

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich

---

**Prädiktiver Wert  
der frühfollikulären AMH- und Inhibin B-  
Konzentrationen sowie  
Korrelationen zwischen Zyklusparametern in der  
In- Vitro- Maturation**

**Dissertation**

Zum Erlangen des Doktorgrades  
der Universität zu Lübeck

- aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Leonie Wöltjen  
aus Lübeck  
Lübeck 2009

**1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Privatdozent Dr. med. Sören von Otte**

**2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Hartmut Merz**

**Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2010**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.07.2010**

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1 Bedeutung der Reproduktionsmedizin in der Gesellschaft .....	5
1.2 Das Ovar und die frühantrale Follikelzahl (AFC).....	7
1.3 Das Anti- Müller- Hormon (AMH).....	8
1.4 Inhibin B.....	11
1.5 Prädiktion der ovariellen Reserve .....	12
1.6 Die In- Vitro- Maturation.....	13
1.7 Fragestellung .....	17
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
2.1 Patientenkollektiv.....	19
2.2 Studiendesign .....	21
2.2.1 Allgemeines .....	21
2.2.2 Einverständniserklärung/ Ethikvotum.....	22
2.3 Erfasste Parameter .....	23
2.4 Behandlungsprotokolle .....	24
2.5 Analyse und Datengewinnung .....	30
2.5.1 Probenentnahme .....	30
2.5.2 Sonographie .....	30
2.5.3 Bestimmung von FSH.....	30
2.5.4 Bestimmung von LH .....	31
2.5.5 Bestimmung von Estradiol .....	32
2.5.7 Bestimmung von AMH .....	33
2.5.8 Bestimmung von Inhibin B .....	34

2.6 Statistik .....	36
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
3.1 Demographische Daten des behandelten Kollektivs.....	37
3.2 Ergebnisse des In- Vitro- Abschnitts.....	39
3.2.1 Endokrine Parameter .....	39
3.2.2 Eizellgewinnung, -reifung und -fertilisation .....	40
3.2.3 Behandlungserfolg/ Embryonentransfer .....	43
3.2.4 Korrelationen zwischen der Anzahl der Germinalvesikel und den verschiedenen Behandlungsparametern .....	44
3.2.5 Korrelationen zwischen der Anzahl der regelrecht fertilisierten Oozyten und den verschiedenen Behandlungsparametern .....	46
3.5.6 Das Anti- Müller- Hormon (AMH) und sein Bezug zum Alter und der Antralen Follikelzahl (AFC) .....	49
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>51</b>
4.1 Bedeutung und Bewertung der Studie .....	51
4.2 Prädiktiver Wert von AMH.....	54
4.3 Prädiktiver Wert von Inhibin B.....	55
4.4 Prädiktiver Wert der antralen Follikelzahl (AFC).....	56
4.5 Weitere Korrelationen zwischen Zyklusparametern.....	57
4.6 Sind prädiktive Tests möglich und sinnvoll? .....	59
4.7 Vor- und Nachteile der Patientenselektion.....	60
4.8. Offene Fragen der IVM .....	62
4.8.1 Gonadotropinpriming/ Ovulationsinduktion .....	62
4.8.2 Rolle der Follikeldominanz/ Punktionszeitpunkt.....	63
4.8.3 Reifungsmedium/ Wachstumsfaktoren .....	64
4.8.4 Langzeitentwicklung der IVM- Kinder .....	65

4.9 Ausblick .....	66
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>69</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>
<b>9. CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>79</b>

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Bedeutung der Reproduktionsmedizin in der Gesellschaft

Nach aktuellen Schätzungen ist eines von sechs Paaren in Deutschland, insgesamt zwei Millionen Paare, ungewollt kinderlos. Von ungewollter Kinderlosigkeit oder Sterilität spricht man, wenn es bei einem Paar innerhalb eines Jahres trotz ungeschütztem Geschlechtsverkehr nicht zu einer Schwangerschaft kommt. Die soziographischen Auswirkungen rückläufiger Geburtenzahlen sind gravierend. 2003 erreichte die Zahl der Geburten in Deutschland einen historischen Tiefstand von 715 000 Kindern<sup>15</sup>. Die Geburtenrate (d.h. die Anzahl der Kinder pro Frau) liegt in Westdeutschland seit Mitte der siebziger Jahre zwischen 1,3 und 1,4 Kindern. Bliebe es bei diesem Niveau oder käme es sogar zu einem weiteren Abfall, würde die Zahl der in Deutschland geborenen Kinder pro Generation um rund ein Drittel abnehmen. In der DDR nahm die Geburtenhäufigkeit in der zweiten Hälfte der siebziger Jahre zeitweise wieder zu, sank Anfang der neunziger Jahre aber wieder auf nur noch 0,8 Kinder pro Frau. Inzwischen hat die Geburtenhäufigkeit in den neuen Ländern wieder zugenommen und nähert sich dem Niveau der alten Bundesländer, ist aber mit etwa 1,1 Kindern pro Frau im Jahr 1998 noch immer deutlich niedriger als in den westlichen Bundesländern.

Vielfach wird vermutet, dass Zuwanderer das niedrigere Fertilitätsniveau der deutschen Bevölkerung ausgleichen könnten. Dies kann aber nicht erwartet werden, da sich die durchschnittliche Kinderzahl von Zuwanderern jener der einheimischen Bevölkerung mit der Zeit angleicht. Ohne weitere Zuwanderung und bei gleich bleibender Kinderzahl pro Frau würde die Bevölkerung in Deutschland bis zum Jahr 2050 von derzeit 82 Millionen auf voraussichtlich weniger als 60 Millionen sinken<sup>4</sup>.

Der Anteil der kinderlosen Paare wächst mit deren Ausbildungsniveau<sup>15</sup>. Insbesondere Akademiker mit langer und teurer Ausbildung verschieben die

Familienplanung in spätere Lebensabschnitte. Die meisten Paare konzentrieren sich zunächst auf die berufliche Karriere und die finanzielle Unabhängigkeit. So betrug das durchschnittliche Alter einer Frau bei der Geburt des ersten Kindes 2002 bereits 29 Jahre, im Vergleich dazu lag es 1970 im Durchschnitt noch bei 24 Jahren. Die Anzahl der über 35-jährigen Erstgebärenden hat sich von 1986 bis 2002 mehr als verdoppelt<sup>15</sup>. Bei dieser Entwicklung ist eine Zunahme der ungewollten Kinderlosigkeit zu erwarten, da die Fruchtbarkeit einer Frau mit 25 Jahren abzunehmen beginnt. Ihr fortgeschrittenes Alter ist daher der Hauptgrund dafür, dass Frauen Hilfe bei der Reproduktionsmedizin suchen. Die Ursache für die zunehmende Unfruchtbarkeit deutscher Paare liegt jedoch nicht nur an den Frauen. Auch das durchschnittliche Alter von Vätern steigt. Zudem deuten Studienergebnisse darauf hin, dass die Qualität des Spermias drastisch gesunken ist. Die Gründe dafür sind vielfältig, wie zum Beispiel möglicher Cannabiskonsum, Rauchen, Anabolika oder Umweltgifte. Nicht zuletzt aufgrund dieser Tatsachen gewinnt die Reproduktionsmedizin in der modernen westlichen Gesellschaft immer mehr an Bedeutung. Wegen ungewollter Kinderlosigkeit suchen jährlich 200000 Paare allein in der Bundesrepublik Deutschland den Rat eines Mediziners. Die Reproduktionsmedizin kann Paaren, für die aufgrund fortgeschrittenen Alters eine natürliche Befruchtung keine Erfolgsaussichten mehr hat, zu einer Schwangerschaft verhelfen. Hierbei ergibt sich zwangsläufig ein ethisches Problem: wo soll die Altersgrenze für eine Elternschaft liegen und wer soll darüber entscheiden? Aber auch in der Reproduktionsmedizin sinken die Chancen für eine erfolgreiche Behandlung mit dem Alter.

Die Gründe für die Infertilität von Paaren, die die Hilfe der Reproduktionsmedizin in Anspruch nehmen, sind vielfältig und nicht immer ist das Alter der einzige ursächliche Faktor. Dem Arzt obliegt es für jede Patientin die richtige Therapie und Vorgehensweise zu wählen. Eine große Bedeutung kommt hierbei Serummarkern zu, die möglicherweise die Erfolgsaussichten der Patientin bei Anwendung einer reproduktionsmedizinischen Maßnahme vorhersagen und so als Entscheidungshilfe dienen können.



## 1.2 Das Ovar und die frühantrale Follikelzahl (AFC)

Das Alter eines Ovars ist durch die Gesamtheit der vorhandenen Primärfollikel gekennzeichnet. Ein messbarer Parameter dieses Pools ist die Anzahl der wachsenden antralen Follikel pro Zyklus. Mit zunehmendem Alter einer Frau altert auch das Ovar, jedoch erweist sich dieser Zusammenhang im Vergleich von Frauen gleichen Alters als sehr variabel. Studien zeigen, dass auch junge Frauen bisweilen schon stark gealterte Ovarien haben<sup>50</sup>. Alle Primärfollikel einer Frau werden schon intrauterin im dritten bis vierten Schwangerschaftsmonat im weiblichen Embryo angelegt. Eine Neubildung ist danach nicht mehr möglich. Die ab der 12. Schwangerschaftswoche ca. sechs Millionen angelegten primären Eizellen reduzieren sich auf etwa eine Millionen Eizellen zum Zeitpunkt der Geburt. Aus diesen wird bis zum Eintritt in die Pubertät durch weitgehend unbekannte parakrine Mechanismen ein Pool von ca. 300 000 Eizellen rekrutiert, von denen wiederum nur etwa 450 zur Reifung gelangen<sup>17</sup>.

Im Zyklus der geschlechtsreifen Frau bewirkt der Abfall der Progesteron- und Inhibinbildung im zugrunde gehenden Corpus luteum des Vorzyklus einen prämenstruellen Anstieg des Follikel stimulierenden Hormons (FSH). Die bereits vorgereifte Follikelkohorte wächst zunächst FSH- abhängig heran. Im Zusammenspiel mit dem luteinisierenden Hormon (LH) bewirkt FSH eine vermehrte Aktivität der Aromatase und damit eine gesteigerte Östrogenproduktion in den Granulosazellen des Ovars. Über ein negatives Feedback des Östrogens wird die FSH- Produktion der Hypophyse gedrosselt und damit die Wachstumsstimulation auf die Follikel reduziert. Derjenige Follikel, der den größten Wachstumsvorsprung aufweist, genug eigenes Östrogen produziert und damit unabhängig vom FSH geworden ist, kann als dominanter Follikel die Ovulationsreife erlangen. Der Großteil der Kohorte jedoch wird durch den FSH- Abfall atretisch. Die pro Zyklus heranreifende Follikelkohorte, der so genannte Antrale Follikel Count (AFC), kann per Ultraschall am Anfang eines Zyklus bestimmt werden und gilt als Marker der ovariellen Reserve, welche durch die maximale Anzahl an Follikeln, die unter Stimulation zum Wachsen angeregt werden können,

definiert ist <sup>41</sup>. Der AFC zeigt in Studien eine signifikante Korrelation ( $r=0,5$ ) zu den gewonnenen Eizellen bei der In- Vitro- Fertilisation (IVF) und zum Erfolg dieser Behandlung in Form einer Schwangerschaft. Es besteht zudem eine positive Korrelation vom AFC, zu Serummarkern wie Inhibin B und dem Anti- Müller- Hormon (AMH), sowie eine negative Korrelation zu FSH und zum Alter der Patientin <sup>41</sup>. Dies legt nahe den AFC als einen guten Marker der ovariellen Reserve anzusehen. Der nicht zu unterschätzende Nachteil des AFC ist jedoch seine Abhängigkeit vom jeweiligen Untersucher bzw. dem verwendeten Ultraschallgerät, das heißt seine hohe Inter- Observer- Variabilität. Diese bezeichnet eine hohe Messvariabilität bei wechselndem Untersucher und gleichen Messbedingungen. Damit wird der AFC zu einem subjektiven Marker, zumal die Anzahl der antralen Follikel von Zyklus zu Zyklus einer Frau variieren kann.

### 1.3 Das Anti- Müller- Hormon (AMH)

Eine Alternative zum AFC als Marker der ovariellen Reserve stellt das Anti- Müller- Hormon (AMH) dar. Dieses ist ein Glykoprotein, das als Homodimer ein Gewicht von 140 kDa aufweist und zur TGF- $\beta$ -Familie gehört. Das Hormon ist bekannt für seine Rolle in der embryonalen und postnatalen Genitalentwicklung. Beim männlichen Embryo werden die angelegten Müllergänge durch das in den Sertolizellen gebildete AMH zurückgebildet, während das Wachstum der Wolffgänge durch Androgene stimuliert wird. Bei zahlreichen Fehlentwicklungen der Genitalien wie Intersexualität oder *androgen insensitivity* ist AMH als Marker in der Diagnosefindung gefragt <sup>26</sup>. In der Kindheit scheint AMH eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die AMH- Spiegel im Serum sind bis zur Pubertät kaum messbar. Mit dem Eintritt in die Pubertät kommt AMH wieder stärkere Bedeutung zu. Beim Mann steigt die AMH-Produktion mit dem vermehrt gebildeten Testosteron im männlichen Hoden wieder an. Studien belegen, dass die Sertolizellen das AMH androgenabhängig in das Lumen der Samengänge abgeben. Dabei bleiben die im Plasma gemessenen Spiegel stets niedriger

als die in der Samenflüssigkeit, was wiederum eine lokale Wirkung vermuten lässt<sup>44</sup>. AMH scheint außerdem die Produktion von Testosteron in den Theca- Zellen des Hodens zu beeinflussen<sup>28</sup>. Andere Studien belegen, dass AMH in der Samenflüssigkeit als Marker der Spermatogenese bedeutsam ist<sup>23</sup>. Der Anteil an AMH in der Samenflüssigkeit und im Serum von Männern mit bekannter Störung der Spermatogenese ist signifikant niedriger als der von AMH in der Samenflüssigkeit der normal fruchtbaren Vergleichsgruppe<sup>1</sup>. In wie weit AMH als Marker der Spermatogenese genutzt werden kann, müssen zukünftige Studien noch zeigen.

Die Rolle von AMH als Marker der ovariellen Reserve der Frau ist dagegen bereits Gegenstand zahlreicher Forschungen. AMH wird im weiblichen Ovar von den Granulosazellen antraler und frühantraler Follikel gebildet. Je weiter sich der Follikel entwickelt, desto stärker wird die AMH-Produktion gedrosselt, um schließlich im Stadium der FSH- abhängigen Wachstumsphase vollständig zum Erliegen zu kommen. Am stärksten ist die AMH- Produktion in kleinen antralen Follikeln mit einem Durchmesser unter 4 mm und sistiert größtenteils in Follikeln ab einer Größe von 12 mm Durchmesser<sup>15</sup>. Vereinzelt Studien legen den Schluss nahe, dass AMH nicht nur die Menge der vorhandenen kleinen Follikel widerspiegelt, sondern auch von der einzelnen Fähigkeit jedes Follikels AMH zu produzieren und damit von dessen Qualität abhängt<sup>20</sup>. Studien an Mäusen mit gentechnisch ausgeschalteter AMH- Produktion zeigen, dass diese eine größere Kohorte an Primärfollikeln pro Zyklus und geringere FSH- Spiegel im Serum aufweisen. Durch die größere Anzahl von Follikeln pro Zyklus tritt bei diesen Mäusen die Menopause früher ein, da der Follikelpool früher „aufgebraucht“ ist<sup>16</sup>. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass AMH das FSH- abhängige Wachstum der Follikel hemmt und damit insgesamt einen hemmenden Einfluss auf die Follikelkohorte hat. Zudem ist bekannt, dass AMH die FSH- abhängige Zunahme der Aromatase und die Expression von LH-Rezeptoren auf Granulosazellen bremst<sup>15</sup>. Dies scheint während der Selektion des dominanten Follikels eine entscheidende Rolle zu spielen. Derjenige Follikel, der am wenigsten AMH produziert, benötigt die geringsten Mengen an FSH- Stimulation zum Wachsen und ist somit

befähigt als dominanter Follikel zum Eisprung zu kommen<sup>54</sup>. Mit zunehmender Luteinisierung des Follikels sinkt die Produktion von AMH im Follikel und ist in atretischen Follikeln nicht mehr nachweisbar<sup>20</sup>. Mit fortschreitendem Alter einer Frau sinkt der im Serum gemessene AMH-Spiegel kontinuierlich ab, was als Zeichen des abnehmenden Follikelpools zu werten ist<sup>54</sup>. AMH wird folglich in zahlreichen Studien als ein Marker der ovariellen Reserve bzw. des ovariellen Alters untersucht.

Darüber hinaus scheint AMH auch als Serummarker in der ovariellen Pathophysiologie wie dem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) eine Rolle zu spielen. Das PCO- Syndrom ist die häufigste endokrine Erkrankung der Frau im gebärfähigen Alter<sup>24</sup> und ist unter anderem durch erhöhte Konzentrationen von Androgenen gekennzeichnet. Deutschlandweit sind mehr als eine Million Frauen von dieser Erkrankung betroffen. Das Ovar produziert in den Thekazellen unter dem Einfluss von LH Testosteron, das zum Teil in den Granulosazellen in Östrogene umgewandelt wird. Erhöhte Spiegel von Androgenen bei Frauen mit PCO- Syndrom hemmen die Follikelreifung und die pulsatile Freisetzung der hypophysären Gonadotropine. Im Ultraschall imponieren die Ovarien in dem Fall oft als „polyzystisch“ mit vielen, kleinen und randständigen Follikeln, die meist kleiner als ein Zentimeter sind. Die PCO- Patienten zeigen Oligomenorrhoe bzw. Amenorrhoe und aufgrund einer gehäuft nachweisbaren Insulinresistenz Störungen im Glukosestoffwechsel bis hin zum Diabetes mellitus Typ 2 im Rahmen eines metabolischen Syndroms. Wie das Vorkommen einer Vielzahl an kleinen Follikeln vermuten lässt, weisen PCO- Frauen erhöhte AMH- Spiegel auf<sup>22</sup>. Da diese sowohl im Serum als auch in der Follikelflüssigkeit erhöht sind, scheinen die vorhandenen Follikel auch mehr AMH zu produzieren<sup>54</sup>. Zudem ist die Aktivität der Aromatase in PCO- Frauen vermindert, was auch auf die Wirkung von AMH zurück zu führen sein könnte. Studien zeigen, dass der AMH- Spiegel in PCO- Patientinnen mit zahlreichen klinischen Daten wie der Zykluslänge, der Zyklusdauer und dem Androgenspiegel korreliert<sup>43</sup>. Über die genaueren Zusammenhänge zwischen AMH und dieser Erkrankung ist darüber hinaus noch wenig bekannt.

Im Gegensatz zu anderen Markern scheint der AMH- Spiegel während eines Zyklus sowie während einer Schwangerschaft relativ konstant zu bleiben und zeigt keine nennenswerte Abhängigkeit von Gonadotropinregelkreisen<sup>11; 53; 34</sup>. Weiterhin wurde demonstriert, dass der AMH- Spiegel schon sehr frühzeitig mit zunehmendem ovariellen Alter sinkt. Andere Marker der ovariellen Reserve wie z.B. FSH zeigen erst dann eine Veränderung ihres Serumspiegels, wenn schon eine starke Alterung des Ovars stattgefunden hat<sup>5</sup>. Viele Studien haben AMH als Marker des ovariellen Alterns bestätigt. So wurde nachgewiesen, dass AMH eine stärkere Korrelation zum AFC aufweist als andere Marker der ovariellen Reserve wie FSH, Inhibin B und Estradiol<sup>54; 5</sup>.

