahme die Endometriumdicke sowie Hormonwerte von Östradiol (E<sub>2</sub>), luteinisierendem Hormon (LH) und Progesteron bestimmt. Die Pflaster werden weiterhin jeden zweiten Abend durch die Patientin selbstständig gewechselt. Zweimal werden jeweils drei und dann jeweils zwei Pflaster verwendet. Zusätzlich wird ab dem 15. Zyklustag mit der Progesteron-Substitution begonnen. Täglich

wird morgens das vaginale Progesterongel (Crinone 8%®; Wyeth, Münster, Deutschland) appliziert. Am 17. Zyklustag wird der Embryonentransfer durchgeführt und 12 Tage später, am 29. Tag, wird im Serum der HCG-Wert bestimmt. Für den Fall, dass eine Schwangerschaft (HCG>10IE/l) eintritt, wird die Behandlung mit Estraderm TTS 100® und Crinone® für weitere 8 Wochen fortgesetzt. Die Patientinnen erhalten ein genaues Protokoll zur selbstständigen Durchführung der Behandlung.

## *II.2 Kryokonservierung*

Die Kryokonservierung der Vorkernstadien wird im Reproduktionslabor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des UK-SH, Campus Lübeck, durchgeführt. In den Jahren 1999 bis 2005 wurde vorwiegend die Methode des Erlanger „offenen Gefriersystems“ (Al-Hasani et al. 1999) angewendet. Im letzten Jahr des Studienzeitraums wurde zusätzlich das Verfahren der Vitrifikation, welches erstmals von Rall und Fahy (1985) publiziert wurde, eingeführt. Die Vorgehensweise beider Methoden soll im Folgenden erläutert werden.

### *II.2.1 Erlanger „offenes Gefriersystem“*

Das Erlanger „offene Gefriersystem“ wurde zur Kryokonservierung angewendet wie beschrieben in der Publikation von Al Hasani et al. (1999).

Für das Einfrieren benötigt man zwei Einfriermedien. Diese basieren auf dem vom Hormonlabor selbst angesetzten Kulturmedium HAM-F-10 (Biochrom Company, Berlin, Deutschland) zusammengesetzt mit 20% humanem Nabelschnurserum und 5% CO<sub>2</sub>. Für das Einfrier-Medium 1 wird zum Kulturmedium 1,2-Propandiol (1,5M) hinzugegeben. Für das Einfriermedium 2 wird zusätzlich zum Einfriermedium 1 Saccharose (0,2M) hinzugegeben. Die Eizellen im Vorkernstadium werden jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur zunächst in Medium 1 und anschließend in Medium 2 inkubiert. Im Anschluss werden sie in so genannte Kryo-Straws (CTE Company, Erlangen, Deutschland), gefüllt mit Medium 2, transferiert. Nach Abschluss dieser vorbereitenden Maßnahmen wird zur eigentlichen Kryokonservierung das Erlanger „offene Gefriersystem“ von CTE-

880 (Cryo-Technik, Erlangen, Deutschland) genutzt. Das Gerät kühlt die vorbereiteten Vorkernstadien in den Kryo-Straws langsam von Raumtemperatur auf  $-33^{\circ}\text{C}$  ab. Diese Temperatur wird für 30 Minuten beibehalten. Dann werden die Kryo-Straws mit den Eizellen direkt in flüssigen Stickstoff getaucht und dort aufbewahrt.

Zum Auftauen werden die Kryo-Straws im Wasserbad bei  $30^{\circ}\text{C}$  etwa eine Minute lang vorgetaut. Anschließend werden sie für jeweils 5 Minuten in 3 verschiedenen Auftau-Medien bei Raumtemperatur inkubiert. Das erste Medium besteht aus 1,0M Propandiol und 0,2M Saccharose, das zweite aus 0,5M Propandiol und 0,2M Saccharose und das dritte aus 0,2M Saccharose. Nach Abschluss dieser drei Inkubationschritte werden die Eizellen im Kulturmedium gut gespült und über Nacht kultiviert (Al-Hasani et al., 1999).

### II.2.2 Vitrifikation von Eizellen im Vorkernstadium

Maximal 10 Eizellen im Vorkernstadium werden in Equilibration Solution (ES) für 5 bis 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die ES besteht aus 0,375ml Ethylenglycol (7,5%) und 0,375ml Dimethylsulfoxide (DMSO) (7,5%) und wird mit Kulturmedium auf 5ml aufgefüllt. Dabei schrumpfen die Zellen erst, bevor sie wieder an Volumen zunehmen. Sobald eine Zelle ihr ursprüngliches Volumen wieder erreicht hat, erfolgt für 45 bis 60 Sekunden bei Raumtemperatur eine Inkubation in Vitrification Solution (VS), bestehend aus 0,75ml Ethylenglycol (15%) und 0,75ml DMSO (15%) in Kulturmedium auf 5ml gesamt, sowie 0,856g Saccharose (0,5M) in Kulturmedium auf 5ml. Im Anschluss daran werden mit einer englumigen Pasteurpipette maximal drei der Eizellen auf ein Cryotop gegeben und das überschüssige Nährmedium wird abgesaugt. Daraufhin wird das Cryotop mit den Eizellen in flüssigen Stickstoff getaucht und in Kunststoff-Schutzhüllen geschoben. Diese werden auf Spezialhängern in Stickstofftanks aufbewahrt.

Zum Auftauen nach Vitrifikation wird noch im flüssigen Stickstoff die Schutzhülle vom Cryotop entfernt. Das Cryotop mit den Eizellen wird in die  $37^{\circ}\text{C}$  warme Thawing Solution, bestehend aus 1,712g Saccharose (1M) in 5ml Kulturmedium getaucht. Eine Minute lang werden die Eizellen so inkubiert und die Abnahme ihres Volumens wird dabei mit dem Stereomikroskop überwacht. Für 3 Minuten

werden sie anschließend bei Raumtemperatur in Diluent Solution (0,5M Saccharose) inkubiert, wobei die Zellen erst an Volumen zu- und dann wieder abnehmen. Zum Schluss werden sie jeweils für fünf Minuten in zwei verschiedenen Kulturmedien gespült.

### *II.3 Hormonwertbestimmung*

Die Serumspiegel von E<sub>2</sub>, LH und Progesteron wurden mit dem ElektroChemilumineszenz ImmunoAssay „ECLIA“ (Roche Diagnostics Inc., Germany) an dem Roche Immunoassay Analysenautomaten „Elecsys 2010“ im Labor der Klinik für Frauenheilkunde des UK-SH, Campus Lübeck, bestimmt. Das Gerät wurde während der gesamten Zeit der Studie in festgelegten regelmäßigen Abständen auf Messgenauigkeit überprüft. Die intra-assay und inter-assay Koeffizienten der Variation waren kleiner 2% und kleiner 7% für E<sub>2</sub>, kleiner 2,5% und kleiner 5% für LH und kleiner 2,5% und kleiner 5% für Progesteron.

### *II.4 Datenerhebung*

Die IVF-Patientendaten des UK-SH, Campus Lübeck, wurden in RecDate<sup>®</sup> gespeichert. Dies ist eine relationale Datenbank auf der Basis von Filemaker Pro<sup>®</sup>, in der alle Daten für die Behandlung von Infertilität erfasst werden können. Um bestimmten Fragestellungen nachgehen zu können, bietet das RecDate<sup>®</sup> die Möglichkeit, über mathematische oder logische Operatoren Suchkriterien zu definieren (Pak et al. 2001). So wurde für die vorliegende Studie die Datenbank mit den Suchkriterien „Kryo-Zyklus“ und „Datum ET > 1.1.1999“ durchsucht. Diese zwei Kriterien wurden von 859 Zyklen erfüllt. Von diesen wurden daraufhin alle gewünschten Daten aus den Hauptmasken „Anamnese“ und „IVF“ in eine Excel-Tabelle (Microsoft Office Excel 2003) exportiert.

Aus der Maske „Anamnese“ stammen folgende Angaben zur Patientin:

- Patienten ID
- Gewicht

- Größe
- BMI
- Dauer des ungeschützten Geschlechtsverkehrs des Paares
- frühere Schwangerschaften (Gravida)
- frühere Geburten (Para)

Aus der Maske „IVF“ wurden zusätzlich noch folgende Angaben entnommen:

- Zyklus ID
- Zyklus total: die gesamte Anzahl der Zyklen mit Embryonen-Transfer, die bei der Frau bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden
- Stimulation: ja/nein
- Alter der Frau
- Alter des Mannes
- Datum des Embryonen-Transfers
- Anzahl der transferierten Embryonen
- Embryonen IVF transferiert: Embryonen, die nach einer IVF kryokonserviert und nun zurückgesetzt wurden
- Embryonen ICSI transferiert: Embryonen, die nach einer ICSI kryokonserviert und nun zurückgesetzt wurden
- Embryo Score
- Zyklus Ausgang: Schwangerschaft ja/nein
- Schwangerschaft intrauterine Fruchthöhle: Embryo mit dem Ultraschall im Uterus sichtbar ja/nein
- Sonographische Herzaktivität des Kindes
- Schwangerschaftsverlauf: 10. bis 12. Woche Schwangerschaft ja/nein

Die Excel-Tabelle wurde durch folgende Spalten ergänzt:

- biochemische Schwangerschaft (HCG >10IE/l)
- klinische Schwangerschaft
- Geburt
- Schwangerschaftswoche (SSW) bei Geburt
- Geburtsgewicht
- Entbindungsart
- Abort
- SSW bei Abort
- Endometriumdicke am 14. Tag
- LH am 14. Tag
- E<sub>2</sub> am 14. Tag
- Progesteron am 14. Tag

Diese zuletzt aufgeführten Angaben wurden entweder aus der „IVF“-Maske des RecDates<sup>®</sup>, aus der Patientenakte oder den ursprünglich ausgefüllten Hormontabellen, welche im Hormonlabor archiviert werden, entnommen. Eine Problematik beim Transfer der Daten vom RecDate<sup>®</sup> in die Excel-Tabelle ergab sich dadurch, dass bei Patientinnen, die sich mehrfach einer Behandlung unterzogen hatten, jeweils die Angaben der Anamnese-Maske übertragen wurden, welche bei der Erstvorstellung ausgefüllt worden war, auch wenn zu jedem Zyklus passende aktuelle Daten vorlagen. Deshalb wurden die betroffenen Parameter mit Hilfe der passenden Maske geprüft und wenn nötig, manuell korrigiert. Fehlende Werte wurden mit Hilfe der Patientenakten vervollständigt.

### *II.5 Erstellung zweier Datensätze*

Für die Auswertung wurde primär der jeweils erste Kryo-Embryonen-Transfer-Zyklus pro Patientin (n=565 Patientinnen, bzw. erste Kryo-Zyklen) vorgesehen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden aber darüber hinausgehend auch alle erfassten Kryo-Embryonen-Transfer-Zyklen, das heißt auch mehrere Zyklen einer Patientin, in einem zweiten Datensatz erfasst (n=859 Zyklen).

Wegen teilweise fehlender Variablen mussten 30 Patientinnen aus dem 1. Datensatz und 37 Zyklen von 30 Patientinnen aus dem 2. Datensatz entfernt werden. Bei 34 Zyklen fehlten die Angaben zum LH-Wert, bei einem Zyklus die Information über den Zyklusausgang und in zwei Fällen war der Zyklus fälschlicherweise als Kryo-Zyklus in der Patientendatenbank verzeichnet. Des Weiteren wurden 25 Zyklen von 22 Patientinnen entfernt, da deren Vorkernstadien mit der Methode der Vitrifikation kryokonserviert wurden und die vorliegende Studie sich auf Kryokonservierung durch das Erlanger „offene Gefriersystem“ beschränkt.

