

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. L. Kiesel

Individuelle Analytik des
präovulatorischen intrafollikulären
Mikromilieus bei assistierter
Reproduktion

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von Winkelmann, Daniel

aus Lüdinghausen

2007

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

Dekan: Univ. - Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ. - Prof. Dr. med. L. Kiesel

2. Berichterstatter: Priv. - Doz. Dr. med. R. R. Greb

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

- Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. Kiesel -

Referent: Univ. - Prof. Dr. med. Kiesel

Koreferent: Priv. - Doz.. Dr. med. Greb

ZUSAMMENFASSUNG

Individuelle Analytik des präovulatorischen intrafollikulären Mikromilieus bei assistierter Reproduktion

Winkelmann, Daniel

Das Entwicklungspotenzial menschlicher Embryonen stellt den einflussreichsten Faktor für eine erfolgreiche Therapie der assistierten Reproduktion dar. Das die Oozyte umgebende intrafollikuläre Mikromilieu determiniert wahrscheinlich die optimale Reifung weiblicher Gameten und reflektiert die Unterschiede zwischen Follikeln, Oozytenqualität und Outcome. Wesentlich scheint die perifollikuläre Mikrovaskularisation zu sein, welche nach aktuellen Untersuchungen die Follikulogenese und die Oozytenqualität bedeutend beeinflusst. Eine zentrale Rolle bei der de-novo Gefäßbildung spielt der Angiogenesefaktor VEGF_A. Dieser induziert eine Aussprossung von Endothelzellen aus präexistenten Blutgefäßen und ist damit unabdingbar für die Bildung eines nutritiven perifollikulären Kapillarnetzes.

Die in der klinischen Routine durchgeführte Ovarpunktion erfolgt durch eine serielle Follikelpunktion, die aufgrund der fehlenden Separation der Einzelaspirate zu einer Kontamination und Vermischung verschiedener Follikelflüssigkeiten führt.

Aus diesem Grund wurde zur Analytik der intrafollikulären Biochemie zunächst eine neue Methode zur Gewinnung individueller Follikelaspirate etabliert. Durch diese neue Arbeitsweise wurde es unumgänglich, die Konzentrationen der zu untersuchenden Einzelsubstanzen nicht als Volumenkonzentration anzugeben, sondern in Korrelation mit dem Proteingehalt der individuellen Follikelflüssigkeiten zu setzen.

Die gewonnenen Aspirate wurden mit kommerziellen ELISA auf den Gehalt des Angiogenesefaktors VEGF_A (gesamt VEGF und bioaktives, freies VEGF_A) und der Hormone FSH, LH, Testosteron, Östradiol, Progesteron und β -HCG untersucht und mit den morphologischen Parametern von Oozyten und Pronuclei korreliert. Das Kollektiv, welches für diese Studie ausgewählt wurde, umfasst 13 Patientinnen mit einem Durchschnittsalter bei Punktion von 33,4 Jahren und insgesamt 64 Follikeln.

Die Analysen ergaben verschiedene Resultate. Ein spezieller biochemischer Marker für die Oozytenqualität und deren Entwicklungspotenzial konnte nicht identifiziert werden, vielmehr schien ein „Set“ an Markern notwendig zu sein. Nach Auswertung der gewonnenen Daten wird deutlich, dass das VEGF_A nicht zu diesen Markern gehört. Vermutlich hat die Angiogenese einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung, aber dieser einzelne Faktor reflektiert anscheinend nicht die Entstehung eines nutritiven perifollikulären Kapillarnetzes. Der ideale Follikel in diesem Kollektiv wies eine intensive Östradiol Produktion auf, ist klein und zeigt eine hohe LDH-Konzentration. Aufgrund der Verzahnung vieler Marker in mehrere biologische Prozesse, wie z.B. Östradiol und LDH, sind Cut-off Werte im untersuchten Kollektiv nicht definierbar.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Physiologische Grundlagen	2
1.2.1	Oogenese.....	2
1.2.2	Die Steuerungssysteme des weibliche Zyklus	3
1.2.3	Follikelreifung	4
1.3	Infertilität	7
1.4	Assistierte Reproduktionstechniken.....	7
1.4.1	Hormonelle Überstimulation.....	8
1.4.2	Die Arbeit im reproduktionstechnischen Labor	10
1.5	Follikuläres Mikromilieu.....	11
1.6	Perifollikuläre Angiogenese	13
1.6.1	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) / (VPF)	13
1.7	Fragestellung der Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1	Patientenkollektiv	15
2.2	Punktionsverfahren & spez. Spültechnik.....	17
2.3	Aufbereiten der Follikelpunktate und Blutproben.....	19
2.4	Morphologischer Score – Pronucleusgrading nach Scott.....	20
2.5	Messung der Proteinkonzentration	21
2.6	Bestimmung der Angiogenesefaktoren	21
2.7	Hormonanalyse und LDH-Bestimmung	22
2.8	Statistik.....	22
2.9	Einverständniserklärung	23
2.10	Veröffentlichungen.....	23
3	RESULTATE.....	24
3.1	Intrafollikuläre hCG-Bioverfügbarkeit	24
3.2	Steroidbiosynthese und Aromatasekapazität	25
3.3	Frühe Luteinisierung: Progesteronsynthese.....	27
3.4	Neoangiogenese zur Corpus luteum – Formation	29
3.4.1	Angiogenesemarker	29

Inhaltsverzeichnis

3.5	Oozytenreife und Qualität der frühen Zygote	34
3.5.1	Zellvitalität (LDH)	34
3.5.2	Östradiol	36
3.5.3	Volumen	37
4	DISKUSSION	39
4.1	Intrafollikuläre hCG-Bioverfügbarkeit	40
4.2	Steroidbiosynthese und Aromatasekapazität	40
4.3	Frühe Luteinisierung: Progesteronsynthese.....	41
4.4	Neoangiogenese zur Corpus luteum – Formation	42
4.5	Oozytenreife und Qualität der frühen Zygote	43
4.6	Kritische Stellungnahme	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	47
6	LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	49
7	ABKÜRZUNGEN	58
8	LEBENS LAUF	59
9	DANKSAGUNG	60

1 Einleitung

1.1 Einführung

Weltweit leiden 10% aller Paare an unerfülltem Kinderwunsch, wobei die Ursachen dafür zu 45% bei der Frau, zu 40% bei dem Mann und zu 15% bei beiden liegen [26]. Neben konventionellen Stimulationsverfahren mit Clomifencitrat oder humanem-Menopausen-Gonadotropin (hMG) und anschließender homologer Insemination stellen nun seit mittlerweile 28 Jahren die in vitro Fertilisation (IVF) und seit 14 Jahren die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) etablierte Methoden in der assistierten Reproduktion dar [44, 50].

Die Schwangerschaftsraten bei diesen Methoden liegen immer noch deutlich hinter denen gesunder Paare [13]. Daher zielt die aktuelle Forschung auf eine Optimierung und Effektivitätssteigerung dieser Methoden.

Entscheidend für eine hohe Schwangerschaftsrate sind neben der Spermienqualität, der Methodik und der endometrialen Rezeptivität auch die optimale Reife und die hohe Qualität der verwendeten Oozyten. Durch die kontrollierte hormonelle Überstimulation können zwar mehrere Oozyten zur IVF rekrutiert werden, diese weisen aber bezüglich ihrer Reife und Qualität eine hohe Heterogenität auf, welche in der Fertilisierbarkeit und weiteren Entwicklung deutlich wird [12, 31, 35]. Gängige Methode zur Einschätzung des prospektiven Entwicklungspotentials und der Implantationschance sind die Erhebung morphologischer Charakteristika der Oozyten, bzw. Pronucleusstadien [22, 38]. Die Morphologie spiegelt allerdings die Qualität und das Entwicklungspotential nicht optimal wieder, da zytoplasmatische und chromosomale Anomalien lichtmikroskopisch nicht aufgedeckt werden, so dass weitere, biochemische Parameter, die den Funktionszustand des ovariellen Follikels reflektieren, von Interesse sind [31, 36, 49, 55].

Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen steht nun die perifollikuläre Mikrovaskularisation, die als proliferierendes kapillares Netzwerk den expandierenden Follikel umgibt und diesen nutritiv versorgt. Nach bisher

publizierten Daten beeinflusst dies Follikulogenese und Oozytenqualität [10, 47].

Bei suboptimaler Vaskularisation kann es aufgrund nutritiver Versorgungsstörungen zu Unterschieden im Entwicklungspotenzial der einzelnen Oozyten kommen [20]. Charakteristisch für jede Oozyte ist ihre individuelle ovarielle Follikelflüssigkeit, in welcher sie ab der Phase des antralen Follikels reift.

In diesem intrafollikulären Mikromilieu sind die Mediatoren der perifollikulären Angiogenese von besonderem Interesse.

In den Untersuchungen wird aus ovarieller Follikelflüssigkeit, die durch eine vaginalsonographische serielle Punktion gewonnen wird, die Konzentration des enthaltenen Endothelzellwachstumsfaktors (vascular endothelial growth factor, VEGF), sowie die Fraktion des freien, bioaktiven, d.h. nicht mit dem löslichen Rezeptor sFlt komplexierten VEGF bestimmt [51]. Des Weiteren werden die Konzentrationen von verschiedenen Steroidhormonen, Gonadotropinen und Enzymen gemessen.

1.2 Physiologische Grundlagen

1.2.1 Oogenese

Oogonien entwickeln sich ab der siebten Embryonalwoche aus Urkeimzellen, die aus dem Dottersack stammen. In den Gonadenanlagen durchlaufen sie eine Reihe mitotischer Teilungen, so dass sich bis zu 600.000 Oogonien in den Gonaden befinden. Im weiteren Verlauf treten einige Oogonien in die Prophase der meiotischen Teilung ein und werden ab diesem Zeitpunkt primäre Oozyten genannt. In der 20. Gestationswoche ist die Produktion abgeschlossen und es befinden sich ca. 7 Millionen Follikelapparate in den Ovarien. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Atresie der Oogonien, die nicht in die Meiose eingetreten sind, so dass bis zur Geburt eines Mädchens in der Regel 90% degeneriert sind. Die primären Oozyten haben sich zu diesem Zeitpunkt mit Granulosazellen zum Primordialfollikel zusammengefunden.

1.2.2 Die Steuerungssysteme des weibliche Zyklus

Das Hauptziel des weiblichen Zyklus ist die Rekrutierung einer befruchtungsfähigen Oozyte, welche dann bei der Ovulation in die Tube abgegeben wird. In die Regulation und Steuerung sind verschiedene Hormone und zentrale Steuerungssysteme beteiligt. Der Hypothalamus mit den sekretorischen Neuralzellen des Nucleus arcuatus und der Area praeoptica stellt dabei das übergeordnete Organ in dem zyklischen Regelkreis der Frau dar. Hier wird das Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH), ein Dekapeptid, synthetisiert und in pulsatiler Form sezerniert. Die Axone der sekretorischen Neuralzellen stellen einen engen Kontakt zu den Gefäßen der hypothalamisch - hypophysären Pfortadersysteme her. Durch die stoßweise Ausschüttung des GnRH, in der Regel alle 70 - 90 Minuten, kommt es in der Adenohypophyse zu einer gleichfalls pulsatilen Freisetzung der Gonadotropine: follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH). Die Spontanaktivität des hypothalamischen Pulsgenerators wird wiederum von einer Reihe von Neurotransmittern, Neuropeptiden, endogenen Opioiden und den Sexualsteroiden gesteuert.

Die in der Adenohypophyse gebildeten Gonadotropine FSH und LH wirken nun ihrerseits spezifisch auf verschiedene Zelltypen im Ovar und steuern dort die Follikelreifung.

1.2.3 Follikelreifung



Abbildung 1: Das Ovar während des Zyklus. Dargestellt werden die unterschiedlichen Phasen des Zyklus und hier im Besonderen die Blutversorgung, von der Follikelreifung über die Ovulation bis hin zur Corpus luteum-Transformation.

Ab der Pubertät beginnen sich ein Teil der Primordialfollikel, die sich in der Ruhephase befinden, weiterzuentwickeln. In dieser dreimonatigen präantralen Entwicklungsphase wachsen sie über das Stadium des Primärfollikels zum Sekundärfollikel. So gelangen ca. 30 Begleitfollikel pro Zyklus in ein gonadotropinsensitives Stadium.

Aus dieser Kohorte wird später der dominante Follikel selektiert. Die Aufgabe der restlichen Follikel besteht in der Steroidsynthese besonders in der frühen Follikelphase.

Zu Beginn des Zyklus, vom 1. – 5. Tag, steigt die Expression der FSH-Rezeptoren der Granulosazellen, die einen individuellen Schwellenwert für FSH besitzen. Übersteigt die FSH-Konzentration diesen Schwellenwert, wird Insulinlike-Growth-Factor 2 (IGF-2) in den Granulosazellen produziert und induziert die Differenzierung der die Granulosazellen umgebenden Ovarialstromazellen in

eine Theca interna- und eine Theca externa-Schicht. Die Theca interna-Zellen exprimieren nun vermehrt LH Rezeptoren und werden für die hypophysäre Steuerung sensitiv. Des Weiteren produzieren sie aus hepatischem Cholesterin Androstendion und Testosteron [5]. Ca. 50% dieser Steroide gelangen in die Peripherie, die anderen 50% diffundieren in die reifenden Granulosazellen und werden dort unter dem Einfluss von FSH zu Östradiol aromatisiert.

Um eine hyperandrogene Stoffwechsellage zu unterbinden, die aufgrund der noch insuffizienten Aromatisierungskapazität entstehen würde, sezernieren die Granulosazellen das Proteohormon Activin, das die Androgenproduktion in den Theca interna Zellen hemmt und die FSH-Sekretion in der Hypophyse stimuliert.

Gleichzeitig werden durch die erhöhte FSH-Präsenz in den Granulosazellen LH-Rezeptoren exprimiert, so dass nun LH und FSH synergistisch wirken [58]. Dieser Vorgang stimuliert die Proliferation und steigert die Expression von Enzymen der Steroidproduktion, im Speziellen der Aromatase.

Erst in der antralen Phase der Follikelreifung erfolgt die Angiogenese aus dem Ovarialmark, die ein suffizientes Gefäßnetz um die einzelnen antralen Follikel ausbildet, wobei die Granulosazellschicht und der Follikelbinnenraum gefäßfrei bleiben.

Durch die zunehmende Reife der Follikel und der andauernden Proliferation der Granulosazellen steigt die Aromatisierungskapazität stark an, so dass vermehrt Follistatin und Inhibin produziert werden. Follistatin bindet spezifisch Activin und reduziert dessen Wirkung, währenddessen Inhibin die Produktion der Androgene in den Theca interna Zellen anregt und die FSH Sekretion der Hypophyse hemmt [18, 23]. Gleichzeitig hemmt das in den Granulosazellen entstandene Östradiol die FSH-Ausschüttung. Dies führt zu einem relativen FSH-Mangel, den, wie angenommen wird, nur der dominante Follikel durch die steigende LH-Sensitivität kompensieren kann.

Mit Ausnahme des dominanten Follikels, werden alle subordinalen Follikel durch das nun entstehende androgendominante Milieu atretisch. Nur der dominante Follikel entwickelt sich zum sprungreifen Follikel. Dennoch werden

die übrigen Follikel benötigt, um genügend Östradiol für die Umwandlung des Endometriums bereitzustellen, da der dominante Follikel erst kurz vor der Ovulation in der Lage ist, eine ausreichende Menge Östradiol zu produzieren. Zusätzlich reduzieren nichtdominante Follikel durch ihr selbst hergestelltes Östradiol die Gonadotropinproduktion und tragen so zum eigenen Untergang bei.

Die hohe mitzyklische Östradiolkonzentration führt um den 13. Tag herum zu einem LH-Peak, der in der Wand des dominanten Follikels, welcher inzwischen einen Durchmesser 20 – 30 mm erreicht hat, Proteasen aktiviert und in den Granulosazellschicht die Produktion von LH-Rezeptoren induziert. Gleichzeitig löst dieser Peak die Beendigung der ersten meiotischen Teilung in der Oozyte aus. Diese arretiert dann in der Metaphase der zweiten meiotischen Teilung, welche erst bei der Fertilisation mit einem Spermium beendet wird.

Die Proteasen lösen die Basalmembran auf, welche die Theca interna Schicht von der Granulosazellschicht trennt. Nach Andauung des peritonenealen Überzugs kann die Follikelflüssigkeit aus dem Follikel fließen und den Cumulus oophorus direkt in den Fimbrientrichter ausschwemmen.

Sobald das Granulosazellkompartiment Anschluss an das Gefäßsystem erlangt, luteinisieren die Granulosazellen bei Kontakt mit Serum spontan, und das aus der Leber stammende Cholesterin wird zu Progesteron metabolisiert. Die intrazytoplasmatischen gelben Fetttröpfchen geben dem nun entstandenen Gelbkörper den Namen. Im weiteren Verlauf wird das Corpus luteum stärker vaskularisiert, um die Versorgung mit den Präkursoren der Steroidsynthese sicherzustellen. Progesteron besitzt während dieses zweiten Teils des Zyklus einen protektiven Einfluß auf Granulosazellen, LH hingegen, vermutlich über den cAMP Weg, einen luteolytischen Effekt [29]. Zum Ende der Gelbkörperphase, im nichtkonzeptiven Zyklus, überwiegt dann der luteolytische Effekt, und es kommt zum Untergang des Corpus luteum.

1.3 Infertilität

Schätzungen gehen davon aus, dass mindestens 10 – 15% aller Paare in Deutschland ungewollt kinderlos sind. Von Infertilität wird gesprochen, wenn eine Schwangerschaft trotz regelmäßigen ungeschützten Geschlechtsverkehrs nach mindestens zwölf Monaten nicht eingetreten ist. Bei vier von fünf Paaren lassen sich ein oder mehrere Faktoren der Infertilität diagnostizieren, die häufigsten sind in der folgenden Tabelle aufgezeigt.

Frau	Mann
<ul style="list-style-type: none"> • gestörte Follikulo- oder Oogenese • Tubenverschluß- oder schädigung • Endometriose • genetische Faktoren • Medikamente • Genussmittel • angeborene oder erworbene Uterusfehlbildungen 	<ul style="list-style-type: none"> • endokrine Störungen • Entzündungen des Genitaltraktes • Kryptorchismus • Spermienautoantikörper • Malignome im Genitalorgan • genetische Faktoren • Medikamente • Genussmittel

Tabelle 1: Sterilitätsursachen

1.4 Assistierte Reproduktionstechniken

Seit der ersten erfolgreich durchgeführten assistierten Reproduktion 1978, mit der Geburt von Luise Brown, haben sich die Methoden zur technisch assistieren Fertilisation beim Menschen stark weiterentwickelt. Dabei bieten diese Techniken einem Großteil Hilfe suchender Patienten eine Chance, den eigenen Kinderwunsch zu erfüllen.