## 1.4 Inhibin B

Ein weiterer diskutierter Marker der ovariellen Reserve ist Inhibin B. Inhibin B ist ein Heterodimer, das wie AMH zur TGF- $\beta$  Familie gehört und wie dieses von den Granulosazellen des Ovars und den Sertolizellen des Testis gebildet wird. Inhibin B ist Teil eines Gonadotropinregelkreises, der die Selektion des dominanten Follikels steuert. Zusammen mit Estradiol steigt es mit der zunehmenden Follikelreifung an und führt zu einer verminderten FSH- Ausschüttung aus der Hypophyse. Folglich ist Inhibin B starken zyklischen Schwankungen unterworfen. Den Höhepunkt erreicht die Sekretion an Zyklustag 5-6 und fällt dann in der Lutealphase in den kaum mehr messbaren Bereich ab<sup>41</sup>. Diese Tatsache macht Inhibin B problematisch als Marker der ovariellen Reserve, zumal es bei externer Gonadotropin- Stimulation z.B. bei der IVF in seinem Serumspiegel beeinflusst wird. Zur Verwendung von Inhibin B als prädiktiver Marker der ovariellen Reserve muss daher eine Serumbestimmung an exakt den gleichen Zyklustagen angestrebt werden. Zahlreiche Studien zur Bedeutung von Inhibin B mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen spiegeln dieses Problem wider<sup>33; 18; 12; 13</sup>. Eine Studie von Talia et al. prüfte den prädiktiven Wert von Inhibin B im Serum nach Verabreichung von exogenem FSH bei der IVF- Behandlung. Es zeigt sich eine deutliche Korrelation zu den

gewonnenen Eizellen in der IVF- Behandlung <sup>49</sup>. Inhibin B zeigt eine negative Korrelation zum Alter, zum Nikotinabusus der Patientin und zu ihrem Bodymaßindex, was vermuten lässt, dass diese Parameter die ovarielle Reserve verringern <sup>35</sup>. Andere Studien zeigen, dass die Serumspiegel von Inhibin B bei PCO- Frauen signifikant höher sind als in der Vergleichsgruppe und eine Korrelation zum gemessenen AMH- Spiegel vorliegt <sup>31</sup>.

## 1.5 Prädiktion der ovariellen Reserve

Die Beurteilung des ovariellen biologischen Alters bzw. der ovariellen Reserve ist insbesondere in der Reproduktionsmedizin von großer Wichtigkeit. Patientinnen gleichen chronologischen Alters reagieren oft völlig unterschiedlich auf die Gonadotropin- Stimulation in IVF- Zyklen. AMH bietet sich hier als Marker der ovariellen Reserve an. AMH zeigt eine lineare Korrelation zu den aus der IVF- Behandlung resultierenden Eizellen ( $r=0,25$ ,  $P<0,001$ ). Die Signifikanz ist dabei deutlich stärker als bei den Markern FSH und Inhibin B, die ebenfalls eine lineare Korrelation aufweisen. Keiner dieser Marker scheint allerdings als alleiniger prädiktiver Marker der ovariellen Reserve ideal zu sein. Die besten prädiktiven Aussagen zeigten sich bei einer Kombination all dieser Parameter <sup>40</sup>. Andere Studien erhalten die besten Ergebnisse mit der Kombination von AMH und Inhibin B oder auch mit AFC als alleinigem Prädiktor <sup>49</sup>.

Auch so genannte „Poor- responder“ bei der IVF-Behandlung scheinen vermehrt kaum nachweisbare Serumspiegel an AMH zu haben. Es kommen jedoch auch bei den Frauen, die eine gute Ansprechbarkeit auf Gonadotropin- Stimulation haben, vereinzelt kaum messbare AMH-Spiegel vor <sup>40</sup>. Die „High- responder“ mit besonders vielen gewonnenen Eizellen nach IVF zeigen höhere AMH-, Inhibin B- und Östradiolspiegel sowie einen höheren AFC und größere ovarielle Volumina <sup>49</sup>.

Das Ziel der reproduktionsmedizinischen Therapie stellt eine erfolgreiche Behandlung durch Eintritt einer Schwangerschaft dar. Von Beginn an gab es Bestrebungen den Behandlungserfolg mit Hilfe prädiktiver Marker

vorherzusagen. Als einfach bestimmbare Parameter wurde daher schon früh die Eignung von Serummarkern für eine Vorhersage einer Schwangerschaft untersucht. Hier scheint der Höhe des AMH- Spiegels im Gegensatz zu Östradiol, Inhibin B oder dem sonographisch bestimmten AFC eine Bedeutung zuzukommen<sup>27</sup>. Die resultierende Korrelation vom AFC zum Behandlungserfolg ist allerdings eher gering ausgeprägt<sup>49</sup>. Zum Eintritt einer Schwangerschaft bedarf es neben den Voraussetzungen, die an das weibliche Ovar gestellt werden, zahlreicher anderer Faktoren wie Spermaqualität, anatomische Gegebenheiten und Faktoren, die die Einnistung und Reifung der Eizellen beeinflussen. Es ist daher unklar ob Serummarker eine sichere Vorhersage des Behandlungserfolges (gewinnbare Eizellzahl, Eintritt einer Schwangerschaft usw.) leisten können.

## 1.6 Die In- Vitro- Maturation

Die Rolle von AMH und Inhibin B in der Sterilitätsbehandlung in Form der In-Vitro-Fertilisation (IVF) wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht.

Bei der IVF handelt es sich im Gegensatz zur IVM um eine künstliche Stimulation des Ovars mit hochgereinigtem urinärem oder gentechnisch rekombinantem Gonadotropin in einer höheren Dosis, als es der Körper normalerweise produzieren würde. Dies wird mit GnRH- Analoga (Antagonisten und Agonisten) kombiniert um den endogenen ovulatorischen LH- Anstieg zu verhindern. Der daraus resultierende FSH- Anstieg im Ovar ermöglicht es insbesondere den atresiegefährdeten Follikeln, die nachweislich einen erhöhten FSH- Bedarf aufweisen<sup>10</sup>, bis zur präovulatorischen Reife heranzureifen. Auf diese Weise können pro Zyklus gleich mehrere Follikel punktiert werden. Auch die Anzahl der entstehenden Embryonen und damit auch die Chance auf einen Therapieerfolg werden erhöht.

Ein modernes Verfahren in der Reproduktionsmedizin, das nicht mit überstimulierten Zyklen arbeitet, ist die In-Vitro-Maturation (IVM).

Bei diesem Verfahren werden unreife Eizellen des GV- oder M1- Stadiums eines normalen Zyklus oder in niedrig dosierten Stimulationszyklen („Priming“) aus dem Ovar entnommen und reifen in vitro zum M2- Stadium nach. Die Möglichkeit Eizellen außerhalb des Körpers reifen zu lassen wurde erstmals in den 60er Jahren durch Edwards et al.<sup>19</sup> beschrieben und führte 1991 zur ersten Schwangerschaft nach IVM durch Cha et al.<sup>7</sup>. In dieser Studie wurden die unreifen Eizellen aus chirurgisch entfernten Gewebeproben des Ovars gewonnen. Trounson et al. nutzte als erste Gruppe die transvaginale Follikelpunktion zur Gewinnung unreifer Eizellen für die IVM bei PCO – Patienten<sup>52</sup>.

Der Zyklus einer IVM Behandlung beginnt üblicherweise mit einem Ultraschall an den ersten drei Zyklustagen einer Patientin sowie einer Blutentnahme zur Messung von FSH, LH, Östradiol und Progesteron. Der Ultraschall dient zur Bestimmung des AFC (s.o.) und durch die Parameter im Blut sollen endokrine Pathologien wie Ovarialzysten oder eine unvollständige Regression des Corpus luteum ausgeschlossen werden. Die Zweckmäßigkeit eines zweiten Ultraschalls am sechsten bis achten Zyklustag ist umstritten, kann aber zur Kontrolle des folliculären Wachstums und der Endometriumdicke genutzt werden.

An den Zyklustagen drei bis sechs kann ein niedrig dosiertes Gonadotropinpräparat, gefolgt von hCG zur Ovulationsinduktion, die Anzahl der Eizellen und ihr Wachstum in vitro positiv beeinflussen<sup>7, 58</sup>. Der Einfluss auf den Behandlungserfolg und damit der Nutzen dieser Maßnahme ist allerdings umstritten<sup>37</sup>. In lokaler oder allgemeiner Betäubung werden die Eizellen transvaginal mit Hilfe eines hochauflösenden Ultraschallgerätes und einer speziellen Aspirationsnadel punktiert. Der Zeitpunkt der Punktion wird anhand der Größe des Leitfollikels gewählt, wobei Unstimmigkeit herrscht bei welcher Größe die Punktion stattfinden sollte<sup>38; 9</sup>. Wird hCG zur Ovulationsinduktion gegeben, sollte die Punktion 36 Stunden danach stattfinden. Das gewonnene Aspirat wird anhand des Dissektionsmikroskops und mit Hilfe von Filtersystemen auf Eizellen durchsucht. Diese werden üblicherweise in komplexen Medien unter variabler Zugabe von Gonadotropinen 24 bis 28 Stunden bis zur Reifung kultiviert und anschließend mit Intra- Cytoplasmatischer- Spermien-



Injektion (ICSI) befruchtet. Das Endometrium sollte in der Zwischenzeit durch subkutane Gabe von Östrogenen und Progesteron unmittelbar vor dem Embryonentransfer zur Reifung gebracht werden <sup>56</sup>. Maximal drei Embryonen werden an Tag 3 mit Hilfe eines speziellen Katheters in die Gebärmutter transferiert. Die durch dieses Verfahren möglichen Schwangerschaftsraten nehmen in den letzten Jahren kontinuierlich zu <sup>8</sup>, es wird von Schwangerschaftsraten bis zu 27 Prozent berichtet <sup>6</sup>. Im Vergleich dazu werden bei der schon viel etablierteren IVF Schwangerschaftsraten je nach Alter zwischen 13 und 36 Prozent erreicht. Bedenkt man, dass in natürlichen Zyklen eines gesunden, normal fruchtbaren Paares von 35 Jahren auch nur eine Chance von 25- 29 Prozent besteht schwanger zu werden, sind die Ergebnisse der IVM beachtlich <sup>15</sup>.

Im Vergleich zur In- Vitro- Fertilisation hat die IVM erhebliche Vorteile: Die Behandlung ist durch Wegfall der hohen Gonadotropingabe weniger invasiv und es entfallen die Nebenwirkungen der ovariellen Überstimulation wie Stimmungsschwankungen, Depressionen, Hitzewallungen, Schwindel, Sehstörungen, Kopfschmerzen und Bauchbeschwerden durch die vergrößerten Ovarien oder gar das gefürchtete Hyperstimulationssyndrom (OHSS). Diese Komplikation droht immer dann, wenn sehr viele Follikel punktiert werden, das heißt mehr als 10 Follikel pro Eierstock. Bei der mildereren Verlaufsform des OHSS, die mit einer Häufigkeit von 8-23 Prozent auftritt, kommt es nach der Ovulationsauslösung zu Unterleibsschmerzen und Erbrechen. In dem Fall genügt eine konservative Therapie. Tritt allerdings die schwerere Verlaufsform der OHSS auf, die eine Häufigkeit von ca. 7 bis 10 Prozent aufweist, muss die Patientin wegen freier Flüssigkeit im Bauch- oder schlimmstenfalls im Brustraum stationär behandelt werden. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung beruht auf einer erhöhten Durchlässigkeit der peritonealen Kapillaren. Als Folge davon tritt Aszites, Hypovolämie und Hämokonzentration mit erhöhter Koagulabilität auf. Im Extremfall kann dies zu einer Minderdurchblutung, zu akutem Nierenversagen oder zum Tod führen <sup>15; 45</sup>. Besonders gefährdet für das OHSS sind Frauen mit PCO- Syndrom, die eine erhöhte Gonadotropinempfindlichkeit aufweisen. Insbesondere für diese Frauen ist die IVM folglich eine Alternative ohne das Risiko, das mit einer ovariellen

Überstimulation einhergeht. Bei den geringen Hormonmengen, die bei der IVM verwandt werden, sind im Gegensatz zur IVF bisher nahezu keine Nebenwirkungen aufgetreten<sup>56</sup>. Ein weiterer Vorteil der IVM ist eine Kostenreduktion durch den geringeren Hormonverbrauch und ein geringerer Zeitaufwand für die Patientin und die behandelnde Klinik in der Vorbereitung der Follikelpunktion. Die Kosten für die IVM –Behandlung betragen etwa zwei Drittel der Kosten für eine IVF- Behandlung von ca. 3000 Euro. Zu diskutieren wäre hierbei allerdings die Tatsache, dass die Erfolgsrate bei IVF derzeit noch deutlich höher liegt als bei der IVM und sich damit die Kostenersparnis relativiert<sup>55</sup>.

Es scheint in Studien sogar Hinweise darauf zu geben, dass die IVM sich zudem auch für so genannte „Poor- responder“ eignet, deren Ovarien in der IVF- Behandlung nicht oder nur unzureichend auf die Hormonstimulation reagieren und so nur wenige Follikel punktiert werden können<sup>46</sup>.

Die Nachteile der IVM- Methode sind der vermehrte Nährmedienvverbrauch, die etwas kompliziertere Durchführung der Follikelpunktion und die geringeren Erfolgsaussichten. Es ist allerdings zu erwarten, dass die Erfolgsquoten der IVM mit der Zahl der Anwendungen und der zunehmenden Etablierung ansteigen werden<sup>56</sup>.

Weltweit sind bereits über 800 Geburten nach IVM dokumentiert, in Deutschland wenden nur die Universitätskliniken Heidelberg und Lübeck dieses Verfahren an. Nachdem Lübeck Anfang 2005 die IVM- Behandlung einführte, kam im Dezember 2005 das erste Kind nach einer IVM- Behandlung in Deutschland zur Welt (gesunder Junge, 4030g, 52cm Länge, Kopfumfang 35cm, APGAR 9/10/10). Welche Spätfolgen die Reifung der Eizellen außerhalb des Körpers für die durch IVM gezeugten Kinder haben könnte, lässt sich erst im Rahmen längerer Nachbeobachtungen beurteilen.

## 1.7 Fragestellung

Gerade bei einer relativ jungen Methode wie der In- Vitro- Maturation sind Parameter von Bedeutung, die eine Vorhersage des Behandlungserfolges zulassen. Anhand passender Serummarker wäre vor Beginn einer Therapie eine differenziertere Aufklärung der Patientin möglich und eventuell eine Suche nach Alternativen zur Reproduktionsmedizin wie Adoption sinnvoll. Nicht zuletzt ergibt sich durch immer knapper werdende Mittel die Notwendigkeit die Erfolgsaussichten einer Behandlung kritisch zu hinterfragen. Das Vorhandensein von Ausschlusskriterien für eine Behandlung ist dabei nicht als Diskriminierung eines Paares, sondern unter anderem zu dessen Schutz gedacht. Zahlreichen Paaren, die sich einer solchen Therapie unterziehen, ließe sich viel an Frustration und falscher Hoffnung ersparen, wenn dem behandelnden Arzt eine Vorhersage über den Behandlungserfolg möglich wäre. Da die psychische Belastung, die auf Paare mit Kinderwunsch bei ergebnislosen Versuchen der Reproduktionsmedizin zukommt, nicht zu unterschätzen ist, geht es bei der Frage nach einer Vorhersage des Therapieerfolges auch um die psychische Gesundheit der Patienten.

Es stellt sich allerdings die Frage, ob eine Vorhersage des Behandlungserfolges durch die bisher bekannten Parameter möglich ist. Es wäre fatal, wenn aufgrund unzuverlässiger Parameter Patientinnen von der Behandlung ausgeschlossen würden oder von sich aus eine an sich viel versprechende Behandlung nicht durchführen würden. Von Seiten der Krankenkassen besteht die Gefahr, dass diese die Kostenübernahme der Behandlung von diesen klinischen Parametern abhängig machen, was für viele Paare gravierende finanzielle Folgen hätte. Daher sollte von prädiktiven Parametern hier nur mit äußerster Vorsicht gesprochen werden. Eine Vorhersage für das Eintreten einer Schwangerschaft anhand von Behandlungsparametern scheint bisher noch nicht möglich zu sein.

Die Möglichkeit durch Serummarker die Reaktionen des Ovars vorherzusagen birgt jedoch auch die Möglichkeit die Therapie so individuell wie möglich zu gestalten um zum Beispiel die Intensität der benötigten

Hormonstimulation oder den perfekten Zeitpunkt der Follikelpunktion bestimmen zu können.

Durch die IVM- Behandlung haben Patienten und Ärzte erstmals die Möglichkeit der Auswahl zwischen der hochdosierten Hormonstimulation und der Follikelpunktion ohne vorherige Hormonbehandlung im Rahmen der IVM- Behandlung. Dies bedarf neuer Parameter, mit Hilfe derer die oben genannte Auswahl getroffen werden kann, um für jede Patientin die Behandlung zu wählen, bei der die größten Erfolgsaussichten bestehen. Der Arzt muss in der Lage sein eine Diagnostik durchzuführen, die ihn den Therapieerfolg beider Behandlungen abschätzen lässt. Allerdings stellt eine maßgeschneiderte Infertilitätsbehandlung noch kein absehbares Ziel dar. Dazu bedarf es noch zahlreicher Forschungen in diesem Themengebiet. Mit dieser Studie sollen die Korrelationen zwischen den bereits bei der IVF neu diskutierten Parametern der ovariellen Reserve, dem AMH und dem Inhibin B, mit der Anzahl der gewonnenen Eizellen bei IVM und dem Behandlungserfolg bestimmt werden. Zudem werden etablierte Parameter der ovariellen Reserve wie basales Östradiol und FSH sowie der AFC auf Korrelationen untereinander und auf ihren möglichen prädiktiven Wert für den Behandlungserfolg untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Für die folgenden Untersuchungen wurden Blutproben von 146 Frauen verwendet, die sich im Rahmen der Kinderwunschsprechstunde an der Universität zu Lübeck vorstellten und sich einer Sterilitätsbehandlung unterzogen. In diesem Rahmen wurde den Patientinnen nach Aufklärung über Vor- und Nachteile das Angebot zur IVM- Behandlung unterbreitet.

Die Follikelpunktionen der Patientinnen wurden vom 22.11.2004 bis zum 21.07.2006 durchgeführt. Der Start der IVM- Behandlung selbst begann jeweils einige Monate vorher.

Von den 146 Patientinnen wurden 81, deren Daten vollständig erhoben und dokumentiert und deren Seren in ausreichender Menge eingefroren wurden, für diese Studie retrospektiv herangezogen. Die Daten der übrigen 65 Patientinnen wurde aus folgenden Gründen nicht weiter berücksichtigt: Bei sechs Patientinnen war die Anamnese unvollständig dokumentiert, bei 17 war die antrale Follikelzahl nicht schriftlich festgehalten worden, bei sechs Patientinnen war die Blutprobe an Tag vier oder später abgenommen worden und bei den übrigen 36 Patientinnen war das Serum lipämisch und daher nicht zur Bestimmung von AMH und Inhibin B geeignet oder lag nicht zur Bestimmung vor.

In das Kollektiv eingeschlossen wurden Patientinnen mit primärer oder sekundärer Sterilität im Alter von mindestens 18 und höchstens 41 Jahren. Des Weiteren wiesen die Patientinnen einen regelmäßigen Menstruationszyklus zwischen 25 und 35 Tagen (Gruppe 1) oder eine Oligo- oder Amenorrhö im Rahmen eines PCO- Syndroms gemäß den Kriterien der Rotterdam- Konsensus- Konferenz 2003 (Gruppe 2) auf. Die Infertilität war ursächlich auf tubare oder männliche Faktoren bzw. ein PCO- Syndrom zurück zu führen, das heißt auch, dass noch beide Ovarien intakt waren und die Patientinnen ein unauffälliges Cavum uteri aufwiesen (Endometriumdicke < 4mm, keine Polypen o. ä.). Jede der Patientinnen

hatte sich bereits mindestens einmal einer IVF- oder ICSI- Behandlung unterzogen.

Vor Beginn der Studie wurden eine Schwangerschaft und Infektionen wie HIV und Hepatitis B und C mittels Serologie ausgeschlossen. Der Röteltiter musste einen ausreichenden Immunschutz gewähren. Schlussendlich musste eine schriftliche Einverständniserklärung zwingend vorliegen, in der sich jede Patientin bereit erklärte den Vorgaben des Studienprotokolls zu folgen.

Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit Zeichen beginnender Einschränkung der ovariellen Reserve wie einem basalem FSH- Spiegel über 10 IU/ ml oder Patientinnen, die mehrmalig als so genannte „low responder“ mit gewonnenen Eizellzahlen von weniger als vier Oozyten in vorhergehenden IVF- oder ICSI- Zyklen aufgefallen waren.

Ebenfalls von der Studie ausgeschlossen wurden Patientinnen mit einer sonographisch bestimmten Follikelzahl unter sechs Follikeln beidseits oder einem pathologischen Erstultraschall bzw. dem Nachweis endometrialer Pathologien. Auch die Notwendigkeit Kryosperma oder Spermien aus Hodenbiopsaten (TESE) zu verwenden, galt als Ausschlusskriterium. Nicht teilnehmen durften weiterhin Patientinnen, deren Gewicht mehr als 100 kg betrug bzw. mit einem BMI von über 30, da die Follikelaspiration unter diesen Bedingungen erwartungsgemäß schwierig durchzuführen gewesen wäre.