Die Umstellung des Protokolls der Kryokonservierung im Verlauf der Studie auf die neue Methode der Vitrifikation beruht laut Aussage von Prof. Al-Hasani, Leiter des Labors, in erster Linie darauf, dass nach Einsatz der Vitrifikation bessere Ergebnisse beobachtet wurden als nach dem Erlanger offenen Gefriersystem. Es liegt derzeit jedoch noch keine veröffentlichte prospektive randomisierte Studie vor, die die beiden Methoden vergleicht und diesen Eindruck bestätigt. Um eine größtmögliche Homogenität der Daten zu erreichen, wurde post-hoc beschlossen, Zyklen mit Vitrifikation von der Auswertung auszuschließen. Es wurden jeweils nur die Daten von Zyklen erfasst, in denen es auch zum Embryonen-Transfer kam. Unter Aussparung der genannten Zyklen ergibt sich eine Datenbasis von 513 ersten Zyklen und einer Gesamtmenge von 797 Zyklen der 513 Patientinnen. Die vollständige Excel-Tabelle (Microsoft Office Excel 2003) wurde in SPSS (SPSS Version 13) übertragen und mit diesem Programm ausgewertet.

## *II.6 Datenanalyse und Statistik*

Der Zusammenhang zwischen dem Erreichen der klinischen Schwangerschaft und dem LH-Serumspiegel am 14. Zyklustag wurde mit einer robusten logistischen Regression untersucht und zwar anhand des Datensatzes der ersten Kryo-Zyklen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test, einem nichtparametrischen Test für zwei unabhängige Stichproben, wurden die unabhängigen Variablen herausgefunden, die in das Regressions-Modell aufgenommen werden konnten. Außerdem wurden die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten dreier Gruppen mit dem Chi-Quadrat-

Test verglichen, welche zuvor mit der Tukey-Hinges Perzentil-Analyse der LH-Werte am 14. Tag eines Kryo-Zyklus definiert wurden. Gruppe 1 enthielt alle Zyklen mit LH-Werten bis zur 25. Perzentile, Gruppe 2 die von der 25. bis zur 75. Perzentile und Gruppe 3 die Zyklen mit LH-Werten ab der 75. Perzentile.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests mit Lilliefors Korrektur wurden Variablen auf das Vorliegen von Normalverteilung geprüft. Normalverteilte metrische Variablen wurden mittels univariater Varianzanalysen verglichen, während nicht normal verteilte metrische Variablen mit dem Kruskal-Wallis-Test ausgewertet wurden. Korrelationen von LH mit Gewicht, BMI, Endometriumdicke, E<sub>2</sub> und Progesteron wurden durch die Pearson Korrelation untersucht.

### *II.7 Fallzahlüberlegung*

Für Kryo-Zyklen waren keine Daten zur Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des LH-Wertes in der Literatur vorhanden, um die nötige Datengröße für die vorliegende Studie genau zu bestimmen. Die Fallzahlkalkulation wurde deshalb basierend auf der Vermutung durchgeführt, dass Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten in der mittleren LH-Gruppe höher (20%) und in der niedrigen und hohen LH-Gruppe niedriger (10%) sind. Eine Datengröße von 506 Patienten würde ausreichen, um mit 80% Wahrscheinlichkeit eine Effektstärke in der vermuteten Höhe (W-Wert des Chi-Quadrat-Test 0,138) mit einem Alphafehler von 5% nachzuweisen.

### *II.8 Ergebnisdefinitionen*

#### Klinische Schwangerschaft

In dieser Studie wird eine klinische Schwangerschaft als positiv bewertet, wenn in der vierten bis fünften Woche nach dem Embryonentransfer der fetale Herzschlag im Ultraschall sichtbar ist.

### Fortlaufende Schwangerschaft

Die Schwangerschaft gilt als fortlaufend, wenn sie in der 10. bis 12. Schwangerschaftswoche weiter sonographisch nachgewiesen werden kann.

### Embryo Score

Zur Beurteilung der Qualität von Embryonen wurde das Verfahren des kumulativen Embryo Scores (Steer et al., 1992) in einer Modifizierung von Ludwig et al., (2000) herangezogen. Bei dieser Einteilung wird jeder Embryo in die drei Qualitätsgrade 1: „unregelmäßig“, 2: „schön“ und 3: „ideal“ eingeordnet. Durch Multiplikation des Qualitätsgrades eines Embryos mit der Anzahl seiner Blastomeren erhält man den individuellen Score eines Embryos. Addiert man alle Embryo Scores der Embryonen, welche in einem Zyklus transferiert werden, erhält man den kumulativen Embryo Score.

## III Ergebnisse

Bei 513 Patientinnen wurden im Zeitraum von Januar 1999 bis November 2005 ein oder mehrere Kryo-Embryonen-Transfers durchgeführt. Die dazu nötigen kryokonservierten Eizellen im Vorkernstadium waren in 89,9% der Fälle im Rahmen einer früher durchgeführten ICSI gewonnen worden. Weniger als 2% aller Embryonen wurden später als 48 Stunden nach dem Auftauen transferiert. Alle Embryonen, die für einen Transfer verwendet wurden, kamen jeweils aus demselben frischen Zyklus.

### III.1 Demographische Daten

#### Alter der Frau

Das Alter der 513 Patientinnen liegt zwischen 19 und 45 Jahren, der Altersdurchschnitt bei 32,69 Jahren mit einer Standardabweichung (SD) von 4,5 Jahren. Der Median beträgt 33 Jahre.

#### Alter des Mannes

Die Altersspanne der Männer liegt zwischen 22 und 60 Jahren. Im Mittelwert beträgt das Alter der Männer 36,01 Jahre mit einer Standardabweichung von 6,3 Jahre, der Median liegt bei 35 Jahren.

#### Gewicht, Größe und Body-Mass-Index (BMI)

Das mittlere Gewicht der Frauen liegt bei 67,09 kg (Standardabweichung 12,7kg, Median 64kg). Das Gewicht der Frauen liegt zwischen 44kg und 122 kg. Die Körpergröße der Patientinnen umfasst Werte zwischen 1,48m und 1,87m. Mittelwert und Median betragen 1,68m bei einer Standardabweichung von 0,063m. Der kleinste gemessene BMI beträgt  $16,3\text{kg/m}^2$ , der größte  $44,2\text{kg/m}^2$ . Der Mittelwert liegt bei  $23,38\text{ kg/m}^2$  mit einer Standardabweichung von  $4,54\text{kg/m}^2$ . Der Median beträgt  $22,7\text{kg/m}^2$ .

### Vorherige Schwangerschaften

61,6% der Patientinnen waren vor der betrachteten Behandlung noch nie schwanger. 25,9% waren bereits einmal schwanger, 7,6% der Patientinnen schon zweimal. Drei, vier, fünf oder sechs Schwangerschaften waren bei 2,3%, 1,7%, 0,8% bzw. 0,2% der Frauen verzeichnet. Aus diesen Daten ergibt sich ein Mittelwert der Anzahl vorangegangener Schwangerschaften von 0,6.

### Vorherige Geburten

Der Großteil der Patientinnen (79,7%) ist zum Zeitpunkt der Studie noch kinderlos. 16,1% der Frauen haben bereits ein Kind und 2,6% der Frauen haben zwei Kinder geboren. Drei oder vier Kinder haben 0,9% bzw. 0,6% der Patientinnen. Der Mittelwert der Anzahl der Geburten liegt bei 0,26.

### Transferierte Embryonen

Bis zu drei Embryonen dürfen pro Zyklus einer Frau übertragen werden. In 50,7% der Fälle in dieser Studie wurden drei Embryonen transferiert. Bei 36,1% der Frauen wurden zwei und bei 12,3% der Frauen wurde ein Embryo zurückgesetzt. Im Mittel wurden 2,36 Embryonen transferiert.

### Totale Zyklusanzahl mit Embryonentransfer

Vor dem hier ausgewerteten Kryo-Zyklus sind bei den Patientinnen schon bis zu elf Zyklen im Rahmen der Kinderwunschbehandlung durchgeführt worden. Bei 2,6% der Frauen wurde der Kryo-Zyklus im Rahmen eines ersten IVF Behandlungsversuches, welcher ohne Frisch-Transfer war, durchgeführt. Bei über der Hälfte der Frauen (53,3%) war es der zweite Versuch eines Embryotransfers. Bei 22,8% der Frauen war es der dritte Zyklus mit Embryotransfer, bei 11,2% der vierte, bei 5,2% der fünfte und bei 3,2% der sechste Zyklus. Den siebten Zyklus mit Embryotransfer erhielten 0,9% der Patientinnen, den achten Zyklus 0,4%. Bei jeweils einer der Frauen (0,2%) wurde der neunte bzw. der 12. Zyklus mit Embryotransfer durchgeführt. Im Mittel war der hier ausgewertete Kryo-Zyklus der 2,81. Versuch jeder Frau.

### Kumulativer Embryo Score

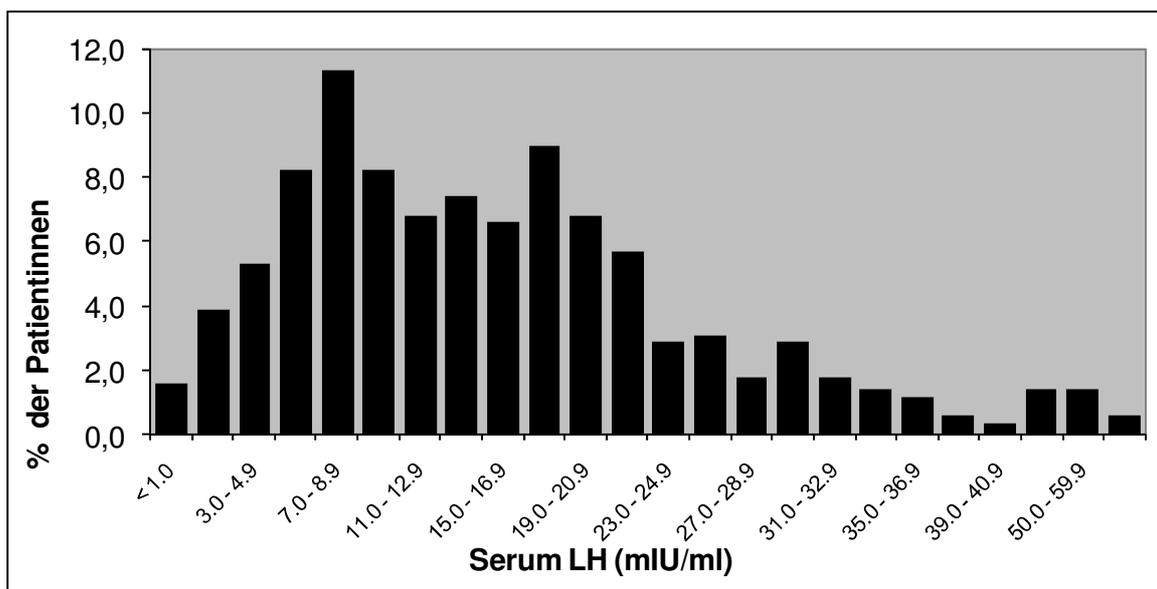
Der mittlere Embryo Score liegt bei 22,85 mit einer Standardabweichung von 12,7. Der Median beträgt 21. Der minimale Wert, der erfasst wurde liegt bei null. Ein Wert von null bedeutet, dass Eizellen transferiert werden, die 24 Stunden nach dem Auftauprozess noch keine Weiterentwicklung in das Embryonalstadium zeigen. Der maximale Wert beträgt 72.