Oozyten, die in vitro fertilisiert werden, stammten 1978 aus einem natürlichen Zyklus. Assistierte Reproduktionsverfahren und der Einsatz der hormonellen Stimulation haben gezeigt, dass Oozyten des dominanten und der nichtdominanten Follikel prinzipiell gleichwertig sind. So wird im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung in den hormonellen Regelkreislauf eingegriffen, um möglichst bis zu zehn sprungreife Follikel zu rekrutieren (Abb. 2). Nach der

sonographisch gesteuerten, transvaginalen Punktion der Follikel werden die Oozyten in Petrischalen durch Zugabe oder Injektion von Spermien in vitro fertilisiert (IVF bzw. ICSI). Zwei bis drei Tage später werden bis zu drei Embryonen rücktransferiert.

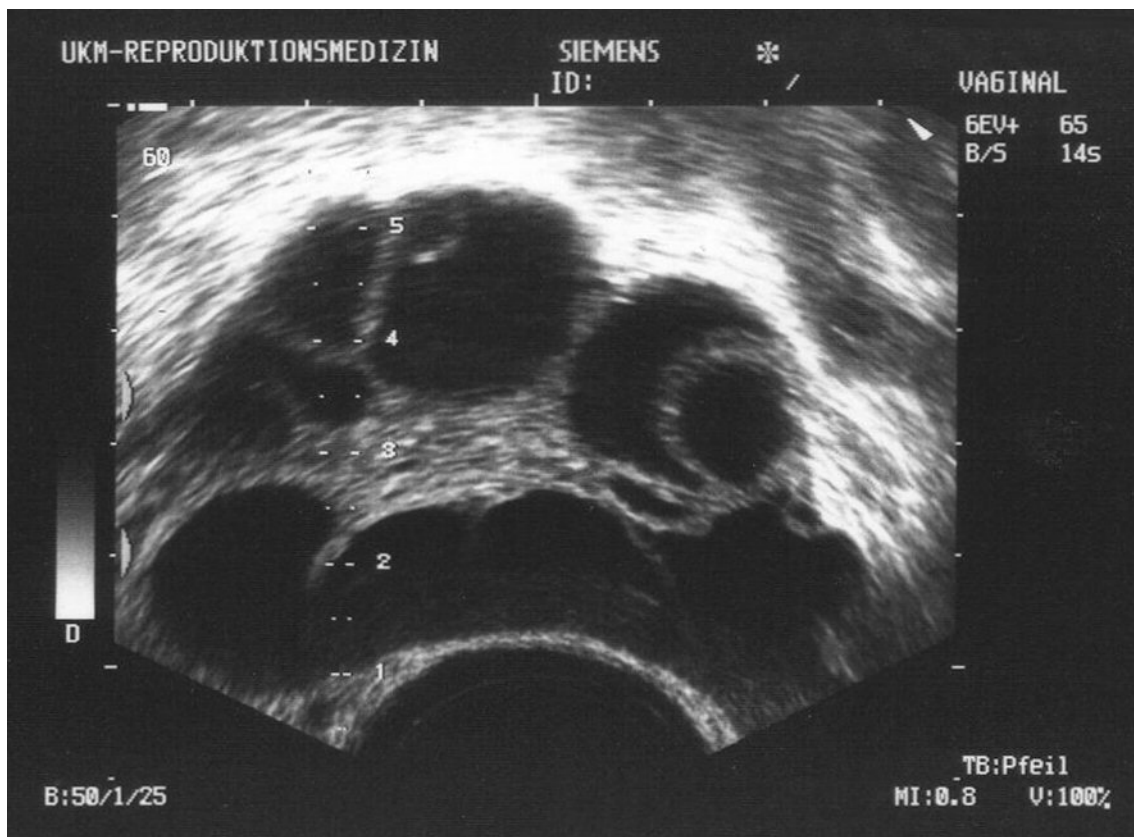


Abbildung 2: Vaginalultraschall bei einer Patientin mit hormoneller Überstimulation direkt vor der Punktion. Zu sehen sind mehrere Follikel, die größer als 18 mm sind.

1.4.1 Hormonelle Überstimulation

Die hormonelle Überstimulation wird für jede Patientin individuell abgestimmt, denn eine zu geringe Rekrutierung verringert die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft und eine zu starke Stimulation kann das potentiell lebensbedrohliche Überstimulationssyndrom (OHSS) auslösen [13].

Eine Stimulation besteht immer aus zwei Teilen, zum einen aus der Down-Regulierung der Hypophyse um den eigenen Regelkreis zu unterbrechen, zum

anderen aus der Anregung der Ovarien durch rekombinantes FSH zur Reifung mehrerer Follikel.

Zur Anwendung kommen verschiedene standardisierte Stimulationsprotokolle. Beschrieben werden hier die häufigsten und die im Rahmen der Studie durchgeführten Protokolle:

Langes-Stimulationsprotokoll („long protocol“)

Beim Langzeitprotokoll wird die Hypophyse schon im vorausgehenden Zyklus (ab dem 21. Zyklustag) mittels GnRH Analoga herunter reguliert. Wenn der temporäre Zustand des hypogonadotropen Hypogonadismus nach 10 bis 14 Tagen erreicht ist, beginnt die Gonadotropinsubstitution mit rekombinaten FSH.

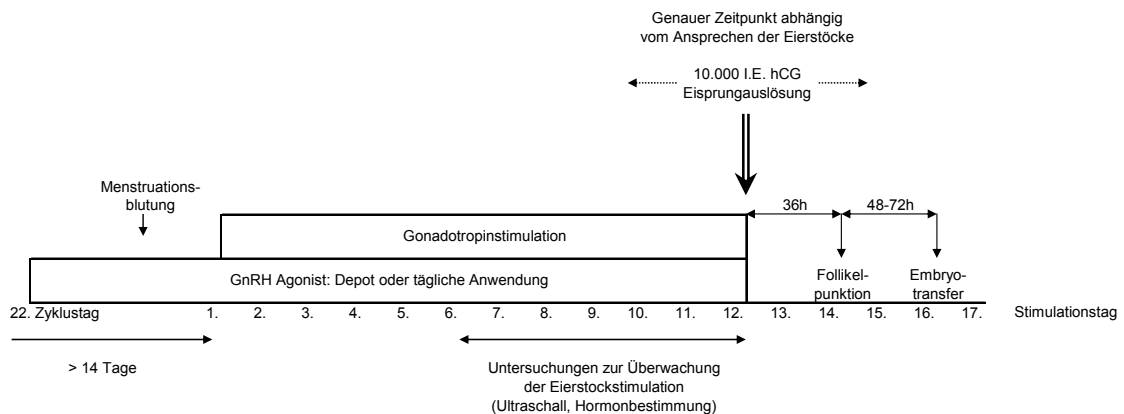


Abbildung 3: Langes-Stimulationsprotokoll. Zeitlicher Ablauf des Protokolls mit der Übersicht über die Zeitpunkte der Medikamentengabe und Untersuchungen während der Stimulation.

Antagonisten Stimulationsprotokoll

Das Antagonistenprotokoll ist kürzer und beginnt direkt am zweiten oder dritten Zyklustag mit der Gonadotropinstimulation. Die Blockade der Hypophyse wird anschließend durch GnRH Antagonisten ab dem sechsten Tag durchgeführt.

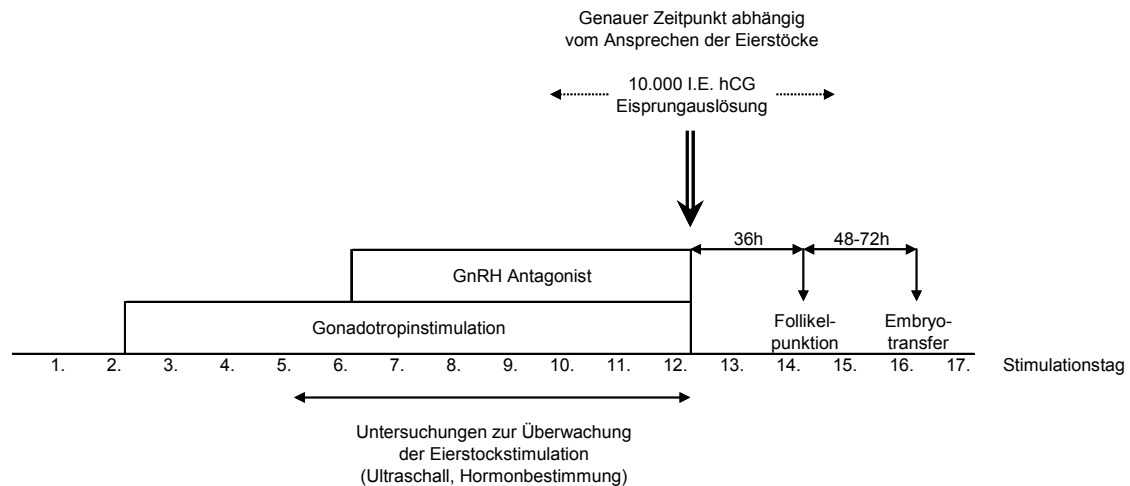


Abbildung 4: Antagonistenprotokoll. Zeitlicher Ablauf des Protokolls mit der Übersicht über die Medikamentengabe und Untersuchungen während der Stimulation.

Ab dem sechsten Tag beginnt dann die Überwachung der Eierstockstimulation, es werden im regelmäßigen Abstand die Follikelgrößen sonographisch kontrolliert und die Hormone im Serum bestimmt.

Besitzen mindestens zwei Follikel eine Größe von 18 mm (Abb. 2) und liegt eine entsprechende Serumöstrogenkonzentration vor, wird die Ovulation mit 10000 I.E. hCG induziert.

34 bis 36 Stunden nach der Ovulationsauslösung werden dann die Follikel mit einer Hohlnadel vom seitlichen Scheidengewölbe aus unter sonographischer Sicht punktiert, wobei die Oozyten und die Follikelflüssigkeit abgesaugt, bzw. ausgespült werden.

1.4.2 Die Arbeit im reproduktionstechnischen Labor

Direkt im Anschluss an die Punktion werden die Oozyten durch einen Biologen in ein Nährmedium gegeben und aufgearbeitet, sodass ein erstes morphologisches Grading der Oozyten durchgeführt werden kann.

Danach folgt die Durchführung der IVF oder der ICSI nach einem standardisierten Zeitschema.

Bei der herkömmlichen IVF werden zu jeder Eizelle eine bestimmte Anzahl Spermien, die im andrologischen Labor zuvor vorbereitet wurden, hinzugegeben. Über Nacht werden diese dann bei 37°C im Brutschrank kultiviert, so dass es zur Befruchtung kommen kann.

Die ICSI Technik erleichtert den Befruchtungsvorgang und wird deshalb häufiger bei OAT Syndromen (Oligo-Astheno-Teratozoospermie) des Mannes eingesetzt. Mit Hilfe einer Mikropipette wird ein zuvor aufgenommenes Spermium direkt in die von Cumuluszellen befreite Eizelle injiziert. Genauso wie bei der IVF Technik werden die Oozyten über Nacht kultiviert. Der weitere Verlauf ist dann bei beiden Techniken wieder identisch.

16 bis 18 Stunden später werden sie in ein frisches Kulturmedium gesetzt und auf Befruchtungszeichen überprüft, sowie der morphologische Pronucleusgrad lichtmikroskopisch nach Scott bestimmt (vergleiche Seite 20).

Mit Hilfe dieses Gradings werden in Deutschland aufgrund des geltenden Embryonenschutzgesetzes (EschG) nun maximal drei Pronucleusstadien ausgewählt, die zu Embryonen weiterkultiviert werden. Die Übrigen können für weitere IVF / ICSI Zyklen kryokonserviert oder müssen verworfen werden.

Am zweiten bzw. dritten Tag nach der Follikelpunktion werden alle weiterkultivierten Embryonen mittels eines speziellen Katheters in den Uterus transferiert. In den nächsten zwei Wochen werden die Patientinnen weiter betreut, um rechtzeitig Komplikationen zu erkennen und zu behandeln. Frühestens zwölf Tage nach dem Embryotransfer wird ein Frühschwangerschaftstest durch Bestimmung des Serum-hCG durchgeführt.

1.5 Follikuläres Mikromilieu

Das follikuläre Mikromilieu ist an den physiologischen Prozessen im Follikel beteiligt. Es ist für die Ernährung der Oozyten und Granulosazellen mitverantwortlich [15, 44].

Vorwiegend entsteht die Follikelflüssigkeit durch Transsudation des Plasmas. Ihre Zusammensetzung ändert sich im Laufe der Entwicklung eines Follikels.

Während die Versorgung des Primordialfollikels noch von dessen Nähe zu ovariellen Stromagefäßen abhängt, entwickeln Primärfollikel eine eigene Gefäßanbindung, die zunächst aus ein oder zwei Arteriolen besteht [1].

Parallel zur Weiterentwicklung des Follikels zum antralen Follikel und der Zunahme der Follikelgröße durch Vermehrung der Follikelflüssigkeit bildet sich ein kapillares Netzwerk aus.

Die Proteine der Follikelflüssigkeit sind Produkte der Granulosa- und Thecazellen oder stammen aus dem Plasma, wobei aber insgesamt die Proteinkonzentration in der Follikelflüssigkeit niedriger ist als im Plasma.

Bis kurz vor der Ovulation bilden die beiden Zelltypen eine funktionelle Einheit, die durch eine Basalmembran, die Membrana propria, getrennt sind. Die Vaskularisation reicht nur bis zur Thecazellschicht, so dass alle Stoffe, die aus dem Plasma in den Follikel gelangen, diese Blut-Follikel Schranke passieren müssen [42].

Die Membrana propria besteht hauptsächlich aus Typ IV Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen, welche von den Granulosazellen produziert werden. Bis zur Ovulation hin wird die Basalmembran für Plasmaproteine immer durchlässiger.

Moleküle bis zu einer Größe von 100 bis 850 kDa können die Membran passieren [3, 4]. Hochmolekulare Plasmaproteine werden herausgefiltert. Des Weiteren spielt die Ladung der Moleküle eine wichtige Rolle für die Passage, da die Membran negativ polarisiert ist [21].

Der anorganische Anteil ist dem des Plasmas ähnlich. Die Konzentrationen bei Natrium, Calcium, Chlorid und Phosphat sind fast gleich, nur der Kaliumwert ist höher als im Plasma.

Während eines Zyklus verändern sich ebenfalls durch lokale Synthese und Sekretionsprozesse die Konzentrationen der Kohlenhydrate und Lipide, welche die Hauptenergieträger darstellen [14].

1.6 Perifollikuläre Angiogenese

Bis zum Zeitpunkt der Ovulation erfolgt die Versorgung der avaskulären inneren Follikelstrukturen und der Oozyte durch Diffusion, welche von der kapillaren Permeabilität abhängig ist.

Somit spielt die perifollikuläre Angiogenese eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Oozyte. Eine insuffiziente Follikelversorgung führt demnach zur Unterversorgung der Oozyte, welche aufgrund von Hypoxie, pH Abfall und erniedrigtem ATP Anomalien und niedrigere Entwicklungspotentiale aufweist [20, 48].

Mit Hilfe der Farbdopplersonographie können Unterschiede in der Vaskularisation und damit in der Versorgung der Follikel verdeutlicht werden [10, 47, 49].

Die physiologische Regulation von ovarieller Angiogenese und Vasopermeabilität unterliegt einer gezielten Steuerung durch lokal wirksame Zytokine. Hierbei nimmt der Vascular Endothelial Growth Factor / Vascular Permeability Factor (VEGF / VPF) eine Schlüsselrolle ein [19, 33, 47].

1.6.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) / (VPF)

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren ist in die Regulation der Angiogenese einbezogen. Die gefäßspezifischen Wachstumsfaktoren wirken im Wesentlichen nur auf endotheliale Zellen (z.B. VEGF, Angiopoetine, Ephrine), wohingegen die nicht-gefäßspezifischen Wachstumsfaktoren (z.B. fibroblast growth factor) neben Gefäßzellen auch andere Zellen beeinflussen.

Das VEGF-Gen ist so bedeutsam für Säugetieren, dass bereits der Verlust eines VEGF-Allels zum Tod im Embryonalstadium führt [56]. Die VEGF Familie besteht aus verschiedenen Mitgliedern: VEGF-1, -2, -B, -D, -E und Placenta Wachstumsfaktor. VEGF-1 weist durch alternantives Spleißen verschiedene Isoformen mit jeweils unterschiedlichen Anzahl von Aminosäuren auf: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Die am häufigsten vorkommende Form ist VEGF₁₆₅, weswegen sie in der Literatur mit VEGF-A

gleichgesetzt wird. Es wird als Homodimer mit einem Gewicht von ca. 45 kDa sezerniert [32].

Die Signaltransduktion erfolgt über zwei membranständige Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1 und -2. Beide Rezeptoren lösen eine Endothelzellmigration aus, wobei sie bezüglich der Proliferation unterschiedlich wirken: VEGFR-2 aktiviert sie, VEGFR-1 hingegen nicht. Neben diesen Effekten besitzt VEGF-1 noch eine vasodilatative und permeabilitätserhöhende Wirkung und kann eine Monozytenmigration aktivieren [6, 28, 39, 57].

Zusätzlich zu den membranständigen Rezeptoren VEGFR-1 und -2 kann VEGF-1 an einen löslichen Rezeptor, den soluble VEGFR binden, der durch alternatives Spleißen auf Basis des VEGFR-1 entsteht. Dieser Komplex ist biochemisch inaktiv, sodass nur der unkomplexierte Teil des VEGF-A wirksam ist [27].

Im Follikel wird VEGF von den Granulosazellen produziert und sezerniert oder gelangt aus dem Plasma ins Follikelinnere. Hinsichtlich der genauen Bedeutung bezüglich der Oozytenreifung gibt es in der Literatur gegensätzliche Aussagen. Auf der einen Seite wird diskutiert, dass eine hohe VEGF-Konzentration eine folliculäre Hypoxie und somit eine unzureichende Versorgung widerspiegelt, auf der anderen Seite soll die VEGF mRNA-Expression der Granulosazellen positiv mit der Oozytenqualität und dem Outcome korrelieren.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Untersuchungsziel dieser Arbeit ist die Beurteilung der Fragen, ob in individuellen Follikelflüssigkeiten bestimmte Inhaltsstoffe intraindividuelle Unterschiede in der Follikelkohorte reflektieren und ob biochemische Marker neben den etablierten morphologischen Scores ein eigenes, unabhängiges prädiktives Potenzial zur Qualitätseinschätzung weiblicher Gameten besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Studie wurden die Sern und Follikelflüssigkeiten von 13 Patientinnen, die zwischen September und Dezember 2002 in der Reproduktionsmedizin der Universitätsfrauenklinik Münster behandelt wurden, untersucht. Vier Patientinnen unterzogen sich einer IVF und neun einer ICSI-Behandlung, wobei insgesamt 64 individuell auswertbare Oozyten und deren Follikelflüssigkeiten gewonnen wurden. Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Follikelpunktion betrug zwischen 30 und 36 Jahren, im Durchschnitt 33,4 Jahre.