Bei jedem Paar erfolgte im Vorfeld eine Karyotypisierung um genetische Ursachen der bestehenden Infertilität auszuschließen.

<i>Einschlusskriterien</i>	<i>Ausschlusskriterien</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frauen von 18 bis 41 Jahre</li> <li>• Indikation zur ART</li> <li>• Zyklus regularis (25- 35d) oder PCO- Syndrom</li> <li>• Max. Gewicht 100 kg</li> <li>• Einverständniserklärung</li> <li>• Beide Ovarien und unauffälliges Cavum uteri vorhanden</li> <li>• Bereits erfolgte IVF- oder ICSI- Behandlung</li> <li>• Infertilität beruht auf tubaren oder männlichen Faktoren oder PCOS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduzierte ovarielle Reserve (low response, FSH basal &gt;10 IU/ml)</li> <li>• AFC gesamt &lt; 6 an Zyklustag 1-3</li> <li>• Auffälliger Erstultraschall (Zyste, Endometriose, multiple Myome)</li> <li>• Kryosperma oder TESE</li> <li>• Hepatitis C/ B</li> </ul>

**Tab. 1 Patientenselektion:** Festgelegte Ein- und Ausschlusskriterien zur Selektion der Patientinnen, die zur IVM- Studie zugelassen wurden

## 2.2 Studiendesign

### 2.2.1 Allgemeines

Es handelt sich bei der Studie um eine retrospektive Datenanalyse von IVM- Patientinnen der Universität zu Lübeck. Die IVM- Studie begann bei jeder Patientin mit einem Erstgespräch und einer ausführlichen Aufklärung über Vor- und Nachteile bzw. Risiken der IVM- Behandlung. Mittels einer anschließenden Blutentnahme und eines Ultraschalls wurden pathologische Befunde, die ein Ausschlusskriterium darstellen könnten, ausgeschlossen. Waren die oben genannten Voraussetzungen zur Teilnahme an der Studie gegeben, stellten sich die Patientinnen an Tag 1 bis 3 des folgenden Zyklus (erster Tag definiert als erster Tag mit morgendlicher Menstruation) wieder in der Sterilitätssprechstunde vor. Zur Bestimmung der Follikelzahl (AFC)

wurde ein Basisultraschall durchgeführt und mittels einer Blutentnahme wurden die Hormone FSH, Estradiol, Progesteron und LH im Serum bestimmt. Ein Teil der Seren wurde zur späteren Bestimmung von AMH und Inhibin B bei -20°C eingefroren.

Ziel dieser Studie ist es das Vorhandensein von Korrelationen zwischen den oben genannten endokrinen Parametern, der sonographisch sichtbaren Follikelzahl (AFC), der Anzahl gewonnener Eizellen und Parametern des IVF- Labors wie Maturations- und Fertilisationsrate sowie die Qualität der resultierenden Embryonen zu überprüfen.

### **2.2.2 Einverständniserklärung/ Ethikvotum**

Die Methode der IVM wurde nach Einholung eines Ethikvotums (Aktenzeichen 01- 105 von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Lübeck) im September 2004 an der Klinik für Frauen- und Geburtshilfe in Lübeck eingeführt.

Es lag eine schriftliche Einverständniserklärung der Studienteilnehmerinnen zur Teilnahme an der Studie, zur anonymen Auswertung und gegebenenfalls zur Publikation der gewonnenen Daten vor. Die Studienteilnehmerinnen konnten die Behandlung zu jedem Zeitpunkt der Behandlung ohne Angabe von Gründen beenden. Die Behandlung war für die Patientinnen während der ersten Behandlungszyklen kostenfrei. Bestandteil der Aufklärung war auch die fehlende Datenlage zur Langzeitentwicklung der nach IVM geborenen Kinder. Um diesem Problem Abhilfe zu schaffen wurde die Durchführung eines neuropädiatrischen Follow- Up durch die neuropädiatrische Sprechstunde der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Professor Sperner angeboten. Dieses Follow- Up beinhaltete eine somatisch orientierte Untersuchung zum Ausschluss von Malformationen sowie eine neurologische bzw. entwicklungsneurologische Untersuchung mithilfe etablierter Tests wie der Albert- Infant- Motor- Scale oder dem Griffith- Test (Tabelle 2).



<b>Untersuchung</b>	
<b>3 Monate</b>	<b>Albert- Infant- Motor- Scale</b> Neurologische Entwicklung+ körperliche Basisuntersuchung
<b>9 Monate</b>	<b>Albert- Infant- Motor- Scale</b> Neurologische Entwicklung+ körperliche Basisuntersuchung
<b>2 Jahre</b>	<b>Griffith- Test und Denver- Test</b> motorische Entwicklung und kognitive Lernfähigkeit Seh- und Hörtest, körperliche Basisuntersuchung
<b>6 Jahre</b>	<b>Wechsler- Test und Kaufmann- ABC</b> kognitive Entwicklung+ körperliche Basisuntersuchung Fragebogen „Activities of daily living“ Fragebogen Lebensqualität

**Tab. 2 Neuropädiatisches Follow- Up:** Auflistung der angestrebten neuropädiatrische Folgeuntersuchungen für die geborenen Kinder nach IVM- Behandlung. Diese beinhalten etablierte Tests wie die Albert- Infant- Motor- Scale oder den Wechsler- Test. Die Folgeuntersuchungen wurden von der Kinderklinik der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Professor Dr. Sperner durchgeführt.

## 2.3 Erfasste Parameter

Es wurden anamnestische Daten wie Voroperationen, Erkrankungen, Dauer des Kinderwunsches, mittlere Zyklusdauer und Ursache bzw. Dauer der Infertilität in Form eines Fragebogens bzw. gegebenenfalls im nachfolgenden Gespräch erfasst.

Neben der Feststellung von Alter, Größe und Gewicht sowie der körperlichen Untersuchung erfolgte eine endokrinologische Basisuntersuchung. Dabei wurden an Tag 1 bis 3 des Zyklus FSH, LH, Progesteron, Estradiol, Prolaktin, TSH und bei Bedarf freies T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> oder Testosteron bestimmt. Zum gleichen Zeitpunkt wurde mithilfe eines

Basisultraschalls die antrale Follikelzahl (AFC) bestimmt sowie das Endometrium und die Ovarien dargestellt um Zysten und pathologische Strukturen zu identifizieren. Vor Beginn der Behandlung erfolgte zudem bei allen Patientinnen eine Bestimmung des Immunstatus in Bezug auf HIV, Hepatitis B und C und des Röteltiters.

Neben der Anzahl wurden auch das Wachstum der Follikel, die Endometriumdicke und gegebenenfalls weitere Laborwerte schriftlich festgehalten. Um chromosomale Anomalien auszuschließen, wurde eine Chromosomenbeurteilung nach Anzahl und Form und bei anamnestisch bekannter Familienanamnese auch nach speziellen genetischen Erkrankungen wie Mukoviszidose durchgeführt.

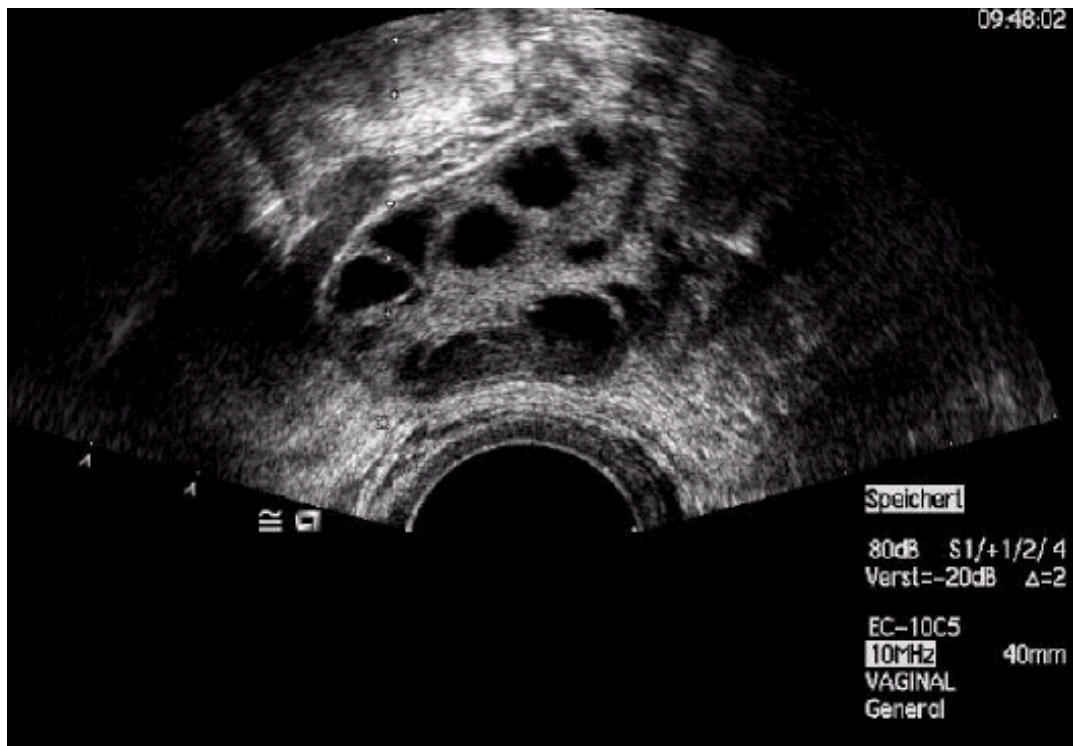
Zum Zeitpunkt der Follikelpunktion wurde die Anzahl der gewonnenen Eizellen, die Anzahl der gereiften Eizellen in vitro, die Anzahl der Vorkernstadien und Qualität und Anzahl der resultierenden Embryonen sowie die Anzahl der transferierten Embryonen dokumentiert. Mit Hilfe einer weiteren Serumuntersuchung an Tag 12 bis 14 nach durchgeführtem Embryonentransfer wurde der Eintritt einer Schwangerschaft mittels hCG-Test im Serum überprüft.

## **2.4 Behandlungsprotokolle**

An Tag 1 bis 3 des spontan eintretenden Zyklus erfolgte eine Blutentnahme zur Bestimmung endokriner Parameter wie Prolaktin, TSH, FSH, LH, Estradiol und Progesteron. Ziel war der Ausschluss endokriner Pathologien wie hohe Östrogenspiegel durch persistierende Ovarialzysten oder hohe Progesteronwerte durch eine unvollständige Regression des Corpus luteum des Vorzyklus. Ein Teil des abgenommenen Serums wurde zur späteren Bestimmung von AMH und Inhibin B bei -20°C eingefroren. Zudem erfolgte eine sonographische Kontrolle des Uterus und der Ovarien zur Bestimmung von Größe und Anzahl der vorhandenen Follikel (AFC) und der Endometriumdicke. Eine weitere Kontrolle dieser Art erfolgte an Tag 7 bis 9 des Zyklus.

An Tag 4 bis 6 des Zyklus wurde ein niedrigdosiertes Gonadotropinpriming in Form einer subkutanen Injektion von 75 I. E. hochgereinigtes Menotropin (Menogon<sup>®</sup>HP, hMG-HP, Ferring, Kiel) durch die Patientin selbst vorgenommen, um das Wachstum der Follikel zu optimieren. Wies der Leitfollikel eine Größe von mindestens 10 mm bis höchstens 12 bis 14 mm auf und war das Endometrium mindestens 5 mm hoch, wurde die Ovulation mit 10.000 IE hCG (Choragon<sup>®</sup>, Ferring, Kiel) induziert.

36 Stunden nach der Induktion erfolgte die transvaginale ultraschallgesteuerte Follikelpunktion mittels eines hochauflösenden Ultraschallgerätes (Accuson Sequia 512, Siemens AG, Deutschland/ K-OPS 7035- Wood, Cook GmbH, Mönchengladbach, Deutschland).

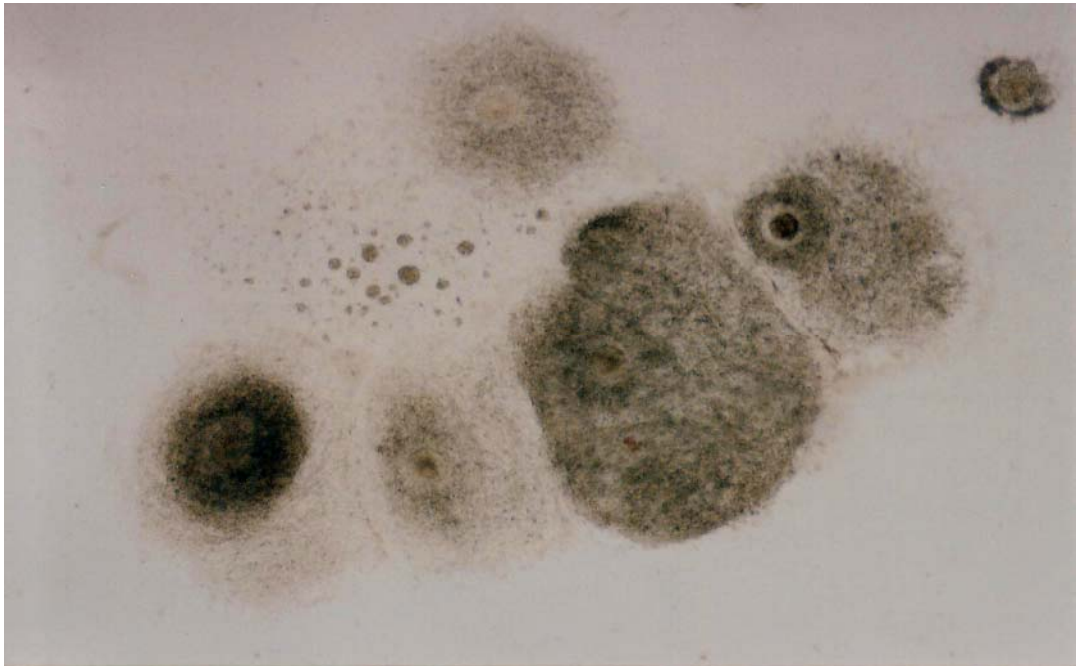


**Abb.1:** Ovar nach niedrig dosiertem FSH- Priming (4 Tage je 1 Ampulle Menogon- HP, Ferring) unmittelbar vor Punktion. Die maximale Größe der Follikel beträgt 12 mm. Eingesetzt wird ein hochauflösendes Ultraschallgerät zur optimalen Darstellung des vergleichsweise kleinen Ovars (Accuson Sequia 512, Siemens)<sup>56</sup>

Die Follikelpunktion wurde in allgemeiner Anästhesie durchgeführt. Die Aspiration erfolgte mittels eines doppelumigen 17G-Follikelaspirationssystems, welches vorher mit 37°C warmer heparinhaltiger Spüllösung (Medicult Flushing Medium, Kat.Nr.10760125, Gück

Zellkulturbedarf GmbH, Berlin, Deutschland) gefüllt wurde. Die Aspiration erfolgte mit einem Aspirationsdruck von etwa 80- 100 mmHg. Der Druck wurde niedriger als bei der IVF- Methode gewählt um die der Eizelle anhaftenden Kumuluszellen nicht mechanisch zu beschädigen.

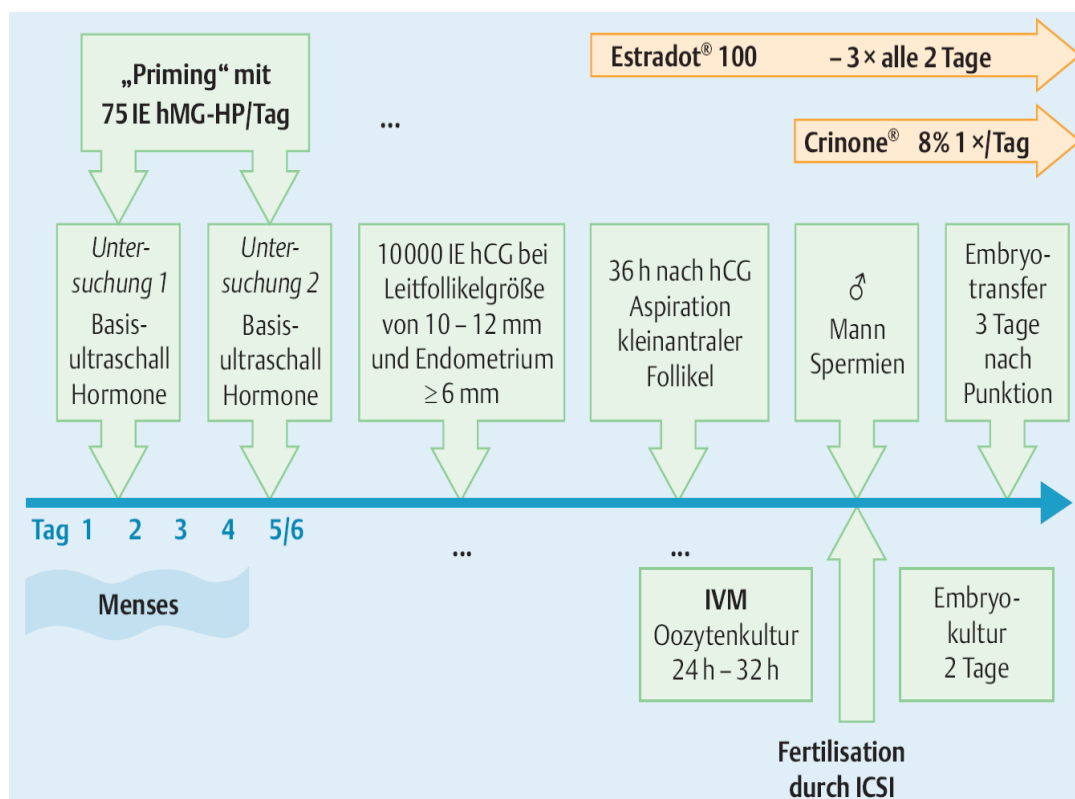
Um Blutkoagel und Verschmutzungen, die die Eizellidentifikation behindern könnten, zu entfernen, wurde das gewonnene Aspirat unter weiterem Zusatz von Spülmedium verdünnt und mithilfe eines Zellsiebs der Porengröße 70  $\mu\text{m}$  (Nylon Falcon REF 352350, Bedford, USA) gefiltert und gereinigt. Retinierte Anteile der Aspiration wurden mit einem Zellkulturmedium (Universal-IVF-Medium, Medicult, Kopenhagen, Dänemark) ausgewaschen. Unter dem Dissektionsmikroskop wurden anschließend die Eizellen im Germinalstadium isoliert und in einem Vorinkubationsmedium (LAG, IVM-System, Medicult, Kopenhagen, Dänemark) für zwei Stunden inkubiert. Abbildung 3 zeigt eine Gruppe unreifer Eizellen unmittelbar nach der Aspiration an Zyklustag acht. Erkennbar sind insbesondere die unterschiedliche Ausstattung an Kumuluszellen und der unterschiedliche Dissoziationsgrad der Granulosazellen, der ein indirektes Maß für das Reifungsstadium der Eizelle darstellt. Mit zunehmender Reife der Eizelle nimmt die Dissoziation der Granulosazellen zu und der Zellkern der Oozyte wird sichtbar.



**Abb. 3:** Gruppe unreif gewonnener Eizellen unmittelbar nach der Aspiration aus kleinantralen Follikeln an Zyklustag 8. Die individuelle Ausstattung der aspirierten Oozyten mit Kumuluszellen sowie deren Dissoziationsgrad schwankt deutlich<sup>55</sup>.

Die darauf folgende In- Vitro- Reifung erfolgte in Medicult IVM-Medium (IVM-System, Kat.Nr. 82214010 Medicult, Kopenhagen, Dänemark), dem 20% inaktiviertes humanes Nabelschnurserum und 0,075 IU/ml rekombinantes FSH (Gonal F<sup>®</sup>, Serono, Unterschleißheim, Deutschland) sowie 0,050 IU/ml humanes Choriongonadotropin (Choragon<sup>®</sup>, Ferring, Kiel, Deutschland) zugesetzt wurden. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Eizellen auf ihren nukleären Reifungsgrad anhand ihres ausgestoßenen Polkörpers überprüft und gegebenenfalls bei intakter Kumuluszellohülle weitere sechs Stunden kultiviert um eine Nachreifung zu erzielen.