## III.2 Ergebnisse der ersten Kryo-Zyklen pro Patientin

### III.2.1 Hormonwerte und Endometriumhöhe

#### LH-Wert am 14. Tag

Der mittlere LH-Serum-Wert liegt bei  $15,8 \pm 11,0$  mIU/ml (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Der Median liegt bei 14mIU/ml. Die Verteilung der LH-Werte der 513 Patientinnen am 14. Zyklustag ist in Abbildung 1 aufgeführt. Sie reichen von  $<1,0$  mIU/ml bis über 60 mIU/ml.



**Abb. 1:** Verteilung der Serum- LH-Werte am 14. Tag ( $n = 513$ ).

E<sub>2</sub>-Wert am 14. Tag

Der mittlere Wert für E<sub>2</sub> beträgt 340,6±175,6 pg/ml. Bei 21,2% der Zyklen, das sind 109 von 513 Zyklen, liegt der Wert über 450,0 pg/ml.

Progesteron-Wert am 14. Tag

Der mittlere Progesteron-Wert liegt bei 0,64±0,4 ng/ml. Bei 4 der 513 Patientinnen ist der Wert größer als 2,0 ng/ml. Das entspricht 0,7% der Zyklen. Die höchste Konzentration beläuft sich auf 2,8 ng/ml.

Endometriumhöhe am 14. Tag

Die mittlere Endometriumhöhe beträgt 10,2±2,0 mm. Bei 512 von 513, also 99,8% der Zyklen, ist sie höher als 6mm.

*III.2.2 Korrelationen des LH-Wertes*

Die LH-Serum-Werte korrelieren negativ mit den E<sub>2</sub>-Werten ( $r = -0,075$ ). Dieses Ergebnis ist signifikant mit  $p = 0,05$ . Es konnten dagegen keine signifikanten Korrelationen zwischen LH und dem Körpergewicht ( $r = -0,07$ ;  $p = 0,10$ ), dem BMI ( $r = -0,06$ ;  $p = 0,12$ ), der Endometriumhöhe ( $r = 0,01$ ;  $p = 0,40$ ) und den Progesteron-Werten ( $r = 0,04$ ;  $p = 0,21$ ) gefunden werden. Die genannten Ergebnisse sind in Tabelle 1 im Überblick dargestellt.

LH	Gewicht	BMI	Endometrium	E <sub>2</sub>	Progesteron
Pearson Korrelations-Koeffizient (r)	-0,07	-0,06	0,01	-0,075	0,04
p-Wert	0,10	0,12	0,40	0,05	0,21

**Tabelle1:** Bivariate Korrelation von LH am Tag 14 mit Patienten-Eigenschaften und Hormonwerten

*III.2.3 Eigenschaften der Zyklen und Patientinnen*in Abhängigkeit vom LH-Wert

Die Patientinnen wurden anhand der Perzentilen der LH-Werte am 14. Tag in drei Gruppen eingeteilt. In Gruppe 1 sind alle Frauen mit LH-Werten bis zur 25. Perzentile enthalten. Dazu gehören insgesamt 132 Patientinnen. Der mittlere

Serum-LH-Wert dieser Gruppe beträgt  $5,1 \pm 2,3$  mIU/ml, mit einem kleinsten Wert von  $0,1$  mIU/ml und einem größten Wert von  $8,1$  mIU/ml. In Gruppe 2 befinden sich 238 Frauen, deren LH-Werte zwischen der 25. und 75. Perzentile liegen. Die Werte dieser Gruppe reichen von  $8,2$  mIU/ml bis  $19,4$  mIU/ml mit einem Mittelwert von  $13,6 \pm 3,5$  mIU/ml. Zu Gruppe 3 gehören 143 Patientinnen, deren LH-Werte zwischen der 75. und 100. Perzentile liegen. Der mittlere LH-Wert dieser Gruppe beträgt  $29,3 \pm 10,7$  mIU/ml. Der kleinste Wert liegt bei  $20,0$  mIU/ml, der größte Wert liegt bei  $78,0$  mIU/ml (s. Tabelle 3).

Zwischen diesen Gruppen wurden Unterschiede bezüglich der Parameter Alter, BMI, vorherige Schwangerschaften, totale Zyklusanzahl, Anzahl der transferierten Embryonen, Embryo Score, Endometriumhöhe, E<sub>2</sub>-Werte und Progesteronwerte untersucht.

Das Alter der Frauen beträgt in der ersten Gruppe  $32,4 \pm 4,9$  Jahre (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), in der zweiten Gruppe  $32,6 \pm 4,3$  Jahre und in der dritten Gruppe  $33,2 \pm 4,3$  Jahre. Der Body-Mass-Index (BMI) der Patientinnen beträgt in den Gruppen 1, 2 und 3 jeweils  $24,2 \pm 4,3$  kg/m<sup>2</sup>,  $23,5 \pm 4,2$  kg/m<sup>2</sup> bzw.  $22,7 \pm 5,2$  kg/m<sup>2</sup>. Einige der Patientinnen waren vor dem durchgeführten Zyklus schon einmal oder mehrere Male schwanger. Die Mittelwerte der vorangegangenen Schwangerschaften lauten  $0,5 \pm 0,8$  in der ersten Gruppe,  $0,7 \pm 1,0$  in der zweiten Gruppe und  $0,6 \pm 1,0$  Schwangerschaften in der dritten Gruppe. Für viele Patientinnen war es nicht der erste Versuch, durch ärztliche Hilfe schwanger zu werden. Es war durchschnittlich der dritte Zyklus (aber der erste Kryo-Zyklus), der ausgewertet wurde. Die Zyklusanzahl beläuft sich in Gruppe 1 auf  $2,9 \pm 1,5$  in Gruppe 2 auf  $2,8 \pm 1,2$  und in Gruppe 3 auf  $2,8 \pm 1,1$  Zyklen. Bis zu drei Embryonen können in Deutschland in einem Zyklus transferiert werden. In Gruppe 1 wurden im Durchschnitt  $2,4 \pm 0,7$ , in der zweiten Gruppe  $2,3 \pm 0,8$  und in der dritten Gruppe  $2,4 \pm 0,7$  Embryonen übertragen. Der Embryo Score nach Steer in der Modifikation von Ludwig beträgt in der ersten Gruppe  $22,3 \pm 10,8$ , in der zweiten Gruppe  $22,8 \pm 13,6$  und in der dritten Gruppe  $22,2 \pm 12,2$ . Die durchschnittliche Höhe des Endometriums ist in den drei verschiedenen Gruppen fast identisch. Die Werte betragen  $10,1 \pm 2,0$  mm in Gruppe 1,  $10,2 \pm 2,0$  mm in Gruppe 2 und  $10,2 \pm 1,9$  mm in

Gruppe 3. Der E<sub>2</sub>-Wert beträgt in den drei Gruppen 352,4±203,7pg/ml, 340,3±160,6pg/ml bzw. 330,4±173,5pg/ml. Der Progesteron-Wert unterscheidet sich ebenfalls nur geringfügig in den Gruppen 1,2 und 3. Er beträgt 0,6±0,4ng/ml, 0,6±0,3ng/ml bzw. 0,7±0,4ng/ml. Es konnten bei der Auswertung aller genannten Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Einen Überblick über die Ergebnisse verschafft Tabelle 2.

Gruppeneinteilung der Zyklen abhängig von den Perzentilen der LH-Werte	0-25	25-75	75-100	
	Mittelwert ± Standardabweichung			<i>p</i>
	( <i>n</i> =132)	( <i>n</i> =238)	( <i>n</i> =143)	
Alter der Frau (Jahre)	32,4±4,9	32,6±4,3	33,2±4,3	0,36
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,2±4,3	23,5±4,2	22,7±5,2	0,09
Schwangerschaften ( <i>n</i> )	0,5±0,8	0,7±1,0	0,6±1,0	0,31
Totale Zyklusanzahl ( <i>n</i> )	2,9±1,5	2,8±1,2	2,8±1,1	0,94
Transferierte Embryonen ( <i>n</i> )	2,4±0,7	2,3±0,8	2,4±0,7	0,83
Embryo Score	22,3±10,8	22,8±13,6	22,2±12,2	0,98
Endometrium (mm)	10,1±2,0	10,2±2,0	10,2±1,9	0,67
E <sub>2</sub> (pg/ml)	352,4±203,7	340,3±160,6	330,4±173,5	0,74
Progesteron (ng/ml)	0,6±0,4	0,6±0,3	0,7±0,4	0,79

**Tabelle 2:** Demographische Eigenschaften der Patientinnen sowie deren Hormonwerte abhängig von den Perzentilen der LH-Werte am 14. Tag in einer künstlichen Vorbereitung des Endometriums für einen Kryo-Embryonen-Transfer (*n*=513).

### III.2.4 Schwangerschaftswahrscheinlichkeit

Die totale klinische Schwangerschaftswahrscheinlichkeit liegt bei 13,8% mit einem 95%igen Konfidenzintervall von 11,1% bis 17,1%.

### III.2.5 Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom LH-Wert

Die Patientinnen wurden durch die Perzentil-Analyse ihrer LH-Werte wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt III.2.3) in drei Gruppen eingeteilt.

Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten liegen in den drei Gruppen bei 12,1%, 13,4% und 16,1% und unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,5$ ).

In Tabelle 3 und Abbildung 2 sind diese Ergebnisse zusammengefasst.

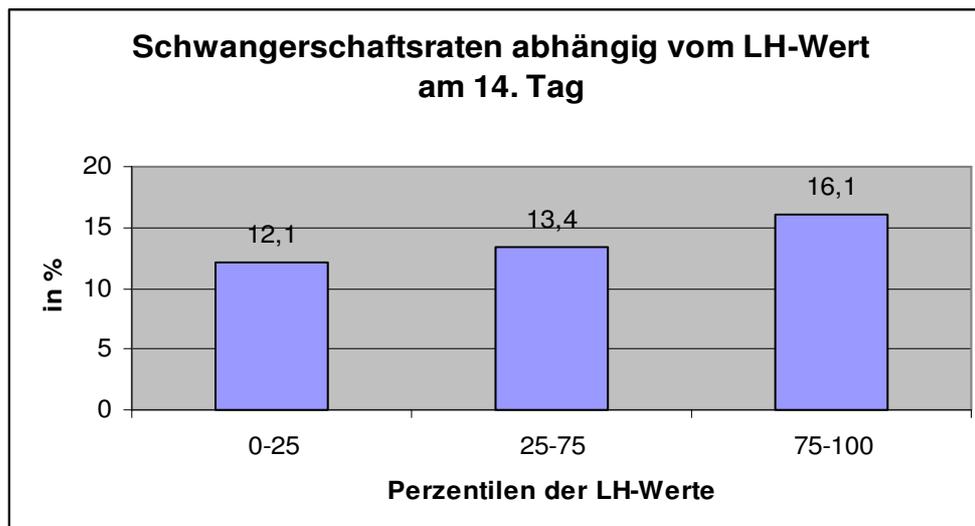
Einteilung der Kryo-ET-Zyklen abhängig von ihren LH-Werten	Hormonwerte			cPR/ET		
	Perzentilen (Tukey)	Mittelwert $\pm$ S	Min	Max	n (%)	95% KI
LH (mIU/ml)						
0-25	5,1 $\pm$ 2,3	0,1	8,1	16/132 (12,1)	7,6 – 18,8	0,62
25-75	13,6 $\pm$ 3,5	8,2	19,4	32/238 (13,4)	9,7 – 18,4	
75-100	29,3 $\pm$ 10,7	20,0	78,0	23/143 (16,1)	11,0 – 23,0	

**Tabelle 3:** Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten in Gruppen von Patienten ( $n=513$ ), eingeteilt abhängig von den Perzentilen ihrer LH-Werte am 14. Tag.