Patientenpaare bei denen eine TESE (testikuläre Spermienextraktion) indiziert war, wurden nicht ins Kollektiv aufgenommen, da die Fertilisation der Oozyten stark von der Qualität der Spermien abhängt, das bei Paaren mit TESE oft reduziert ist.

Bei sechs der Patientinnen konnte mit Hilfe eines β -hCG Tests eine Frühschwangerschaft diagnostiziert werden, wobei es bei einer Patientin zu einem Frühabort und bei einer anderen zu einer missed abortion kam. In den anderen vier Fällen konnte eine Einlingsschwangerschaft mittels Sonographie bestätigt werden.

Patientin	Alter	Zyklus	Protokoll	Schwangerschaft	Sterilität	Andrologie
1	31	3. ICSI	Long	missed abortion	sekundär	OAT
2	35	1. IVF	Long	Negativ	sekundär	o.p.B.
3	33	1. ICSI	Long	Negativ	primär	OAT
4	30	3. IVF	Long	Negativ	sekundär	o.p.B.
5	32	2. ICSI	Long	Frühabort	primär	OAT
6	31	1. ICSI	Long	Negativ	primär	OAT
7	36	1. IVF	Long	Ultraschall	primär	o.p.B.
8	35	4. ICSI	Antagonist	Ultraschall	primär	OAT
9	35	1. ICSI	Antagonist	Negativ	primär	OAT
10	35	1. ICSI (+ 2 IVF)	Antagonist	Negativ	primär	AT
11	34	2. ICSI	Long	Negativ	primär	OAT
12	34	5. ICSI (+ 2 IVF)	Antagonist	Ultraschall	primär	AT
13	33	2. IVF	Antagonist	Ultraschall	sekundär	o.p.B.

o.p.B. - ohne pathologischen Befund;

AT – Astheno-Teratozoospermie;

OAT – Oligo-Astheno-Teratozoospermie

Ultraschall – Schwangerschaft im Ultraschall bestätigt

Tabelle 2: Das Patientenkollektiv, dessen Seren und Follikelflüssigkeiten analysiert wurden.

Eine Endometriose war bei den Patientinnen 3, 7 und 10 bekannt, welche bei Patientin 10 zur rechtsseitigen Ovariectomie führte. Bei den Patientinnen 4 und 5 lag ein beidseitiger und bei 8 ein rechtsseitiger Tubenverschluß vor.

In acht Fällen wurde nach dem Schema des langen Agonisten – Protokolls stimuliert. Die Down Regulation der Hypophyse begann am 21. Zyklustag durch Gabe von GnRH Analoga, bei Patientin 1 mit Buserelin und bei den übrigen Patientinnen mit Nafarelin. Nach ca. 14 Tagen, bei Patientin 3 nach 21 Tagen, war die Desensibilisierung erreicht, so dass die hormonelle Stimulation mit Follitropin begonnen wurde.

Die anderen 5 Patientinnen wurden nach dem Antagonisten – Protokoll stimuliert. Am 1. Zyklustag wurde direkt mit der Stimulation durch Follitropin begonnen. Die Down Regulation der Hypophyse mit GnRH – Antagonisten wurde erst durchgeführt, nachdem die Durchmesser der Follikel 10 mm

überschritten hatten. Patientin 9 wurde mit dem Wirkstoff Ganirelix, die Patientinnen 8, 10, 12 und 13 wurden mit Cetrorelix hypophysär downreguliert. Sobald zwei Follikel einen Durchmesser von 18 mm erreicht hatten, wurde die Ovulation durch Gabe von HCG induziert. Ca. 34 Stunden nach der HCG Gabe wurden die Follikel transvaginalsonographisch nach Vermessung punktiert und gespült.

2.2 Punktionsverfahren und spezielle Spültechnik

Das Punktionsset besitzt ein Volumen von 2ml, die gängige Spültechnik bei der seriellen Follikelpunktion verursacht daher einen ständigen Verschleppungsfehler, der durch Vermischung aspirierter Flüssigkeiten im Punktionsystem entsteht. Dadurch waren die Follikelflüssigkeiten nicht mehr der zugehörigen Eizelle zuzuordnen. Durch Einzelpunktionen würde dieses Problem entfallen, es bestände aber ein höheres Risiko für die Patientin und ein höherer Arbeits- und Kostenaufwand für den Behandler. Aus diesem Grund wurde ein neues Aspirationsverfahren entwickelt.

Bei der Follikelpunktion ist das Punktionsset der Firma Gynemed (FAS #4551 - Follikel Aspiration Set) benutzt worden. Dieses wurde ebenfalls bei Voruntersuchungen zur Methodenetablierung genutzt.

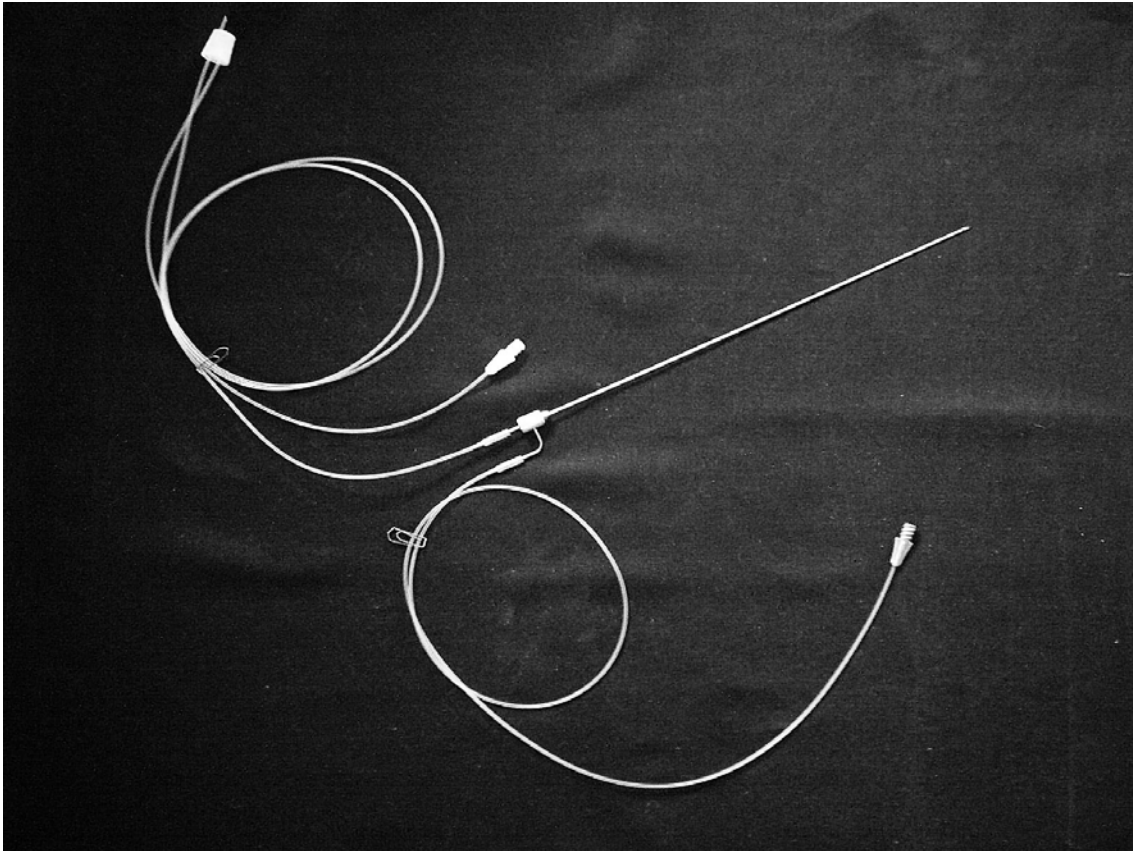


Abbildung 5: FAS #4551 der Firma Gynemed. Das Aspirationsset besteht aus einer einlumigen Punktionsnadel mit Aspirations- und Spülschlauch.

Um den bei serieller Punktion entstehenden Verschleppungsfehler zu minimieren, konnte durch Voruntersuchungen gezeigt werden, dass bei fünfmaliger Spülung und Aspiration des Systems mit proteinfreiem Spülmedium zwischen jeder Follikelpunktion der Verschleppungsfehler, der abhängig vom Follikelvolumen ist, auf maximal 3,5% reduziert werden konnte (Abb. 6).

Die ersten beiden Aspirate jeden Follikels wurden aufgefangen und sofort aufbereitet. Somit wurden Proben gesammelt, die einen repräsentativen Gesamtproteinanteil zwischen 39% und 85% besaßen und eine sehr geringe Probenkontamination durch vorausgehende Aspirate aufwiesen.

Der durch die Spülung entstandene Verdünnungsfehler wurde kompensiert, indem die Messdaten der Angiogenesefaktoren und Hormone auf die Proteinmenge der Follikelflüssigkeitsproben bezogen wurden und nicht auf das Probenvolumen.

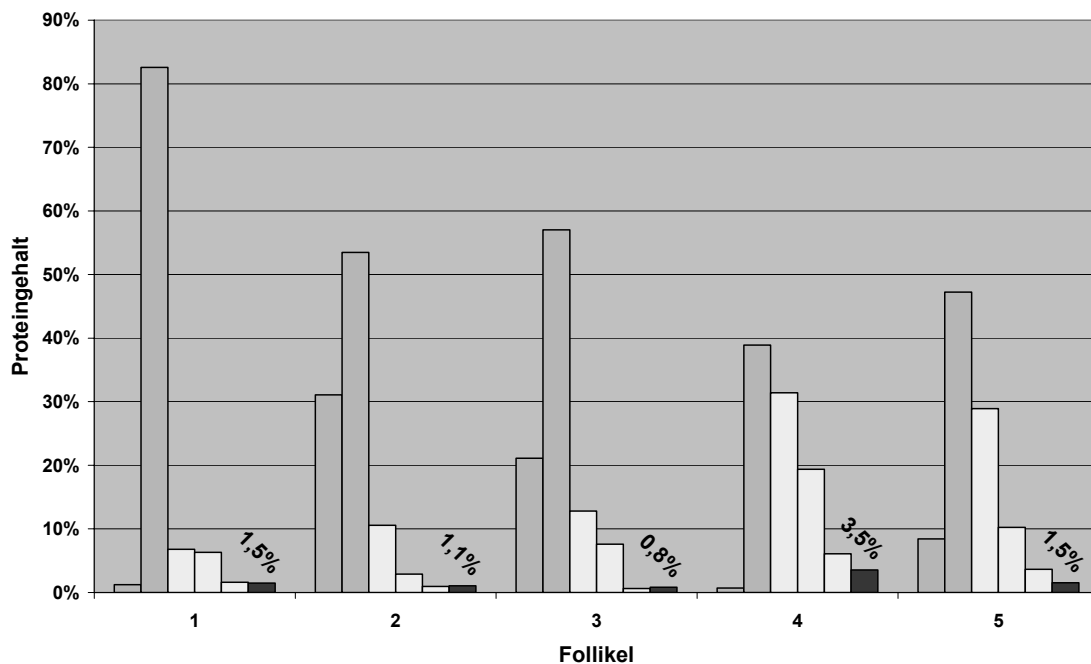


Abbildung 6: Proteinverteilung der einzelnen Spülfractionen bei fünf Follikelpunktionen. Die Prozentzahlen geben die relativen Proteingehalte zum punktierten Follikel der aufgefundenen Spülfractionen 1 bis 5 wieder. Die Prozentzahlen im Diagramm entsprechen dem relativen Proteingehalt, der nach der 5. Spülung im System verbleibt.

Aufgrund der speziellen Punktionstechnik konnte jeder Oozyte deren entsprechende Follikelflüssigkeit zugeordnet werden, so dass folliculäre Charakteristika mit der jeweiligen Oozyte korreliert werden konnten [51].

2.3 Aufbereiten der Follikelpunktate und Blutproben

Die Follikelflüssigkeiten wurden direkt nach der Gewinnung bei 1500g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand jeweils zu zwei Aliquots bei minus 80° Celsius tiefgefroren. Makroskopisch blutkontaminierte Aspirate wurden verworfen und nicht mit in die Studie einbezogen.

Die Blutproben, die am Tag der Follikelpunktion aus einer Kubitalvene gewonnen wurden, sind bei 1500g für 10 Minuten zentrifugiert worden. Die Seren wurden bis zur Analyse bei minus 80° Celsius aufbewahrt.

2.4 Morphologischer Score – Pronucleusgrading nach Scott

Das Pronucleusgrading ist zurzeit das gängigste Verfahren, um die Qualität der befruchteten Oozyten abzuschätzen. In diesem Stadium werden sie laut Embryonenschutzgesetz noch nicht als Embryo betrachtet, so dass anhand dieser Bestimmung maximal drei Pronuclei, die zu Embryonen weiterreifen, für die spätere Implantation ausgewählt werden. Die übrigen Pronuclei können für weitere IVF Versuche kryokonserviert werden.

Jede Zygote wird lichtmikroskopisch bezüglich der Kerngröße, -anordnung und -position sowie der Verteilung und Ausrichtung der Nucleoli in vier verschiedene Z-Scores eingeteilt [38]. Die Qualität der Pronuclei nimmt mit zunehmenden Z-Score ab, so dass im Normalfall die Z1 oder Z2 Zygoten weiterkultiviert werden.

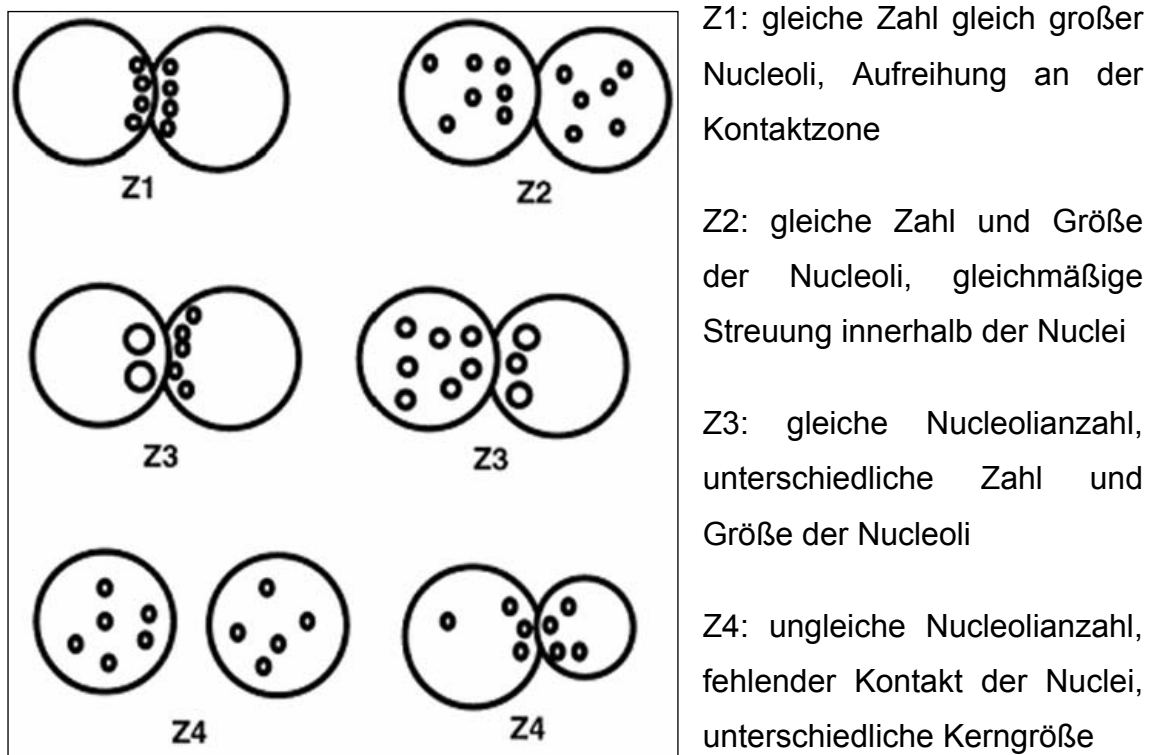


Abbildung 7: Pronucleus Grading nach Scott et. al. (2000)

2.5 Messung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA-Test nach Pierce angewandt. Der Nachweis beruht darauf, daß Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die zweifach positiven Kupferkationen dieses Komplexes werden zu Cu^+ reduziert, die mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 595 nm gemessen. Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 und 2.0 mg/ml.

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurden 10 µl der Lösung bzw. des BSA-Standards mit 200 µl BCA-Reagenz in Reaktionsgefäße pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen und Zentrifugation wurden 100 µl des jeweiligen Ansatzes in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

BCA (Protein Assay Reagent) Pierce (Rockford, MD, USA)

2.6 Bestimmung der Angiogenesefaktoren

Die Bestimmung der Konzentrationen des Gesamt-VEGF_A in den Follikelflüssigkeiten wurde mittels eines ELISA der Firma RELIAtech (Braunschweig), Angiogenesis TestKit (Receptor-based VEGF_A RELIDA) durchgeführt, der eine Intra-Assay- und eine Inter-Assay-Variation von 6,3% bzw. 8,3% besitzt.

Das freie VEGF_A ist mit dem ELISA der Firma Bender MedSystems (Wien), human VEGF-A BioLISA (BMS277BL) ermittelt worden. Dieser ELISA weist eine Intra-Assay-Variation von 5,9% und eine Inter-Assay-Variation von 17,7% auf.

2.7 Hormonanalyse und LDH-Bestimmung

Die Bestimmung aller nun folgenden Parameter wurde im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Direktor Prof. Dr. med. G. Assmann) durchgeführt.

Die Hormone FSH, LH, Testosteron, Östradiol, Progesteron und β -HCG wurden am Gerät Elecsys 2010[®] der Firma Roche bestimmt. Androstendion wurde mittels eines Radioimmuno Assays der Firma DiaSorin (Androstendione-¹²⁵I RIA Kit / Catalog No.: CA-1725) gemessen. Die Konzentrationen des LDH wurde mit dem Gerät Hitachi 747[®] der Firma Roche ermittelt.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten wurde mit Hilfe des PC-Programms SPSS, Version 11.0 und mit Unterstützung des Instituts für Medizinische Informatik und Biomathematik durchgeführt.