Die Befruchtung der gereiften Eizellen erfolgte durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Diese 1992 erstmals erfolgreich durchgeführte Methode<sup>42</sup> ermöglicht es, befruchtete Eizellen, Schwangerschaften und die Geburten von gesunden Kindern unabhängig von der Qualität der Spermien zu erzielen. Nur vollkommen immotile Spermien können nicht verwendet werden<sup>32</sup>. Die Eizellen werden im Labor mechanisch- chemisch von den Kumuluszellen und der Corona radiata befreit und anschließend unter mikroskopischer Kontrolle ein speziell aufbereitetes Spermium in die Eizelle injiziert.



**Abb. 3:** Übersicht über den Ablauf eines IVM- Zyklus. Begonnen wurde mit einem perimenstruellen sonographischen und endokrinen Screening auf das Vorliegen von Pathologien an den Zyklustagen 1 bis 3. Ab Tag 3 folgte ein niedrig dosiertes ovariell Priming mit hMG- HP, weitere Einzelheiten siehe Text.<sup>55</sup>

Eine erfolgreiche Befruchtung wurde durch das Vorhandensein von zwei Vorkernen 16 bis 18 Stunden nach ICSI bestätigt. Bis zum Embryonentransfer an Tag 3 nach der Follikelpunktion wurden maximal drei Zygoten in Zellkulturmedium (ISM1-Medium, Medicult, Kopenhagen, Dänemark) kultiviert. Überzählige Eizellen im Vorkernstadium konnten bei Bedarf kryokonserviert werden und standen somit für einen weiteren Transfer zur Verfügung. An Tag 4 nach der Follikelpunktion wurden je nach Alter der Patientin zwei bis drei Embryonen in den Uterus transferiert, bei Patientinnen unter 35 Jahren zwei, bei Patientinnen über 35 Jahren drei Embryonen.

Bei jeder Patientin erfolgte ab dem Tag der Follikelpunktion ein Endometriumpriming durch externe Applikation von Estradiol in Form von drei Pflastern (Estradot 100, Novartis Pharma Schweiz AG, Bern, Schweiz, die alle zwei Tage gewechselt wurden. Ab dem zweiten Tag wurde zusätzlich mit Progesteron mittels einer abendlichen vaginalen Applikation

von Crinone-Gel 8% (Serono GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) substituiert. Die Applikation beider Medikamente wurde bis zum Ausschluss einer Schwangerschaft, die Progesterongabe zusätzlich bis zum 50. Gestationstag bei eingetretener Schwangerschaft fortgesetzt.

12 bis 20 Tage nach dem Embryonentransfer wurde der mögliche Eintritt einer Schwangerschaft mittels hCG- Test im Serum nachgewiesen und gegebenenfalls 28 bis 35 Tage nach Embryonentransfer eine vaginalsonographische Dokumentation der Fruchthöhle und der embryonalen Herzaktivität durchgeführt.



**Abb. 4:** Mikroinjektion eines Spermiums in die Eizelle unter mikroskopischer Kontrolle, die Haltekapillare fixiert die Eizelle Während ein aufbereitetes Spermium injiziert wird

## **2.5 Analyse und Datengewinnung**

### **2.5.1 Probenentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte standardisiert unter Einhalten der üblichen hygienischen Maßnahmen in eine 9mm Sarstedt Monovette. Zur Gewinnung des Serums wurde die Probe zehn Minuten bei 400 U/min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und für die spätere Messung bei -20°C eingefroren.

### **2.5.2 Sonographie**

Die sonographische Bestimmung des AFC erfolgte an Tag 1 bis 3 mit einem einfachen Ultraschallgerät, wie es üblicherweise in der klinischen Routine verwendet wird, in diesem Fall SonoScope 30 der Firma Kranzbühler. Der jeweils diensthabende Arzt bestimmte die bei Durchmusterung der Ovarien zählbaren Eibläschen und dokumentierte die gewonnenen Daten auf einem Vordruck. Insgesamt wurden die Untersuchungen von drei wechselnden Ärzten vorgenommen.

### **2.5.3 Bestimmung von FSH**

Die Bestimmung von FSH wurde mit einem Testkit der Firma Cobas<sup>®</sup> (Lot No. #11775863 122) vorgenommen. Der Standardmessbereich des Testkits umfasst die Konzentrationen 0.100- 200 mIU/mL, Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden mit < 0,1 und Werte oberhalb der Nachweisgrenze mit > 200 mIU/ mL angegeben. Die Spezifität liegt laut Hersteller bei < 0,1 % für getestete Kreuzreaktionen mit LH, TSH, hCG und hPL.

Bei der Durchführung des Testes wurden 40 µL der Probe mit biotinyliertem monoklonalen FSH- spezifischem Antikörper, sowie mit einem mit Ruthenium-Komplex markiertem monoklonalen FSH- spezifischem



Antikörper inkubiert, welche während der Inkubation einen Sandwich-Komplex bildeten. Mittels einer zweiten Inkubation wurde der Komplex nach Zugabe von mit Streptavidin beschichteten Mikropartikeln an die Festplatte gebunden. Anschließend erfolgte die Überführung des Reaktionsgemisches in die Messzelle, wo die Mikropartikel magnetisch an die Elektrode fixiert und die ungebundenen Bestandteile mittels ProCell entfernt wurden. Durch Anlegen einer Spannung wurde das Gemisch zur Chemielumineszenzemission angeregt und der Emissionswert anhand eines Photomultipliers, einer signalverstärkenden Elektronenröhre, gemessen. Die FSH- Konzentrationen wurden anschließend mittels einer gerätespezifisch generierten Kalibrationskurve (extern vorgegebene Standards) berechnet. Die Messung erfolgte automatisch im Roche<sup>®</sup> Immunoassay Analyseautomaten Elecsys 2010.

#### **2.5.4 Bestimmung von LH**

Die Bestimmung von LH erfolgte mit Hilfe eines Testkit der Firma Cobas<sup>®</sup> (Lot No. #11732234 122). Der Standardmessbereich umfasst die Konzentration 0,100- 200 mIU/mL, wobei Werte unterhalb der Nachweisgrenze als < 0,100 mIU/mL und Werte oberhalb des Messbereiches als > 200 mIU/ mL angegeben werden. Die Spezifität liegt laut Hersteller bei < 0,1 % für getestete Kreuzreaktionen mit FSH, TSH, hCG, hGH und hPL.

Bei der Durchführung des Testes wurden 20 µL der Probe mit biotinyliertem monoklonalen LH- spezifischem Antikörper, sowie mit einem mit Ruthenium- Komplex markiertem monoklonalen LH- spezifischem Antikörper inkubiert, welche während der Inkubation ebenfalls einen Sandwich- Komplex bildeten. Mittels einer zweiten Inkubation wurde der Komplex nach Zugabe von mit Streptavidin beschichteten Mikropartikeln an die Festplatte gebunden. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in die Messzelle überführt und die Mikropartikel magnetisch an die Elektrode fixiert. Mit ProCell wurden anschließend die ungebundenen Bestandteile entfernt und das Gemisch durch Anlegen einer Spannung zur

Chemielumineszenzemission angeregt. Der Emissionswert wurde mit Hilfe eines Photomultipliers nach identischem Verfahren der FSH- Bestimmung anhand einer Kalibrationskurve für LH erfasst.

### 2.5.5 Bestimmung von Estradiol

Die Bestimmung von Estradiol erfolgte mit Hilfe eines Testes der Firma Cobas<sup>®</sup> (Lot No. #12145383 122). Der Standardmessbereich des Testkits umfasst die Konzentrationen 18,4 - 15.781 pmol/L bzw. 5,00- 4300 pg/mL, Werte unterhalb des Messbereiches werden als < 18,4 pmol/L bzw. < 5,00 pg/mL, Werte oberhalb des Messbereiches als > pmol/L bzw. >15.781 pg/mL angegeben. Die Spezifität für die Kreuzreaktionen wird laut Hersteller folgendermaßen bestimmt:

Aldosteron 0,006; Estriol 0,018; Estron 0,515; Estron- 3 $\beta$ - Glucuronid 0,012; Estron- 3- Sulfat 0,004; Ethisteron 0,01; Norethindronacetat 0,006; Pregnelonon 0,008; Progesteron 0,009; 2- Methoxy- Estradiol 0,054; 17  $\beta$ - Estradiol- 3, 17- Sulfat 0,411; 17  $\beta$ - Estradiol- 3-  $\beta$ - D- Glucuronid 0,033; 17 $\beta$ - Estradiol- 17-  $\beta$  – D- Glucuronid 0,014; 17  $\beta$  – Estradiol- 3- sulfat- 17- Glucuronid 0,013; 17  $\beta$  – Estradiol- 3- Sulfat 0,038; 17  $\beta$  – Estradiol- 17- Valerat 0,294; 17  $\beta$  – Estradiol- 17- Sulfat 0,002; 17- Hydroxyprogesteron 0,010.

Bei der Durchführung des Testes wurden 35  $\mu$ L Probe mit einem estradiol-spezifischen biotinyliertem Antikörper inkubiert. In einer zweiten Inkubation erfolgte durch Zugabe von mit Streptavidin beschichteten Mikropartikeln die Bindung der Ruthenium- markierten Estradiolderivate an die noch freien Bindungsstellen des biotinylierten Antikörpers. Anschließend wurde der Komplex an die Festplatte gebunden, in die Messzelle überführt und die Mikropartikel magnetisch an die Elektrode fixiert. Ungebundene Bestandteile wurden Mittels ProCell entfernt und das Gemisch durch Anlegen einer Spannung zur Chemielumineszenzemission angeregt. Der Emissionswert wurde mit Hilfe eines Photomultipliers anhand einer estradiolspezifischen Kalibrationskurve bestimmt.

### 2.5.7 Bestimmung von AMH

Die Bestimmung von AMH wurde mittels Elisa der Firma DSL<sup>®</sup> (DSL- 10-14400) vorgenommen. Der Standardbereich dieses Testkits umfasst die Konzentrationen 0; 0,03; 0,15; 1, 4 und 10 ng/ml. Die Intraassayvariabilität beträgt laut Hersteller  $0,144 \pm 0,006$  [ng/mL], die Interassayvariabilität wird mit  $0,149 \pm 0,012$  [ng/mL] angegeben. Bei der Durchführung des Testes wurden Standards, Kontrollen und Serumproben in Mikrotitervertiefungen inkubiert, welche mit Antikörpern gegen AMH bestückt waren. Nach der Inkubation und mehreren Waschsritten wurden biotinmarkierte Antikörper zugegeben und die Immunantwort durch Zugabe von enzymmarkiertem Streptavidin kontrolliert. Nach der dritten Inkubation und der anschließenden Waschung wurden die Proben mit dem Substrat Tetramethylbenzidin inkubiert, die saure Stopplösung zugegeben und der Grad der enzymatischen Umwandlung des Substrates mithilfe einer Zweiwellenabsorptionsmessung bei 450 und 620 nm ermittelt. Die Absorption der Proben ist dabei direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen AMHs. Anhand einer Kalibrationskurve wurde anschließend die AMH- Konzentration der Proben bestimmt.

Die Seren wurden nach dem in Tabelle 4 aufgelisteten Pipettierschema bearbeitet, die Inkubationszeit betrug 2,5 Stunden.

### 2.5.8 Bestimmung von Inhibin B

Die Bestimmung von Inhibin B wurde mit einem Assay der Firma DSL<sup>®</sup> (DSL- 10- 84100) durchgeführt. Der Standardbereich dieses Testes umfasst die Konzentrationen 0; 10; 30; 100; 250; 500 und 1000 pg/ml. Die Intraassayvariabilität beträgt laut Hersteller  $69 \pm 2,4$  [pg/ml], die Interassayvariabilität wird mit  $50 \pm 3,8$  [pg/ml] angegeben. Aufgrund der hohen Spezifität war eine Vorbehandlung der Seren nicht notwendig.

Bei der Durchführung des Testes wurden Standards, Kontrollen und Serumproben in Mikrotitervertiefungen inkubiert, welche mit Antikörpern gegen die  $\beta$ - Untereinheit des Inhibin B bestückt waren. Nach der Inkubation und mehreren Waschschritten wurden biotinmarkierte Antikörper gegen die  $\alpha$ - Untereinheit zugegeben. Die Immunantwort wurde durch Zugabe von enzymmarkiertem Streptavidin kontrolliert. Nach der dritten Inkubation und der anschließenden Waschung wurden die Proben mit dem Substrat Tetramethylbenzidin inkubiert, die saure Stopplösung zugegeben und der Grad der enzymatischen Umwandlung des Substrates mithilfe einer Zweiwellenabsorptionsmessung bei 450 und 620 nm ermittelt. Die so bestimmte Absorption ist direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Inhibin B. Anhand einer Kalibrationskurve wurde die Inhibin B-Konzentration der Proben bestimmt.

Die Verarbeitung erfolgte nach dem in Tabelle 3 aufgelisteten Pipettierschema.

Mikrotiterplatte	Standard Kontrolle Probe	Puffer A	Puffer B	Biotin- konjugat	1,5 Stunden schütteln und 6 mal waschen	Streptavidin- konjugat	Tetramethyl- benzidin
Standard	50 µl	25 µl	25 µl	50 µl	Über Nacht schütteln und 3 mal waschen	50 µl 50 µl 50 µl	100 µl 100 µl 100 µl
Kontrolle	50 µl	25 µl	25 µl	50 µl			
Probe	50 µl	25 µl	25 µl	50 µl			
					20 min schütteln und 6 mal waschen		

Tab. 3 Pipettierschema des Inhibin B- ELISA (DSL-10-84100)

Mikrotiterplatte	Standard Kontrolle Probe	Puffer	1 Stunde bei Raum- temperatur schütteln und 5 mal waschen	Biotin- konjugat	1 Stunde bei Raum- temperatur schütteln und 5 mal waschen	Streptavidin- konjugat	Tetramethyl- benzidin
Standard	100 µl	50 µl	1 Stunde bei Raum- temperatur schütteln und 5 mal waschen	100 µl 100 µl 100 µl	100 µl 100 µl 100 µl	30 min schütteln und 5 mal waschen	100 µl 100 µl 100 µl
Kontrolle	100 µl	50 µl					
Probe	100 µl	50 µl					

Tab. 4 Pipettierschema des AMH- ELISA (DSL-10-14400)

## 2.6 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte rechnergestützt mit einem Statistikprogramm (SPSS, USA, Chicago, 2002, Version 12-0).

Die Daten wurden dabei mit Hilfe einer Regressionsanalyse auf ihren statistischen Zusammenhang untersucht und mittels einer Korrelationsanalyse auf ihre Signifikanz bei einem gewählten Mindestsignifikanzniveau von  $p < 0,05$  untersucht. Als Variablen für den Zusammenhang der Parameter und dem Behandlungserfolg wurden in einem ersten Durchgang die Anzahl der Germinalvesikel (GV) und im zweiten Durchgang die Anzahl an Zwei- Vorkern- Stadien (2-VK) gewählt und zu den anderen Parametern in Beziehung gesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Demographische Daten des behandelten Kollektivs

Die Patientinnen waren im Mittel  $34 \pm 4,9$  Jahre alt und wiesen einen durchschnittlichen Bodymaßindex von  $23,9 \pm 4,5 \text{ kg/m}^2$  auf (siehe Tabelle 5 Patientenprofil).

	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Mittelwert + SA</i>
<i>Alter [Jahre]</i>	23,0	43,7	$34,0 \pm 4,9$
<i>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</i>	17,9	41,1	$23,9 \pm 4,5$
<i>Mittlere Zyklusdauer [Tage]</i>	21	77,5	$30,9 \pm 10,7$
<i>Dauer der Infertilität [Monate]</i>	18	180	$56,9 \pm 34,6$

**Tab. 5 Patientenprofil:** Die demographischen Daten Alter, BMI, Zyklusdauer und Dauer der Infertilität der 77 Patientinnen: dargestellt ist jeweils der minimale und der maximale Wert sowie der Mittelwert mit Standardabweichung (SA)

Im Mittel litten die Paare seit  $56,9 \pm 34,6$  Monaten unter dem unerfüllten Kinderwunsch. Die mittlere Zykluslänge betrug im Mittel  $30,9 \pm 10,7$  Tage, wobei 15 Patientinnen, d.h. 19,5 % des Kollektivs, ein PCO- Syndrom aufwiesen, von denen 10 anamnestisch eine Oligo- oder Amenorrhoe angaben (siehe Tabelle 6).

	<i>n</i>	<i>%</i>
<i>PCOS vorhanden</i>	15	19,5
<i>PCOS nicht vorhanden</i>	65	80,5
<i>gesamt</i>	77	100

**Tab. 6 Vorkommen des PCO- Syndroms im Kollektiv:** Dargestellt ist die Anzahl an Patientinnen mit oder ohne PCO- Syndrom sowie der jeweilige prozentuale Anteil am Gesamtkollektiv

Die Sterilität war in 63,6 % der Fälle primärer Natur, d.h. es waren bisher weder Schwangerschaften noch Geburten voraus gegangen, und in 36,4 % der Fälle sekundärer Natur, d.h. es waren bereits entweder eine Schwangerschaft oder die Geburt eines oder mehrere Kinder in dieser Partnerschaft voraus gegangen (siehe auch Tabelle 7).

	<i>n</i>	<i>%</i>
<i>Primäre Sterilität</i>	49	63,6
<i>Sekundäre Sterilität</i>	28	36,4
<i>gesamt</i>	77	100

**Tab. 7 Primäre/ sekundäre Sterilität:** Anteil von primärer Sterilität oder sekundärer Sterilität im Patientinnenkollektiv. Primäre Sterilität bedeutet bei der Patientin lag noch nie eine Schwangerschaft vor, bei der sekundären Sterilität ist es dagegen in der Vorgeschichte der Patientin bereits zu einer Schwangerschaft gekommen.

Als Ursachen der Infertilität waren bei 6 Paaren, entsprechen 7,9 %, tubare Ursachen festzustellen worden, bei 46 Paaren bzw. 59,7 % waren androgene Faktoren wie z. B. Astheno-, Terato- oder Oligospermie entscheidend und bei 15 Paaren, entsprechen 19,7 %, lag eine Kombination aus beidem vor. Bei 9 Paaren bzw. 11,7 % der Paare war keine Ursache auszumachen und die Ursache wurde somit als idiopathisch tituliert (siehe auch Tabelle 8).



	<i>n</i>	<i>%</i>
<i>Andrologischer Faktor</i>	46	59,7
<i>Tubarer Faktor</i>	6	7,9
<i>Idiopathisch</i>	9	11,7
<i>Kombiniert</i>	15	19,5
<i>Gesamt</i>	77	100

**Tab. 8 Hauptindikation des Paares zur assistierten Reproduktion:** Zusammenfassung der Indikationen der zur assistierten Reproduktion eingeschlossenen Paare, Mehrfachnennungen wurden unter dem Begriff kombiniert zusammengefasst.

## 3.2 Ergebnisse des In- Vitro- Abschnitts

### 3.2.1 Endokrine Parameter

Die Untersuchung der Hormonparameter im Patientenserum ergab eine durchschnittliche FSH- Konzentration von 7,7 mIU/mL mit einer Standardabweichung von 2,4 mIU/mL und eine LH- Konzentration von 7,1 mIU/mL mit einer Standardabweichung von 3,6 mIU/mL. Die Estradiolkonzentrationen lagen im Mittel bei 42,7 pg/ml mit einer Standardabweichung von 17,5 pg/ml. Die Bestimmung der AMH- Konzentrationen ergab Werte von durchschnittlich  $3,5 \pm 3,1$  ng/ml, die Inhibin B- Konzentrationen lagen durchschnittlich bei  $76,2 \pm 73,9$  pg/ml (siehe Tabelle 9).

	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Mittelwert + SA</i>
<b><i>FSH</i></b>	2,5	10	7,7 ± 2,4
<b><i>[mIU/mL]</i></b>			
<b><i>LH</i></b>	1,1	25	7,1 ± 3,6
<b><i>[mIU/mL]</i></b>			
<b><i>Estradiol</i></b>	14,0	110	42,7 ± 17,5
<b><i>[pg/ml]</i></b>			
<b><i>AMH</i></b>	0,02	13,5	3,5 ± 3,1
<b><i>[ng/ml]</i></b>			
<b><i>Inhibin B</i></b>	11,6	498,1	76,2 ± 73,9
<b><i>[pg/ml]</i></b>			

**Tab. 9 Basale Hormonparameter an Zyklustag drei:** Der minimale und der maximale Hormonwerte sowie der Mittelwert mit Standardabweichung (SA) der Patientinnen für das Follikelstimulierende Hormon (FSH), das Luteinisierende Hormon (LH), Estradiol, das Anti-Müller- Hormon (AMH) und Inhibin B. Diese wurden bei jeder Patientin in Form einer Serumuntersuchung an Tag drei des IVM- Zyklus untersucht.

