

Gynäkologische Endokrinologie
2006 · 4:205–210
DOI 10.1007/s10304-006-0162-9
Online publiziert: 26. Oktober 2006
© Springer Medizin Verlag 2006

Redaktion

M. von Wolff, Heidelberg
K. Diedrich, Lübeck

M. Montag¹ · V. Isachenko¹ · E. Isachenko¹ · M. von Wolff² · S. von Otte³ ·
A. Schultze-Mosgau³ · S. Al-Hasani³

¹ Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin,
Universitätsklinikum Bonn

² Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen,
Universitätsfrauenklinik Heidelberg

³ Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Lübeck

Generierung und Konservierung von Keimzellen

Von der In-vitro-Maturation bis zur Oozytenvitrifikation

Die Generierung und Kryokonservierung von Eizellen ist eine relativ neue Therapieoption der assistierten Reproduktion. Obwohl Edwards bereits 1965 von der spontanen Reifung unreifer Eizellen in vitro berichtete, wurde dieser Ansatz durch die Etablierung der Ovarstimulation über Gonadotropine zunächst nicht als Routineanwendung weiter verfolgt, da nach Stimulation bedeutend mehr Eizellen zur Verfügung standen. Im Vergleich zu den heute etablierten labortechnischen Möglichkeiten war damals die assistierte Reproduktion weniger effektiv.

Verbesserte Kulturmedien, striktere Laborbedingungen und immer bessere Beurteilungskriterien bezüglich der Qualität von Eizellen und Embryonen haben dazu geführt, dass weltweit über eine Reduktion der hochdosierten Gonadotropinstimulation nachgedacht wird. Eine optimierte Behandlung besteht in der Gewinnung qualitativ guter Eizellen, von denen dann letztlich nur ein Embryo mit dem höchsten Implantationspotenzial transferriert wird. Die Weiterentwicklung der In-vitro-Maturation, die Möglichkeiten zur Beurteilung von in vitro gereiften Eizellen und insbesondere die realistische Option der Kryokonservierung von reifen, aber noch nicht befruchteten Eizellen, lassen auch für die In-vitro-Maturation neue Einsatzgebiete erkennen.

Der Stellenwert der In-vitro-Maturation und Kryokonservierung von Keimzellen soll in diesem Artikel dargestellt werden.

Reifung von Eizellen in vitro

Unter In-vitro-Maturation (IVM) versteht man die Reifung unreifer Eizellen vom Germinalvesikelstadium zur reifen Metaphase-II-Eizelle in vitro. Die unreifen Eizellen werden aus kleinen, antralen Follikeln des Ovars der Größe 5–12 mm gewonnen. Zu Beginn des Zyklus wird ein Basisultraschall durchgeführt und am Tag 3 sollten mindesten 5 antrale Follikel der Größe 2–5 mm und keine Zyste >20 mm vorhanden sein. Ebenso ist der endokrine Status hinsichtlich einer Fortführung des IVM-Zyklus von Bedeutung. Ob danach ein FSH-Priming über 3 oder mehr Tage von Vorteil ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [3, 6, 18, 31], und eine allgemeingültige Empfehlung kann hier nicht ausgesprochen werden. Ebenso besteht keine einhellige Meinung bezüglich der Notwendigkeit, den Zeitpunkt der Punktion in Abhängigkeit von der Größe des Leitfollikels (10–14 mm) festzulegen [7, 16, 17] und ob ein hCG-Priming 36 h vor Punktion erforderlich ist [6, 18]. Die Punktion selbst erfordert ein hoch auflösendes Ultraschallgerät, spezielle Aspirationssysteme und einen reduzierten Aspirationsdruck (80–100 mm Hg; **Abb. 1**).

Von besonderer Bedeutung ist eine optimale Vorbereitung des Endometriums,

und bei einer Endometriumhöhe von unter 5–6 mm sollte die Kryokonservierung der gewonnenen Eizellen/Vorkernstadien/Embryonen für einen Transfer in einem Folgezyklus nach optimaler Endometriumsvorbereitung durchgeführt werden.