Es wurden folgende statistischen Tests verwendet:

- Spearman-Korrelation
- Kruskal-Wallis-Test
- Jonckheere-Terpstra-Test

Mit dem Kruskal-Wallis-H-Test und dem Jonckheere-Terpstra-Test kann geprüft werden, ob mehrere unabhängige Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Der Kruskal-Wallis-H-Test, eine Erweiterung des Mann-Whitney-U-Tests, ist die nichtparametrische Entsprechung der einfaktoriellem Varianzanalyse und erkennt Unterschiede in der Lage der Verteilung. Der Kruskal-Wallis-H-Test setzt voraus, daß keine a-priori-Ordnung der k-Grundgesamtheiten vorliegt, aus denen die Stichproben gezogen werden. Wenn eine natürliche a-priori-Ordnung (aufsteigend oder absteigend) der k-Grundgesamtheiten besteht, ist der Jonckheere-Terpstra-Test leistungsfähiger.

2.9 Einverständniserklärung

Die Verwendung der Follikelflüssigkeiten und Patientenseren wurde durch ein Ethikvotum abgesichert. Für die zusätzlich entnommene Blutprobe lag eine Einverständniserklärung der Patientin vor. Die Patientinnen mussten nicht zusätzlich im Krankenhaus vorstellig werden, und sie wurden vor Einleitung der Therapie über die Studie aufgeklärt. Es lag eine generelle schriftliche Einverständniserklärung für die Verwendung der in der Routine anfallenden Daten für die Auswertung in klinischen Studien vor.

2.10 Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Dissertation wurde durch ein Posterbeitrag auf dem 4. Weltkongress „Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility“ (COGI) in Berlin im April 2003 und durch einen Vortrag auf dem 4. Kolloquium „Junge, forschende Reproduktionsmediziner“ in Münster im Mai 2003 vorgestellt.

3 Resultate

3.1 Intrafollikuläre hCG-Bioverfügbarkeit

Die Messung der intrafollikulären hCG Konzentration von 59 Follikeln verschiedener Größe 35 Stunden nach der subcutanen Bolusgabe von 10.000 I.E. hCG lässt erkennen, dass die Konzentration eine signifikant negative Korrelation ($p < 0,01$) zum Follikelvolumen besitzt. Je voluminöser die Follikel, desto niedriger ist der Gehalt an hCG.

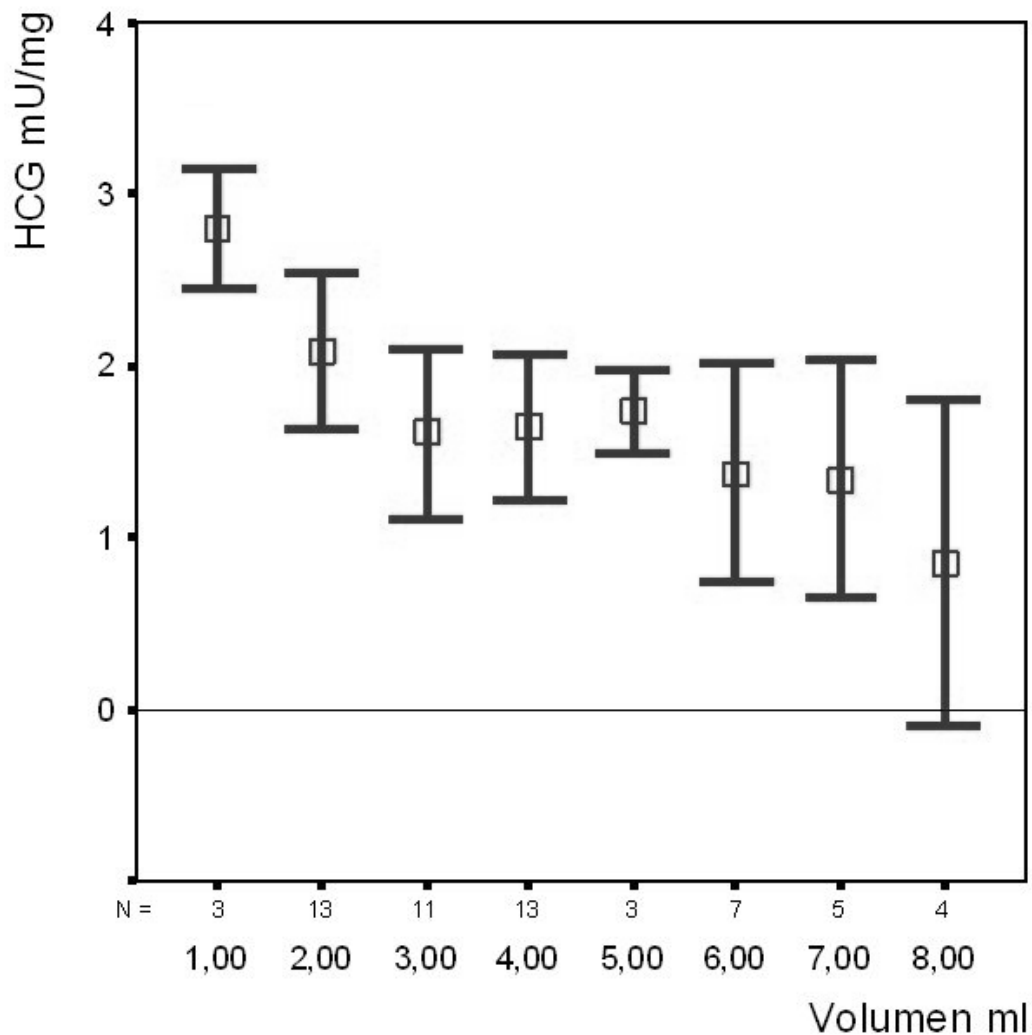


Abbildung 8: Korrelation hCG Konzentration zu Follikelvolumen [$r = -0,49$; $p < 0,01$; 59 Follikel; Punkte zeigen den Mittelwert, Fehlerbalken ± 1 Standardfehler]

3.2 Steroidbiosynthese und Aromatasekapazität

Voluminöse Follikel sind in der Lage größere Mengen an Androgenen zu produzieren als kleinere Follikel. Die Testosteronsynthese korreliert hochsignifikant mit dem Volumen in den gemessenen 64 Follikelflüssigkeiten.

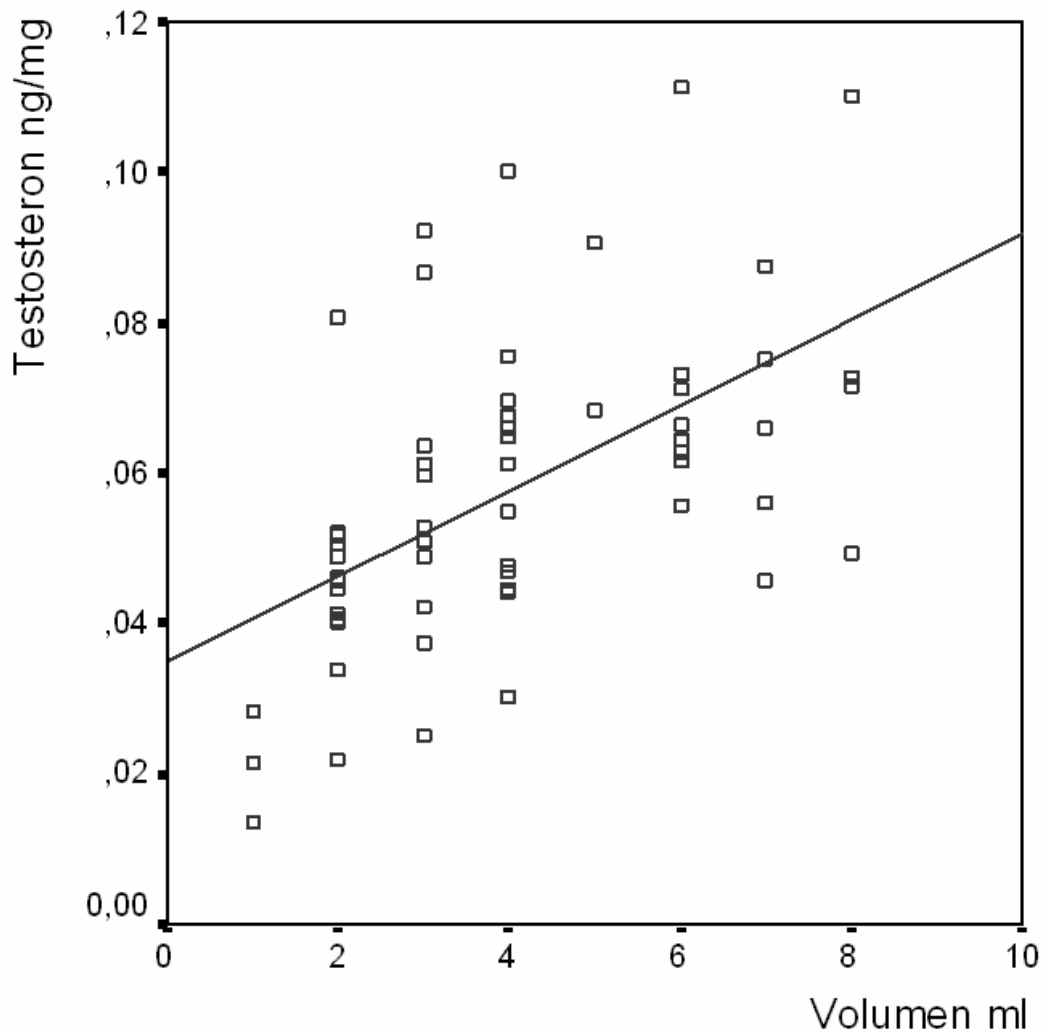


Abbildung 9: Androgenkonzentration in Bezug auf das Follikelvolumen [$r=0,55$; $p<0,01$; 64 Follikel]

Mit steigendem Substratangebot an Androstendion, welches in den Theca interna Zellen gebildet wird, kann in den Granulosazellen vermehrt Östradiol

synthetisiert werden. Abbildung 10 weist einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Östradiol- und der Androstendionkonzentration nach.

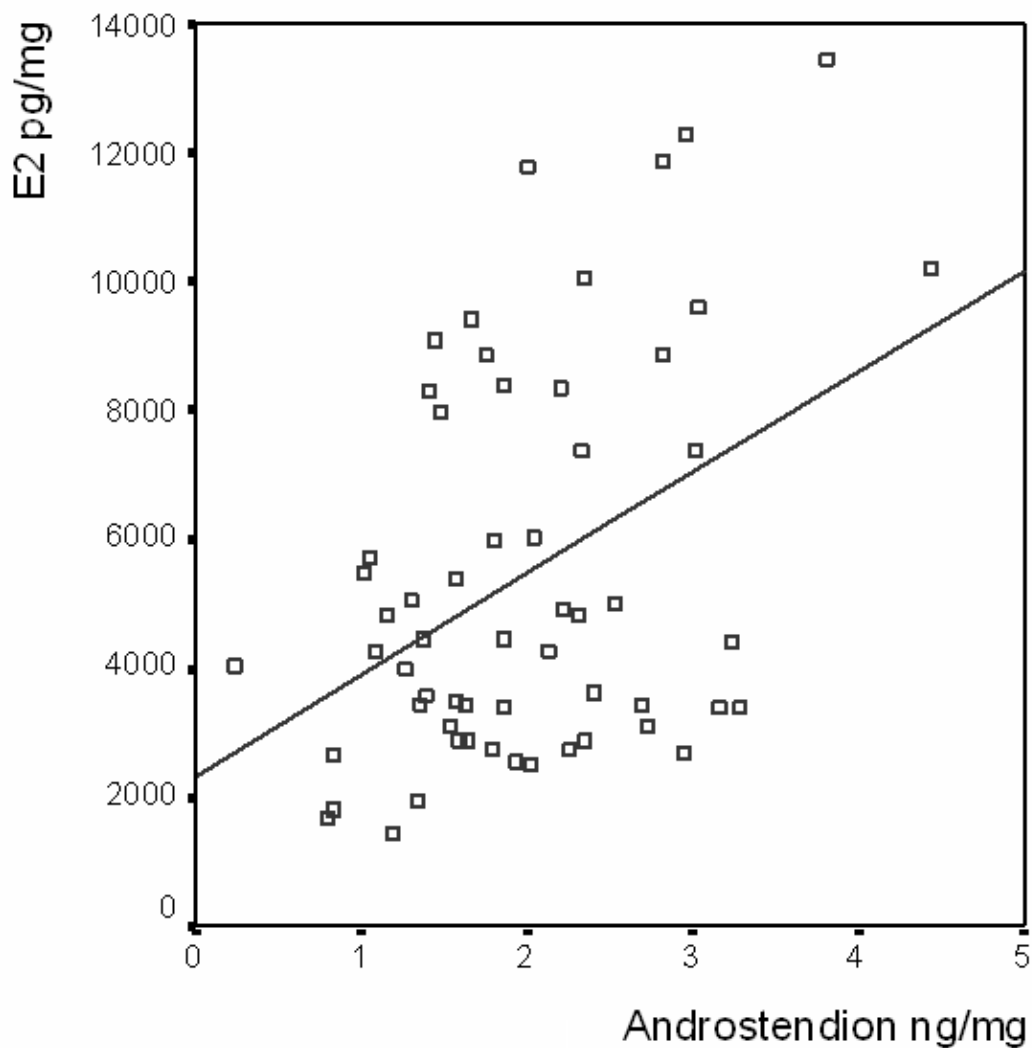


Abbildung 10: Korrelation der Östradiol Konzentration zur Androstendion Konzentration [r=0,42; p<0,01; 64 Follikel]

Die Korrelation der Östrogenkonzentration zum Volumen zeigt dagegen, dass die Östradiolsynthese unabhängig vom Volumen des Follikels ist (Abb. 11).

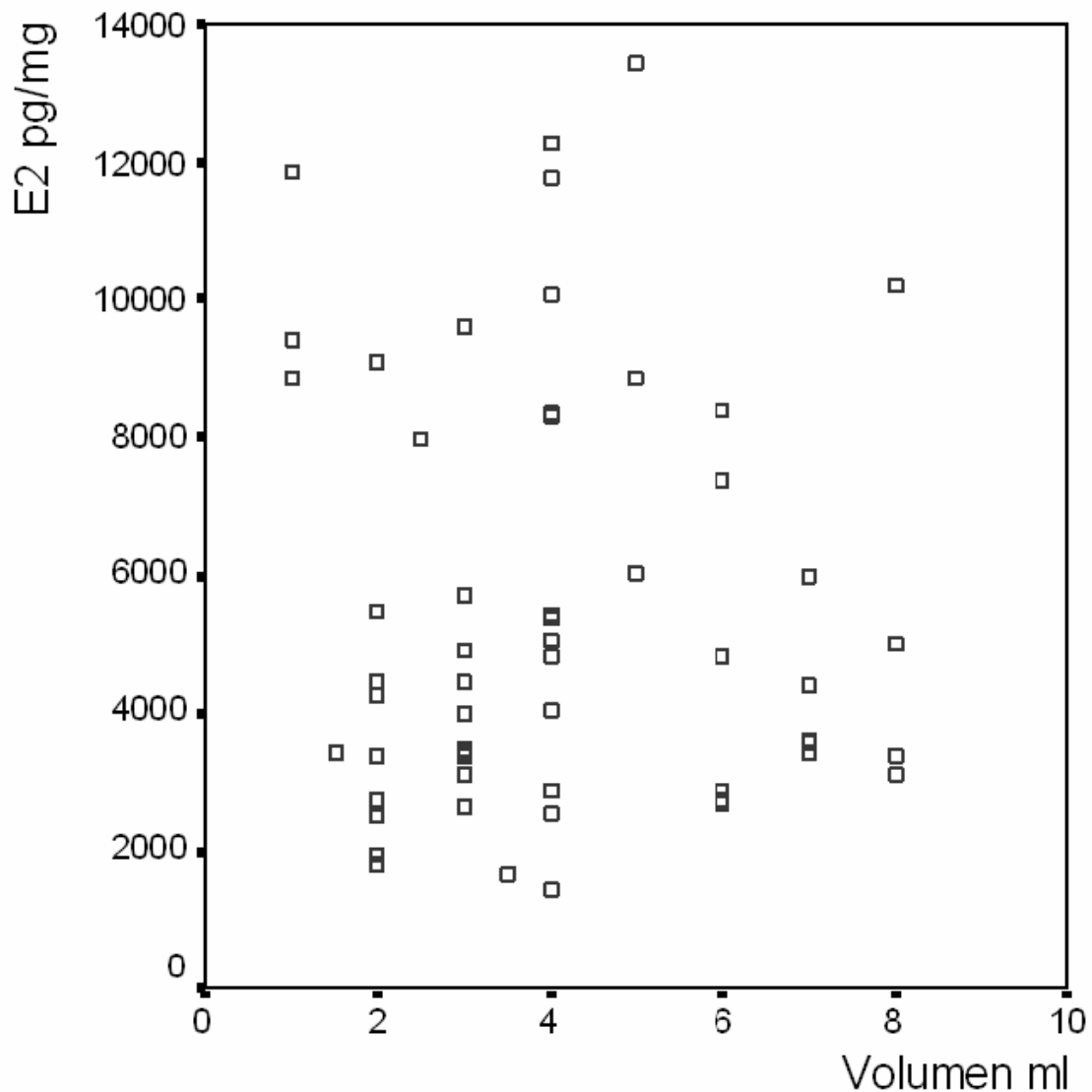


Abbildung 11: Östradiolkonzentration in Bezug auf das Follikelvolumen [Es lässt sich keine Korrelation nachweisen; 64 Follikel]

3.3 Frühe Luteinisierung: Progesteronsynthese

Durch die Gabe von 10.000 I.E. hCG wird in den Follikeln die Luteinisierung ausgelöst. In dieser frühen Luteinisierungsphase ist Progesteron das Hauptsyntheseprodukt. Die Auswertung der Daten legt dar, dass voluminösere Follikel signifikant mehr Progesteron produzieren als kleinere Follikel.