### 3.2.2 Eizellgewinnung, -reifung und -fertilisation

An Tag 1 bis 3 des IVM- Zyklus wurde sonographisch die Anzahl der zählbaren Follikel, der Antrale Follikel Count (AFC) bestimmt. Durchschnittlich ergab sich ein AFC von 12,6 mit einer Standardabweichung von 5. Der maximale bestimmte AFC ergab 25, der niedrigste AFC lag bei vier erkennbaren Eibläschen.

Aus der Behandlung resultierten durchschnittlich 9,3 Germinalvesikel mit einer Standardabweichung von 6,6, wobei auch hier maximal 25 Germinalvesikel aus der Punktion resultierten.

Es erreichten im Durchschnitt pro behandeltem Paar  $5,5 \pm 4,1$  Eizellen in Vitro das Metaphase 2 Stadium, d.h. es ergab sich eine durchschnittliche Maturationsrate von  $63,2 \text{ Prozent} \pm 33,6$ . Folglich ließen sich 36,8% nicht in vitro reifen.

Regelrecht fertilisiert, das heißt bis zur mikroskopischen Identifizierung von zwei Vorkernen in der fertilisierten Oozyte, wurden durchschnittlich  $2,4 \pm 1,6$

Eizellen pro behandeltem Paar, das entspricht einer Fertilisationsrate von  $33 \pm 23$  Prozent aller primär gewonnenen Eizellen. Irregulär fertilisiert, das heißt es wurden drei Vorkerne identifiziert, wurden im Schnitt  $0,6 \pm 1$  Zellen. Das entspricht einer Fertilisationsrate von  $6,3 \pm 9$  Prozent.

In acht Fällen entschieden sich die Paare für eine Kryokonservierung der überzähligen Vorkernstadien, dies ergab 31 kryokonservierte Zellen, entsprechend einer Quote von drei kryokonservierten Zellen pro behandeltem Paar (siehe auch Tabelle 10).

	<i>N</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>%</i>	<i>Mittelwert + SA</i>
<i>AFC</i>	993	4	25		12,6 ± 5
<i>Anzahl GV</i>	762	0	25		9,3 ± 6,6
<i>Anzahl GV degeneriert</i>	8	0	2		0,1 ± 0,4
<i>Anzahl M2 nach IVM</i>	343	0	16		5,5 ± 4,1
<i>Maturationsrate</i>				63,2 ± 33,6	
<i>Transferierte Embryonen</i>	161	0	3		2,7 ± 0,7
<i>ET (pro Punktion)</i>	68			88,3	
<i>Fertilisationsrate</i>					
<i>Regelrecht (2VK)</i>	196	0	9	33 ± 23	2,4 ± 1,6
<i>Irregulär (3VK)</i>	47	0	3	6,3 ± 9	0,6 ± 1
<i>Kryokonservierte Zellen</i>	31	0	7		3 ± 2,4

**Tab. 10 Klinische Ergebnisse des Kollektivs:** Dargestellt sind die sonographisch bestimmte Eizellzahl (AFC), die Anzahl der Germinalvesikel nach Punktion, die Anzahl der sich in der Metaphase zwei befindlichen Eizellen (M2), die Anzahl der transferierten Embryonen und die der kryokonservierten Embryonen. Mithilfe dieser Parameter wurden die durchschnittliche Maturationsrate und die Fertilisationsrate berechnet. SA = Standardabweichung, VK = Vorkerne

### 3.2.3 Behandlungserfolg/ Embryonentransfer

Das individuelle Ergebnis der Studienteilnahme jeder Patientin wurde in verschiedenen Ergebnisparametern (Outcome) zusammengefasst. Es kamen vier mögliche Therapieausgänge der Teilnahme in Frage: 1. Die Teilnahme endete noch vor der Follikelpunktion bzw. es konnten im Rahmen der Punktion keine Germinalvesikel entnommen werden; 2. es gelang Eizellen durch die Punktion zu gewinnen, aber diese reiften nicht in Vitro (Maturationsversagen); 3. die Eizellen reiften, aber nach durchgeführter ICSI fand keine Fertilisation statt (Fertilisationsversagen) oder 4. die Studienteilnahme wurde bis zum Embryonentransfer und anschließendem Schwangerschaftstest fortgeführt.

Bei drei Patientinnen oder 3,9 % kam es zu keiner Gewinnung von Germinalvesikeln (Outcome 1), bei ebenfalls drei Patientinnen bzw. 3,9 % ergab sich ein Maturationsversagen in vitro (Outcome 2) und für fünf Patientinnen entsprechend 6,6 % endete die Behandlung infolge von Fertilisationsversagen nach durchgeführter ICSI (Outcome 3). Die restlichen 65 Patientinnen, d. h. 85,5 % durchliefen die Behandlung bis zum hCG-Test nach durchgeführtem Embryonentransfer (Outcome 4)(siehe Tabelle 11).

165 Embryonen wurden in diesem Kollektiv zurückgesetzt, davon wurden je nach Wunsch und Alter in 15,4 % der Fälle ein Embryo, in 30,8 % zwei Embryonen und in 53,8 % drei Embryonen zurückgesetzt.

65 von 77 Patientinnen erhielten nach der durchgeführten Follikelpunktion auch einen Embryonentransfer, das entspricht 84,4 % aller punktierten Patienten.

	<i>n</i>	<i>Prozent</i>
<b>Anzahl der transferierten Embryonen</b>		
1	10	13
2	20	26
3	35	45,5
<b>Gesamt</b>	165	100
<b>1. Punktion aber keine GV</b>	3	3,9
<b>2. Punktion, GV aber keine Maturation</b>	3	3,9
<b>3. ICSI aber kein ET (Fertilisationsversagen)</b>	5	6,5
<b>4. hCG und ET</b>	65	84,4
<b>Gesamt</b>	76	98,7

**Tab. 11 Behandlungserfolg nach IVM:** Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse in Form der Anzahl der transferierten Embryonen und eines definierten Behandlungsergebnisses 1. bis 4. GV= Germinalvesikel, ET= Embryonentransfer, hCG= humanes Choriongonadotropin

### 3.2.4 Korrelationen zwischen der Anzahl der Germinalvesikel und den verschiedenen Behandlungsparametern

Es wurden im Folgenden die Parameter Alter, Bodymassindex, Zykluslänge, Dauer der Infertilität in Monaten, Anzahl der im Ultraschall sichtbaren Antralfollikel (AFC), Anzahl der Metaphase 2- Zellen nach der IVM, Anzahl der 2- Vorkernstadien nach IVM sowie die Hormonparameter AMH, Inhibin B, FSH, Estradiol und LH auf ihre Korrelationen (nach Pearson) zum

Behandlungserfolg gesetzt. Als Maß für den erreichten Behandlungserfolg wurde in einem ersten Schritt die Anzahl der nach Punktion resultierenden Germinalvesikel gewählt. Bei den vermeintlich prädiktiven Hormonparametern AMH und Inhibin B ergaben sich mit  $r = -0,08$  für AMH und  $r = 0,03$  für Inhibin B keine signifikanten Korrelationen. Dasselbe gilt für den sonographisch bestimmten AFC, für den der Korrelationskoeffizient nach Pearson nur bei  $r = -0,24$  liegt. Das Alter der Patientinnen zeigte zur Anzahl der Germinalvesikel eine Korrelation von  $0,04$ . Entsprechend ergaben die Korrelationsanalysen für den BMI- Index Werte von  $0,09$ , für die Zykluslänge von  $0,28$ , für die Dauer der Infertilität von  $-0,09$ , für den FSH-Wert von  $0,01$ , für den Estradiol- Wert von  $0,03$  und für den LH- Wert von  $-0,36$ . Damit ergibt auch die Analyse der Pearson- Korrelationen zwischen den resultierenden Germinalvesikeln und den Parametern Alter, Bodymaßindex, Zykluslänge in Monaten und Dauer der Infertilität sowie den FSH-, LH- und Estradiol- Werten keine signifikanten Korrelationen. Signifikante Korrelationen sind mit  $r = 0,63$  bzw.  $0,57$  allerdings zwischen den entnommenen Germinalvesikeln und den Zellen, die nach erfolgreicher Maturation das Stadium der Metaphase 2 erreicht haben sowie den regelrecht fertilisierten Oozyten nach durchgeführter ICSI vorhanden (siehe auch Tabelle 12).

<i>Testvariable</i>	<i>Signifikanz 2-seitig</i>	<i>R</i>
<i>Alter [Jahre]</i>	0,72	0,04
<i>BMI [kg/ m<sup>2</sup>]</i>	0,09	-0,2
<i>Zykluslänge [Tage]</i>	0,02	0,28
<i>Dauer der Infertilität [Monate]</i>	0,48	-0,09
<i>Anzahl GV</i>		1
<i>Anzahl M2 nach IVM</i>	0	0,63
<i>Anzahl 2 VK</i>	0	0,57
<i>AFC gesamt</i>	0,04	-0,24
<i>AMH [ng/ml ]</i>	0,48	-0,08
<i>Inhibin B [pg/ml ]</i>	0,82	0,03
<i>FSH [mIU/mL]</i>	0,94	0,01
<i>Estradiol [pg/ml]</i>	0,79	0,03
<i>LH [IU/ml]</i>	0,001	-0,36

**Tab. 12 Pearson Korrelationen zwischen der Anzahl der Germinalvesikel und den Behandlungsvariablen:** Darstellung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse mittels SPSS (Version 12-0) zwischen der Anzahl der Germinalvesikel nach Punktion und den verschiedenen Behandlungsvariablen: Es ergaben sich keine klinisch relevanten signifikanten Korrelationen. Zur Berechnung wurden die Behandlungsdaten von 77 Patientinnen heran gezogen. GV = Germinalvesikel, M2 = Oozyten in der Metaphase 2, 2VK = regelrecht fertilisierte Oozyten, AFC = Antraler Follikel Count, , AMH = Anti- Müller-Hormon, FSH = Follikel- Stimulierendes- Hormon, LH = luteinisierendes Hormon

### 3.2.5 Korrelationen zwischen der Anzahl der regelrecht fertilisierten Oozyten und den verschiedenen Behandlungsparametern

In einem zweiten Schritt wurde im Folgenden die Anzahl der regelrecht fertilisierten Oozyten nach der In- Vitro- Maturation als Indikator für den Behandlungserfolg gewählt und in Beziehung zu den Behandlungsparametern Alter, Bodymaßindex, Zykluslänge, Dauer der Infertilität in Monaten, Anzahl der im Ultraschall erkannten Eizellen (AFC) und Anzahl der Metaphase 2- Zellen nach der Maturation gesetzt.



Es ergaben sich für die Hormonparameter AMH und Inhibin B, bei denen ein prädiktiver Wert vermutet wurde, eine Korrelation von  $r = -0,01$  für AMH und eine Korrelation von  $r = 0,17$  für Inhibin B. Damit liegt auch hier keine signifikante Korrelation zwischen AMH bzw. Inhibin B und der Anzahl der regelrecht fertilisierten Oozyten vor.

Das Alter der Patientinnen zeigte zur Anzahl der Germinalvesikel eine Korrelation von  $r = 0,08$ . Entsprechend ergaben die Korrelationsanalysen für den BMI- Index Werte von  $-0,117$ , für die Zykluslänge von  $0,08$ , für die Dauer der Infertilität von  $-0,003$ , für den FSH- Wert von  $0,048$ , für den Estradiol- Wert von  $0,184$  und für den LH- Wert von  $-0,167$ . Damit ergibt auch die Analyse der Pearson- Korrelationen zwischen den resultierenden Germinalvesikeln und den Parametern Alter, Bodymaßindex, Zykluslänge in Monaten und Dauer der Infertilität sowie den FSH-, LH- und Estradiol- Werten keine signifikanten Korrelationen. Damit ergibt auch die Korrelationsanalyse zwischen den regelrecht fertilisierten Oozyten nach durchgeführter ICSI und den Behandlungsparametern Alter, Bodymaßindex, Zykluslänge, Dauer der Infertilität in Monaten und der Anzahl der im Ultraschall erkannten Eizellen (AFC) sowie den FSH-, LH- und Estradiol- Werten keine signifikanten Korrelationen. Signifikante Korrelationen von  $0,57$  bzw.  $0,77$  ergeben sich dagegen für die Beziehung zwischen der Anzahl der Germinalvesikel und der Anzahl der Metaphase 2 Zellen einerseits und den regelrecht fertilisierten Oozyten andererseits (siehe Tabelle 13).

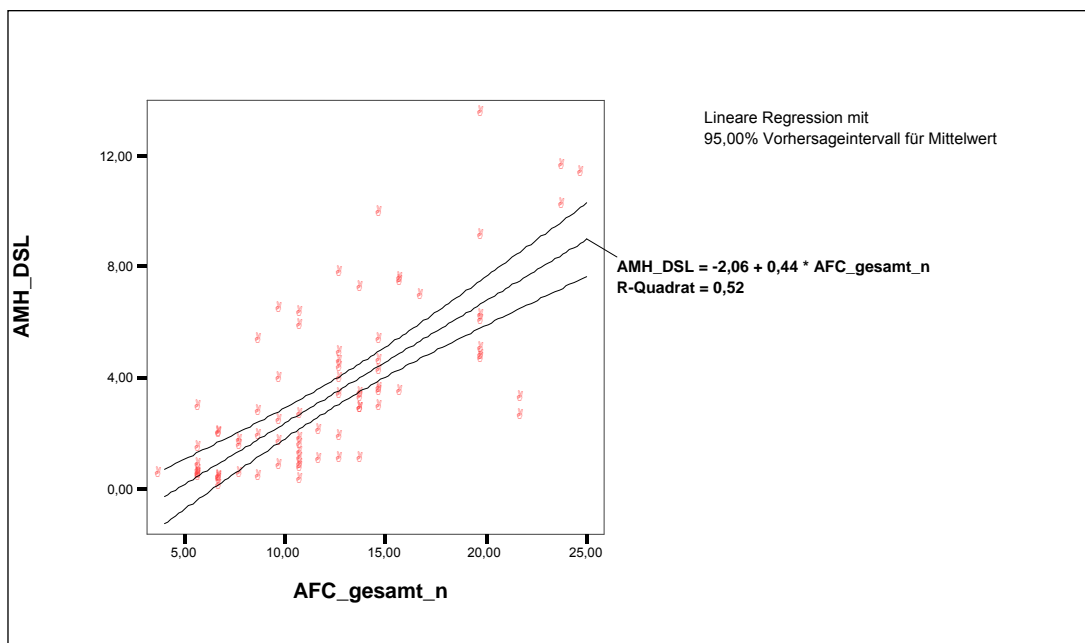
<i>Testvariable</i>	<i>Signifikanz 2-seitig</i>	<i>R</i>
<i>Alter [Jahre]</i>	0,494	0,08
<i>BMI [kg/ m<sup>2</sup>]</i>	0,313	-0,117
<i>Zykluslänge [Tage]</i>	0,521	0,08
<i>Dauer der Infertilität [Monate]</i>	0,980	-0,003
<i>Anzahl GV</i>	0,00	0,571
<i>Anzahl M2 nach IVM</i>	0,00	0,773
<i>Anzahl 2 VK</i>		1
<i>AFC gesamt</i>	0,041	-0,239
<i>AMH [ng/ml ]</i>	0,917	-0,012
<i>Inhibin B [pg/ml ]</i>	0,169	0,165
<i>FSH [mIU/mL]</i>	0,683	0,048
<i>Estradiol [pg/ml]</i>	0,111	0,184
<i>LH [IU/ml]</i>	0,150	-0,167

**Tab. 13 Pearson Korrelation zwischen der Anzahl der regelrecht fertilisierten Oozyten und den Behandlungsparametern:** Ergebnisse der Korrelationen zwischen den regelrecht fertilisierten Oozyten und den verschiedenen Behandlungsvariablen mittels SPSS (Version 12-0): es ergaben sich keine klinisch relevanten signifikanten Korrelationen. Zur Berechnung wurden die Behandlungsdaten von 77 Patientinnen heran gezogen. GV = Germinalvesikel, M2 = Oozyten in der Metaphase 2, 2VK = regelrecht fertilisierte Oozyten, AFC = Antraler Follikel Count, , AMH = Anti- Müller- Hormon, FSH = Follikel- Stimulierendes- Hormon, LH = luteinisierendes Hormon

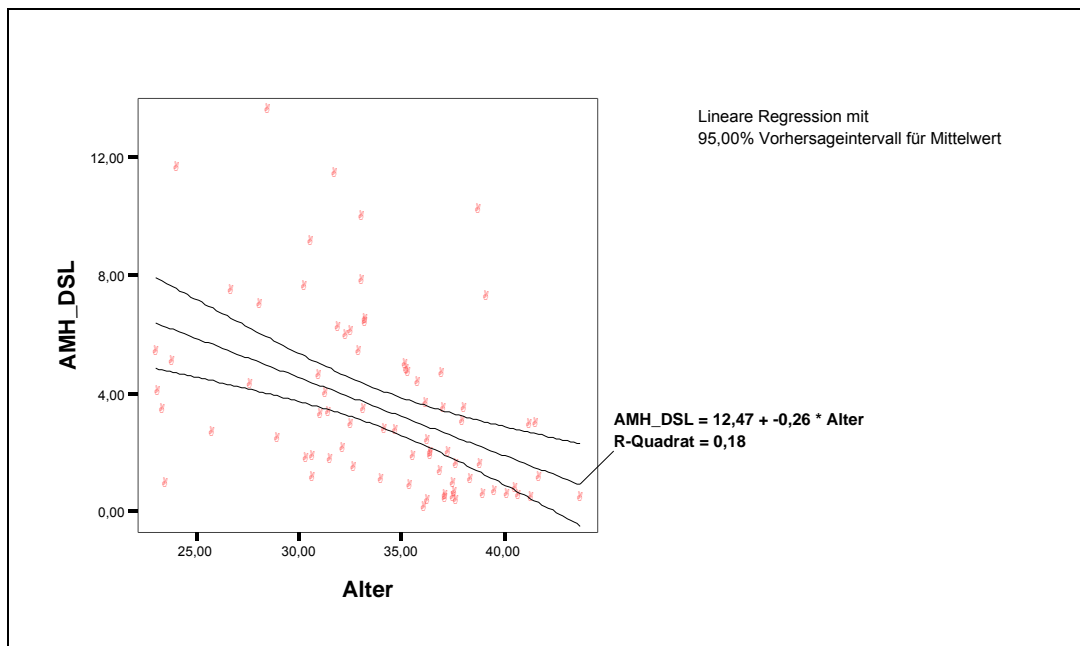
### 3.5.6 Das Anti- Müller- Hormon (AMH) und sein Bezug zum Alter und der Antralen Follikelzahl ( AFC)

Aufgrund seines vermutet hohen prognostischen Wertes wurde das Anti-Müller- Hormon speziell auf seine Korrelation zum Alter der Patientinnen und zu deren früh- antral bestimmten Follikelzahl untersucht. Für AMH und dem AFC ergaben sich Korrelationen von  $r = 0,72$ , bei einer Signifikanz von 0,0001. Für AMH und das Alter der Patientin ergab sich eine Korrelation von  $r = - 0,42$ , bei einer Signifikanz von 0,001.

Damit ergeben sich sowohl für AMH und AFC, als auch für AMH und das Alter der Patientinnen signifikante Korrelationen.



**Abb. 5:** Die Korrelationsanalyse vom Anti- Müller- Hormon (AMH) und der früh- antral bestimmten Follikelzahl (AFC) mittels SPSS ergab eine Korrelation von  $r = 0,72$ .



**Abb. 6:** Die Korrelationsanalyse vom Anti- Müller- Hormon (AMH) und dem Alter der Patientin mittels SPSS ergab eine Korrelation von  $r = -0,42$ .