► Temperaturschwankungen beeinflussen den Erfolg der IVM

Für die Identifikation der Eizellen in den granulosazellhaltigen und meist blutigen Aspiraten können spezielle Filter eingesetzt werden, die die Eizellen zurückhalten und die Isolation beschleunigen. Ein bedeutender Faktor bei der IVM ist die Gewährleistung einer möglichst gleich bleibenden Temperatur während der Punktion und den nachfolgenden Isolationsschritten. Größere Temperaturschwankungen scheinen einen direkten negativen Einfluss auf den Erfolg eines IVM-Programms zu haben. Die eigentliche Reifung der gewonnenen Eizellen erfolgt während der Inkubation in speziellen Kulturmedien mit verschiedenen Zusätzen [1, 3, 16, 19, 26] und dauert in der Regel 24–36 h, wobei Abweichungen nach oben durchaus zu beobachten sind (**Abb. 2**). Da die einzelnen Zellen unterschiedlich lange für das Erreichen des Metaphase-II-Stadiums benötigen, können unter Umständen eine regelmäßige Kontrolle und ein an diese Zeitintervalle adaptiertes Spermienmikroinjektionsschema der jeweils reifen Eizellen erforderlich sein.



Abb. 1 ◀ Ultraschongraphische Darstellung eines Ovars nach FSH-Priming am Tag 8 mit kleinen Follikeln vor Punktion und anschließender IVM

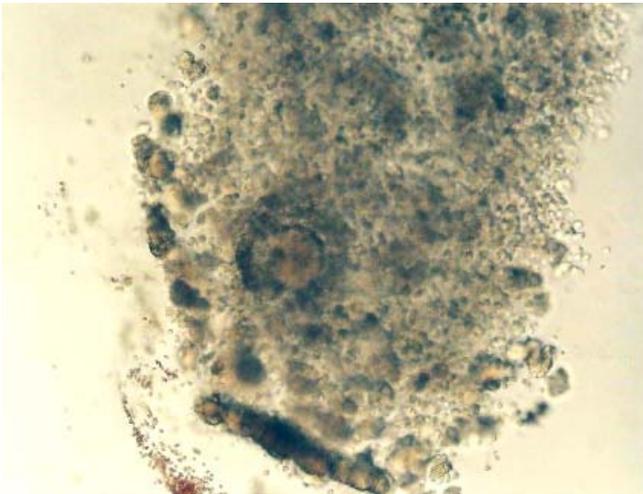


Abb. 2 ◀ Mikroskopische Aufnahme einer kumulumschlossenen, unreifen Eizelle nach Punktion und vor Beginn der IVM

Die Schwangerschaftsraten nach IVM bewegen sich international zwischen einigen wenigen Prozent und >27% und sind wegen der zum Teil großen Anzahl an transferierten Embryonen nicht aussagekräftig [4, 6, 16, 17]. Generell kann die IVM derzeit noch nicht an den Schwangerschaftsraten der konventionellen Gonadotropinstimulation gemessen werden. Weltweit wurden nach IVM nahezu 500 Kinder geboren. Die oftmals diskutierten Risiken der IVM (Stichwort „imprinting“), können letztlich nur durch ein enges Follow-up der geborenen Kinder evaluiert werden.

Eine detaillierte Beschreibung der methodischen Anforderungen der IVM findet sich bei von Wolff et al. [29] und von Otte et al. [28].