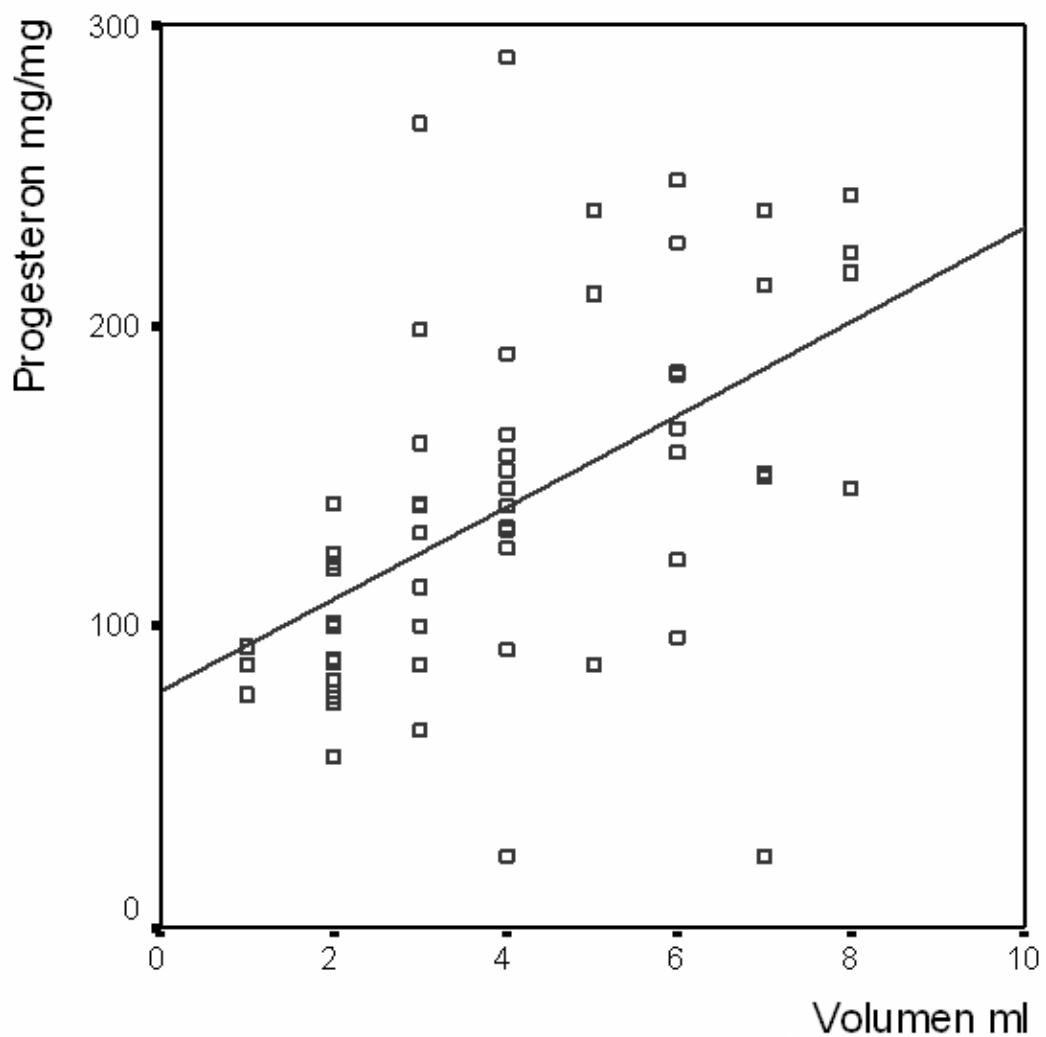


Abbildung 12: Korrelation Progesteronkonzentration zu Follikelvolumen [$r=0,51$; $p<0,01$; 64 Follikel]

Im Vergleich der Progesteron- mit der hCG-Konzentration (Abb. 13) zeigt sich eine negative Korrelation ($r=-0,32$; $p<0,05$). Follikel mit niedrigen hCG Konzentrationen besitzen die höchsten Progesteronkonzentrationen.

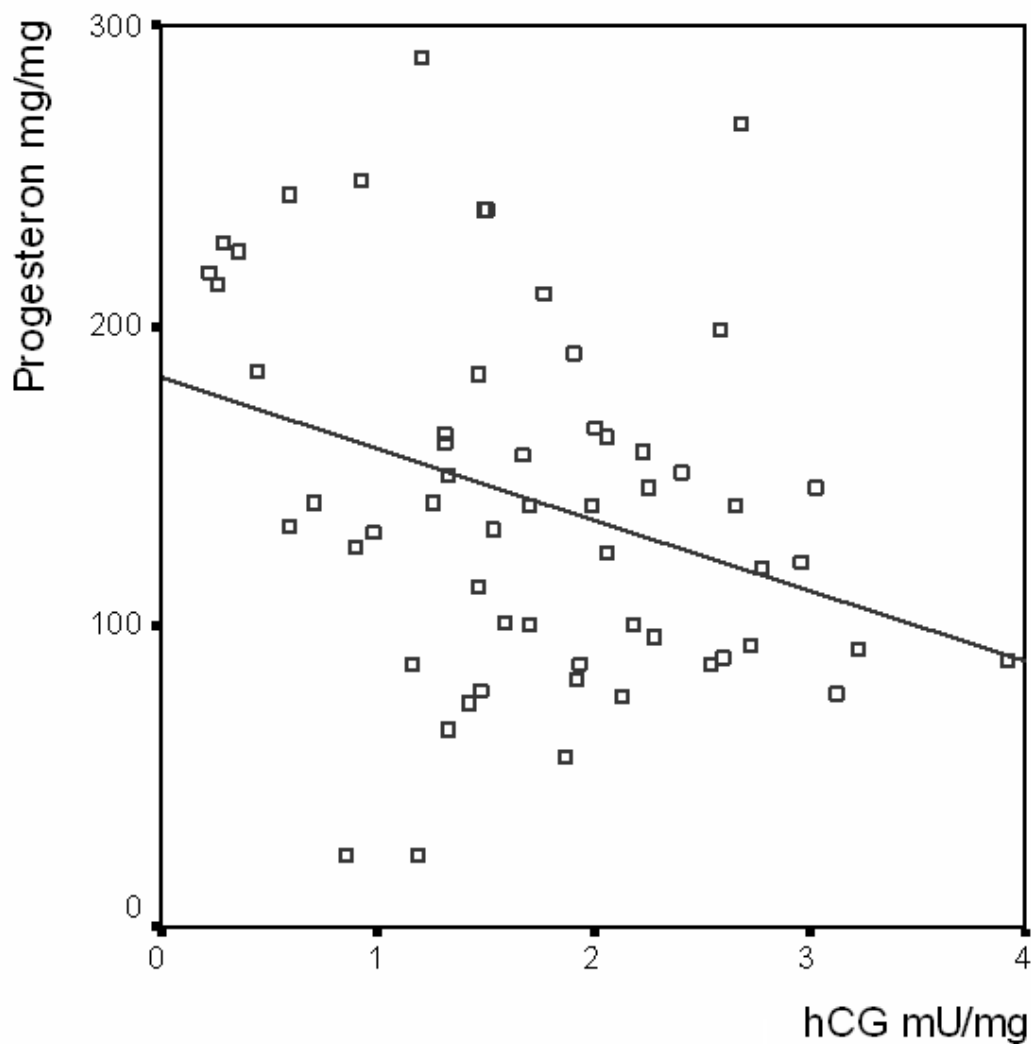


Abbildung 13: Verhältnis Progesteron zu hCG Konzentration [$r=-0,32$; $p<0,05$; 58 Follikel]

3.4 Neoangiogenese zur Corpus luteum – Formation

3.4.1 Angiogenesemarker

Bei der Untersuchung der Follikelflüssigkeiten auf den Angiogenesefaktor VEGF-A wurden verschiedene Ergebnisse gefunden. Es besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen dem bioaktiven und dem gesamten VEGF-A.

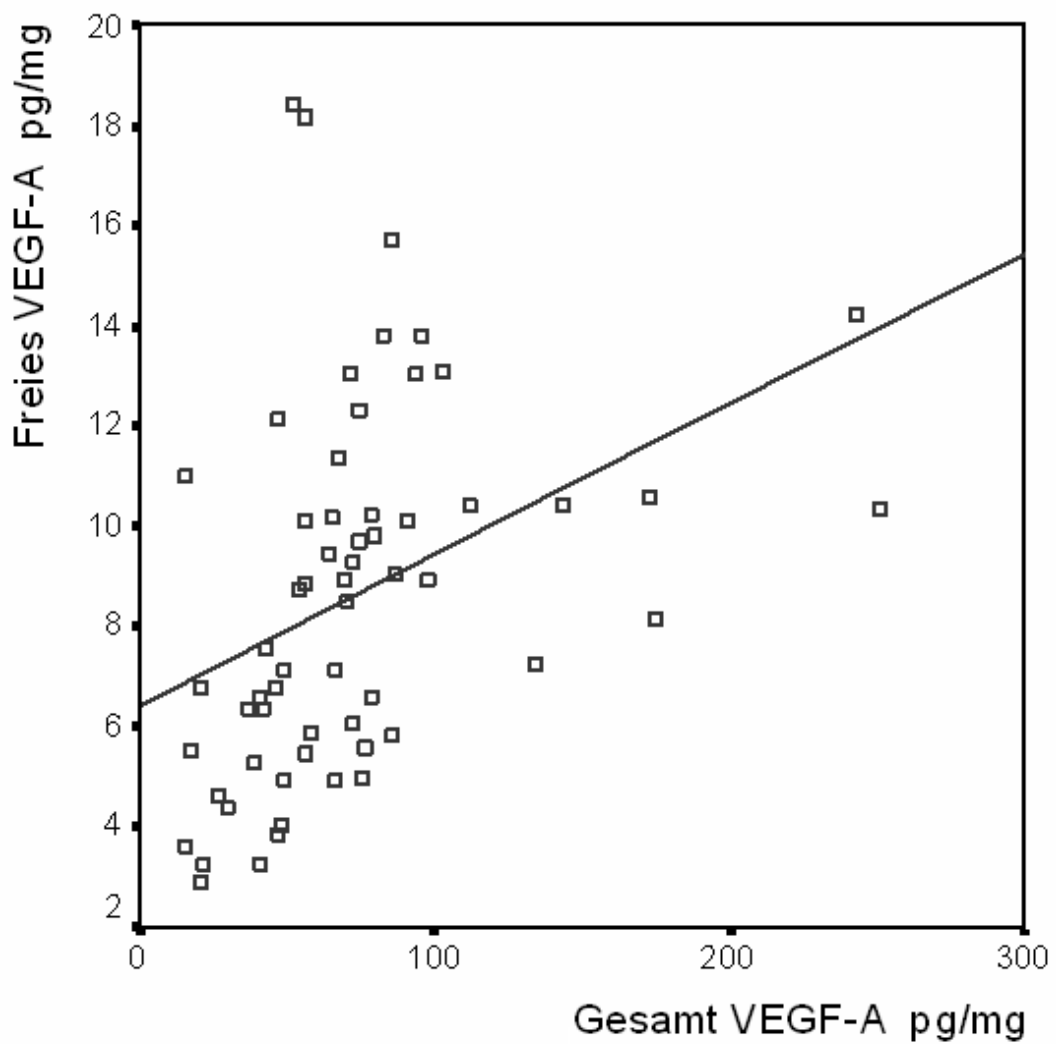


Abbildung 14: Verhältnis freies zu gesamt VEGF-A [$r=0,39$; $p<0,01$; 64 Follikel]

Mit zunehmendem Follikelvolumen und damit zunehmender Zellmasse nimmt der Gehalt des von Granulosazellen sezernierten VEGF zu. Voluminösere Follikel besitzen signifikant höhere gesamt VEGF-A Konzentrationen

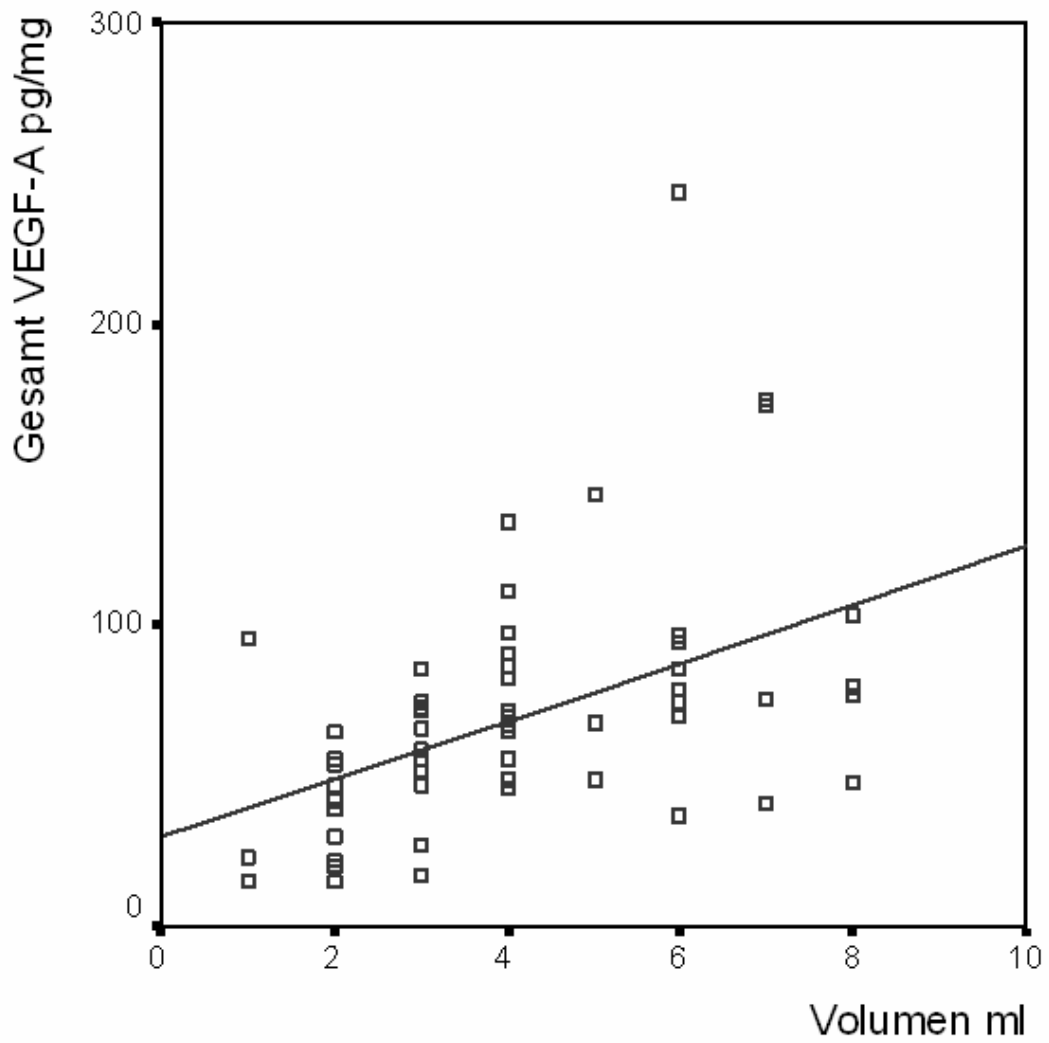


Abbildung 15: Korrelation gesamt VEGF-A zum Volumen [$r=0,46$; $p<0,01$; 64 Follikel]

Freies VEGF-A hingegen korreliert nicht mit dem Follikelvolumen.

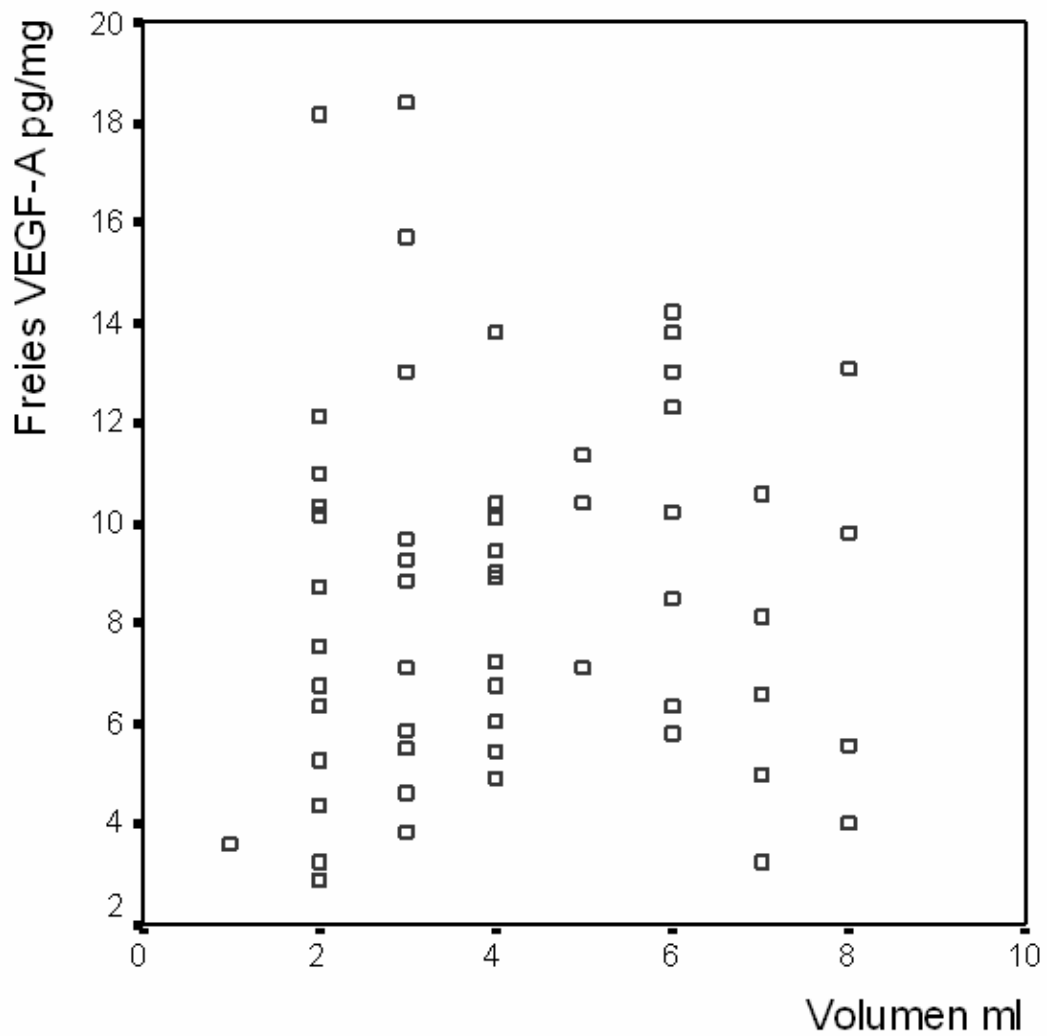


Abbildung 16: Verhältnis freies VEGF-A zum Volumen [Es lässt sich keine Korrelation nachweisen; 64 Follikel]

Die Ratio des freien / gesamt VEGF nimmt mit zunehmender Größe des Follikelvolumens ab ($r=-0,45$; $p<0,01$).