<i>Testvariable</i>	<i>Signifikanz 2-seitig</i>	<i>R</i>
<i>AFC</i>	0,0001	0,72
<i>Alter</i>	0,001	-0,42

**Tab 14 Korrelationen zwischen AMH und dem AFC bzw. dem Alter den Patientinnen:** Es besteht eine signifikante Korrelationen von 0,75 zwischen dem Anti- Müller- Hormon (AMH) und der frühantralen Follikelzahl (AFC) jedoch nicht zum Alter der Patientinnen ( $r = -0,42$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Bedeutung und Bewertung der Studie

Das Ziel der assistierten Reproduktion ist eine möglichst erfolgreiche Fertilisationsbehandlung der Hilfe suchenden Paare durch effektive Verfahren. Daher hat sich in den Anfängen der Infertilitätsbehandlung in den 80er Jahren das Konzept der ovariellen Überstimulation mittels hochdosierten Gonadotropinen etabliert, um die simultane Reifung einer großen Follikelkohorte zu ermöglichen. Dieses Verfahren ist höchst effektiv und weist inzwischen hohe Erfolgsquoten in der Behandlung ungewollt kinderloser Paare auf<sup>6</sup>. Die aktuellen Statistiken des IVF- Registers nennen durchschnittliche Fertilisationsraten von 96 und Schwangerschaftsraten von 27 Prozent für die nach konventioneller Stimulation gewonnenen Oozyten und anschließend durchgeführter ICSI. Die zahlreichen Nebenwirkungen, unter anderem auch das die Gesundheit gefährdende Überstimulationssyndrom (OHSS) zeigen dennoch den Bedarf nach einer Weiterentwicklung dieses Verfahrens. Das Ziel sollte eine möglichst nebenwirkungsarme und effektive Behandlung der ungewollten Kinderlosigkeit sein, um die Belastung der Patientinnen durch die Behandlung gering zu halten.

Die schon in den Anfängen der Reproduktionsmedizin verwendete Idee unreife Eizellen zur Fertilisationsbehandlung zu verwenden, wurde mit der IVM als nebenwirkungsarmer Alternative zur konventionellen IVF wieder entdeckt.

Bei diesem Verfahren wird das Risiko der Entwicklung eines OHSS nahezu vollständig vermieden, was insbesondere für das durch diese Erkrankung besonders gefährdete Kollektiv der PCO- Patientinnen von großer Bedeutung ist<sup>55</sup>. Auch weniger schwerwiegende Nebenwirkungen wie die Entwicklung von Ovarialzysten oder eines abdominellen Spannungs- und Völlegefühl können weitgehend vermieden werden<sup>55</sup>.

Auch im Kostenvergleich schneidet die IVM- Behandlung gegenüber der IVF besser ab, da die Kosten für die Medikamente der massiven ovariellen Stimulation entfallen. Manche Zentren verzichten bei der IVM sogar auf den Einsatz von niedrigdosierten Gonadotropinen als „Priming“, welches auch im Falle der Lübecker Arbeitsgruppe verwendet wurde. Dieses Vorgehen soll die Aspiration der kleinen Follikel erleichtern und die Rate erfolgreicher In- Vitro- Maturationen erhöhen. Auch der Einsatz von hCG zur Ovulationsinduktion wird kontrovers diskutiert. Arbeitsgruppen, die bei der Behandlung auf diesen Schritt verzichten, scheinen damit vergleichbare Ergebnisse zu erreichen <sup>55</sup>.

Durch die geringere Effektivität des IVM- Verfahrens relativiert sich allerdings die Kostenersparnis pro Behandlungszyklus zumindest zum heutigen Zeitpunkt wieder. Hinzu kommt, dass die Abläufe der IVM- Behandlung im Vergleich zur herkömmlichen IVF insbesondere für das Labor und die Follikelpunktion zeitaufwendiger sind. Jedoch erfordert jedes Verfahren mit neuen Abläufen und Techniken das Absolvieren einer Lernkurve und so kann auch bei der IVM davon ausgegangen werden, dass sowohl bei der Behandlungsdauer als auch beim Behandlungserfolg eine Verbesserung bzw. Steigerung auftreten wird. Bei der Follikelpunktion der kleinantralen Follikel wird jedoch durch die kleinere Größe des Ovars ein zeitlicher Mehraufwand von etwa fünf bis zehn Minuten nicht zu vermeiden sein. Es kann dennoch davon ausgegangen werden, dass sich das Kostenverhältnis mit der Zeit stetig zugunsten der IVM verschiebt.

Für die Patienten selbst wird der Ablauf der IVM- Behandlung durch den Wegfall der ovariellen Überstimulation nicht nur nebenwirkungsärmer sondern auch einfacher. Daher wird das Verfahren in Patientenbefragungen durchweg als positiv bewertet <sup>55</sup>.

Für die vergleichsweise geringen Schwangerschaftsraten dieser Studie könnte auch die Tatsache, dass ein Großteil der Patientinnen bereits ein bis drei erfolglose Zyklen einer IVF- Behandlung hinter sich haben, ursächlich sein. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die meisten Krankenkassen für die ersten Zyklen einer IVF- Behandlung 50% zuzahlen und erst danach eine Teilnahme an einer klinischen Studie attraktiv wird. Tatsächlich scheint es aber sinnvoller zu sein die nebenwirkungsärmere

Behandlung vor der nebenwirkungsreichen Methode durchzuführen. Bei weiterer Effizienzsteigerung der Methode stellt dies eine Perspektive in der klinischen Routineanwendung dar.

Zur Abschätzung der Ovariellen Reserve und des Behandlungserfolges sind Serumparameter von großer Bedeutung. Sie können einerseits eine individuelle Anpassung der Behandlung an die Voraussetzungen der jeweiligen Patientin ermöglichen, andererseits besteht oft von Arzt- und Patientenseite die Erwartung, dass sich die Erfolgsaussichten der IVM-Behandlung durch Serumparameter vorhersagen lassen.

Zahlreiche vorangegangene Studien beschäftigten sich mit der Untersuchung von Behandlungsparametern und der Korrelation dieser zum Behandlungserfolg der IVF, allein in dieser Studie wurde dies jedoch für die neu etablierte IVM-Behandlung durchgeführt.

Die Erwartungen hinsichtlich der Ergebnisse waren unterschiedlich. Einerseits reflektiert der AMH-Spiegel scheinbar die Anzahl der frühantralen Follikel im Ovar (AFC), andererseits lässt sich dies klinisch auch in der IVF nicht oder nur eingeschränkt verwenden, da keine zuverlässige Vorhersage des Behandlungserfolges anhand des AMH-Spiegels möglich ist<sup>3</sup>. Das Ziel dieser Studie war es folglich die von der IVF in ihrem Nutzen umstrittenen Parameter auf ihre Bedeutung für die IVM zu bewerten. Insbesondere AMH und Inhibin B sollten auf ihren prädiktiven Wert hinsichtlich der nach Punktion resultierenden Eizellen und dem Eintreten einer Schwangerschaft geprüft werden. Andere Behandlungsparameter wie Alter, BMI und AFC wurden auf ihre Korrelation untereinander und zum Behandlungserfolg untersucht.

Die Ergebnisse für jeden der untersuchten Parameter werden separat diskutiert. Da zurzeit noch keine weiteren Studien zum prädiktiven Nutzen von Hormonwerten in der IVM-Behandlung vorliegen, werden die Ergebnisse mit vorangegangenen Studien der IVF-Behandlung verglichen.

## 4.2 Prädiktiver Wert von AMH

Es zeigt sich in dieser Studie für AMH ein Korrelationskoeffizient von  $r = -0,081$  zur Anzahl der Germinalvesikel nach Punktion und von  $r = -0,012$  zu der Anzahl an regelrecht fertilisierten Oozyten (2VK). Damit ergibt sich für AMH keine signifikante Korrelation zum Erfolg der IVM- Behandlung. Nach den Ergebnissen dieser Studie ist eine Vorhersage des Behandlungserfolges mit diesem Parameter daher nicht möglich.

Der AMH- Spiegel im Serum von Patientinnen, die sich einer konventionellen IVF unterzogen, scheint jedoch eine Beziehung zum Erfolg der Behandlung zu haben. Studien, in denen Patientinnen anhand der Eizellzahl, die nach einer ovariellen Überstimulation gewonnen wurden, in „high- responder“ und „low- responder“ eingeteilt wurden, zeigen deutlich niedrigere AMH- Spiegel in der „low- responder“- Gruppe. Als Ergebnis resultieren Vorhersagewerte mit einer Sensitivität von einerseits bis zu 26 Prozent<sup>36</sup> bzw. 67 Prozent in einer anderen Studie für den Erfolg der IVF- Behandlung<sup>49</sup>.

Auch andere große prospektive Studien an 238 Patientinnen ergaben für AMH eine Sensitivität von 80 Prozent und eine Spezifität von 85 Prozent in der Vorhersage der ovariellen Reserve<sup>27</sup>. Zudem zeigen andere Studien, dass 75 Prozent der Patientinnen, die IVF- Zyklen wegen zu geringer Ansprechrate abbrechen, AMH- Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen<sup>40</sup>.

Die systematisch durchgeführte Metaanalyse von Broekmans et al. ergibt dagegen einen völlig anderen Stellenwert von allen bekannten Markern und somit auch vom AMH. Die Möglichkeit den Erfolg der IVF, gemessen an der Anzahl resultierender Eizellen bzw. dem Eintreten einer Schwangerschaft, vorherzusagen sei sehr gering oder gar nicht vorhanden. Auch die „poor- responder“ werden laut Broekmans anhand aller bekannten Vorhersageparameter nur mit einer Sensitivität von drei Prozent vorhergesagt<sup>3</sup>.

Zusammenfassend scheint folglich auch AMH in IVF- Populationen keinen großen Wert in der Vorhersage einer Schwangerschaft zu besitzen. Anders



scheint es allerdings in normalen Vergleichspopulationen, in denen AMH durchaus einen prädiktiven Charakter in Bezug auf das Eintreten einer Schwangerschaft gezeigt hat, zu sein <sup>27</sup>. AMH- Spiegel und deren Korrelationen an gesunden fertilen Vergleichspopulationen sind verständlicherweise deutlich weniger von wissenschaftlichem Interesse und somit auch weniger untersucht.

Da für die noch junge Methode der IVM noch keine anderen Studien zum Zusammenhang zwischen AMH und dem Erfolg der IVM vorliegen, ist ein Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen nicht möglich. Der unternommene Vergleich zur Bedeutung von AMH in IVM- und IVF- Behandlungen stellt lediglich den Versuch eines Analogieschlusses dar. Jedoch sind weitere Untersuchungen zu diesem Zweck notwendig.

### 4.3 Prädiktiver Wert von Inhibin B

In dieser Studie ergaben sich für Inhibin-B eine Korrelation zur Eizellzahl von  $r = 0,027$  und zur Anzahl regelrecht fertilisierter Oozyten eine Korrelation von  $r = 0,169$ . Damit liegen auch für Inhibin B keine signifikanten Korrelationen, so dass die Relevanz von Inhibin B als prädiktiver Parameter in der IVM- Behandlung als gering einzuschätzen ist.

Inhibin B ist als zyklusabhängiger Parameter in der IVF in den letzten Jahren nicht in dem Maße untersucht worden wie AMH. Er wurde in den Anfängen der IVF als einer der ersten prädiktiven Parameter untersucht, hat aber in den letzten Jahren durch seine Zyklusschwankungen an Interesse und Attraktivität verloren. Es ergeben sich in Studien zum Teil signifikante Korrelationen zwischen Inhibin B und FSH <sup>51; 48</sup>, keines dieser Ergebnisse scheint jedoch klinischen Nutzen zu haben <sup>2</sup>. Wiederum andere Studien zeigen, dass Inhibin B eine Sensitivität von 87 Prozent und eine Spezifität von 49 Prozent in der Vorhersage so genannter „poor- responder“ aufweist und ergeben eine Korrelation zwischen Inhibin B und der Eizellzahl nach Punktion von  $r = 0,509$  <sup>41</sup>. Eine metaanalytische Übersicht spricht Inhibin B eine klinisch relevante prädiktive Bedeutung ab <sup>3</sup>.

Die starke Diskrepanz zwischen den hier erreichten Ergebnissen kann mit den starken Serumschwankungen von Inhibin B im Verlauf des Zyklus erklärt werden. Es erfordert eine sehr zeitgenaue Durchführung der Blutentnahme an jeweils exakt demselben Tag des Zyklus jeder Patientin. Ob dieses enge Zeitfenster einen klinischen Nutzen in Zukunft nicht generell verhindert, ist eine Frage, die prinzipiell geklärt werden sollte.

Es muss anbei kritisch erwähnt werden, dass die Blutentnahmen der Patientinnen an der Universitätsklinik in Lübeck an Tag 1 bis 3 des Zyklus stattfanden. Es mag sein, dass schon durch diese Tatsache die Inhibin B-Werte sehr stark gestreut haben (hohe Standardabweichungen).

Sowohl AMH als auch Inhibin B wurden im Rahmen dieser Studie erstmals mit dem oben beschriebenen ELISA bestimmt. Die Erstanwendung dieser Methode könnte daher eine weitere Begründung für die große Streuung der Ergebnisse sein.

#### **4.4 Prädiktiver Wert der antralen Follikelzahl (AFC)**

Der AFC zeigt in dieser Studie eine Korrelation von  $r = -0,238$  zu der Anzahl an Zweivorkernstadien und eine Korrelation von  $r = -0,239$  zu der Anzahl regelrecht fertilisierter Oozyten. Damit ergeben sich in dieser Studie auch für den dritten untersuchten potentiellen prädiktiven Marker AFC keine signifikanten Korrelationen zum Behandlungserfolg der IVM.

Der AFC scheint als ein direkter Parameter zur Vorhersage der nach der Punktion resultierenden Eizellen geeignet zu sein. Viele Forschungsergebnisse stellen den AFC als wichtigsten prädiktiven Marker für die gewinnbare Eizellzahl in den Vordergrund. Es ergeben sich bei diesen Studien Korrelationen von  $r = 0,81$ . Die Signifikanz dieser Ergebnisse ist allerdings immer noch nicht sehr hoch und lässt sich selbst nach rechnerischem Hinzufügen der anderen üblichen Serum-Parameter nicht verbessern<sup>51</sup>. Andere Studien ergeben Korrelationen von  $r = 0,505$  für den AFC und die resultierenden Eizellen in der IVF<sup>41</sup>. Auch in der Vorhersage einer Schwangerschaft beweist sich der AFC zum Teil als besserer prädiktiver Marker als Inhibin B, Estradiol oder FSH<sup>27</sup>.

Bei der IVF wird zwischen dem Zeitpunkt des basalen Ultraschalls und der Follikelpunktion die Stimulation des Ovars vorgenommen, so dass viele Follikel, die vorher im Ultraschall nicht sichtbar waren, hormonell getriggert wachsen und reifen. Bei der IVM dagegen wird der AFC erhoben und im selben Zyklus die Punktion meist ohne vorherige Stimulation durchgeführt, so dass der AFC zumindest theoretisch als ein perfektes Maß für die resultierende Eizellzahl erscheint. Der Nachteil dieses Parameters liegt allerdings in der subjektiven Ultraschalluntersuchung, die sehr von der Erfahrung und den Fähigkeiten des Untersuchers sowie von der Qualität des Ultraschallgerätes abhängig ist. So wurden im Falle dieser Studie zwei unterschiedliche Ultraschallgeräte zur Bestimmung des AFC einerseits und zur Punktion andererseits verwandt. Zudem wurden die Bestimmungen des AFC von drei wechselnden Untersuchern vorgenommen, da dies der klinische Alltag erforderte. Das mag Verfälschungen der vorliegenden Ergebnisse erklären.

#### **4.5 Weitere Korrelationen zwischen Zyklusparametern**

Neben den Hormonparametern AMH, Inhibin B und dem klinischen Parameter AFC, wurden auch die klinischen Daten der Patientinnen wie beispielsweise das Alter, die Dauer der Infertilität und die Routinehormonparameter wie FSH oder LH auf ihre Korrelation zu der Anzahl der Germinalvesikel und der Anzahl der regelrecht fertilisierten Eizellen untersucht. Es ergeben sich keine signifikanten Korrelationen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass auch Parameter wie der BMI, das Alter der Patientinnen und die Dauer der Infertilität eine negative Korrelation zum Behandlungserfolg nach IVM aufweisen, da all diese Einflüsse im klinischen Alltag im Verdacht stehen die Fertilität einer Frau zu verringern. Dies scheint im Falle der IVM aber weniger bedeutend zu sein, denn zumindest für die IVM- Methode konnte kein direkter Einfluss dieser Parameter auf das Ergebnis der Behandlung festgestellt werden.

Vor Therapiebeginn wurden allerdings anhand dieser Parameter Patientinnen von der IVM- Studie ausgeschlossen (siehe Ein- und

Ausschlusskriterien). Dies hatte neben den zu erwartenden geringeren Erfolgsaussichten auch andere Gründe. Für den Parameter des BMI bzw. des maximal erlaubten Gewichtes von 100 Kilogramm im Rahmen der In-Vitro- Maturation war der Ausschluss von der IVM- Behandlung vor allem dadurch begründet, dass bei der Punktion der kleinen antralen Follikel gute Ultraschallbedingungen notwendig sind. Zudem ist es bei der Punktion zum Teil notwendig das Ovar transabdominal durch eine zweite Person mittels externer Kompression zu fixieren. Dies ist bei Patientinnen mit hohem BMI oder zu hohem Gewicht nicht mehr durchführbar.

Mit zunehmendem Alter sinkt die Anzahl der rekrutierbaren Follikel im Ovar und damit auch die Anzahl an gewinnbarer Eizellen nach der Punktion. Jedoch resultieren auch aus anderen Arbeitsgruppen zum Teil nur Korrelationen von  $r = -0,275$  zwischen dem Alter der Patientinnen und den Eizellmenge nach Punktion<sup>49</sup>. Insgesamt zeigt sich in zahlreichen Studien eine nur sehr geringe Abhängigkeit der Oozytenzahlen von Behandlungsparametern wie Alter, BMI oder anderen Zyklusparametern. In der Arbeitsgruppe um Fanchin et al zeigte sich zudem, dass auch die AMH-Hormonlevel im Serum sowie in der Follikelflüssigkeit keine signifikante Korrelation zu den Parametern Alter, BMI und Zykluslänge aufweisen<sup>20</sup>. Es stellt sich bei der Betrachtung der Datenlage die Frage, ob die Bedeutung des Alters einer Frau für die Ursachen einer Infertilität überschätzt wird. Andere Studien belegen dagegen einen Zusammenhang zwischen Alter und Erfolg der In- Vitro- Fertilisation<sup>52</sup>. Insgesamt wird allerdings von einer altersbedingten Abhängigkeit des Behandlungserfolges ausgegangen, jedoch scheint eine Vielzahl weiterer Faktoren mit Einfluss auf den individuellen Behandlungserfolg beteiligt zu sein. Für die IVM kann anhand dieser Studie keine Beziehung des Behandlungserfolges zum Alter festgestellt werden.

#### 4.6 Sind prädiktive Tests möglich und sinnvoll?

Zwischen keinem der untersuchten Parameter konnte eine Korrelation zum Behandlungserfolg der IVM Behandlung festgestellt werden. Im Hinblick auf diese Ergebnisse stellt sich daher die Frage, ob die Verwendung eines prädiktiven Parameters generell sinnvoll ist.

In der IVF- Behandlung wurden bereits zahlreiche klinische Testmethoden diskutiert wie etwa der Clomiphen Citrat Challenge Test (CCCT) und der Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT). Beide basieren auf dem Prinzip nach exogener Gabe von Clomiphen (CCCT) bzw. FSH (EFFORT) von der resultierenden Hormonsekretion des Ovars Rückschlüsse auf die ovarielle Reserve ziehen zu können. Ein weiterer Test, der GAST (Gonadotropin releasing hormone agonist stimulation test), bestimmt die ovarielle Hormonsekretion nach Gabe eines Gonadotropin- Agonisten. All diesen Tests gemeinsam ist das Ziel den individuellen Behandlungserfolg vorherzusagen. Diese Tests, die zum Teil schon im klinischen Alltag der IVF angewandt werden, sind in ihrem Nutzen aber ebenfalls umstritten. Eine Metaanalyse von Broekmans et al zeigt, dass weder diese Testverfahren, noch die Bestimmung von AMH, Inhibin B oder AFC eine prädiktive Eigenschaft besitzen und damit für den klinischen Alltag keinen Nutzen zeigen. Nur drei Prozent der Patientinnen, für die die IVF wenig Erfolg versprechend ist, da sie nur eine sehr geringe Eizellzahl von weniger als drei Oozyten entwickeln und als „poor responder“ gelten, werden mithilfe dieser Tests identifiziert<sup>3</sup>. Nach Broekmans et al scheint allein die erfolgreiche Durchführung eines IVF- bzw. IVM- Zyklus in der Vorgeschichte einer Patientin eine gute Vorhersage über den Verlauf weiterer Zyklen zu erlauben<sup>3</sup>.