Traditionelle Einsatzgebiete der IVM

Eines der ersten Einsatzgebiete der IVM war die Gewinnung unreifer Eizellen bei Patientinnen mit polyzystischen Ovarien

(PCO), bei denen in der Regel eine hormonelle Therapie mit einem stark erhöhten Überstimulationsrisiko verbunden ist [2]. Die erste Geburt wurde 1996 von der Gruppe um Alan Trounson berichtet [27]. Ein Erfahrungsbericht über die Anwendung von IVM vs. konventioneller IVF bei PCO-Patientinnen wurde von Child und Mitautoren 2002 veröffentlicht [8]. Es wurde gezeigt, dass IVM trotz niedrigerer Implantationsraten zu vergleichbaren Schwangerschaftsraten führte und weniger Patientinnen eine Überstimulation aufwies als in der IVF-Gruppe.

In Hinblick auf die bereits eingangs erwähnte Diskussion über mögliche Risiken einer hochdosierten Gonadotropinstimulation [15], war es nahe liegend, die IVM auch bei Frauen mit unauffälligen Zyklen im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung anzuwenden. Die hierzu vorliegenden Veröffentlichungen wurden alle mit relativ kleinen Fallzahlen durchgeführt. Letztlich fehlt zu diesem Thema international eine randomisierte Studie. In Hinblick auf die noch nicht vollständig

evaluierten möglichen Risiken der IVM („imprinting“) und der immer noch niedrigeren Schwangerschaftsrate ist es fraglich, ob eine solche Studie bei den Patientinnen Akzeptanz finden würde. Daher kann eine endgültige Bewertung der IVM als Alternative zur konventionellen Stimulation bei normal zyklischen Frauen derzeit nicht getroffen werden.

Kryokonservierung von unreifen Eizellen – Vitrifikation vs. langsames Einfrieren

Generell ist die Kryokonservierung von Spermatozoen, Eizellen im Vorkernstadium, Embryonen sowie Hodengewebe ein integraler Bestandteil der assistierten Reproduktion. Die hierbei gebräuchlichste Methode ist das langsame Einfrieren. Beim langsamen Einfrieren werden die Zellen stufenweise mit relativ niedrig konzentrierten Kryoprotektoren versetzt. Spezielle Kryomedien sind seit kurzem auch für Eizellen kommerziell erhältlich. Der Einfriervorgang erfolgt immer unter Zuhilfenahme eines Einfriergerätes, welches die erforderlichen konstanten Abkühlraten regeltechnisch ausführen kann.

Dem etablierten Verfahren der langsamen Kryokonservierung wird zunehmend die Vitrifikation zur Seite gestellt.

Bei der Vitrifikation werden die Zellen aus einem flüssigen Zustand direkt in einen amorphen, vitrifizierten Zustand überführt. Im Unterschied zu dem langsamen Einfrierverfahren wird die Bildung von Eiskristallen unterbunden.

Die zunehmende Diskussion über den Einsatz der In-vitro-Maturation sowie restriktive gesetzliche Rahmenbedingungen (z. B. in Italien) hat das Interesse an der Kryokonservierung von unbefruchteten reifen als auch unreifen Eizellen geweckt.

Das Einfrieren von Eizellen im GV-Stadium (Germinalvesikel) wurde bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht und basiert im Wesentlichen auf langsamen Kryoprotokollen [9, 30]. Untersuchungen der Bonner Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die Vitrifikation für GV-Stadien durchaus erfolgreich möglich ist, wenn durch die

chemische Zusammensetzung des Vitrifikationsmediums das Risiko einer parthenogenetischen Aktivierung dieser frühen Stadien zuverlässig verhindert wird [12]. Die bereits erzielten Überlebensraten und anschließenden Maturationsraten zu befruchtungsfähigen Metaphase-II-Eizellen lassen künftig neue Ansätze der Vitrifikation in diesem Bereich erwarten.

— Wahrscheinlich hat die unterschiedliche Organisation der Chromosomen im GV-Stadium im Vergleich zu Metaphase-II-Eizellen Auswirkungen auf die Einfrier-/Auftau-Verträglichkeit.

Entsprechende Untersuchungen werden zurzeit in unserem eigenen Labor durchgeführt.