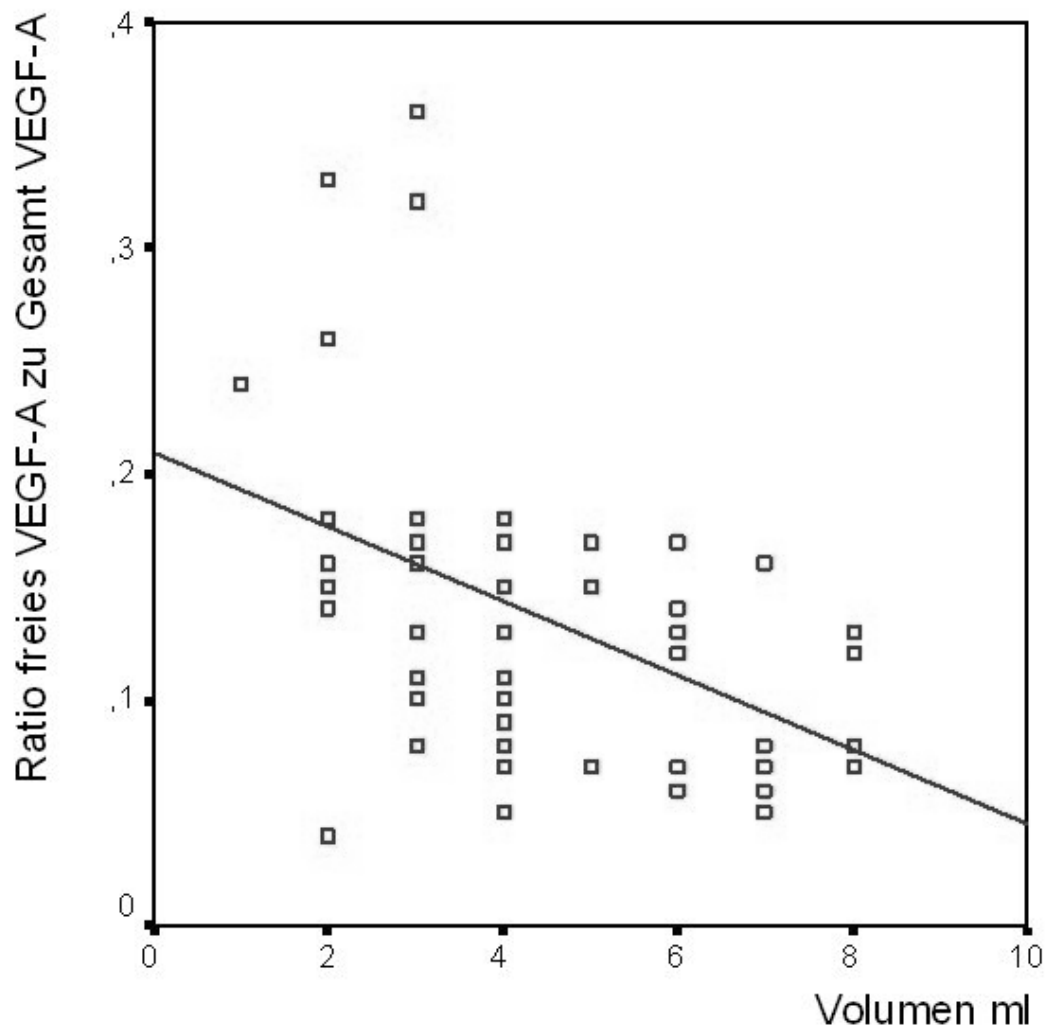


Abbildung 17: Ratio des freien/gesamt VEGF in Bezug zum Volumen [$r=-0,45$; $p<0,01$; 62 Follikel]

In weiteren statistischen Auswertungen werden keine Korrelationen zwischen gesamt VEGF-A, freiem VEGF-A und VEGF-Ratio mit der Kernreife, der Fertilisierbarkeit oder dem Z-Score gefunden.

3.5 Oozytenreife und Qualität der frühen Zygote

3.5.1 Zellvitalität (LDH)

In den Untersuchungen findet sich eine negative Korrelation zwischen LDH und den 64 Follikelvolumen (Abb. 18).

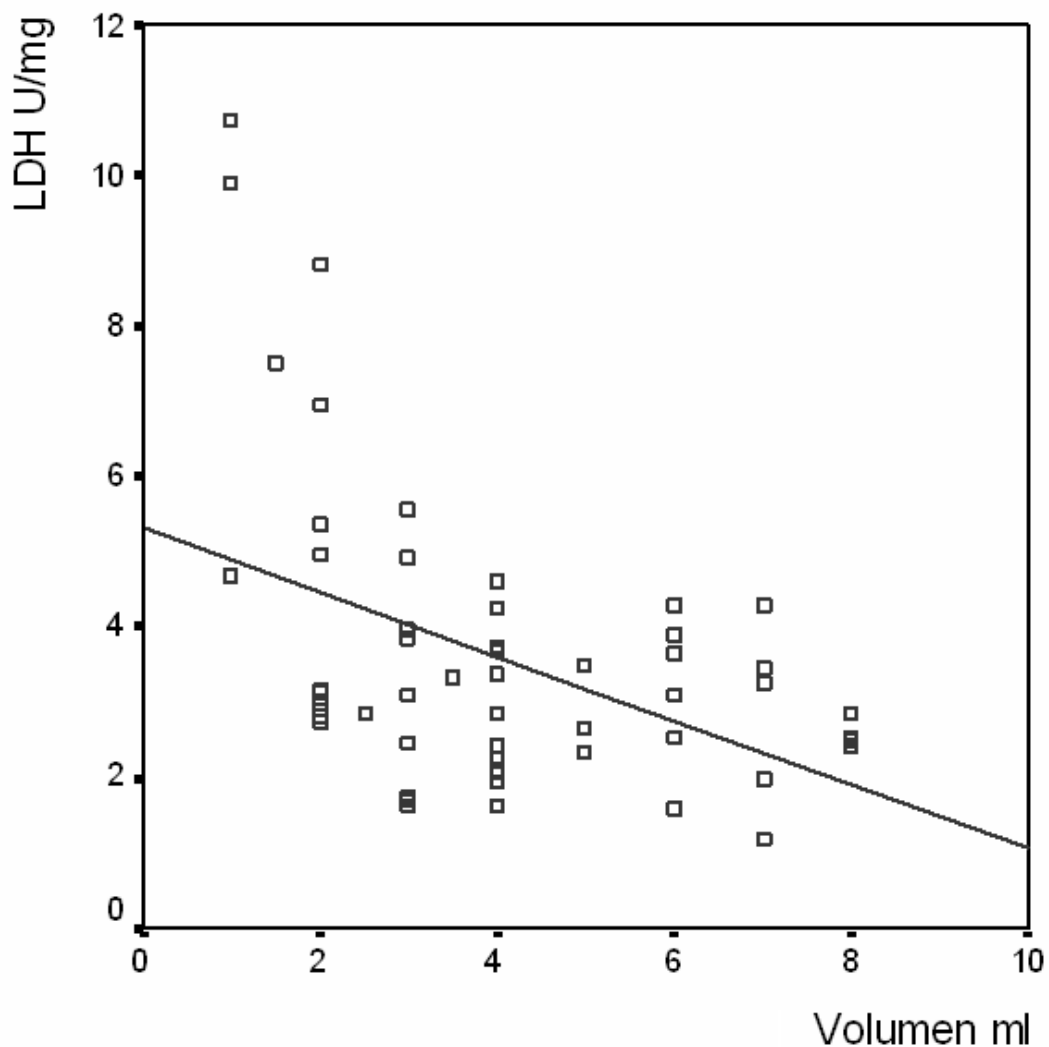


Abbildung 18: LDH Konzentration in Bezug auf das Follikelvolumen [$r=-0,45$; $p<0,01$; 64 Follikel]

Abbildung 19 zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der intrafollikulären hCG Konzentration und der LDH Freisetzung.

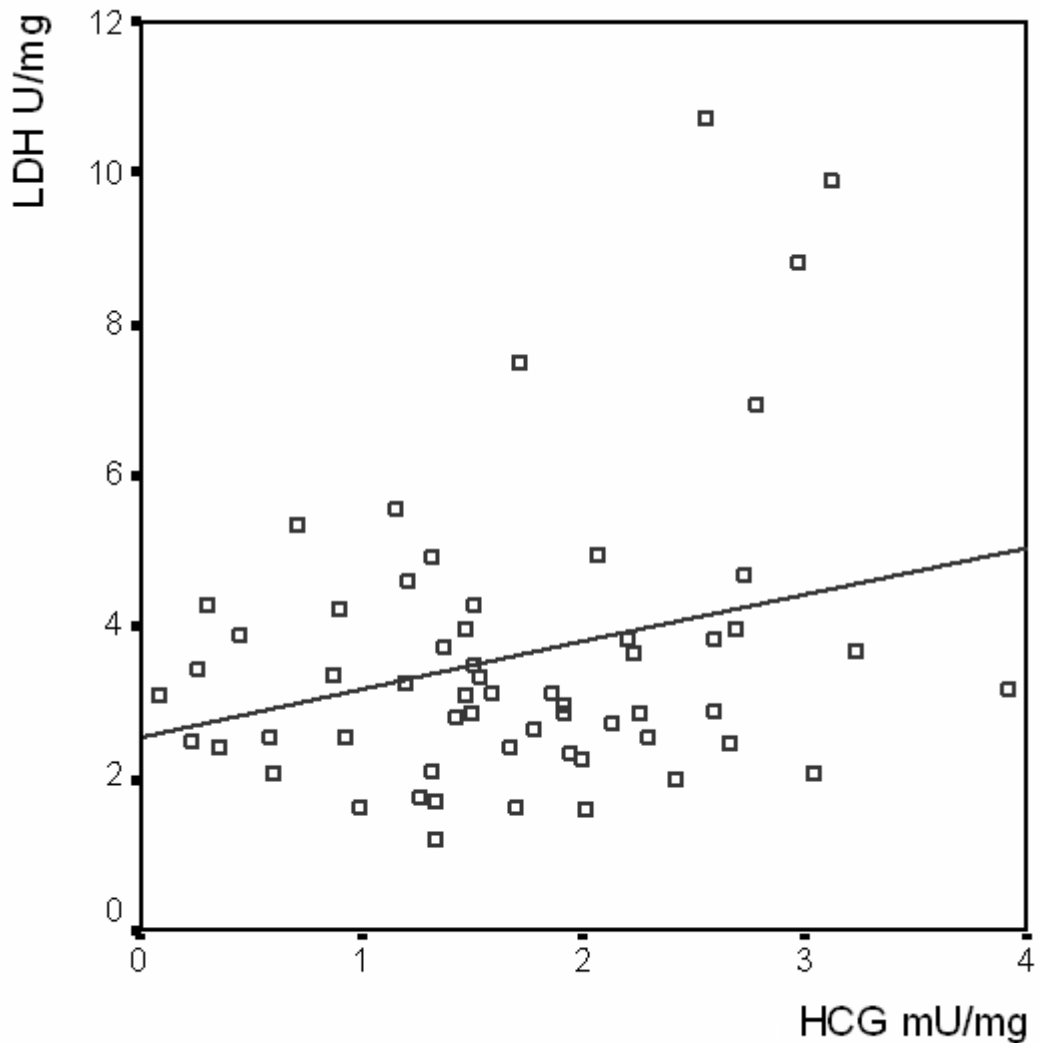


Abbildung 19: Korrelation zwischen LDH und hCG Konzentration [$r=0,28$; $p<0,05$; 61 Follikel]

Die Qualität der Pronucleusformation, Z1-Z4, korreliert signifikant negativ mit dem Follikelgehalt an LDH: je höher die LDH-Menge, desto prognostisch günstiger ist der Z-Score. (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,02$; Jonckheere-Terpstra-Test: $p<0,01$).

Beim Vergleich der der fertilisierten und der nicht fertilisierbaren Oozyten wird eine grenzwertige Signifikanz deutlich (Kruskal-Wallis-Test $p=0,04$ & Jonckheere-Terpstra-Test: $p=0,02$).

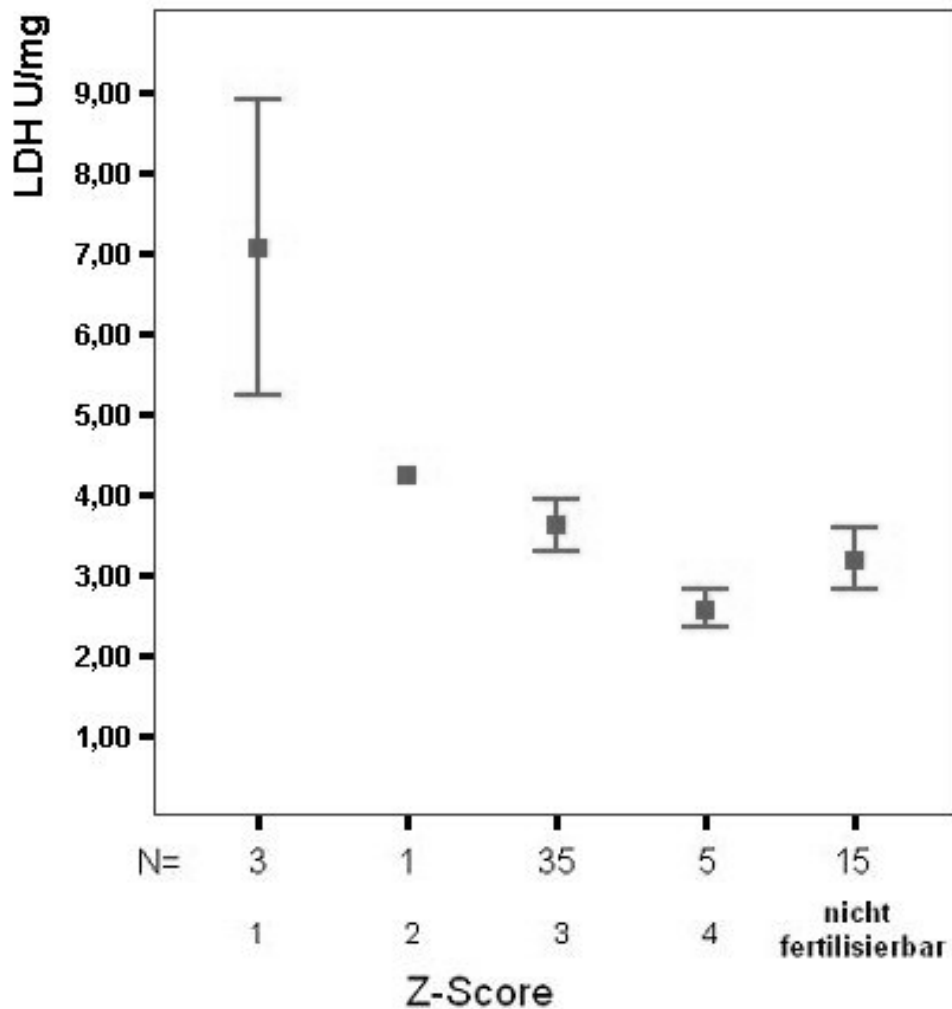


Abbildung 20: LDH Konzentration bei den Z-Scores bzw. nicht fertilisierbaren Oozyten [Punkte zeigen den Mittelwert, Fehlerbalken ± 1 Standardfehler; 59 Follikel]

3.5.2 Östradiol

Vergleiche der Östradiolkonzentration mit den Pronucleusformationen zeigen eine signifikante Korrelation (Kruskal-Wallis-Test $p=0,04$; Jonckheere-Terpstra-Test $p<0,01$; 61 Follikeln). Je günstiger die morphologische Qualität ist, desto höher ist der Östradiolgehalt in der jeweiligen Follikelflüssigkeit.

Es zeigt sich aber entgegen der zuvor beschriebenen Korrelation ein Anstieg des Östradiols in der Gruppe der nicht fertilisierbaren Oozyten.

Zwischen den beiden Gruppen, alle Pronucleusformationen und nicht fertilisierbare Oozyten, liegt keine signifikante Korrelation ($r=0,095$) vor.

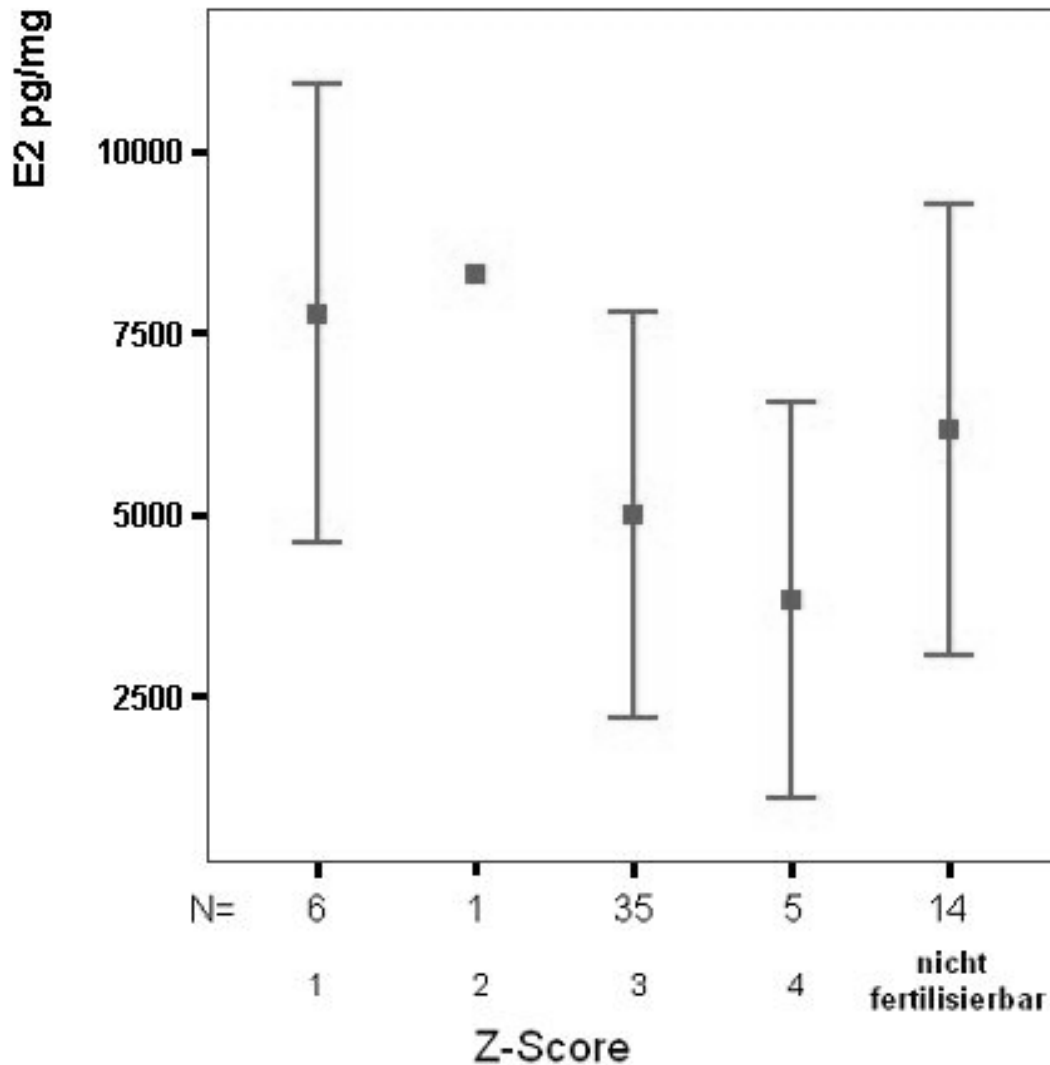


Abbildung 21: Östradiolkonzentrationen der Z-Scores bzw. nicht fertilisierbaren Oozyten [Säulen zeigen den Mittelwert, Fehlerbalken ± 1 Standardfehler; 61 Follikel]

3.5.3 Volumen

Die Qualität der Pronucleusformation, die sich aus einer reifen Oozyte entwickelt hat, scheint eine Abhängigkeit vom Follikelvolumen aufzuweisen: je kleiner der Follikel, desto günstiger ist der Z-Score (Kruskal-Wallis-Test $p=0,2$; Jonckere-Terpstra-Test $p=0,03$).