Im Zeitalter der evidenzbasierten Medizin nimmt eine möglichst effektive und objektiv gut zu beurteilende Behandlung einer Erkrankung einen hohen Stellenwert ein. Als evidenzbasierte Medizin versteht man jede Form von medizinischer Behandlung, bei der patientenorientierte Entscheidungen ausdrücklich auf der Grundlage von nachgewiesener Wirksamkeit getroffen

werden. Der Wirksamkeitsnachweis erfolgt dabei durch statistische Verfahren.

Auf Grund der widersprüchlichen Ergebnisse statistischer Tests herrscht daher Uneinigkeit über den Nutzen klinischer Tests oder der Verwendung von Hormonparametern zur Vorhersage des Behandlungserfolges. Einige Studien befürworteten AMH, einige AFC und andere Inhibin B oder FSH als Prädiktor. Andere Autoren schränken ein, dass die Kombination aller Parameter die maximale Aussagekraft beinhalte.

Allen bisher publizierten Untersuchungen zur Prädiktion der ovariellen Reaktion und einer Schwangerschaft ist jedoch gemeinsam, dass kein Parameter mit Sicherheit und reproduzierbar eine Vorhersage erlaubt.

Des Weiteren sollen bei der Behandlung Kosten gespart und Behandlungswege kurz und übersichtlich gestaltet werden. Folglich haben Hormon- und Untersuchungsparameter für den Patienten und für die Kostenträger das Ziel die kostengünstigste und kürzeste Behandlung zu detektieren. Auf der anderen Seite verursachen diese Parameter und Untersuchungen ihrerseits wieder Kosten und müssen daher auf ihre Notwendigkeit hin geprüft werden.

Da sich in dieser Studie keine Korrelation zwischen den oben genannten Parametern und dem Behandlungserfolg zeigt, muss hier davon ausgegangen werden, dass diese Parameter nicht sinnvoll sind. Da allerdings AFC, FSH und LH für die Basisdiagnostik ohnehin verwendet werden um Pathologien der Ovarien und des endokrinen Systems auszuschließen, führen diese Untersuchungen nicht zu Zusatzkosten. Es kann jedoch anhand dieser Studie nicht empfohlen werden eine Schwangerschaft oder auch nur die Anzahl der resultierenden Eizellen mithilfe dieser Parameter vorherzusagen.

#### **4.7 Vor- und Nachteile der Patientenselektion**

Bei allen Paaren, die in Lübeck eine IVM- Behandlung erhielten, wurde anhand fest definierter Ein- und Ausschlussparameter die Eignung für die Teilnahme an der IVM- Studie geprüft (siehe oben). So wurden

Patientinnen mit vermuteter Erschöpfung der ovariellen Reserve von der Behandlung ausgeschlossen. Als Kriterien einer erschöpften ovariellen Reserve wurden eine sonographisch bestimmte antrale Follikelzahl unter sechs Follikeln oder ein FSH (basal)  $< 10$  IU/ml gewählt. Auch das Alter wurde mit höchstens 41 Jahren und das Gewicht mit höchstens 100 Kilogramm festgelegt. Mit diesen Kriterien wurde versucht sicher zu stellen, dass sich durch die Punktion ausreichend Eizellen gewinnen lassen. Diese Kriterien sind nur der Versuch die komplexen Rahmenbedingungen der Eizellreifung in Form standardisierender Ein- und Ausschlusskriterien zu definieren. Allerdings gibt es auch Frauen weit über 41 Jahre, die sehr gute Eizellraten aufweisen und solche, die in jungen Jahren schon Zeichen der ovariellen Erschöpfung zeigen<sup>50</sup>.

Die starken Schwankungen im Zusammenhang zwischen Fertilität und dem Alter machen die Entscheidung schwierig, bis zu welchem Alter die Behandlung eines Paares erfolgen und bis zu welchem Alter diese abgelehnt werden sollte. Auch ohne Infertilitätsbehandlung werden einige Patientinnen mit Mitte vierzig noch Eltern, während bei anderen die Menopause bereits mit vierzig erreicht ist. Auch die Diskussion, bis zu welchem Alter die Patientin aus moralischen Gründen noch eine assistierte Fertilisation erhalten darf, ist einheitlich schwer zu beantworten und international sehr unterschiedlich geregelt. So ist Deutschland nicht nur eines der Länder mit den strengsten Maßregelungen im Embryonenschutz sondern auch in der Infertilitätsbehandlung. Das Embryonen-Schutz-Gesetz (EschG) beinhaltet unter anderem die „Dreierregel“, die besagt, dass höchstens drei Embryonen pro Zyklus gezeugt und transferiert werden dürfen. Aus den USA erreichen uns immer häufiger Meldungen über Mehrlingsgeburten von über 50jährigen Müttern. Ob dies sinnvoll und ethisch wünschenswert ist, wird eine der schwierigsten Entscheidungen in der Zukunft der Infertilitätsmedizin sein. Zurzeit werden Patientinnen mit einem Alter bis 45 Jahren zu einer IVF- Behandlung zugelassen, wobei die gesetzlichen Krankenkassen sich nur bis zu einem Alter der Frau von 39 Jahren und des Mannes von 50 Jahren an den Kosten beteiligen.

Im Rahmen der IVM, die sich noch in der Etablierungsphase befindet, macht es Sinn die Behandlung zunächst auf jüngere Patientinnen zu

beschränken, um die maximal zu erreichenden Oozytenzahlen und die optimalen Behandlungsbedingungen zu definieren. Anfänglich war die Teilnahme an der Studie ohne Altersbegrenzung geplant. Nach den ersten Erfahrungen, wurde das maximal erlaubte Alter auf 41 Jahre festgelegt. Auch dieser Wert wurde nach weiteren klinischen Erfahrungen weiter nach unten korrigiert und liegt jetzt bei 37 Jahren für die Teilnahme an der IVM-Studie in Lübeck.

Nach den in dieser Studie gemachten Erfahrungen scheint auch in der IVM-Behandlung eine Selektion interessierter Patientinnen anhand der Parameter AMH und Inhibin B nicht empfehlenswert zu sein. Dem AFC, der in dieser Studie ebenfalls keine signifikante Korrelation zum Behandlungserfolg aufwies, könnte zukünftig dennoch eine solche Bedeutung zuzukommen. Als direktes Maß der Zahl heranreifender Eizahlen kann spekuliert werden, dass sich mit zunehmender Erfahrung bei der Follikelpunktion, sowie bei verbesserter Standardisierung der Sonographie an Tag 1 bis 3 des Zyklus, eine signifikante Korrelation zum Behandlungserfolg einstellen könnte. Diese Annahme sollte in weiteren Studien überprüft werden.

Prinzipiell sollte ein Ausschluss von einer Behandlung in der Infertilitätsbehandlung wie in anderen Bereichen der Medizin kritisch vorgenommen werden und sich auf die individuelle Paarkonstellation beziehen.

## **4.8. Offene Fragen der IVM**

### **4.8.1 Gonadotropinpriming/ Ovulationsinduktion**

Im Rahmen der In- Vitro- Maturation wird kontrovers diskutiert ob ein niedrig dosiertes „Priming“ in Form von gering dosierten Gonadotropinen (FSH und hCG) sinnvoll oder gar notwendig ist. Mit diesem niedrig dosierten FSH sollen die Follikel etwas größer und in höherer Anzahl heranreifen, so dass die Punktion besser und erfolgreicher durchzuführen ist. Ein Nachteil ist



jedoch, dass auch hier wieder Hormone mit den damit verbundenen Nebenwirkungen und Risiken zugeführt werden, selbst wenn sie in diesem Fall sehr gering ausfallen. Zahlreiche Arbeitsgruppen befürworten einen Verzicht auf die Gonadotropine und scheinen vergleichbare Ergebnisse zu erreichen<sup>55</sup>. Studien zu diesen Fragen sind nur unzureichend und mit zu geringen Fallzahlen vorhanden.

Ein niedrig dosiertes Priming scheint allerdings gerade bei Patientinnen mit PCO- Syndrom die Maturations- und Fertilisationsrate zu verbessern<sup>55</sup>. Da die IVM insbesondere für Frauen mit PCO- Syndrom besonders attraktiv ist, erscheint es sinnvoll, wie im Falle dieser Studie, das gering dosierte Hormonpriming durchzuführen.

Dieselbe kontroverse Diskussion betrifft die Ovulationsinduktion mittels hCG. Der im klinischen Alltag nicht zu unterschätzende Vorteil ist die gute Planbarkeit der Eizellreifung durch die exogene Induktion, was den hCG-Einsatz daher sinnvoll erscheinen lässt. Es wäre jedoch wünschenswert, wenn weitere Arbeitsgruppen sich mit diesen Zusammenhängen in Form von großen prospektiv- randomisierten Studien beschäftigen würden und dadurch eine wichtige Optimierung des IVM- Verfahrens zu ermöglichen.

#### **4.8.2 Rolle der Follikeldominanz/ Punktionszeitpunkt**

Ein strittiger Punkt im Behandlungsablauf der In- Vitro- Maturation ist weiterhin der Zeitpunkt der Follikelpunktion.

Im Ovar reift bei normozyklischen Frauen simultan eine Kohorte aus kleinantralen Follikeln heran, die sich bis zu einem gewissen Zeitpunkt qualitativ gleichwertig entwickeln. Ein Follikel mit relativ niedriger FSH-Schwelle wird im weiteren Verlauf dominant und durch eigene Östrogenproduktion unabhängiger vom FSH. Über einen negativen Rückkopplungseffekt drosselt das Östrogen die FSH- Ausschüttung und entzieht damit der übrigen Follikelkohorte, die eine höhere FSH- Schwelle aufweist, die Wachstumsbedingungen (FSH- Schwellenwerttheorie). Findet die Follikelpunktion vor dem Auftreten eines dominanten Follikels statt, das heißt wenn der Leitfollikel erst einen Durchmesser von kleiner 10- 12 mm

aufweist, so erhält man eine nahezu gleichwertige Kohorte von Follikeln. Punktiert man erst nach dem Auftreten eines dominanten Follikels, lassen sich neben dem dominanten nur vermehrt teil- atretische Follikel gewinnen. Neuere Daten lassen allerdings die Vermutung zu, dass die resultierende Follikelkohorte auch beim zweit genannten Verfahren nicht von minderwertiger Qualität ist <sup>9</sup>. Dies könnte unter anderem auch mit dem bei IVF durchgeführten exogenen FSH- Priming im Zusammenhang stehen. Eine später im Zyklus stattfindende Punktion hätte den Vorteil, dass das Endometrium weiter gereift wäre und zum Zeitpunkt des Embryonentransfers optimaler auf die Implantation vorbereitet ist <sup>55</sup>.

Um dieses optimal vorbereitete Endometrium auch bei frühzeitiger Punktion des Ovars zu gewährleisten, wird in Lübeck im Rahmen einer Folgestudie untersucht, ob eine Verschiebung des Embryonentransfers auf den Folgezyklus zu einer Steigerung der Schwangerschaftsraten führt. Dies ist dank modernster Kryokonservierungstechniken der Vorkernstadien nahezu ohne Qualitätsverlust möglich <sup>30</sup>.

#### **4.8.3 Reifungsmedium/ Wachstumsfaktoren**

Ein weiterer unsicherer Faktor in der IVM- Behandlung ist das Medium, in dem die unreifen Eizellen zur Reifung gebracht werden. Über die Anforderungen der unreifen Follikel an ihre Umgebung ist wenig bekannt.

Die Reifung außerhalb des Körpers, der IVM, fordert daher ein ständiges Variieren und Auszuprobieren der Reifungsbedingungen mit dem Ziel ein optimales Wachstum zu erlauben. Eine weitere Verfeinerung dieses Mediums könnte unter Umständen eine qualitative und quantitative hochwertigere Eizellreifung ermöglichen, daher ist hier der Forschungsbedarf hoch. Experimentell bereits eingesetzt wurden Medienzusätze wie Estradiol, epidermal growth factor (EGF) und follicular fluid- meiosis activating sterol (F-MAS) <sup>47</sup>. In dieser Studie wurde ein kommerziell erhältliches IVM- Medium unter Zusatz von Gonadotropinen in der vom Hersteller empfohlenen Dosierung verwendet. Die Maturationsrate lag hierbei bei 63,2 Prozent  $\pm$  33,6 und war damit in Übereinstimmung mit publizierten Daten der Literatur zufrieden stellend.

#### 4.8.4 Langzeitentwicklung der IVM- Kinder

Bevor die IVM in größerem Umfang in die klinische Routine etabliert werden kann, sind langfristige Daten der nach IVM geborenen Kinder zwingend erforderlich. Da dies Verfahren sehr jung ist und zumindest in Deutschland nur in den beiden universitären Zentren Lübeck und Heidelberg durchgeführt wird ist eine Nachuntersuchung bisher nur in kleinen Ansätzen möglich gewesen. Wünschenswert wäre nun eine weltweite Zusammenarbeit aller IVM- Zentren um große Studien mit ausreichenden Fallzahlen durchführen zu können.

Deutschlandweit hat eine Zusammenarbeit den IVM- Zentren Heidelberg und Lübeck unter Beteiligung der Humangenetik in Essen (Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Horsthemke, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) in Form einer prospektiven verblindeten Studie begonnen. Als Kontrollgruppe werden Patientinnen einer IVF- Behandlung gewählt, die dasselbe Alter und eine vergleichbare Vorgeschichte aufweisen. Jede Schwangerschaft in Folge einer IVM- Behandlung wird in ihrem Verlauf untersucht, insbesondere umfasst die Studie die Schwerpunkte Früh- oder Spätabort, Schwangerschafts- und Geburtsverlauf sowie eine Neugeborenenuntersuchung und eine pädiatrischen Untersuchung der Kinder im Alter von einem Jahr. Nach einer geplanten Studiendauer von ca. drei Jahren für die Patientinnenselektion und einer weiteren Beobachtungszeit der Kinder von zwei bis fünf Jahren wird eine weitergehende Aussage zur Entwicklung und Gesundheit von Kindern nach IVM- Behandlung möglich sein ("Follow-up of pregnancies established after in vitro maturation and consecutive IVF", Geschäftszeichen: OT 334/2-1, Bewilligung vom 28.04.2008)

## 4.9 Ausblick

Die In-vitro-Maturation stellt eine Behandlungsalternative zur herkömmlichen IVF dar, die kostengünstiger und nebenwirkungsärmer als diese ist und nicht zuletzt für Patientinnen mit dem PCO- Syndrom in Bezug auf das Überstimulationssyndrom eine erhebliche Risikoreduktion darstellt. Nicht zu Unrecht fragt man sich, warum diese Methode der Entnahme unreifer Eizellen, die noch vor den Versuchen einer Überstimulation des Ovars in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckt wurde, so lange ins Hintertreffen geraten konnte. Bei den ersten Versuchen mit unreifen Eizellen wurden Eizellen aus chirurgisch entfernten ovariellen Gewebeproben<sup>7</sup> verwendet. Später nutzte man unreife Eizellen, die bei der Punktion bei der IVF- Behandlung als Nebenprodukt anfielen. Es zeigte sich, dass im letzteren Falle durch den Prozess der Überstimulation die unreifen Eizellen eine minderwertige Population darstellten und somit deutlich ungeeigneter für eine Befruchtung sind als reif gewonnene Eizellen. Dieses ist bei Eizellen, die von vorneherein ohne eine Überstimulation aus dem Ovar entnommen werden, nicht der Fall. Soweit es ohne die Daten der Langzeitentwicklung von durch IVF entstandenen Kindern abzuschätzen ist, hat die Entnahme unreifer Eizellen ohne eine Überstimulation des Ovars und die Reifung außerhalb des Körpers bei nach IVM geborenen Kindern keine nachteiligen Folgen. Die Übersichtsarbeit von Jurema et al ergab Abortraten der IVM- Kollektiven zwischen 13 und 52,9% für Patienten mit PCO- Syndrom und zwischen 16,7 und 33,3% für andere IVM Patientinnen<sup>30</sup>. Auch die Abortraten bei Schwangerschaften ohne die assistierte Reproduktion schwanken in Abhängigkeit vom Alter der Frau deutlich. Schätzwerte gehen von 10- 20% nach klinisch festgestellter Schwangerschaft aus<sup>18</sup>, wobei genaue Zahlen aufgrund der häufig unbemerkten Frühaborte nicht genau zu erheben sind. Ein Vergleich scheint daher nur unzureichend möglich.

Tatsächlich könnte die zuerst entdeckte und wieder verworfene Methode der IVM langfristig zu einer echten Alternative für die IVF werden. Eine Bedingung dafür wäre allerdings eine vergleichbare oder sogar bessere

Erfolgsrate. Dies ist zumindest im Fall der von der Universität zu Lübeck durchgeführten IVM- Behandlungen leider noch nicht der Fall. Die Schwangerschaftsrate von ca. 12 Prozent an der Universitätsklinik in Lübeck zeigt nur die Ansätze der Möglichkeiten dieser Methode. In Studien wurden auch schon Schwangerschaftsraten von bis zu 27 Prozent pro Transfer bei Verwendung einer möglichst großen Anzahl an Embryonen<sup>6</sup> bzw. von 20 Prozent bei der Verwendung von maximal zwei bis drei Embryonen erreicht werden<sup>8; 38</sup>.

Die Gründe für diese gravierenden Unterschiede können vielfältig sein. Die Patientinnen, die für die Lübecker Studie rekrutiert wurden, hatten oft schon viele Fertilisationsversuche hinter sich bzw. hatten in Folge fortgeschrittenen Alters oder anderen Gründen keinen Anspruch der Krankenkasse auf Kostenübernahme der herkömmlichen IVF, so dass für diese Patientinnen die kostenlose IVM- Studie besonders attraktiv war. Auf diese Weise wies allein schon die Patientinnengruppe eine als niedriger einzuschätzende Chance auf Behandlungserfolg auf. Zudem handelt es sich bei der IVM um eine Behandlung, die in Lübeck erst seit Anfang 2005 durchgeführt wird und daher noch nicht in dem Maße zur klinischen Routine gehört wie es bei der seit 30 Jahren etablierten IVF der Fall ist. Hier besteht also erheblicher Optimierungsbedarf bei jedoch vorhandenem Optimierungspotenzial, sowohl in Bezug auf die Anzahl der gewonnen Eizellen nach Punktion als auch in Bezug auf die erzielbaren Schwangerschaftsraten.

Die Reproduktionsmedizin wird im Laufe der nächsten Jahrzehnte immer mehr an Bedeutung gewinnen. Das zunehmend höhere Alter von Paaren bei Beginn der Familienplanung macht es für immer mehr Menschen bedeutsam die richtige Methode der Sterilitätsbehandlung zu finden. Bisher gab es zur konventionellen IVF kaum eine qualitativ gleichwertige Alternative. Mit der Einführung der IVM könnte sich ein alternativer Weg der assistierten Fertilisation abzeichnen. Für PCO- Patientinnen beispielsweise oder Patientinnen mit guter ovarieller Reserve erscheint die IVM gegenüber der IVF aufgrund des Risikopotenzials vorteilhafter. Da die ovarielle Reserve im jungen Alter meist noch größer ist, scheint die IVM insbesondere eine Methode für junge Patientinnen darzustellen. Es wäre

also u.U. zukünftig sinnvoll, auch in Bezug auf die Nebenwirkungen, primär einen Therapieversuch mittels IVM vorzunehmen und erst mit fortschreitendem Alter oder ausbleibendem Behandlungserfolg auf die IVF zurückzugreifen. Dies scheitert momentan noch an der Tatsache, dass die Krankenkassen die Kosten für die IVM nicht übernehmen, so dass erst nach meist drei erfolglosen IVF- Versuchen die IVM im Rahmen von Studien durchgeführt wird. Die IVM muss sich als Behandlung erst weiter etablieren und bessere Erfolgsaussichten zeigen, bevor sich daran etwas ändern dürfte.

Zukünftige Studien müssen nun zeigen welchen Stellenwert die IVM in der Reproduktionsmedizin einnehmen wird. Jeder einzelne Schritt der Behandlung sollte auf seine Notwendigkeit und Optimierbarkeit untersucht werden um die Behandlung ungewollter Kinderlosigkeit in Zukunft so einfach, sicher und erfolgreich wie möglich handhaben zu können.

Vor diesem Hintergrund kann aus Sicht dieser Studie kein klinischer Nutzen in der Bestimmung von AMH, Inhibin B, AFC und Estradiol in der IVM-Behandlung abgeleitet werden. Der Bedarf an der Durchführung weiterer Studien besteht um dieses Ergebnis zu untermauern oder neue Optionen aufzuzeigen.