Die Kryokonservierung von Metaphase-II-Eizellen mit verschiedenen langsamen Einfriermethoden wurde in den vergangenen Jahren insbesondere von der Arbeitsgruppe um Porcu evaluiert [24]. Auf Basis dieser Publikationen arbeiten inzwischen insbesondere italienische Arbeitsgruppen, jedoch mit unterschiedlichen Erfolgen, an der Optimierung der Kryokonservierung von Metaphase-II-Eizellen. Ein wesentliches Problem der langsamen Einfrierprotokolle ist die Überlebensrate von Metaphase-II-Eizellen, die bestenfalls bei 60–70% liegt [5, 20]. Im Vergleich dazu können mit der Vitrifikation und einem aseptischen Vitrifikationsprotokoll Überlebensraten von über 90% erreicht werden (unveröffentlichte eigene Ergebnisse; [13]). Da die Befruchtungsrate der Eizellen nach Kryokonservierung in beiden Methoden nicht unterschiedlich zu sein scheint, würde sich letztlich für die Vitrifikation eine bedeutend höhere Effizienz im Vergleich zu der langsamen Kryokonservierung ergeben. Da die Datenlage für das langsame Einfrieren bedeutend größer ist als für die Vitrifikation, muss diese Aussage derzeit als vorläufig angesehen werden. Zukünftige Studien werden die Vor- und Nachteile des jeweiligen Verfahrens aufdecken.

In Hinblick auf die Umsetzung der Geberichtlinie der Europäischen Union muss bei der Verarbeitung von menschlichen Zellen und Geweben jegliche Gefahr einer Kontamination mit pathogenen Keimen, Viren oder anderweitig schädigenden

Gynäkologische Endokrinologie 2006 · 4:205–210 DOI 10.1007/s10304-006-0162-9
© Springer Medizin Verlag 2006

M. Montag · V. Isachenko · E. Isachenko · M. von Wolff · S. von Otte · A. Schultze-Mosgau · S. Al-Hasani

Generierung und Konservierung von Keimzellen. Von der In-vitro-Maturation bis zur Oozytvitrifikation

Zusammenfassung

Die In-vitro-Maturation (IVM) ist eine Technik, welche die Reifung von Eizellen im Germinalvesikelstadium bis hin zur befruchtungsfähigen Metaphase-II-Eizelle beinhaltet. Die Eizellen werden in der Regel gezielt aus kleinen antralen Follikeln gewonnen. Der Erfolg nach 24- bis 36-stündiger Maturation wird derzeit mit der Bildung des 1. Polkörpers als Anzeichen für eine abgeschlossene erste meiotische Reifeteilung belegt. Die Qualität einer in vitro gereiften Eizelle kann durch ein neuartiges polarisationsmikroskopisches Verfahren noch besser eingeschätzt werden. Dieses

Verfahren ermöglicht eine deutlich bessere Beurteilung und ist somit ein einzigartiges Instrument, um bestehende IVM-Protokolle zu optimieren. Zusammen mit der inzwischen realistischen Option der erfolgreichen Kryokonservierung von unreifen und reifen Eizellen durch die Vitrifikation eröffnen sich künftig für die IVM neue Einsatzgebiete.

Schlüsselwörter

In-vitro-Maturation · Vitrifikation · Kryokonservierung · Oocyte · Zona pellucida · Lichtbrechung

Generation and conservation of stem cells. From in vitro maturation to vitrification of oocytes

Abstract

In vitro maturation (IVM) is a technique which allows the maturation of oocytes from the germinal vesicle stage up to the stage of the fertilization-competent metaphase-II oocytes. Immature oocytes are primarily retrieved from small antral follicles. Their successful maturation is usually documented by formation of the first polar body as an indicator of completion of the first meiotic division. The quality of in vitro matured oocytes can now be judged by polarisation microscopy. This technique allows better quality as-

essment and is hence a unique instrument for optimising existing IVM protocols. In combination with the now realistic option of successful cryopreservation of mature and immature oocytes by the technique of vitrification, IVM will soon enter new fields of application.