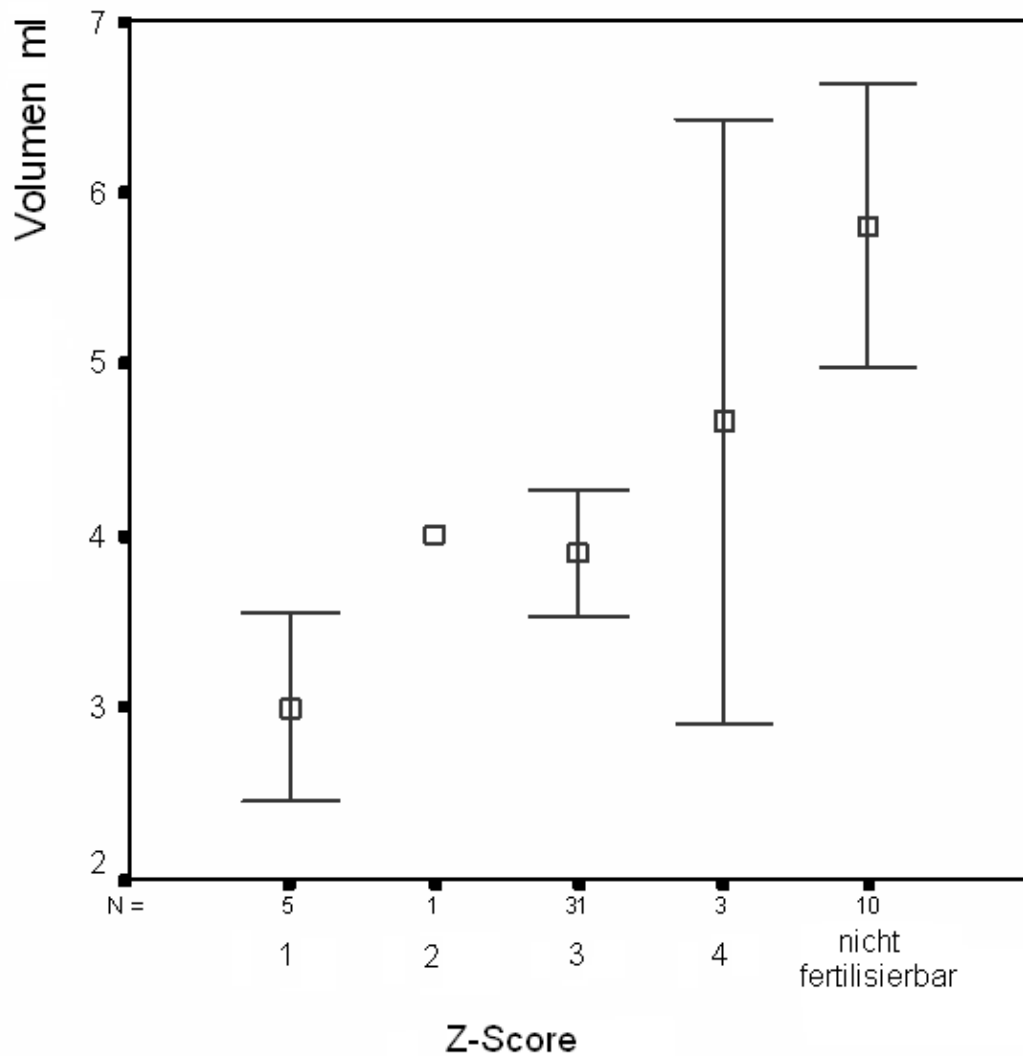


Abbildung 22: Morphologisch reife Oozyten: Volumen in Abhängigkeit von den Z-Scores bzw. nicht fertilisierbaren Oozyten [Punkte zeigen den Mittelwert, Fehlerbalken ± 1 Standardfehler; 50 Follikel]

4 Diskussion

In dieser Studie wurden die humanen Follikellüssigkeiten (hFF) von 64 Follikeln bei 13 Patientinnen untersucht, um Beziehungen zwischen den morphologischen Charakteristiken der Oozyten und den biochemischen Eigenschaften der hFF aufzudecken.

Ein spezifischer Marker der Oozytenqualität widerspiegelt, wurde bisher nicht identifiziert. Bisher publizierte Studien, die verschiedene Hormon- und Enzymkonzentrationen in humanen Follikelflüssigkeiten mit dem Outcome bei assistierter Reproduktion untersucht haben, konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen biochemischen Stoffen und dem Outcome finden. Es wird vielmehr deutlich, dass aufgrund der komplexen Vernetzung der unterschiedlichen Regulationsmechanismen ein Set an Markern nötig ist, um die Qualität und das Entwicklungspotenzial der zu befruchtenden Eizelle abschätzen zu können. Allerdings sind physiologische Details der Mechanismen und deren Faktoren die potenziell Einfluss auf die Eizellqualität haben wie z. B. die Regulation der de-novo-Gefäßsynthese teilweise noch unverstanden.

Die hFF ist eine leicht zugängliche Substanz, bei der nur ein minimaler Mehraufwand zur optimalen Gewinnung und damit exakten Auswertung nötig ist. Neu ist in diesem Zusammenhang die Methode der seriellen, individuellen hFF-Sammlung, die eine exakte biochemische Charakterisierung der gesamten Follikelkohorte einer Patientin zulässt. Die Art der Sammlung macht es erforderlich, dass die Konzentrationen der verschiedenen Substanzen in Abhängigkeit zum Gesamtprotein der einzelnen Follikel und nicht mehr die Volumenkonzentrationen bestimmt werden [51].

Bei der Untersuchung der einzelnen biochemischen Parameter, der Korrelation dieser untereinander und mit morphologischen Merkmalen wurde deutlich, dass eine genaue Qualitätsvoraussage, gemessen an der Morphologie der frühen Zygote (Z-Score), mit den untersuchten Werten nicht möglich ist. Retrospektiv können aber bestimmte follikuläre Kenngrößen identifiziert werden, bei denen

die Oozyten überdurchschnittliche Qualität, bzw. Entwicklungspotential besitzen.

Im nun folgenden Teil sollen die Ergebnisse diskutiert werden, die im 3. Kapitel beschrieben wurden. Hierbei werden Übereinstimmungen und im Besonderen Abweichungen mit publizierten Daten erläutert.

4.1 Intrafollikuläre hCG-Bioverfügbarkeit

Bei der Untersuchung zur hCG-Bioverfügbarkeit zeigt sich, dass voluminösere Follikel einen niedrigeren Gehalt an hCG aufweisen. Eine mögliche Erklärung für diese signifikante negative Korrelation ($r=-0,49$; $p<0,01$) der hCG-Konzentration mit dem Follikelvolumen lässt sich im Aufbau der Follikel finden. Das Molekulargewicht von hCG beträgt ca. 22.000 Dalton. Die Blut-Follikel Schranke ist für Moleküle < 30.000 Dalton ladungsunabhängig frei permeabel, weswegen die Transmission lediglich zeitabhängig ist [21]. Die Oberfläche der Follikel, die generell die Geometrie einer Kugel aufweisen, wächst im Quadrat, das Volumen aber mit der dritten Potenz. Größere Follikel besitzen, im Vergleich zu kleineren, eine relativ kleinere Diffusionsfläche, so dass sich das hCG-Equilibrium langsamer einstellen kann. 35 Stunden nach hCG-Gabe scheint sich in den voluminösen Follikeln das Maximum noch nicht eingestellt zu haben. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass das hCG in Follikeln mit morphologisch unreifen Oozyten aufgrund einer geringeren LH / hCG Rezeptoraktivität akkumuliert, dies wurde von Enien et al. 1998 beschrieben [16, 52].

4.2 Steroidbiosynthese und Aromatasekapazität

Voluminöse Follikel sind aufgrund der größeren Anzahl an Thekazellen in der Lage, umfangreichere Mengen an Androgenen zu produzieren als kleinere Follikel. Folglich korreliert die Testosteronkonzentration in der hFF hochsignifikant ($r=0,55$; $p<0,01$) mit dem Volumen in den gemessenen 64 Follikelflüssigkeiten.

Mit steigendem Substratangebot an Androstendion, welches in den Theca-interna Zellen gebildet wird, synthetisiert die Aromatase in den Granulosazellen vermehrt Östradiol ($r=0,42$; $p<0,01$). Dies deckt sich mit der 2-Zell 2-Gonadotropintheorie von Falck [17].

Folglich sollte eine volumenabhängige Östradiolsynthese vorliegen. Die Korrelation der Östrogenkonzentration zum Volumen zeigt dagegen, dass die Östradiolsynthese volumenunabhängig abläuft ($r=0$). Uehara konnte diese Abhängigkeit bei kleineren Follikeln nachweisen, diese Abhängigkeit verliert sich bei einem Volumen von mehr als 8 ml [46]. Bekanntermaßen steigert aber das injizierte hCG die Aromatasekapazität in Granulosazellen, so dass die Aromatasekapazität in kleineren Follikeln, durch vergleichsweise höhere hCG Konzentrationen gesteigert ist [34, 45]. Somit ist das Fehlen der zu erwartenden Abhängigkeit der Östradiolsynthese vom Follikelvolumen erklärbar.

4.3 Frühe Luteinisierung: Progesteronsynthese

In der frühen Luteinisierungsphase, die durch die hCG-Gabe induziert wird, ist Progesteron das Hauptsyntheseprodukt. Voluminösere Follikel produzieren signifikant mehr Progesteron als kleinere Follikel ($r=0,51$; $p<0,01$), was sich mit älteren Daten deckt [24, 46, 46]. Im Vergleich der Progesteron- mit der hCG-Konzentration findet sich eine negative Korrelation ($r=-0,32$; $p<0,05$). Kleine Follikel besitzen hohe hCG- und geringe Progesteronkonzentrationen, bei großen Follikeln hingegen ist das Verhältnis umgekehrt. Gesteuert wird die Progesteronbildung über LH- / hCG-Rezeptoren. Zum Zeitpunkt der hCG-Gabe ist die Anzahl und damit die Effektivität der Rezeptoren relativ gering. In der frühen Luteinisierungsphase kommt es dann zur vermehrten Produktion, was eine höhere Effektivität nach sich zieht [43]. Infolgedessen ist es wahrscheinlich, dass kleinere Follikel zur Zeit der Punktion einen geringeren Luteinisierungsgrad erreicht haben als größere. Somit sind voluminöse Follikel in der Lage, den hCG Reiz effektiver zu nutzen.

4.4 Neoangiogenese zur Corpus luteum – Formation

Angiogenesemarker

Barroso et al., Battaglia et al. und Friedman et al. publizierten, dass hohe VEGF-A Spiegel negativ mit der Erfolgsquote der IVF / ICSI Behandlung korrelieren. Hohe Spiegel korrelieren mit einem niedrigen Ertrag an Oozyten, einer schlechten Embryonenmorphologie und einer niedrigeren Schwangerschaftsrate. Barroso et al. schreiben VEGF-A die Rolle eines Hypoxiemarker zu [7, 8, 8, 19, 19]. Diese Daten beruhen aber nur auf Auswertung bei denen die Gesamtkonzentration des VEGF-A analysiert wurde und zwischen bioaktiven und komplexierten VEGF-A in hFF differenziert wurde.

In der Literatur sind bisher nur wenige Untersuchungen zum bioaktiven VEGF-A in IVF / ICSI Studien bekannt. Neulen et al. veröffentlichten, dass eine hohe sFlt Produktion und Abgabe ans Follikellumen eine verminderte Konzeptionswahrscheinlichkeit mit sich führt [33].

Bei der aktuellen Untersuchung der Follikelflüssigkeiten auf den Angiogenesefaktor wurden unterschiedliche Ergebnisse deutlich.

Mit zunehmendem Follikelvolumen und damit zunehmender Zellmasse nimmt der Gehalt des von Granulosazellen sezernierten VEGF-A zu. Es besteht eine spezifische Korrelation ($r=0,46$; $p<0,01$), die sich beim freien VEGF-A nicht widerspiegelt, dort ist keine Wechselbeziehung vorhanden.

VEGF-A könnte die mit der Luteinisierung einsetzende Angiogenese des entstehenden Corpus luteum widerspiegeln. In großen Follikeln ist die Umwandlung in das Gelbkörperchen weiter fortgeschritten als in Kleineren.

Eine signifikante positive Korrelation besteht auch zwischen dem freien und dem gesamten VEGF-A ($r=0,39$; $p<0,01$). Demnach sollte ein Zusammenhang in der Regulation der VEGF-A und der sFLT Produktion in der Granulosazelle bestehen.

Die Ratio des freien zum gesamten VEGF-A nimmt mit zunehmender Größe des Follikelvolumens ab ($r=-0,45$; $p<0,01$). Somit besitzen voluminöse Follikel relativ weniger bioaktives VEGF-A.

Wie im 3. Kapitel beschrieben konnten keine weiteren signifikanten Zusammenhänge zwischen dem gesamten VEGF-A, dem freiem VEGF-A und der VEGF-Ratio mit der Kernreife, der Fertilisierbarkeit oder dem Z-Score gefunden werden.

4.5 Oozytenreife und Qualität der frühen Zygote

Zellvitalität (LDH)

Das Zellenzym Lactatdehydrogenase kann als Marker der Zellfunktion herangezogen werden. Bei Zelltod gelangt es aus dem Zytoplasma ins Interstitium und Blut. Die Expression in Granulosazellen wurde bereits 1983 nachgewiesen [59]. Präovulatorisch finden sich in der Follikelflüssigkeit höhere LDH Konzentrationen als im Serum [2]. Seifer et. al konnten 1996 Verbindungen zwischen der Apoptoserate der Granulosazellen und der follikulären LDH-Konzentration aufzeigen [41].

Bei bovinen Follikeln wurde eine negative Korrelation des LDH zur Follikelgröße beschrieben [53]. Ähnlich wie in der Studie mit bovinen Follikeln, wurde in den hier beschriebenen Untersuchungen eine negative Korrelation gefunden (Abb. 18). Adiga et al. publizierte 2002 hingegen eine Studie, in der eine positive Korrelation des LDHs mit dem Volumen und dem Alter der Patientinnen dargestellt wird. Diese Ergebnisse decken sich aber nicht mit den bisher dargestellten [2].

Abbildung 19 zeigt eine signifikante Korrelation ($r=0,28$; $p<0,05$) zwischen der LDH-Freisetzung und der intrafollikulären hCG Konzentration. Dieser Zusammenhang kann aufgrund einer hohen Volumenabhängigkeit der beiden Proteine zustande kommen. Andererseits ist es aber denkbar, dass die kleinen Follikel, die sich wie oben beschrieben möglicherweise am Anfang der

Luteinisierung aufhalten, zum Zeitpunkt der Punktion einen intensiveren Ovulationsprozess durchlaufen als größere Follikel.

LDH könnte demnach ein möglicher Marker für den Ovulationsprozess sein, der bei der lokalen Granulosazellnekrose zur Vorbereitung der Follikelruptur freigesetzt wird.

Bei der Analyse der LDH-Konzentration in den einzelnen Pronucleusformationen, Z₁-Z₄, fällt eine signifikant positive Korrelation auf (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,02$; Jonckheere-Terpstra-Test: $p<0,01$). Wird die Gruppe aller Pronucleusformation mit der Gruppe der nicht fertilisierten Oozyten verglichen, zeigt sich nur eine grenzwertige Signifikanz (Kruskal-Wallis-Test $p=0,04$ & Jonckheere-Terpstra-Test: $p=0,02$), die gegebenenfalls auf einer Inhomogenität der Gruppe der nicht fertilisierten Oozyten zurückzuführen ist. In dieser Gruppe kann der genaue Grund der fehlenden Fertilisierung nicht ermittelt werden.

Östradiol

Östradiol gilt als ein Marker für die Aromataseaktivität in Follikeln. Gegenüberstellungen der Östradiolkonzentration mit den Pronucleusformationen weisen eine signifikante Wechselbeziehung (Kruskal-Wallis-Test $p=0,04$; Jonckheere-Terpstra-Test $p<0,01$) auf. Morphologisch günstigere Pronuclei besitzen höhere Östradiolkonzentrationen in den jeweiligen Follikelflüssigkeiten als solche mit einer unvorteilhaften Morphologie. Dieser Zusammenhang deckt sich mit bisher publizierten Daten. Hohe Östradiolspiegel wurden in verschiedenen Studien mit hohen Schwangerschaftsraten, einem guten Follikelwachstum und guter Oozytenqualität sowie niedrige Spiegel mit Follikelatresien und degenerierten Oozyten in Verbindung gebracht [9, 25, 30, 40, 53].

Unklar ist der Anstieg des Östradiols in der Gruppe der nicht fertilisierbaren Oozyten. Analog zur LDH Auswertung können auch hier andrologische und weitere, unbekannte Störgrößen, die zur Nichtfertilisierung führen, die entscheidenden Faktoren sein.

Eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Gruppen, alle Pronucleusformationen und nicht fertilisierbare Oozyten, liegt nicht vor ($r=0,095$).

Volumen

In der aktuellen Literatur sind zwei große retrospektive Studien von Salha 1998 und Wittmaack 1994 zu finden [37, 54]. Sie kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen, wobei sie jedoch eine Gemeinsamkeit besitzen. Die Embryonenqualität ist unabhängig vom Follikelvolumen. Bei der Beurteilung der Oozytenqualität und Fertilisationsrate in Bezug zum Follikelvolumen unterscheiden sie sich jedoch. Salha ist der Überzeugung, dass das Entwicklungspotenzial der Oozyten unabhängig vom Follikelvolumen ist [37]. Wittmaack hingegen kommt zu dem Ergebnis, dass das Follikelvolumen ein nützvoller Indikator für die Oozytengewinnung und die Fertilisationsrate ist [54]. Zu kleine ($< 1\text{ml}$) und zu große Follikel ($> 7\text{ml}$) sind demnach prognostisch ungünstigere Faktoren.