## 5. Zusammenfassung

Als neue nebenwirkungsärmere Alternative zur jetzt 30 Jahre etablierten In-Vitro-Fertilisation (IVF) wird zunehmend die Aspiration frühantraler unreifer Follikel und deren in Vitro-Reifung (In-Vitro-Maturation, IVM) diskutiert. Durch den Verzicht auf eine hoch dosierte Hormonstimulierung können schwerwiegende Nebenwirkungen wie das Überstimulationssyndrom der konventionellen IVF weitgehend vermieden und zudem noch Kosten gespart werden. Das Ziel der IVM ist die Gewinnung von Oozyten im Germinalstadium und deren in vitro Reifung zur Metaphase zwei der Reifungsteilung sowie die anschließende Fertilisation und Implantation des entstehenden Embryos.

Mit fortschreitender klinischer Etablierung des recht jungen Verfahrens der IVM ergibt sich die Fragestellung inwiefern behandlungsrelevante endokrine Parameter von der IVF auf die IVM übertragbar sind. Etablierte Parameter wie das Follikel-stimulierende Hormon (FSH), das luteinisierende Hormon (LH) und Estradiol, klinische Parameter wie die sonographisch bestimmte Follikelzahl (AFC), Alter und BMI wie auch neu diskutierte Hormonparameter wie das Anti-Müller-Hormon und Inhibin B wurden in der vorgelegten Untersuchung untereinander und zum Behandlungserfolg in Beziehung gesetzt.

Das vorgestellte Kollektiv umfasste 80 Patientinnen, die sich im Rahmen eines Kinderwunsches in der Infertilitätssprechstunde in Lübeck vorstellten. Im Rahmen einer Basisuntersuchung wurden Serumparameter und die sonographisch erkennbare Follikelzahl (AFC) bestimmt.

Nach einem niedrig dosierten Gonadotropinpriming mit anschließender Ovulationsinduktion mittels hCG wurden mit einem hoch auflösendem Ultraschallgerät und einem speziellen Aspirationssystem unreife Oozyten entnommen. Diese wurden nach anschließender Reifung über 24 bis 32 Stunden mittels ICSI fertilisiert. Wenn vorhanden, wurden die resultierenden Embryonen zurückgesetzt und gegebenenfalls eine Schwangerschaft festgestellt.

Die 77 punktierten Patientinnen hatten ein Durchschnittsalter von  $34,02 \pm 4,90$  Jahren. Im Mittel wurden  $9,3 \pm 6,6$  Eizellen pro Patientin gewonnen und es konnte durchschnittlich in 88,3 Prozent der Punktionen ein Embryonentransfer vorgenommen werden. Die Maturationsrate betrug  $63,24 \pm 33,58$  % und die regelrechte Fertilisationsrate 33 %. Es ergaben sich Korrelationen zwischen AMH und den aus der Punktion resultierenden Germinalvesikeln von  $r = -0,081$  für AMH und zu der Anzahl regelrecht fertilisierten Oozyten von  $r = -0,012$ . Für Inhibin B ergaben sich Korrelationen zu den Germinalvesikeln bzw. den Oozyten von  $r = 0,027$  bzw.  $r = 0,165$ . Damit ergeben sich für beide Hormonparameter keine signifikanten Korrelationen zum Behandlungserfolg nach IVM. Dasselbe Ergebnis zeigten die Korrelationsanalysen der anderen Behandlungsparameter wie dem AFC, dem BMI, dem Alter oder der Dauer der Infertilität. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zum Behandlungserfolg der IVM.

Für die IVM ergeben sich nach den Ergebnissen dieser Studie keine signifikanten Korrelationen, so dass eine Vorhersage des Behandlungserfolges anhand dieser Parameter nicht möglich zu sein scheint. In dieser Studie zeigt sich ebenfalls keine signifikante Korrelation für die antrale Follikelzahl (AFC) oder das Alter der Patientinnen zum Behandlungserfolg. Ein Einsatz dieser Parameter für die Prädiktion der gewinnbaren Eizellzahlen bzw. den Behandlungserfolg (Schwangerschaft) kann anhand dieser Studienergebnisse derzeit nicht empfohlen werden.

Die IVM- Behandlung bietet das Potential langfristig zu einer gleichberechtigten Alternative zur IVF zu werden. Daher besteht der Bedarf an weiteren Studien.



## 6. Literaturverzeichnis

- 1 AlQahtani A, Muttukrishna S, Appasamy M, Johnst J, Cranfield M, Vissert JA, Themmen APN, Groome NP (2005) Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Müllerian hormone and the evaluation of potential clinical application in males and females. *Clinical Endocrinology*, 63, 267-273
- 2 Bansci LF, Huijs AM, den Ouden CT et al. (2000) Basal follicle-stimulating hormone levels are of limited value in predicting ongoing pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 73, 552- 557
- 3 Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB, (2006) A systematic review of tests predicting ovarian response and IVF outcome. *Human Reprod Update*, 12, 685- 718)
- 4 Bundesministerium des Inneren: Bericht der unabhängigen Kommission Zuwanderung (2006 ) [www.bmi.bund.de](http://www.bmi.bund.de) (Tag des Zugriffs: 30.03.2008))
- 5 Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Groome N., Guthrie JR., Green A & Dennerstein L (1999) Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 84, 4025-4030
- 6 Cha KY, Han SY, Chung HM et al. (2000) Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilisation and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility Sterility*, 73, 978-983
- 7 Cha KY, Koo JJ, Ko JJ et al. (1991) Pregnancy after in vitro fertilisation of human follicular oocytes collected from nonstimulating cycles<sup>37</sup>, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertility and Sterility*, 55, 109-113
- 8 Chian RC, Buckett WM, Tulandi T et al. (2000) Prospective randomized study of human chorionic gonadotropin priming before immature oocyte retrieval from unstimulating women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*, 15, 165-170
- 9 Chian RC, Buckett, WM, Jalil, AKH et al (2004) Natural- cycle in vitro fertilisation combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment, *Fertil Steril*, 82, 1676- 1678
- 10 Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Husheh AJW (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle- stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137, 1447- 1456
- 11 Cook CL, Siow Y, Taylor S & Fallat ME, (2000) Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal woman. *Fertility and Sterility*, 73, 859-861
- 12 Corson SL, Gutman J, Batzer FR, et al. Inhibin B as a test of ovarian reserve in infertile women. *Human Reproduction*, 14, 2818-2821
- 13 Creus M, Penarrubia J, Fabregues F, et al. (2000) Day 3 serum inhibin B and FSH and age as a predictor of assisted reproduction treatment outcome., *Human Reproduction*, 15, 2341-2346
- 14 di Clement N, Goxe B, Remy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B & Salesse R (1994) Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine*, 2, 553-558

- 15 Diedrich K, Kunz S (2005) Endlich ein Baby. Knauer- Verlag, 107
- 16 Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. (2001) Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142, 4891-9
- 17 Dietrich, Holzgreve, Jonat, Schultze- Mosgau, Schneider, Weiss (2007) Gynäkologie und Geburtshilfe. 517
- 18 Dzik A, Lambert- Messerlian G, Izzo VM, Soares JB, Pinotti JA, Seifer DB (2000) Inhibin B response to EFFORD is associated with the outcome of oocyte retrieval in the subsequent in vitro fertilisation cycle. *Fertil Steril*, 74, 1114-1117
- 19 Edwards RG (1965) Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*, 2, 926-929
- 20 Fachin R, Nabil Louafi M D, Daniel H, Mendez Lozano M D, Frydman N, Pharm D, Frydman R, M D and Taieb J, Ph. D. (2005) Per-follikel measurements indicate that anti-Müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil steril*. 84, 167-73
- 21 Fachin R, Schönäuer LM, Claudia Righini, Guibourdenche J, Frydman R and Taieb J (2003) Serum anti- mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Human Reproduktion*, 18, 323-327,
- 22 Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C & Carillo A (1997) Mullerian- Inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome and endometriose. *Fertility and Sterility*, 67, 962-965
- 23 Fenichel P, Rey R, Poggioli S, Donzeau M, Chevallier D & Pointtis G (1999) Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstruktiv azoospermia. *Human Reproduktions*, 14, 2020-2024
- 24 Franks S (1995) Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*, 333, 853-861
- 25 Fujisawa M, Yamasaki T, Okada H & Kamidono S (2002) The significance of anti-Müllerian hormone concentrations in seminal plasma for spermatogenesis. *Human Reproduction*, 17, 968-970
- 26 Gustafson M, Lee M, Asmundson L, Maclaughlin D & Donahoe P (1993) Müllerian inhibiting substance in the diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. *Journal of Pediatric Surgery*, 28, 439- 444
- 27 Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM and Cohen- Bacrie P (2004) Serum antimullerian hormone/ mullerian- inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle- stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril.*, 82, 1323- 1329
- 28 Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts L M, Mellon S H, McGee E, Nachtigal MW and Visser J A (2000) Autocrine and paracrine Mullerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.*, 55, 53- 67
- 29 injection of single spermatozoon into an oocyte (1992), *Lancet*, 340; 17- 18
- 30 Jurema MW, Nogueira D (2006) In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril*, 86, 1277- 1291
- 31 Kenny HA, Woodruff TK (2006) Follicle size class contributes to distinct secretion patterns of inhibin isoforms during the rat estrous cycle. *Endocrinology*, 147, 51- 60

- 32 K pkner W, Al-Hasani S, Schulze W, K hnel W, Schill T, Felberbaum R, Diedrich K, (1995), Morphology in intracytoplasmic sperm injection, *Assist Reprod Genetk*, 12, 620- 626
- 33 Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J (2003) Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomised study. *Human Reproduction*, 18, 1422-1427
- 34 La Marca A, Giulini S, Orvieto R., De Leo V & Volpe A. (2005) Anti-Mullerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Human Reproduction*, 20, 1569-1572
- 35 Lambert- Messerlian GM; Harlow BL (2006) The Influence of Depression, body mass index, and smoking on serum inhibin B in late reproductive Women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91, 1496-1500
- 36 Marca A, Volpe A (2006) Anti- Mullerian Hormone (AMH) in Female Reproduction: Is Measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical Endocrinology*, 64, 603- 610
- 37 Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J et al (2001) Maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *Reprod BioMed Online*, 3, 112-116
- 38 Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S (2000) Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy rate in in-vitro oocyte maturation. *Human Reprod*, 15, 1685-1690
- 39 Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S (2000) Possible factors affecting the development of oocytes in in- vitro maturation. *Human Reprod*, 15, 11-17
- 40 Muttukrishna S, Suharjone H, McGarrigle H, Muttukrishna Sathanandan (2004), Inhibin B and anti- Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients?, *Obstetrics and Gynaecology*, 111, 1248-1253
- 41 Muttukrishna S., McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri D M, Serhal P (2005) Antral follicle count, anti- mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *Obstetric and Gynaecology*, 112, 1384-1390
- 42 Palermo G, Joris H, Devroey P et al. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340; 17–18
- 43 Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet- Rudelli C, Decanter C, Jonard S & Dewailly D (2003) Elevated serum levels of anti- mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88, 5957- 5962
- 44 Rey R, Mebarki F, Forest M G, Mowszowics I, Cate R, Morel Y, Chaussain J & Josso N (1994) Antim llerian in children with androgen insensitivity. *Journal of Clinical Endocrinologie and Metabolism*, 79, 960-964
- 45 Rinaldi ML, Spirtos NJ (1995) Chest tube drainage of pleural effusion correcting abdominal ascites in a patient with severe ovarian hyperstimulation: a case report, *Fertil Steril*, 63, 1114-1117
- 46 Russel JB, Knezevich KM, Fabian KF et al.: Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril*, 67 (1997), 616- 620
- 47 Smitz J, Picton HM, Plattau P, Rutherford A, Cortvrindt R, Clyde J, Nogueira D, Devroey P, Lyby K, Grondahl C ( 2006), Principal findings from a multicenter trial investigating the safety of follicular- fluid meiosis- activating sterol for in- vitro- maturation of human cumulus- enclosed oocytes. *Fertil steril*, 87, 949-64
- 48 Seifer DB, Lambert Messerlian G, Hogan JW et al.( 1997), Day 3 serum inhibin-B is predictive

- of assisted reproductive technologies outcome. *Fertility and Sterility*, 67, 110-114
- 49 Talia EG, Avraham BC, Irving M, Spitz, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E und EHUD J. Margalioth (2005) Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Human Reproduction*, 20, 3178-3183
- 50 te Velde ER, Pearson PL (2002) The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction Update*, 8, 141-154
- 51 Toner JP, Philput CB, Jones G et al. (1991) Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertility and Sterility*, 55, 784-791
- 52 Trounson A, Wood C, Kaunche A (1994) In vitro maturation and fertilisation and development competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril*, 62, 353-362
- 53 van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH & Themmen APN (2002) Serum anti-Müllerian hormone levels. A novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*, 17, 3065-3071
- 54 Visser JA, de Jong FH, Laven JSE and Themmen APN (2006) Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131, 1-9
- 55 von Otte S, Griesinger G, Schulze-Mosgau A, Härtel C, Al Hasani S, Schöpfer B, Diedrich K (2007) Die Etablierung der In-vitro-Maturation als neue Variante der assistierten Reproduktion-Erfahrungen der Lübecker Arbeitsgruppe. *Geburtsheilkunde Frauenheilkunde*, 67, 1-9
- 56 von Otte S, Schöpfer B, Schulze-Mosgau A, Griesinger G, Al Hasani S, Diedrich K (2006) Die In-Vitro-Maturation – eine neue Chance für die assistierte Reproduktion? *Frauenarzt*, 47, Nr. 2
- 57 [www.deutsches-ivf-register.de](http://www.deutsches-ivf-register.de) (Tag des Zugriffs: 15.08.2008)
- 58 Wynn P, Picton HM, Krapez JA et al. (1998) Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the number of human oocytes reaching metaphase 2 by in vitro maturation. *Human Reproduction*, 13, 3132-3138

## 7. Danksagung

Mein Dank geht an Herrn Professor Dr. med. K. Diedrich, dem Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, der mir die Erstellung der Arbeit ermöglicht hat.

Vor allem möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Sören von Otte bedanken, der das Thema formuliert, das Studiendesign entworfen und mich zum wissenschaftlichen Arbeiten angeleitet hat. Er hat mir durch die Überlassung entsprechender Literatur und durch stete Diskussion der Ergebnisse in vielen Gesprächen die Abfassung der vorliegenden Arbeit erleichtert. Die sorgfältigen Erläuterungen und die formalen Korrekturen machten viele Aspekte der Sterilisationsbehandlung für mich transparenter. Die Möglichkeit jederzeit hospitieren zu können hat mir sehr viel Freude gemacht. Die Zusammenarbeit mit Herrn Privatdozent Dr. med. Sören von Otte hat mir dazu verholfen ein tieferes Verständnis für die Problematik der Sterilitätsbehandlung insbesondere durch die IVM zu erlangen. Er war ein jederzeit freundlicher Ansprechpartner und hat mich in hervorragender Weise motiviert und gefordert. Ihm habe ich zu verdanken, dass mir die Arbeit an dieser Dissertation sehr viel Spaß bereitet hat.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Privatdozent Dr. med. Georg Griesinger für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Studiendaten. Ohne ihn wäre die Dissertation im Dschungel der Statistik hängen geblieben.

Sehr hilfreich für das Verständnis der ELISA- Auswertung war außerdem die Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Frank Köster. Vielen Dank an dieser Stelle auch an ihn.

Danken möchte ich außerdem dem S1- Labor insbesondere Christiane Schultz für die Hilfe bei der Durchführung der AMH- und Inhibin B- Elisa, die freundliche Aufnahme am Arbeitsplatz und nicht zuletzt die vielen netten Worte. Auch dem Labor 2 mit Frau Uhlig und Frau Kerstan danke ich für die Bestimmung der FSH, Estradiol und LH- Werte, sowie für das Aufbewahren

der Patientinnenseren und die Toleranz mich ständig beim Seren sortieren vor ihrem Kühlschrank sitzen zu haben.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. vet. Al-Hasani für die Erklärungen zur ICSI und allen Schwestern der Sterilitätssprechstunde, die mein ständiges Aktensuchen toleriert und unterstützt haben.

Insbesondere danke ich den IVM-Patientinnen der Sterilisationssprechstunde Lübeck, die sich bereit erklärt haben an dieser Studie teilzunehmen und mir damit Einsicht in ihre Akten gewährt haben.

Eine Voraussetzung dafür, dass ich diese Arbeit schreiben konnte, war die Betreuung meiner Kinder in dieser Zeit. Ich möchte folglich auch dem studentischen Kindergarten unter der Leitung von Eva von Barga danken. Sie haben die Grundvoraussetzungen für diese Arbeit geschaffen.

Nicht zuletzt danke ich all denen, die sich bereit erklärt haben Fehler zu lesen, mich konstruktiv zu kritisieren und immer wieder zu motivieren. Besonders mein Mann Holger hat etliche Arbeit in Fehlerlesen und Ausdruck korrigieren investiert. Mein Cousin Markus hat mir wertvolle Tipps zur Formatierung gegeben. Auch meine Schwester Janina hat wertvolle Zeit in das Fehlerlesen investiert und mir sehr hilfreiche Korrekturvorschläge geliefert. Vielen Dank an Euch.

Zuletzt dank ich meinen Kindern Joshua und Jola und meinem Mann Holger, dass sie mir Zeit gelassen haben so manche Stunde am Computer zu verbringen.

Ein Dank auch an alle, die hier nicht genannt sind, aber trotzdem Anteil an dieser Arbeit genommen haben: in Gedanken, Gebeten oder weil sie einfach nur an mich geglaubt haben

## 8. Abkürzungsverzeichnis

<b>2VK</b>	Zwei- Vorkern- Stadium
<b>AFC</b>	Antraler Follikel Count
<b>AMH</b>	Anti- Müller- Hormon
<b>ART</b>	assistierte Reproduktionstechnik
<b>BMI</b>	Body- Mass- Index
<b>CCCT</b>	Clomiphen Citrat Challenge Test
<b>E</b>	Estradiol
<b>EFORT</b>	Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve Test
<b>EGF</b>	epidermal groth factor
<b>EschG</b>	Embryonenschutzgesetz
<b>ET</b>	Embryonentransfer
<b>Fopu</b>	Follikelpunktion
<b>F-MAS</b>	follicular fluid- meiosis activating sterol
<b>FSH</b>	Follikelstimulierendes Hormon
<b>GAST</b>	Gonadotropin agonist stimulation test
<b>GV</b>	Germinalvesikel
<b>hCG</b>	humanes Choriongonadotropin
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz- Virus
<b>ICSI</b>	Intra- zytoplasmatische - Spermien- Injektion
<b>IE</b>	Internationale Einheiten
<b>IVF</b>	In- Vitro- Fertilisation
<b>IVM</b>	In- Vitro- Maturation

---

<b>LH</b>	Luteinisierendes Hormon/ Gelbkörperhormon
<b>M1</b>	Zellen in der Metaphase 1 der Reifeteilung
<b>M2</b>	Zellen in der Metaphase 2 der Reifeteilung
<b>OAT</b>	Oligo- Astheno- Teratozoospermie
<b>OHSS</b>	Ovariellles Überstimulationssyndrom
<b>PCOS</b>	Polyzystisches Ovarsyndrom
<b>SA</b>	Standard- Abweichung
<b>T<sub>3</sub></b>	Triiodthyronin
<b>T<sub>4</sub></b>	Tetraiodthyronin
<b>TESE</b>	testikuläre Spermatozoen Extraktion



## 9. Curriculum vitae

### *Leonie Wöltjen*

#### Biografische Daten

Geburtsdatum: 28.05.1980

Geburtsort: Bremerhaven

Familienstand: verheiratet,  
2 Kinder  
(\*21.09.04; \*26.03.07)

Nationalität: deutsch



#### Ausbildung:

1987-1991 Grundschule Geestenseth

1991- 1993 Orientierungsstufe Beverstedt

1993- 2000 Gymnasium Wesermünde, Bremerhaven

2000-2001 ein Semester Studium der Psychologie in Münster

2001- 2002 Freiwilliges Soziales Jahr im Missionarischen Zentrum in Oldenburg

2002- 2007 Studium der Humanmedizin, Humboldtuniversität Berlin,  
Medizinische Universität zu Lübeck

- 04.2002.- 04.2004 Vorklinik an der HU- Berlin

- 04.2004.- 09.2004 Klinik an der HU- Berlin

- 10.2004- aktuell Klinik an der Medizinischen  
Universität zu Lübeck

03.2006- Erstellen der vorliegenden Dissertation unter der Betreuung  
09.2009 von Dr. med. von Otte

03.2007- Unterbrechung wegen Schwangerschaft und Geburt meiner  
06.2008 Tochter