Keywords

Cryopreservation · In vitro maturation · Oocyte · Vitrification · Zona retardance

Tab. 1 Ergebnisse nach Transfer von Embryonen aus Eizellen mit niedriger vs. hoher Zona-Lichtbrechung

	Gruppe 1	Gruppe 2	Statistik
	Niedrige Zona-Lichtbrechung	Hohe Zona-Lichtbrechung	
Patienten	41	16	
Mittleres Alter	34,9	34,1	n.s.
Transferierte Embryonen	2,0	2,0	n.s.
8-Zeller Grad A am Tag 3	28%	39%	p<0,05
Implantationsrate	13,4%	31,3%	p<0,01
Klinische Schwangerschaftsrate	26,8%	56,3%	p<0,01

Substanzen und Stoffen ausgeschlossen werden. Da eine solche Kontamination sowohl beim Einfrieren als auch bei der anschließenden Lagerung in Stickstoff erfolgen kann, sind künftig an den Einfriervorgang und die Probenbehälter entsprechende Sicherheitsanforderungen zu stellen.

➤ Mit einer neuen Straw-Technik werden Abkühlraten bis zu $-2000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erreicht

Dies gilt insbesondere für die Vitrifikation und hier werden künftig Techniken bzw. Materialien, die ein potenzielles Kontaminationsrisiko besitzen, nicht mehr eingesetzt werden können. Ein Ausweg aus dieser Situation bietet der Einsatz einer aseptischen Technik der Vitrifikation. In der Bonner Arbeitsgruppe wurde eine Technik entwickelt, die mit unterschiedlichen Straws eine aseptische Vitrifikation garantiert [10, 11]. Das Prinzip beruht darauf, dass der mit dem biologischen Objekt beladene so genannte „open pulled straw“ in einen äußeren Straw eingebracht wird, der mit Ultraschall hermetisch verschlossen werden kann. Wird dieses Konstrukt in flüssigen Stickstoff eingetaucht, werden Abkühlraten bis zu $-2000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erreicht, die ausreichend sind um den vitrifizierten Zustand herzustellen. Diese Technik wurde inzwischen derart weiterentwickelt, dass auch normale Straws als Träger verwendet werden können, die ebenfalls in einen äußeren, hermetisch verschließbaren „Container-Straw“ eingebracht werden [11]. Beide Methoden werden sowohl in unserem Labor als auch in anderen, international renommierten Einrichtungen bereits mit Erfolg routinemäßig eingesetzt.

Insgesamt haben diese neueren Entwicklungen mit dazu beigetragen, dass in fast jedem reproduktionsbiologischen und

–medizinischen Labor nach einer entsprechenden Lernphase die Vitrifikation in das bereits vorhandene Spektrum der Labortechniken integriert werden kann.

Insbesondere bei der In-vitro-Maturation ist die Vitrifikation eine sinnvolle Ergänzung um das ganze Potenzial dieser Therapieoption auszuschöpfen.

Neue Einsatzmöglichkeiten der IVM

Im Anschluss an eine erfolgreiche IVM werden die Eizellen in der Regel immer sofort durch die Spermienmikroinjektion fertilisiert. Nachdem die Kryokonservierung von Eizellen zunehmend erfolgreich durchgeführt werden kann, stehen nach erfolgter IVM neue Therapieoptionen zur Verfügung, die mit einer späteren Verwendung der gereiften und danach kryokonservierten Eizellen einhergehen.