Abk.: S: Standardabweichung

cPR/ET: klinische Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Embryo-Transfer

95% KI: 95%iges Konfidenzintervall der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Embryo-Transfer



**Abb.2:** Die Schwangerschaftsraten abhängig vom LH-Wert am 14. Tag, eingeteilt in Perzentilen, in einem künstlichen Zyklus zur Vorbereitung des Kryo-Embryonen-Transfers. Die drei Perzentilgruppen unterscheiden sich nicht signifikant ( $p>0,05$ ).

### III.2.6 Fortlaufende Schwangerschaften

Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei LH-Perzentilgruppen bezüglich der Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten in der 10. bis 12. Schwangerschaftswoche zu finden. Bei niedrigen, mittleren und hohen Werten von endogenem LH am 14. Tag betragen die fortlaufenden Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten 9,8% (95%iges KI 6,2-15,2), 10,5% (8,1-13,5) und 14,4% (9,6-21,0%). Im Chi-Quadrat-Test stellen sich die Unterschiede zwischen den Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten der drei Gruppen als nicht signifikant heraus (Chi-Quadrat-Test:  $p=0,36$ ). In der Datenmenge für den Schwangerschaftsverlauf in der 10. bis 12. Woche fehlen Angaben von fünf Patientinnen, so dass die Berechnungen auf den Daten von  $n=508$  Patientinnen beruhen.

### Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von weiteren Variablen

Eine robuste logistische Regression wurde durchgeführt mit den folgenden unabhängigen Prädiktoren "LH am 14. Tag", „Progesteron am 14. Tag“, Embryo Score, Totale Zyklusanzahl sowie der Anzahl vorheriger Schwangerschaften.

Der Einfluss des Embryo Scores auf die Wahrscheinlichkeit, eine Schwangerschaft zu erreichen, ist signifikant mit  $p < 0,01$ . Das Chancenverhältnis (Odds ratio) beträgt 1,04 und das 95%ige Konfidenzintervall 1,02 bis 1,05.

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Schwangerschaftswahrscheinlichkeit und den übrigen Parametern, im Besonderen dem LH-Wert ( $p=0,15$ ), wie auch dem Progesteron-Wert ( $p=0,87$ ), der Anzahl vorheriger Schwangerschaften ( $p=0,16$ ), der totalen Zyklusanzahl ( $p=0,06$ ). Die Odds ratios sowie die Konfidenzintervalle sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Abhängige Variable: Klinische Schwangerschaft				
			95 %iges Konfidenzintervall	
Unabhängige Variablen	$p$	Odds ratio	Untere Grenze	Obere Grenze
Embryo Score	<i>0,01</i>	1,04	1,02	1,05
Totale Zyklusanzahl	<i>0,06</i>	0,86	0,73	1,01
LH	<i>0,15</i>	1,02	0,99	1,04
Schwangerschaften	<i>0,16</i>	0,77	0,54	1,11
Progesteron	<i>0,87</i>	0,95	0,50	1,80

**Tabelle 4:** Robuste logistische Regression der Wahrscheinlichkeit eine klinische Schwangerschaft zu erreichen in Kryo-Zyklen mit künstlicher Vorbereitung des Endometriums durch transdermale E<sub>2</sub>-Gabe. (Model  $p < 0,001$ ; Hosmer and Lemeshow Test  $p=0,84$ ).

### III.3 Ergebnisse für alle Zyklen

In der Datenmenge für alle Zyklen sind 797 Zyklen der 513 Patientinnen enthalten. Da von einigen Patientinnen mehrere Zyklen in dem Datensatz enthalten sind, fließen individuelle Besonderheiten mehrmals in die Auswertung mit ein. Die untersuchten Beobachtungen sind somit nicht mehr unabhängig voneinander und die Durchführung von zuvor beschriebenen statistischen Testverfahren deshalb nicht möglich.

#### III.3.1 Korrelationen des LH-Wertes

Die LH-Werte am 14. Tag korrelieren, wie auch schon in der anderen Datenmenge, negativ mit den E<sub>2</sub>-Werten ( $r = -0,072$ ). Ebenso liegen negative Korrelationen zwischen Gewicht und LH-Werten ( $r = -0,84$ ), zwischen BMI und LH-Werten ( $r = -0,078$ ) sowie zwischen Progesteron- und LH-Werten ( $r = -0,01$ ) vor. Zwischen dem endogenen LH-Spiegel und der Endometriumhöhe beträgt der Pearson Korrelationskoeffizient  $r = 0,038$ . Tabelle 5 fasst die Korrelationen zwischen den untersuchten Variablen zusammen.

LH	Gewicht	BMI	Endometrium	E <sub>2</sub>	Progesteron
Pearson Korrelations Koeffizient (r)	-0,84	-0,078	0,038	-0,072	-0,01

**Tabelle 5:** Bivariate Korrelation von LH am Tag 14 mit Patienten-Eigenschaften und Hormonwerten. Auswertung aller Zyklen.

### III.3.2 Eigenschaften der Zyklen und Patientinnen

#### in Abhängigkeit vom LH-Wert

Die Patientinnen wurden wie bei der Auswertung der ersten Zyklen anhand ihrer LH-Werte am 14. Tag in drei Gruppen eingeteilt, um diese anschließend vergleichen zu können. Gruppe 1 enthält alle Zyklen mit LH-Werten, welche in die erste Tukey-Hinges Perzentile fallen ( $n=208$ ). Die erste Tukey-Hinges Perzentile umfasst Werte von  $0,1\text{mIU/ml}$  bis  $8,0\text{mIU/ml}$  mit einem Mittelwert von  $4,9\pm 2,3\text{mIU/ml}$ . In Gruppe 2 sind 391 Zyklen mit LH-Werten in der zweiten und dritten Tukey-Hinges Perzentile enthalten. Die Werte dieser Gruppe reichen von  $8,1\text{mIU/ml}$  bis  $20,0\text{mIU/ml}$  mit einem Mittelwert von  $13,6\pm 3,7\text{mIU/ml}$ . In Gruppe 3 befinden sich 198 Zyklen mit LH-Werten am 14. Tag, welche in die vierte Tukey-Hinges Perzentile fallen. Der mittlere LH-Wert dieser Gruppe beträgt  $31,2\pm 11,7\text{mIU/ml}$ . Der kleinste Wert liegt bei  $21,0\text{mIU/ml}$  und der größte Wert bei  $78,0\text{mIU/ml}$  (s. Tabelle 7).

In Gruppe 1, 2 und 3 beträgt das Alter der Frauen  $32,43\pm 4,6$  Jahre,  $32,65\pm 4,2$  Jahre bzw.  $33,52\pm 4,1$  Jahre. Der BMI ist in den drei Gruppen  $23,74\pm 3,9\text{kg/m}^2$ ,  $23,86\pm 3,9\text{kg/m}^2$  bzw.  $22,78\pm 4,9\text{kg/m}^2$ . Die vorherigen Schwangerschaften belaufen sich auf  $0,61\pm 0,9$  in Gruppe 1, auf  $0,68\pm 1,1$  in Gruppe 2 und auf  $0,72\pm 1,0$  in Gruppe 3. Die totale Zyklusanzahl beträgt in der ersten Gruppe  $6,08\pm 3,8$ , in der zweiten Gruppe  $5,27\pm 2,7$  und in der dritten Gruppe  $5,01\pm 2,6$ . In Gruppe 1 wurden  $2,43\pm 0,71$  Embryonen transferiert,  $2,37\pm 0,8$  in Gruppe 2 und  $2,41\pm 0,7$  in Gruppe 3. Der Embryo Score beträgt  $23,9\pm 13,3$  in Gruppe 1,  $23,10\pm 12,5$  in Gruppe 2 und  $22,96\pm 11,6$  in Gruppe 3 und die Endometriumhöhe ist in den drei Gruppen mit  $10,26\pm 2,1\text{mm}$ ,  $10,26\pm 1,8\text{mm}$  bzw.  $10,27\pm 1,9\text{mm}$  anzugeben. Der  $E_2$ -Wert am 14. Tag beträgt in der ersten Gruppe  $440,15\pm 432,7\text{pg/ml}$ , in der zweiten Gruppe  $363,51\pm 188,1\text{pg/ml}$  und in der dritten Gruppe  $380,49\pm 604,4\text{pg/ml}$ . Der Progesteron-Wert am 14. Zyklustag liegt bei  $0,78\pm 1,1\text{ng/ml}$  in Gruppe 1, bei  $0,61\pm 0,3\text{ng/ml}$  in Gruppe 2 und bei  $0,73\pm 0,8\text{ng/ml}$  in Gruppe 3. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Tabelle 6.

Gruppeneinteilung der Zyklen abhängig von den Perzentilen der LH-Werte	0-25	25-75	75-100
	Mittelwert ± Standardabweichung		
	(n=208)	(n=391)	(n=198)
Alter der Frau (Jahre)	32,43±4,6	32,65±4,2	33,52±4,1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,74±3,9	23,86±3,9	22,78±4,9
Schwangerschaften (n)	0,61±0,9	0,68±1,1	0,72±1,0
Totale Zyklusanzahl (n)	6,08±3,8	5,27±2,7	5,01±2,6
Transferierte Embryonen (n)	2,43±0,71	2,37±0,8	2,41±0,7
Embryo Score	23,9±13,3	23,10±12,5	22,96±11,6
Endometriumhöhe (mm)	10,26±2,1	10,26±1,8	10,27±1,9
E <sub>2</sub> (pg/ml)	440,15±432,7	363,51±188,1	380,49±604,4
Progesteron (ng/ml)	0,78±1,1	0,61±0,3	0,73±0,8

**Tabelle 6:** Demographische Eigenschaften der Patientinnen, sowie deren Hormonwerte abhängig von den Perzentilen der LH-Werte am 14. Tag in einer künstlichen Vorbereitung des Endometriums für einen Kryo-Embryonen-Transfer (n=797).

### III.3.3 Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom LH-Wert

Die Zyklen sind in drei Gruppen eingeteilt wie beschrieben in Kapitel III.3.2. Der Mittelwert des Serum-LH-Wertes in der Gruppe 1 beträgt  $4,9 \pm 2,3$  mIU/ml, in der zweiten Gruppe  $13,6 \pm 3,7$  mIU/ml und in der dritten Gruppe  $31,2 \pm 11,7$  mIU/ml. Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit beträgt 11,5% in Gruppe 1, 12,5% in Gruppe 2 und 18,2% in Gruppe 3. Die gesamte mittlere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit liegt bei 13,7%. Siehe Tabelle 7 und Abbildung 3 für eine Übersicht der Werte der drei Perzentilgruppen.