Die bisher dargestellten Ergebnisse, bei der die Qualität der Pronucleusformation, die sich aus einer morphologisch günstigeren Oozyte entwickelt hat, mögliche Abhängigkeiten vom Follikelvolumen aufweisen (Kruskal Wallis Test $p= 0,2$; Jonckere Terpstra Test $p= 0,03$), deckt sich demnach nicht mit den genannten Studien.

4.6 Kritische Stellungnahme

Bei der hier durchgeführten Studie sind folgende Punkte kritisch zu bewerten. Zum einen ist durch die begrenzte Fallzahl, besonders im Rahmen der Auswertung der Pronucleusstadien, nur eine bedingte Aussagekraft möglich. Im Vergleich aber zu den hier zitierten Autoren ist die gesamte Kollektivgröße fast identisch [2, 11]. Somit lassen sich zumindest die zitierten Artikel mit dieser Arbeit vergleichen.

Zum anderen wurde mit der Bestimmung der biochemischen Parameter nur eine Querschnittsmessung im letzten Abschnitt des komplexen intrafollikulären Reifungsprozesses der Oozyten durchgeführt.

Somit stellen die Schlüsse, die im Rahmen dieser Forschungsreihe gezogen wurden, einen Anreiz dar, weitere Untersuchungen mit größeren Kollektiven zu initiieren. In die Vorüberlegungen sollten dann die Ergebnisse dieser Arbeit einfließen, so dass die aktuellen Ergebnisse validiert und neue Strategien zur Optimierung der ART gefunden werden.

5 Zusammenfassung

Das Entwicklungspotenzial menschlicher Embryonen stellt den einflussreichsten Faktor für eine erfolgreiche Therapie der assistierten Reproduktion dar. Das die Oozyte umgebende intrafollikuläre Mikromilieu determiniert wahrscheinlich die optimale Reifung weiblicher Gameten und reflektiert die Unterschiede zwischen Follikeln, Oozytenqualität und Outcome. Wesentlich scheint die perifollikuläre Mikrovaskularisation zu sein, welche nach aktuellen Untersuchungen die Follikulogenese und die Oozytenqualität bedeutend beeinflusst. Eine zentrale Rolle bei der de-novo Gefäßbildung spielt der Angiogenesefaktor VEGF_A. Dieser induziert eine Aussprossung von Endothelzellen aus präexistenten Blutgefäßen und ist damit unabdingbar für die Bildung eines nutritiven perifollikulären Kapillarnetzes.

Die in der klinischen Routine durchgeführte Ovarpunktion erfolgt durch eine serielle Follikelpunktion, die aufgrund der fehlenden Separation der Einzelaspirate zu einer Kontamination und Vermischung verschiedener Follikelflüssigkeiten führt.

Aus diesem Grund wurde zur Analytik der intrafollikulären Biochemie zunächst eine neue Methode zur Gewinnung individueller Follikelaspirate etabliert. Durch diese neue Arbeitsweise wurde es unumgänglich, die Konzentrationen der zu untersuchenden Einzelsubstanzen nicht als Volumenkonzentration anzugeben, sondern in Korrelation mit dem Proteingehalt der individuellen Follikelflüssigkeiten zu setzen.

Die gewonnenen Aspirate wurden mit kommerziellen ELISA auf den Gehalt des Angiogenesefaktors VEGF_A (gesamt VEGF und bioaktives, freies VEGF_A) und der Hormone FSH, LH, Testosteron, Östradiol, Progesteron und β -HCG untersucht und mit den morphologischen Parametern von Oozyten und Pronuclei korreliert. Das Kollektiv, welches für diese Studie ausgewählt wurde, umfasst 13 Patientinnen mit einem Durchschnittsalter bei Punktion von 33,4 Jahren und insgesamt 64 Follikeln.

Die Analysen ergaben verschiedene Resultate. Ein spezieller biochemischer Marker für die Oozytenqualität und deren Entwicklungspotenzial konnte nicht

identifiziert werden, vielmehr schien ein „Set“ an Markern notwendig zu sein. Nach Auswertung der gewonnenen Daten wird deutlich, dass das VEGF_A nicht zu diesen Markern gehört. Vermutlich hat die Angiogenese einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung, aber dieser einzelne Faktor reflektiert anscheinend nicht die Entstehung eines nutritiven perifollikulären Kapillarnetzes. Der ideale Follikel in diesem Kollektiv wies eine intensive Östradiol Produktion auf, ist klein und zeigt eine hohe LDH-Konzentration. Aufgrund der Verzahnung vieler Marker in mehrere biologische Prozesse, wie z.B. Östradiol und LDH, sind Cut-off Werte im untersuchten Kollektiv nicht definierbar.

6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis

- 1 Adashi, E.Y.
Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology
Vol. 1 Lippincott-Raven-Publishers (1996)
- 2 Adiga, S.K.; Kumar, P. et al.
Lactate dehydrogenase estimation in follicular fluid: correlation with patient age, follicle size and super ovulation in ART cycles
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol Vol.105; No.2 (2002) 150-4
- 3 Andersen, C.Y.
Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization
J Clin Endocrinol Metab Vol.77; No.5 (1993) 1227-34
- 4 Andersen, M.M.; Kroll, J. et al.
Protein composition in the fluid of individual bovine follicles
J Reprod Fertil Vol.48; No.1 (1976) 109-18
- 5 Armstrong, D.T. and Papkoff, H.
Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone
Endocrinology Vol.99; No.4 (1976) 1144-51
- 6 Barleon, B.; Sozzani, S. et al.
Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1
Blood Vol.87; No.8 (1996) 3336-43
- 7 Barroso, G.; Barrionuevo, M. et al.
Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients
Fertil Steril Vol.72; No.6 (1999) 1024-6

- 8 Battaglia, C.; Genazzani, A.D. et al.
Perifollicular Doppler flow and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in poor responders
Fertil Steril Vol.74; No.4 (2000) 809-12
- 9 Chiu, T.T.; Rogers, M.S. et al.
Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality
Hum Reprod Vol.17; No.6 (2002) 1591-6
- 10 Chui, D.K.; Pugh, N.D. et al.
Follicular vascularity--the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study
Hum Reprod Vol.12; No.1 (1997) 191-6
- 11 Costa, L.O.; Mendes, M.C. et al.
Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes
Braz J Med Biol Res Vol.37; No.11 (2004) 1747-55
- 12 DeCherney, A.H.; Tarlatzis, B.C. et al.
Follicular development: lessons learned from human in vitro fertilization
Am J Obstet Gynecol Vol.153; No.8 (1985) 911-23
- 13 Deutsche IVF Register
Jahresberichte des DIR 1996 - 2003
- 14 Edwards, R.G.
Follicular fluid
J Reprod Fertil Vol.37; No.1 (1974) 189-219
- 15 Edwards, R.G.; Steptoe, P.C. et al.
Observations on preovulatory human ovarian follicles and their aspirates
Br J Obstet Gynaecol Vol.87; No.9 (1980) 769-79

- 16 Enien, W.M.; Chantler, E. et al.
Human ovarian granulosa cells and follicular fluid indices: the relationship to oocyte maturity and fertilization in vitro
Hum Reprod Vol.13; No.5 (1998) 1303-6
- 17 Falck, B.
Site of production of oestrogen in the ovary of the rat
Nature Vol.184 (Suppl 14); No.1959, 1082
- 18 Findlay, J.K.
An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis
Biol Reprod Vol.48; No.1 (1993) 15-23
- 19 Friedman, C.I.; Seifer, D.B. et al.
Elevated level of follicular fluid vascular endothelial growth factor is a marker of diminished pregnancy potential
Fertil Steril Vol.70; No.5 (1998) 836-9
- 20 Gauden, M.E.
Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions
Mutat Res Vol.296; No.1-2 (1992) 69-88
- 21 Hess, K.A.; Chen, L. et al.
The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size-selective in mice
Biol Reprod Vol.58; No.3 (1998) 705-11
- 22 Hill, G.A.; Freeman, M. et al.
The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer
Fertil Steril Vol.52; No.5 (1989) 801-6
- 23 Hillier, S.G.; Whitelaw, P.F. et al.
Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited
Mol Cell Endocrinol Vol.100; No.1-2 (1994) 51-4

- 24 Hillier, S.G.; Wickings, E.J. et al.
Granulosa cell steroidogenesis before in vitro fertilization
Biol Reprod Vol.31; No.4 (1984) 679-86

- 25 Hsueh, A.J.; Billig, H. et al.
Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process
Endocr Rev Vol.15; No.6 (1994) 707-24

- 26 Hull, M.G.; Glazener, C.M. et al.
Population study of causes, treatment, and outcome of infertility
Br Med J (Clin Res Ed) Vol.291; No.6510 (1985) 1693-7

- 27 Kendall, R.L. and Thomas, K.A.
Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor
Proc Natl Acad Sci U S A Vol. 90; No.22 (1993) 10705-9

- 28 Kroll, J. and Waltenberger, J.
The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells
J Biol Chem Vol.272; No.51 (1997) 32521-7

- 29 Makrigiannakis, A.; Coukos, G. et al.
Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival in vitro
Ann N Y Acad Sci Vol.900; No.2000, 16-25

- 30 Mendoza, C.; Ruiz-Requena, E. et al.
Follicular fluid markers of oocyte developmental potential
Hum Reprod Vol.17; No.4 (2002) 1017-22

- 31 Nayudu, P.L.; Lopata, A. et al.
An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics
Hum Reprod Vol.4; No.5 (1989) 558-67

- 32 Neufeld, G.; Cohen, T. et al.
Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors
FASEB J Vol.13; No.1 (1999) 9-22
- 33 Neulen, J.; Wenzel, D. et al.
Poor responder-high responder: the importance of soluble vascular endothelial
growth factor receptor 1 in ovarian stimulation protocols
Hum Reprod Vol.16; No.4 (2001) 621-6
- 34 Overes, H.W.; de Leeuw, R. et al.
Regulation of aromatase activity in FSH-primed rat granulosa cells in vitro by
follicle-stimulating hormone and various amounts of human chorionic
gonadotrophin
Hum Reprod Vol.7; No.2 (1992) 191-6
- 35 Pellicer, A.; Diamond, M.P. et al.
Intraovarian markers of follicular and oocyte maturation
J In Vitro Fert Embryo Transf Vol.4; No.4 (1987) 205-17
- 36 Plachot, M.; De Grouchy, J. et al.
Chromosome analysis of oocytes and human embryos collected after fertilization
in vitro. A model of natural selection against aneuploidy
Rev Fr Gynecol Obstet Vol.83; No.10 (1988) 613-7
- 37 Salha, O.; Nugent, D. et al.
The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in in-
vitro fertilization cycles
Hum Reprod Vol.13; No.7 (1998) 1901-6
- 38 Scott, L.; Alvero, R. et al.
The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst
development and implantation
Hum Reprod Vol.15; No.11 (2000) 2394-403

- 39 Seetharam, L.; Gotoh, N. et al.
A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF
Oncogene Vol.10; No.1 (1995) 135-47
- 40 Seibel, M.M.; Smith, D. et al.
Periovulatory follicular fluid hormone levels in spontaneous human cycles
J Clin Endocrinol Metab Vol.68; No.6 (1989) 1073-7
- 41 Seifer, D.B.; Gardiner, A.C. et al.
Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization
Fertil Steril Vol.66; No.4 (1996) 593-8
- 42 Shalgi, R.; Kraicer, P. et al.
Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier
Fertil Steril Vol.24; No.6 (1973) 429-34
- 43 Shima, K.; Kitayama, S. et al.
Gonadotropin binding sites in human ovarian follicles and corpora lutea during the menstrual cycle
Obstet Gynecol Vol.69; No.5 (1987) 800-6
- 44 Steptoe, P.C. and Edwards, R.G.
Birth after the reimplantation of a human embryo
Lancet Vol.2; No.8085 (1978) 366
- 45 Tapanainen, J.; McCamant, S. et al.
Regulation of steroid and steroid sulfate production and aromatase activity in cultured human granulosa-luteal cells
J Steroid Biochem Mol Biol Vol.39; No.1 (1991) 19-25
- 46 Uehara, S.; Naganuma, T. et al.
Relationship between follicular fluid steroid concentrations and in vitro fertilization
Obstet Gynecol Vol.66; No.1 (1985) 19-23

- 47 Van Blerkom, J.; Antczak, M. et al.
The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics
Hum Reprod Vol.12; No.5 (1997) 1047-55
- 48 Van Blerkom, J.; Davis, P.W. et al.
ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer
Hum Reprod Vol.10; No.2 (1995) 415-24
- 49 Van Blerkom, J. and Henry, G.
Cytogenetic analysis of living human oocytes: cellular basis and developmental consequences of perturbations in chromosomal organization and complement
Hum Reprod Vol.3; No.6 (1988) 777-90
- 50 Van Steirteghem, A.C.; Liu, J. et al.
Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles
Hum Reprod Vol.8; No.7 (1993) 1055-60
- 51 von Otte, S.; Paletta, J. et al.
Ovarian follicular fluid biochemistry in assisted reproduction: a simple method for individual follicular fluid analysis during serial follicle aspiration
The Fourth World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility (COGI), Berlin, Vol.2003
- 52 Whitman, G.; Luciano, A.A. et al.
Influence of human chorionic gonadotropin (hCG) and hCG internalization by granulosa cells on the rate of in vitro fertilization and embryonic development of human oocytes
Fertil Steril Vol.50; No.4 (1988) 607-11

- 53 Wise, T.
Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle
J Anim Sci Vol.64; No.4 (1987) 1153-69
- 54 Wittmaack, F.M.; Kreger, D.O. et al.
Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6-year data collection
Fertil Steril Vol.62; No.6 (1994) 1205-10
- 55 Wramsby, H.; Fredga, K. et al.
Ploidy in human cleavage stage embryos after fertilization in vitro
Hum Reprod Vol.2; No.3 (1987) 233-6
- 56 Yap, C.
Ontogeny: the evolution of an oocyte
Obstet Gynecol Surv Vol.55; No.7 (2000) 449-54
- 57 Yoshida, A.; Anand-Apte, B. et al.
Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor
Growth Factors Vol.13; No.1-2 (1996) 57-64
- 58 Zeleznik, A.J. and Hillier, S.G.
The role of gonadotropins in the selection of the preovulatory follicle
Clin Obstet Gynecol Vol.27; No.4 (1984) 927-40
- 59 Zoller, L.C. and Enelow, R.
A quantitative histochemical study of lactate dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities in the membrana granulosa of the ovulatory follicle of the rat
Histochem J Vol.15; No.11 (1983) 1055-64

Tabelle 1:	Sterilitätsursachen nach UFK Münster	7
Tabelle 2:	Untersuchtes Patientenkollektiv	16
Abbildung 1:	Das Ovar während des Zyklus (mit freundlicher Genehmigung der Schering AG)	4
Abbildung 2:	Vaginalultraschall bei einer Patientin mit hormoneller Überstimulation	8
Abbildung 3:	Langzeit-Stimulationsprotokoll	9
Abbildung 4:	Antagonistenprotokoll.....	10
Abbildung 5:	FAS #4551 Gynemed.....	18
Abbildung 6:	Proteinverteilung der einzelnen Spülfractionen bei fünf Follikelpunktionen	19
Abbildung 7:	Pronucleus Grading nach Scott et. al. (2000).....	20
Abbildung 8:	Korrelation hCG Konzentration zu Follikelvolumen	24
Abbildung 9:	Androgenkonzentration in Bezug auf das Follikelvolumen.....	25
Abbildung 10:	Korrelation der Östradiol Konzentration zur Androstendion Konzentration	26
Abbildung 11:	Östradiolkonzentration in Bezug auf das Follikelvolumen	27
Abbildung 12:	Korrelation Progesteronkonzentration zu Follikelvolumen.....	28
Abbildung 13:	Verhältnis Progesteron zu hCG Konzentration.....	29
Abbildung 14:	Verhältnis freies zu gesamt VEGF-A.....	30
Abbildung 15:	Korrelation gesamt VEGF-A zum Volumen	31
Abbildung 16:	Verhältnis freies VEGF-A zum Volumen	32
Abbildung 17:	Ratio des freien/gesamt VEGF in Bezug zum Volumen	33
Abbildung 18:	LDH Konzentration in Bezug auf das Follikelvolumen.....	34
Abbildung 19:	Korrelation zwischen LDH und hCG Konzentration.....	35
Abbildung 20:	LDH Konzentration bei den Z-Scores bzw. nicht fertilisierbaren Oozyten.....	36
Abbildung 21:	Östradiolkonzentrationen der Z-Scores bzw. nicht fertilisierbaren Oozyten.....	37
Abbildung 22:	Morphologisch reife Oozyten: Volumen der Z-Scores bzw. nicht fertilisierbaren Oozyten	38

7 Abkürzungen

AT	Asthenno-Teratozoospermie
BCA	Bichinon-Säure
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
E2	Östradiol
EschG	Embryonenschutzgesetz
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
hCG	humane Choriongonadotropin
hFF	humane Follikelflüssigkeit
hMG	humane Menopausengonadotropin
I.E.	internationale Einheiten
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IGF-2	Insulin-like-Growth-Factor 2
IVF	in vitro Fertilisation
kDa	kilo Dalton
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
OAT	Oligo-Asthenno-Teratozoospermie
OHSS	Überstimulationssyndrom
sFit	soluble VEGF-A Rezeptor
TESE	testikuläre Spermienextraktion
VEGF	vascular endothelial growth factor

8 Lebenslauf

Name	Winkelmann
Vorname	Daniel
Geburtsdatum	30.11.1978
Geburtsort	Lüdinghausen

Schulbildung

Grundschule	Ludgerischule, katholische Gundschule Lüdinghausen August 1985 - Juni 1989
Gymnasium	Privates Gymnasium Canisianum Lüdinghausen August 1989 - Juni 1998

Grundwehrdienst September 1998 - Juni 1999 in Dülmen

Studium der Humanmedizin

Westfälische Wilhelms Universität Münster
von Oktober 1999 bis November 2005

Physikum	Herbst 2001
1. Staatsexamen	Herbst 2002
2. Staatsexamen	Herbst 2004
PJ (UK Münster)	Radiologie Chirurgie Innere Medizin
3. Staatsexamen	Herbst 2005

Berufspraxis seit 2006
Radiologischer Weiterbildungsassistenzarzt am
Clemenshospital Münster

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. L. Kiesel und Herrn PD. Dr. med. R. Greb möchte ich für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen sowie wie für die Unterstützung und Betreuung recht herzlich danken.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. med. S. von Otte, Herrn Dr. rer. nat. J. Paletta und den Mitarbeitern des Endokrinologischen Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Münster für die vielseitige Unterstützung und gute Betreuung.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei den Mitarbeitern der Kinderwunschsprechstunde, den Biologinnen des IVF Bereichs, dem Zentrallaboratorium des UKM und Herrn PD Dr. rer. medic. R. - J. Fischer aus dem Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik bedanken.