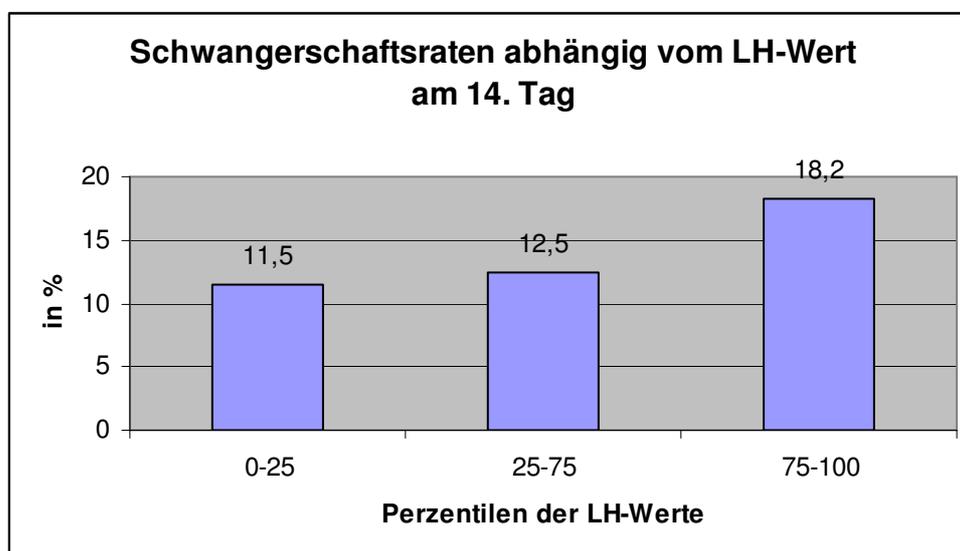
Einteilung der Kryo-ET-Zyklen abhängig von ihren LH-Werten	Hormonwerte			cPR/ET	
	Mittelwert $\pm$ S	Min	Max	n (%)	95% KI
LH (mIU/ml)					
0-25	4,9 $\pm$ 2,3	0,1	8,0	24/208 (11,5)	7,16–15,84
25-75	13,6 $\pm$ 3,7	8,1	20,0	49/391 (12,5)	9,22–15,78
75-100	31,2 $\pm$ 11,7	21,0	78,0	36/198 (18,2)	12,83–23,57

**Tabelle 7:** Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten in Gruppen von Patienten ( $n=797$ ), eingeteilt abhängig von den Perzentilen ihrer LH-Werte vom 14. Tag.

Abk.: S: Standardabweichung

cPR/ET: klinische Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Embryo-Transfer

95% KI: 95%iges Konfidenzintervall der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Embryo-Transfer



**Abb.3:** Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten abhängig vom LH-Wert am 14. Tag, eingeteilt in Perzentilen, in einem künstlichen Zyklus zur Vorbereitung des Kryo-Embryonen-Transfers. Auswertung aller 797 Zyklen.

## IV Diskussion

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem endogenen LH-Wert am 14. Zyklustag und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in einem Kryo-Zyklus herauszufinden. In diesem Kryo-Zyklus wurde das Endometrium mit transdermaler E<sub>2</sub>-Applikation vorbereitet, ohne dass vorher eine Suppression der Hypophyse vorgenommen wurde. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen endogenem LH-Wert und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit festgestellt werden. Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten dreier Gruppen von Frauen mit im Mittelwert niedrigen, mittleren bzw. hohen LH-Werten am 14. Zyklustag unterschieden sich nicht signifikant.

In die Studie sind die Daten einer großen Anzahl von Patientinnen mit einbezogen worden, bei denen ein Kryo-Embryonen-Transfer durchgeführt wurde. Seit 1999 wurde in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des UK-SH, Campus Lübeck, bei jedem Kryo-Zyklus exakt das Substitutionsschema nach Bals-Pratsch befolgt (Bals-Pratsch et al., 1999). Die Ergebnisse der routinemäßigen Messung von Hormonwerten und Endometriumdicke am 14. Zyklustag hatten keine Relevanz für das weitere Vorgehen, da der Transfer unabhängig von den Messergebnissen durchgeführt wurde.

In der Gesamtzahl von 797 erfassten Kryo-Zyklen sind von einigen Patientinnen mehrere Zyklen enthalten. Die primäre Auswertung bezieht sich daher auf den Teildatensatz der jeweils ersten Zyklen mit Embryotransfer der insgesamt 513 Patientinnen. Eine Analyse aller 797 Kryo-Zyklen wurde im Anschluss ebenfalls durchgeführt, soll jedoch nur als Nebenergebnis Beachtung finden.

Verschiedene Studien haben in den letzten Jahren einen direkten Einfluss von LH auf das Endometrium postuliert und damit die Hypothese genährt, dass im LH ein entscheidender Faktor gefunden worden sei, der das Eintreten einer Schwangerschaft mitbestimmt. Die nachgewiesenen LH-Rezeptoren im Endometrium des Uterus legten den Grundstein für diese Überlegung (Rao, 2001; Ziecik et al., 1992).

Tesarik fand 2003 in einem Oozyten-Donorprogramm heraus, dass die Implantationsraten durch exogene HCG-Gabe bei hypophysen-supprimierten Frauen signifikant stieg im Vergleich zu Patientinnen, deren Hypophysen ebenfalls unterdrückt wurden, die aber kein exogenes HCG erhielten (Tesarik, 2003). Da HCG ebenso wie LH physiologisch an die LH-Rezeptoren bindet (Huhtaniemi und Catt, 1981), ist nach diesem Ergebnis eine direkte Wirkung von LH auf das Endometrium sehr wahrscheinlich.

El-Toukhy verglich in seiner Studie Kryo-Zyklen von Frauen, deren Hypophysenaktivität unterdrückt wurde mit Kryo-Zyklen von Frauen, deren Hypophysen nicht supprimiert wurden (El-Toukhy et al., 2004). Eine signifikant bessere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit wurde bei Patientinnen mit Hypophysenunterdrückung erreicht. Der Autor leitete hieraus die Vermutung ab, dass unkontrollierte LH-Wert Anstiege die Implantation der Embryonen negativ beeinflussen könnten.

Kolibianakis (2006) verglich sechs Studien, die den Einfluss von LH auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in stimulierten IVF-Zyklen untersuchten. Die Ergebnisse der Studien waren sehr inhomogen. Bei vier retrospektiven Studien wurde kein Zusammenhang festgestellt, während bei zwei prospektiven Studien ein hoher LH-Wert mit einer niedrigeren Schwangerschaftswahrscheinlichkeit assoziiert war (Kolibanakis et al., 2006).

Um den Einfluss von LH auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit genauer zu untersuchen, wäre eine Interventionsstudie mit LH-Verabreichung notwendig. Die vorliegende Studie kann aufgrund ihres Designs einen Kausalzusammenhang nicht beweisen, sondern lediglich eine Assoziation beschreiben. Es sollte ein Zyklus betrachtet werden, in dem die ovarielle Steroidproduktion unterdrückt wird und allein der direkte Effekt von LH auf das Endometrium messbar ist. Für einen Kryo-Embryonen-Transfer werden die Patientinnen im UK-SH, Campus Lübeck, mit einer Östrogen-Gestagen-Behandlung vorbereitet (Bals-Pratsch et al., 1999). Mit der transdermalen Gabe von E<sub>2</sub> wird durch die negative Feedback-Wirkung die FSH-Sekretion aus der Hypophyse gehemmt (Marshall et al., 1983) und damit eine Follikelentwicklung im Ovar unterbunden. Der präovulatorische LH-Peak wird durch die Applikation von E<sub>2</sub> hingegen nicht unterdrückt. Allerdings bewirkt der LH-

Peak nicht wie in einem normalen Zyklus den Anstieg der Progesteronproduktion, da die folliculäre Reifung und somit die Entstehung des Progesteron produzierenden Gelbkörpers unterbunden wird (de Ziegler 1991).

#### IV.1.1 Hormonwerte und Endometriumhöhe

Die in dieser Population gemessenen Hormonwerte und die Endometriumdicke sind vergleichbar mit Werten aus früheren Publikationen, in denen Kryo-Embryonen-Transfers durch künstliche Zyklen mit transdermaler E<sub>2</sub>-Applikation vorbereitet wurden.

Die durch die E<sub>2</sub>-Gabe intendierte Suppression der Ovarien kann mit Hilfe der gemessenen Progesteron-Werten überprüft werden. Der mittlere Progesteron-Wert am 14. Tag beträgt in dieser Studie  $0,64 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$  und ist damit vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien. Bei Queenan liegt er am 13. Tag bei  $0,4 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$ , bei Bals-Pratsch beträgt der Median  $0,8 \text{ ng/ml}$ . Die Werte reichen von  $0,2$  bis  $1,6 \text{ ng/ml}$  (Queenan et al., 1997; Bals-Pratsch et al., 1999). In dieser Studie liegt die Inzidenz für Progesteron-Anstiege über den Referenzbereich der Follikelphase, definiert als Progesteron-Werte über  $2,0 \text{ ng/ml}$ , bei  $0,7\%$ , während in anderen Studien kein Anstieg der Progesteron-Werte berichtet wird (de Ziegler et al., 1991; Queenan et al., 1997; Bals-Pratsch et al., 1999). Mögliche Ursachen für die vereinzelt Anstiege von Progesteron in dieser Studie könnten z.B. hormonell aktive Zysten sein. Auch unzureichend supprimierte Ovarien, beispielsweise durch fehlerhafte oder ungenaue Befolgung des Substitutionsschemas durch die Patientinnen, könnten den Anstieg erklären. Allerdings wurde bislang noch kein allgemein gültiger Grenzwert für Progesteron festgelegt, der in einem künstlichen Zyklus zur Vorbereitung eines Kryo-Embryonen-Transfers einen Abbruch der Behandlung vor Embryotransfer indizieren sollte, so dass alle Behandlungen unabhängig von der Höhe des Progesteron-Wertes im Rahmen der vorliegenden Studie weiter fortgesetzt wurden. Diese Studie war lediglich auf die Frage ausgerichtet, ob es einen Zusammenhang zwischen LH-Wert und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit gibt. Ein möglicher Einfluss eines

Progesteron-Anstiegs auf eine Schwangerschaft müsste in einer weiteren Studie überprüft werden.

Der mittlere Serum-LH-Wert am 14. Zyklustag liegt in der vorliegenden Studie bei  $15,8 \pm 11,0$  mIU/ml. In der Studie von de Ziegler betrug der mittlere LH-Wert am 14. Tag  $18,1 \pm 5,3$  mIU/ml (de Ziegler et al., 1991). Die Arbeitsgruppe um Bals-Pratsch ermittelte einen Median des LH-Wertes am 14. Tag von 10 mIU/ml. Minimum und Maximum der Werte lagen bei 0,7 bzw. 86 mIU/ml. (Bals-Pratsch et al., 1999)

In der Studie von Queenan wurde ein mittlerer LH-Wert von  $11,2 \pm 7,3$  mIU/ml bestimmt. Dieser wurde jedoch anders als in den anderen Studien bereits am 13. Tag gemessen, so dass davon auszugehen ist, dass der Wert am 14. Tag höher gewesen wäre (Queenan et al., 1997).

Die Messung des  $E_2$ -Spiegels ergab einen mittleren Wert von  $340,6 \pm 175,6$  pg/ml. In vergleichbaren Studien wurden mittlere  $E_2$ -Werte von  $335 \pm 51$  pg/ml und  $332,5 \pm 160,9$  pg/ml bestimmt (de Ziegler et al., 1991 und Queenan et al., 1997). Beide Messungen wurden jedoch am 13. Tag durchgeführt und sind somit nicht exakt mit den von uns am 14. Tag gemessenen Werten vergleichbar. Der Median des  $E_2$ -Wertes in der Studie von Bals-Pratsch lag bei 212 pg/ml. Die Werte erstreckten sich von 112 bis 595 pg/ml (Bals-Pratsch et al., 1999).

In dieser Studie ergab sich eine mittlere Dicke des Endometriums von  $10,2 \pm 2,0$  mm. In der Studie von Bals-Pratsch beträgt die Endometriumdicke im Median 9 mm (7-12 mm) (Bals-Pratsch et al., 1999). Bei Queenan wurde eine Endometriumdicke von  $10,8 \pm 2,1$  mm bestimmt. Die Messung erfolgte wieder am 13. Tag (Queenan et al., 1997). Wie bei den Progesteron-Werten herrscht auch bei der Endometriumdicke kein Konsens über eine Mindesthöhe, die erreicht sein muss, um den Embryo-Transfer durchzuführen. In der Studie von Banz et al. (2002) kommt es bei Patientinnen mit einer Endometriumdicke kleiner als 7 mm oder größer als 15 mm zu keiner Schwangerschaft. Die Patientinnen mit Endometriumhöhen in diesen Bereichen machten jedoch nur einen geringen Anteil

des Kollektivs aus, so dass dieses Ergebnis mit Vorsicht interpretiert werden muss.

#### IV.1.2 Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom LH-Wert

Das Hauptziel dieser Studie ist es, einen Zusammenhang zwischen endogenem LH-Wert und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit festzustellen. Eine klinische Schwangerschaft ist in dieser Studie als positiv definiert, wenn in der vierten bis fünften Woche nach dem Embryonentransfer der fetale Herzschlag im Ultraschall sichtbar ist. Die klinische Schwangerschaftswahrscheinlichkeit der Studie liegt bei 13,8%. In Studien, in denen dasselbe Substitutionsschema angewendet wurde, waren die Ergebnisse ähnlich. Banz stellte eine klinische Schwangerschaftswahrscheinlichkeit von 15,5% und Hoepfner von 17% fest (Banz et al., 2002, Hoepfner et al., 2000).

Mit der Frage, ob zwischen dem LH-Wert am 14. Tag in einem künstlichen Zyklus für einen Kryo-Embryonen-Transfer und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit ein Zusammenhang besteht, hat sich bis jetzt nur eine Forschergruppe aus Kanada befasst, die ihre Ergebnisse bislang nur als Abstract veröffentlicht hat. In dieser Studie wurden die Patientinnen ebenfalls mit transdermale Östrogen und vaginalem Progesteron behandelt. Eine Suppression der Hypophyse wurde auch hier nicht durchgeführt. Die Arbeitsgruppe verglich die LH-Werte der Frauen, die schwanger wurden mit denen, die keine Schwangerschaft erreichten ( $18,52 \pm 2,95 \text{ IU/l}$  vs.  $19,71 \pm 1,25 \text{ IU/l}$ ). Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden (Cheung et al., 2005). Die vorliegende Arbeit stimmt somit mit den Schlussfolgerungen von Cheung et al. überein.

#### IV.1.3 Fortlaufende Schwangerschaften

Ein interessantes Ergebnis der Arbeit wäre gewesen, den Schwangerschaftsausgang (Lebendgeburtswahrscheinlichkeit) auszuwerten, wie in anderen Studien geschehen (El-Toukhy et al., 2004). Jedoch waren die nötigen Informationen in den gespeicherten Daten der Klinik nicht für alle Zyklen

verzeichnet und es konnten nicht alle Patientinnen der letzten sieben Jahre zurückverfolgt werden, so dass zu viele fehlende Daten eine Auswertung unmöglich gemacht haben. Auch die Auswertung der fortlaufenden Schwangerschaften in der zehnten bis zwölften Woche konnte nur mit einem reduzierten Datensatz durchgeführt werden (n=508). Das Ergebnis der Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten im Verlauf bezüglich des Einflusses von LH ändert sich jedoch gegenüber den klinischen Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten nicht. Auch im Verlauf finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (9,8% vs. 10,5% vs. 14,4%, Chi-Quadrat-Test:  $p=0,36$ ).

#### IV.1.4 Schwangerschaftswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Embryo Score

Neben dem LH-Wert wurden weitere Parameter auf einen Zusammenhang mit der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit getestet. Für eine erfolgreiche Implantation muss nicht nur das Endometrium gut vorbereitet sein. Ein weiterer Faktor ist die Qualität der Embryonen. Diese wird mit dem kumulativen Embryo Score von Steer et al. (1992) in einer Modifikation von Ludwig et al. (2000) im Reproduktionslabor vor dem Transfer bewertet. Je besser die Embryonen sind, desto höher ist der Wert des Embryo Scores. In der vorliegenden Studie ist dieser Parameter der einzige, der signifikant mit der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit im Zusammenhang steht. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der Arbeitsgruppe um Hoepfner (Hoepfner et al, 2000) überein. Sie fanden einen signifikant höheren Embryo Score in der Gruppe der schwangeren Patientinnen als in der Gruppe der nicht schwangeren Frauen. Der Embryo Score dient in anderen Ländern als Grundlage für die Zahl und Auswahl der Embryonen für den Transfer oder die Kryokonservierung. Da in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz jedoch nur Vorkernstadien kryokonserviert werden dürfen und alle entwickelten Embryonen transferiert werden müssen, dient er nur zur Abschätzung der individuellen Wahrscheinlichkeit des Paares auf eine klinische Schwangerschaft. Eine Möglichkeit der Optimierung der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit durch

spätere Auswahl und Verwerfen der Embryonen mit geringem Wert im kumulativen Embryo Score bietet sich in Deutschland nicht.

#### *IV.2 Die Bedeutung des LH*

Die bereits genannten Studien von Tesarik und El-Toukhy hatten die Hypothese gestützt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Serum-LH-Wert und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit bestehen könne. Tesarik et al. (2003) finden eine signifikante Verbesserung der Implantationsrate durch exogene Gabe von HCG. El-Toukhy et al. (2004) berichten in ihrer Studie eine höhere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit bei Patientinnen, die vor der transdermalen Östradiol-Gabe einen GnRH-Agonisten zur Unterdrückung der Hypophyse erhalten im Vergleich zu Patientinnen, deren Hypophyse nicht zusätzlich supprimiert wird. Allerdings verzichtet diese Arbeitsgruppe vollständig auf die Hormonmessung am 14. Tag und kann somit Patientinnen, deren Ovarien durch die GnRH-Analogon-Behandlung nicht genügend supprimiert wurden, nicht vor dem Transfer identifizieren. Des Weiteren wurden die Patientinnen ohne Suppression der Hypophyse etwa drei Wochen mit Östradiol behandelt, ehe der Embryo-Transfer vorgenommen wurde. Dieser Umstand lässt vermuten, dass es möglicherweise bei mehr Patientinnen zu einer Ovulation kam oder das Endometrium „überreif“ wurde, als es bei einem Vorgehen wie im Rahmen der vorliegenden Studie zu erwarten wäre.

Auffällig ist außerdem, dass bei Tesarik eine zusätzliche Gabe von HCG die Implantationsrate verbessert hat, während bei El-Toukhy durch eine Verminderung des LH-Spiegels die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit gestiegen ist. Die beiden Studien widersprechen sich also in der Richtung des möglichen Effektes von LH. Da jedoch verschiedene Protokolle zur Vorbereitung des Embryonen-Transfers benutzt wurden, sind Vergleiche nur unter Vorbehalt möglich.

Verschiedene Studien vergleichen den Erfolg der Östrogen-Gestagen-Behandlung mit und ohne zusätzliche Suppression der Hypophyse (Dal Prato et al., 2002; Simon et al., 1998). Auch wenn diese nicht darauf ausgerichtet sind, den Einfluss von LH zu messen, so hätte sich ein gravierender Effekt von LH in den

Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen dennoch jeweils widerspiegeln müssen. Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten mit oder ohne Unterdrückung der Hypophyse unterscheiden sich jedoch nicht signifikant. Darüber hinaus ist aus diesen Ergebnissen zu schließen, dass die Patientinnen dieser Studie nicht von einer Suppression der Hypophyse durch einen GnRH-Agonisten profitiert hätten. Wenn die Applikation von Östrogen am ersten Zyklustag begonnen wird, was in der vorliegenden Studie der Fall war, kann eine spontane Ovulation ausreichend verhindert werden, so dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich Schwangerschafts- und Implantationsrate bestehen (Simon et al 1998; Dal Prato et al., 2002; Yee et al., 1995; Gelbaya et al., 2006).

### *IV.3 Methodische Probleme der Studie*

1. Aus dem ursprünglichen Datensatz mussten einige Zyklen wegen fehlender Angaben entfernt werden, was zu Ungenauigkeiten in der Auswertung führen kann. Die verbleibende Datenmenge ist jedoch umfangreich genug, so dass der Verlust einer kleinen Anzahl von Daten nur einen geringen Einfluss auf die Ergebnisse haben dürfte.
2. Ein potentiell unkontrollierbarer Faktor ist, dass die transdermale Östrogen Applikation zur Vorbereitung des Endometriums auf den Kryo-Embryonen-Transfer von den Patientinnen selbstständig durchgeführt worden ist. Es wurde nicht kontrolliert, ob in allen Fällen das Substitutionsschema korrekt eingehalten wurde. Bei Frauen, die sich einer Kinderwunschbehandlung unterziehen, ist jedoch davon auszugehen, dass ihre Motivation für die Behandlung sehr groß ist. Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, dass sie sorgfältig und gewissenhaft die Anweisungen befolgt haben. Abweichungen vom Substitutionsschema können dennoch nicht ausgeschlossen werden.
3. Es gibt viele konfundierende Faktoren, unbekannte und bekannte, welche Einfluss auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit nehmen können, die in dieser Studie aber nicht gänzlich erfasst wurden. So waren z.B. die Ursachen für die Infertilität der jeweiligen Paare nicht bekannt. Ebenso wurden Angaben zu Lebensgewohnheiten der Patientinnen, wie z.B. Rauch-, Trink- und Essverhalten

oder sportliche Aktivität während der Peri-Implantationszeit, nicht berücksichtigt. Zudem wurde der psychische Zustand der Patientin und des Partners nicht erhoben. Ängste im Zusammenhang mit dem Thema Elternschaft, ungelöste Partnerkonflikte oder gesellschaftlicher Druck sind nur einige Beispiele für denkbare psychische Faktoren, die in dieser Studie nicht beachtet wurden, jedoch durchaus einen Einfluss auf den Schwangerschaftserfolg haben können.

Folgende Überlegungen zur Interpretation der Studie sind anzustellen:

1. In dieser Studie korrelieren die LH-Werte negativ mit den  $E_2$ -Werten. Daraus kann man schließen, dass das exogene  $E_2$  nicht nur die Sekretion von FSH in der Hypophyse hemmt (Marshall et al., 1983), sondern gleichzeitig auch über einen negativen Feedback-Mechanismus Einfluss auf die Sekretion von LH nimmt. Der LH-Wert könnte also ein Epiphänomen des Serum- $E_2$ -Wertes sein, der individuell bei jedem Menschen durch transdermale  $E_2$ -Applikation erreicht wird. Damit wäre LH kein eigenständiger Parameter, der die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit vorhersagt. Weitere Forschung über den prädiktiven Wert von  $E_2$  auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit wäre in diesem Fall sinnvoll.

2. Die Entdeckung der LH-Rezeptoren im Endometrium des Uterus (Reshef et al., 1990) und die Studien von Tesarik und El-Toukhy lassen vermuten, dass LH eine direkte Wirkung auf das Endometrium hat. Es ist aber möglich, dass die endogene LH-Konzentration im Serum nicht mit der Wirkung am Rezeptor identisch ist. Möglicherweise ist der Serum-LH-Wert als Maß für die LH-Wirkung an den Zielorganen ungeeignet. Shemesh stellt in seiner Review (2001) über die Wirkungen der Gonadotropine auf den Uterus die Überlegung an, dass weniger die Serumkonzentration von LH für die Entwicklung des Endometriums von Bedeutung ist, als vielmehr eine gesteigerte Expression des LH-Rezeptors im Uterus (Shemesh, 2001). Weitere Forschung ist nötig, um diese Hypothese zu belegen. Da es jedoch methodisch sehr aufwendig ist, die Rezeptordichte zu messen, scheint dieser Ansatz zwar wissenschaftlich interessant, für die klinisch-prognostische Praxis aber eher ungeeignet.

3. Ein Grund für den fehlenden statistischen Zusammenhang zwischen dem Serum-LH-Wert am 14. Tag und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit könnte darin liegen, dass es zwar einen Zusammenhang zwischen LH-Wert und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit gibt, dieser aber sehr klein ist, so dass er im komplexen Gesamtgefüge vieler Einflussfaktoren keine herausragende Rolle spielt. Ein geringfügiger Effekt könnte sich in der Tendenz widerspiegeln, dass mit steigendem LH-Wert auch die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit ansteigt. Wie bereits erwähnt ist dieses Ergebnis jedoch nicht statistisch signifikant und die beobachteten Effektgrößen sind gering.

#### *IV.4 Ausblick*

Die Bestätigung der hier untersuchten Hypothese hätte zu weiterer Forschung führen können, die beispielsweise eine Optimierung des Kryo-Embryonen-Transfers durch eine Modulation des LH-Wertes, z.B. durch exogene Gabe von rekombinantem LH, ermöglicht hätte. Als Folge hätte man eine Verbesserung der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit erwarten können – ein Fortschritt in der Reproduktionsmedizin, von dem die betroffenen Paare direkt profitiert hätten. Eine höhere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit pro Kryo-Embryonen-Transfer hätte zu einer Verkürzung der Behandlungsdauer und damit zu einer Reduktion der psychischen Belastung führen können. Durch weniger Versuche hätten sich zudem die Kosten reduzieren lassen, was wiederum die Motivation steigern könnte, sich überhaupt einer solchen Behandlung zu unterziehen.

Da keine Assoziation zwischen dem endogenen LH-Wert und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit gefunden wurde, bleibt als positives Ergebnis dieser Studie, dass auf eine Messung des LH-Wertes am 14. Tag verzichtet werden kann und sich die Kosten der Behandlung dadurch reduzieren lassen.

#### *IV.5 Fazit*

Es konnte kein Zusammenhang zwischen endogenem LH-Wert am 14. Tag in einem künstlichen Kryo-Zyklus und der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten unterscheiden sich nicht signifikant in den Gruppen mit niedrigen, mittleren und hohen LH-Werten. Somit hat der LH-Wert keine prognostische Bedeutung und auch keine Relevanz für das weitere Vorgehen beim Embryotransfer kryokonservierter Eizellen im künstlichen Zyklus, so dass auf eine Messung verzichtet werden kann. Dadurch verringert sich der Labor-Aufwand und die Kosten für den Kryo-Embryonen-Transfer können reduziert werden. Schließlich ergeben die hier vorliegenden Daten auch keine Rationale für eine Durchführung von Studien zur zusätzlichen Verabreichung von LH (bzw. hCG) in einem Kryo-Zyklus, in der Absicht, die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit zu steigern.

## V Zusammenfassung

Im Jahr 2004 nahmen aufgrund des Gesundheitsmodernisierungsgesetzes die vorher stetig steigenden Behandlungszahlen der assistierten Reproduktion um mehr als die Hälfte ab. Nur die Anzahl der durchgeführten Kryo-Zyklen stieg. Aufgrund dieser Entwicklung ist es interessant, mehr über den Kryo-Zyklus zu erfahren, um diesen eventuell optimieren zu können. Das Embryonenschutzgesetz verbietet bei einer künstlichen Befruchtung den Transfer von mehr als drei Embryonen in einem Zyklus. Alle überzähligen befruchteten Oozyten dürfen im Vorkernstadium kryokonserviert und in einem späteren Kryo-Zyklus transferiert werden. Im künstlichen Kryo-Zyklus werden am 14. Zyklustag nach exogener Östradiolzufuhr die Hormonwerte von Östradiol, Progesteron und LH, sowie die Endometriumdicke gemessen. Verschiedene Studien haben sich mit dem Zusammenhang von endogenem LH und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit im stimulierten Zyklus auseinandergesetzt. Die Ergebnisse dieser Studien ergeben kein homogenes Bild. In der vorliegenden Studie wird ein Zusammenhang zwischen der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit und dem LH-Wert am 14. Tag in einem künstlichen Kryo-Zyklus ohne Suppression der Hypophyse untersucht.

Daten von 513 Patientinnen, bei denen im Zeitraum von Januar 1999 bis November 2005 ein Kryo-Embryonen-Transfer durchgeführt wurde, wurden ausgewertet. Der Embryonentransfer nach dem Auftauen kryokonservierter Pronukleus-Eizellen wurde in einem künstlichen Zyklus mit transdermaler E<sub>2</sub>-Applikation und vaginaler Progesteron-Gabe vorgenommen. Um einen Zusammenhang zwischen der klinischen Schwangerschaftswahrscheinlichkeit und den LH-Werten festzustellen, wurden die Patienten/Zyklen anhand der LH-Werte am Tag 14 mit der Tukey-Hinges Perzentil-Analyse in drei Perzentilgruppen eingeteilt. Weitere Variablen wurden auf Unterschiede zwischen diesen Gruppen untersucht. Eine robuste logistische Regression wurde durchgeführt mit der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit als abhängige Variable und den unabhängigen Variablen LH, Progesteron, Embryo Score, totale Zyklusanzahl und der Anzahl vorheriger Schwangerschaften.

Die klinischen Schwangerschaftswahrscheinlichkeiten der drei LH Perzentilgruppen unterscheiden sich nicht signifikant [12,1%, 95er KI 7,6-18,8; 13,4%, 95er KI 9,7-18,4; 16,1%, 95er KI 11,0-12,0]. Auch Alter, BMI, die Anzahl vorheriger Schwangerschaften, Zyklusanzahl, Anzahl der transferierten Embryonen, Embryo Score, Endometriumhöhe, E<sub>2</sub>- und Progesteron-Wert unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen mit niedrigen (0,1-8,1mIU/ml), mittleren (8,2-19,4mIU/ml) und hohen (20,0-78,0mIU/ml) LH-Werten. Der E<sub>2</sub>-Wert und der LH-Wert am 14. Tag korrelieren signifikant negativ miteinander [ $r = -0,075$ ,  $p = 0,05$ ]. Die robuste logistische Regression ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit und dem Embryo Score [OR 1,04; 95er KI 1,02-1,06;  $p < 0,01$ ]. Kein Zusammenhang konnte zwischen der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit und dem LH- oder Progesteron-Wert, der Anzahl vorheriger Schwangerschaften und der totalen Zyklusanzahl nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit vergleichbaren Studien überein.

Die Studie ist eine Assoziationsstudie, so dass ein Beweis eines Kausalzusammenhangs nicht geführt werden konnte. Allerdings hätten die vorliegenden Daten zu einer weiterführenden Hypothesenbildung über die Rolle des LH führen können. Im Rahmen von Beobachtungsstudien ist immer mit der Existenz von konfundierenden Faktoren zu rechnen. Allerdings wurden die wichtigsten Faktoren in dieser Studie, die Einfluss auf den Schwangerschaftserfolg haben können, erfasst und im Rahmen einer multi-variablen Analyse ausgewertet. Zu bedenken ist, dass der LH-Wert eventuell lediglich eine Folgeerscheinung des durch E<sub>2</sub>-Applikation erzielten Serum E<sub>2</sub>-Wertes ist. Eine weitere Überlegung ist, dass der Serum-LH-Wert nicht unbedingt etwas über die Wirkung von LH am Rezeptor aussagen muss. Die prognostische Bedeutung von LH ist im komplexen Gefüge vieler Faktoren offenbar nicht groß genug, um klinisch relevant zu sein, bzw. um sich mit statistischer Signifikanz abzubilden.

Da ein Zusammenhang zwischen dem LH-Wert und der klinischen Schwangerschaftswahrscheinlichkeit nicht nachgewiesen werden konnte, kann auf die Messung von LH am 14. Tag verzichtet werden. Dadurch können die Kosten der Behandlung verringert werden.

## VI Literaturverzeichnis

Al-Hasani S., Demirel L.C., Schöpfer B., Bals-Pratsch M., Nikolettos N., Küpker W., Ugur M., Sturm R., Diedrich K. (1999) Pregnancies achieved after frozen-thawed pronuclear oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissues from non-obstrutive azoospermic men. *Hum Reprod* **14**, 2031-2035.

Bals-Pratsch M., Al-Hasani S., Schöpfer B., Diedrich C., Hoepfner A.S., Weiss J., Küpker W., Felberbaum R., Ortmann O., Bauer O., Diedrich 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. *Hum Reprod* **14** (Suppl. 1), 222-230.

Banz C., Katalinic A., Al-Hasani S., Seelig A.S., Diedrich K., Ludwig M. (2002) Preparation of cycles for cryopreservation transfers using estradiol patches and Crinone 8% vaginal gel is effective and does not need any monitoring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **4200**, 1-5.

Bundesgesetzblatt I. (1990) Gesetz zum Schutze der Embryonen (Embryonenschutzgesetz), 2746.

Cheung A.P., Noble J.M., Sierra S., Wilson S.J. (2005) LH and progesterone levels do not predict pregnancy success in cryopreserved embryo replacement using transdermal estradiol for endometrial synchronization. *Hum Reprod* **84** (Suppl. 1), S172.

Cohen J. (1998) How to avoid multiple pregnancies in assisted reproduction. *Hum Reprod* **13** (Suppl. 3), 197-214.

Dal Prato L., Borini A., Cattoli M., Bonu M.A., Sciajno R., Flamigni C. (2002) Endometrial preparation for frozen-thawed embryo transfer with or without pretreatment with gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* **77**, 956-960.

de Ziegler D., Cornel C., Bergeron C., Hazout A., Bouchard P., Frydman R. (1991) Controlled preparation of the endometrium with exogenous estradiol and progesterone in women having functioning ovaries. *Fertil Steril* **56**, 851-855.

Demoulin A., Jouan C., Gerday C., Dubois M. (1991) Pregnancy rates after transfer of embryos obtained from different stimulation protocols and frozen at either pronucleate or multicellular stages. *Hum Reprod* **6**, 799-804.

Deutsches IVF-Register (2005) D.I.R. - Deutsches IVF-Register Jahrbuch 2005. [http://www.meb.uni-bonn.de/frauen/DIR\\_downloads/dirjahrbuch2005.pdf](http://www.meb.uni-bonn.de/frauen/DIR_downloads/dirjahrbuch2005.pdf) (Zugriff: 5.9.2007)

Dietl J. (2001) Geburtenentwicklung: Weiterer Rückgang zu erwarten. *Deutsches Ärzteblatt* **98**, 1053-5.

El-Toukhy T., Taylor A., Khalaf Y., Al-Darazi K., Rowell P., Seed P., Braude P. (2004) Pituitary suppression in ultrasound-monitored frozen embryo replacement cycles. A randomised study. *Hum Reprod* **19**, 874-879.

Felberbaum R., Weiss J.M., Lopens A. (2007) Hormonelle Regulation. In: Diedrich K., Holzgreve W., Jonat W., Schultze-Mosgau A., Schneider K.T.M., Weiss J.M. (Hrsg.) *Gynäkologie & Geburtshilfe*. 2. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 59-77.

Gelbaya T.A., Nardo L.H., Hunter H.R., Fitzgerald C.T., Horne G., Pease E.E., Brison D.R., Lieberman B.A. (2006) Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study. *Fertil Steril* **85**, 603-609.

Gnoth C., Godehardt E., Frank-Herrmann P., Friol K., Tigges J., Freundl G. (2004) Zur Definition und Prävalenz von Subfertilität und Infertilität. *J Reproduktionsmed Endokrinol* **1**, 272-278.

Griesinger G., Diedrich K., (2008) Prävention von Mehrlingsgeburten nach IVF in Deutschland. *Gynäkologe*.

Hoepfner A.-St., Bals-Pratsch M., Diedrich K. (2000) Höhere Erfolgsrate beim Kryotransfer im künstlichen Zyklus mit transdermaler Östradiol- und vaginaler Progesterongabe als in stimulierten Zyklen. *J Fertil Reprod* **10**, 8-13.

Horne G., Critchlow J.D., Newman M.C., Edozien L., Matson P.L., Lieberman B.A. (1997) A prospective evaluation of cryopreservation strategies in a two-embryo transfer programme. *Hum Reprod* **12**, 542-547.

Hornung D. und Kiesel L. (2006) Ovarialfunktion. In: Kaufmann M., Costa S.D., Scharl A. (Hrsg.) Die Gynäkologie. 2. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 37-42.

Huhtaniemi I.T. und Catt K.J. (1981) Differential binding affinities of rat testis luteinizing hormone (LH) receptors for human chorionic gonadotropin, human LH and ovine LH. *Endocrinology* **108**, 1931-1938.

Keck C. (1997) Klinik der männlichen Infertilität. In: Keck C. Neulen J., Breckwoldt M.(Hrsg.) Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie; Praxis der Frauenheilkunde Bd. I. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 225-257.

Kolibianakis E.M., Collins J., Tarlatzis B., Papanikolaou E., Devroey P. (2006) Are endogenous LH levels during ovarian stimulation for IVF using GnRH analogues associated with the probability of ongoing pregnancy? A systematic review. *Hum Reprod Update* **12**, 3-12.

Kowalcek I. (1998) Reproduktionsmedizin und Psychosomatik: Gegensatz, Widerspruch oder Annäherung? *Reproduktionsmedizin* **14**, 275-281.

Ludwig A.K., Diedrich K., Ludwig M., Felberbaum R. (2006) Fertilitätsstörungen und Sterilität. In: Kaufmann M., Costa S.D., Scharl A.(Hrsg.) Die Gynäkologie. 2. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 163-191.

Ludwig M., Schöpfer B., Katalinic A., Sturm R., Al-Hasani S., Diedrich K. (2000) Experience with the elective transfer of two embryos under the conditions of the German Embryo Protection Law; results of a retrospective data analysis of 1573 transfer cycles. *Hum Reprod* **15**, 319-324.

Ludwig M. und Diedrich K. (2003) Zehn Jahre ICSI, Teil 1: Indikationen, Grenzen, Hintergründe männlicher Subfertilität. *Gynäkologische Endokrinologie* **1**, 35-41.

Ludwig M., Kohl M., Krüger A., Löning M., Schröder A., Katalinic A., Diedrich K. (2004) Komplikationen bei höhergradigen Mehrlingsschwangerschaften für Mutter und Kinder. *Geburtsh Frauenheilk* **64**, 168-177.

Marshall J.C., Case G.D., Valk T.W., Corley K.P., Sauder S.E., Kelch R.P. (1983) Selective inhibition of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol. Mechanism for modulation of gonadotropin responses to low dose pulses of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Invest* **71**, 248-257.

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

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

Queenan J.T., Jr., Ramey J.W., Seltman W.J., Eure L., Veeck L.L., Muasher S.J. (1997) Transfer of cryopreserved-thawed pre-embryos in a cycle using exogenous steroids without prior gonadotrophin-releasing hormone agonist suppression yields favourable pregnancy results. *Hum Reprod* **12**, 1176-1180.

Rall W. F., Fahy G.M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* **313**, 573-5.

Rao C.V. (2001) Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertil Steril* **76**, 1097-1100.

Reshef E., Lei Z.M., Rao C.V., Pridham D.D., Chegini N., Luborsky J.L. (1990) The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* **70**, 421-430.

SART (2005) – Society for Assisted Reproduction Technology.

<http://www.sart.org> (Zugriff: 10.11.2007)

Sathanandan M., Macnamee M.C., Rainsbury P., Wick K., Brinsden P., Edwards R.G. (1991) Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: A prospective semi-randomized study. *Hum Reprod* **6**, 685-687.

Schill T., Strik D., Germer U. (1999) Sterilität und Fertilität. In: Holzgreve W., Jonat W., Schneider K.-Th. M.(Hrsg.) Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Schröder A., Banz C., Katalinic A., Al-Hasani S., Weiss J.M., Diedrich K., Ludwig M. (2002) Counselling on cryopreservation of pronucleated oocytes. *Reprod Biomed Online* **6**, 69-74.

Schröder A., Diedrich K., Küpker W. (2003) Vorzeitige Ovarialinsuffizienz - ein unterschätztes Krankheitsbild? *Gynäkologische Endokrinologie* **1**, 104-107.

Schultze-Mosgau A., Schill T., Strik D., Germer U. (2007) Sterilität und Infertilität. In: Diedrich K., Holzgreve W., Jonat W., Schultze-Mosgau A., Schneider K.T.M., Weiss J.M.(Hrsg.) *Gynäkologie & Geburtshilfe*. 2. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 97-122.

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

Shemesh M. (2001) Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproduction* **121**, 835-842.

Silbernagl S. und Despopoulos A. (2003) Hormone, Reproduktion. In: Silbernagl S., Despopoulos A.(Hrsg.): *Taschenatlas der Physiologie*. 6. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 266-309.

Simon A., Hurwitz A., Zentner B.S., Bdolah Y., Laufer N. (1998) Transfer of frozen-thawed embryos in artificially prepared cycles with and without prior gonadotrophin-releasing hormone agonist suppression: a prospective randomized study. *Hum Reprod* **13**, 2712-2717.

Stauber M. (2005) Sterilität und Infertilität. In: Stauber M. und Weyerstahl Th.(Hrsg.) Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 429-454.

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

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 programme. *Hum Reprod* **7**, 117-119.

Stephoe P.C. und Edwards R.G. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* **12**, 366.

Sutcliffe A.G. und Ludwig M. (2007) Outcome of assisted reproduction. *Lancet* **370**, 351-359.

Tesarik J., Hazout A., Mendoza C. (2003) Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function. *Reprod Biomed Online* **7**, 59-64.

Teschner A. und Hinrichsen M. (2005) Gynäkologische Endokrinologie. In: Stauber M., Weyerstahl Th. (Hrsg.) Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 78-133.

Thurin A., Hausken J., Hillensjö T., et al. (2004) Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med* **351**, 2392-2402.

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

Yee B., Lin Y.P., Chacon R.R., Soubra S., Rosen G.F., Cassidenti D.L. (1995) A simplified method of timing frozen embryo transfers. *Am J Obstet Gynecol* **172**, 1844-1848.

Ziecik A.J., Derecka-Reszka K., Rzucidlo S.J. (1992) Extragonadal gonadotropin receptors, their distribution and function. *J Physiol Pharmacol* **43** (Suppl. 1), 33-49.

## VII Lebenslauf

Name: Monika Weig  
Geburtsort: Pegnitz  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1989-1993 Grundschule Haste, Osnabrück  
1993-1995 Thomas-Morus-Schule, Orientierungsstufe in Osnabrück  
1995-2002 Angelaschule, Gymnasium in Osnabrück  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

WS 2002/03 Beginn: Studium der Humanmedizin an der  
Universität zu Lübeck  
August 2004 Ärztliche Vorprüfung  
WS 2007/08 Urlaubssemester  
Frühjahr 2009 Staatsexamen

### Promotion:

Herbst 2005 Beginn der Datenerhebung  
Herbst 2006 Beginn der Datenauswertung  
WS 2007/08 Schreiben der Promotionsarbeit

Famulaturen:

- Februar 2005: Unfallchirurgie, Marienhospital Osnabrück  
Februar 2006: Neurologie, Krankenhaus „Franz Tappeiner“, Meran, Italien  
März 2006: Notaufnahme Innere Medizin, UK-SH, Campus Lübeck  
August 2006: Innere Medizin, Nobles Hospital, Isle of Man, Großbritannien  
September 2006: Innere Medizin, Praxis Dr. Diekhoff, Osnabrück  
Februar 2007: Gynäkologie, Rudolfstiftung, Wien, Österreich  
Oktober 2007: Institut for Indian mother and child, Kalkutta, Indien

Praktisches Jahr, Beginn Februar 2008:

- 1.Tertial: Innere Medizin, Sana Kliniken Ostholstein, Eutin  
2.Tertial: Neurologie, UK-SH, Campus Lübeck  
3.Tertial: Chirurgie, Sana Kliniken Ostholstein, Eutin

## VIII Publikation

Griesinger G., Weig M., Schroer A., Diedrich K., Kolibianakis E.M. (2007)  
Mid-cycle serum levels of endogenous LH are not associated with the likelihood of pregnancy in artificial frozen-thawed embryo transfer cycles without pituitary suppression. *Hum Reprod* **22**, 2589-2593.

## IX Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Georg Griesinger danken für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit sowie die stets unverzügliche und zuverlässige Hilfe in sämtlichen Phasen der Promotion.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Al-Hasani für die Auskünfte bzgl. der Verfahren im Reproduktionslabor.

Desweiteren möchte ich mich bei den MTAs des Reproduktionslabors sowie den Schwestern der Poliklinik bedanken, die mir während der Datensuche die notwendigen Akten zur Verfügung stellten.

Meinen Schwestern Barbara und Eva sowie meinen Eltern danke ich ganz herzlich fürs Korrekturlesen und für ihre wertvollen Tipps zum Formatieren dieser Arbeit.

Auch Sabrina danke ich für die geduldige Unterstützung beim Überlisten des Eigenlebens meines Computers.

Bei Isi, Anne, Sabrina und allen anderen Freunden möchte ich mich bedanken, die mich insbesondere während des Schreibens der Arbeit ermutigt haben und mit denen ich eine unglaublich schöne und abwechslungsreiche Studienzeit in Lübeck erleben durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium mit der Promotion ermöglicht haben und mich dabei sowie bei all meinen anderen Aktivitäten immer liebevoll unterstützt haben. Herzlichen Dank!