Insbesondere bei onkologischen Patientinnen dürfte ein solches Konzept zur Fertilitätsprotektion von besonderem Interesse sein. Vor geplanter Chemotherapie oder Bestrahlung stehen diesen Frauen nur wenige Optionen offen, um in Hinblick auf eine mögliche Schädigung der Ovarien für die Erfüllung eines späteren Kinderwunschs vorbeugend aktiv zu werden. Eine konventionelle Stimulation mit nachfolgender In-vitro-Fertilisation ist oftmals nicht möglich, da entweder die zur Verfügung stehende Zeit für eine Stimulation zu kurz ist, möglicherweise die zur Stimulation verwendeten Gonadotropine bei einem rezeptorpositiven Tumor nicht verwendet werden können oder insbesondere die junge Frau noch nicht den Lebenspartner gefunden hat. In der Regel wird diesen Frauen die Entnahme von Ovarialgewebe mit anschließender Kryokonservierung empfohlen, wobei gleichzeitig darauf hingewie-

sen werden muss, dass diese Vorgehensweise trotz einiger Kasuistiken keine etablierte Routinemethode ist. Eine Abschätzung der individuellen Chancen auf eine spätere Schwangerschaft nach Ovar Replantation ist derzeit nicht möglich.

➤ Die Kryokonservierung ermöglicht eine Lifestyle-basierte Fertilitätsprophylaxe

Als zusätzliche Maßnahme zur Fertilitätsprotektion bietet sich die kurzfristig initiierte Punktion antraler Follikel mit anschließender IVM und Kryokonservierung der reifen Metaphase-II-Eizellen an. Dieses 2-stufige Vorgehen wurde von der Heidelberger Arbeitsgruppe initiiert und ist eine Empfehlung des FertiPROTEKT Netzwerks zum Fertilitätserhalt bei onkologischen Patientinnen. Neben einem etablierten IVM-Programm ist die Beherrschung der Vitrifikation eine Grundvoraussetzung für ein solches Vorgehen.

Ein weiteres Einsatzgebiet könnte sich im Zusammenhang mit der Lifestyle-basierten Fertilitätsprophylaxe junger Frauen ergeben, die in jungen Jahren Eizellen kryokonservieren möchten, um diese bei Bedarf in älteren Jahren für eine Realisierung ihres Kinderwunsches zu verwenden. Bislang wird bei solchen Frauen eine hormonelle Stimulation durchgeführt, doch wäre auch hier prinzipiell die Vorgehensweise über eine Punktion antraler Follikel im unstimulierten Zyklus mit nachfolgender IVM und Kryokonservierung vorstellbar und möglicherweise kosteneffektiver.

Neue Möglichkeiten bei der Beurteilung in vitro gereifter Eizellen

Derzeit wird eine erfolgreiche IVM durch die Bildung des ersten Polkörpers nachgewiesen. Dies wird allgemein als Zeichen für eine abgeschlossene Reifeteilung bewertet, und die dann vorhandene Eizelle wird als befruchtungskompetente Metaphase-II-Eizelle angesehen. In der Bonner Arbeitsgruppe konnte kürzlich mit einem polarisationsmikroskopischen Verfahren gezeigt werden, dass sich nach herkömmlicher Stimulation nur ca. 80–90% der als reife Metaphase-II-eingestuften Eizellen auch wirklich in diesem Stadium

befanden [21]. Die restlichen Eizellen hatten trotz des vorhandenen ersten Polkörpers noch keine Spindel ausgebildet und befanden sich in der Telophase der ersten meiotischen Reifeteilung. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass insbesondere Eizellen ohne Spindel schlechtere Befruchtungsraten zeigen.

Da die IVM in der Regel in den Laborablauf eingegliedert ist, wird in den meisten Laboratorien der Polkörpercheck in definierten Zeitintervallen durchgeführt und die Eizellen entsprechend injiziert. Die unterstützte Beobachtung durch die polarisationsmikroskopische Spindeldarstellung kann vermutlich die Effizienz der IVM erhöhen, da die abgeschlossene Maturation mit Bildung der Metaphase-II-Spindel kontrolliert werden kann und damit der richtige Zeitpunkt für die Injektion besser zu bestimmen ist.

Die Lichtbrechung der Zona pellucida ist ein Qualitätsmerkmal der Eizelle

Mit demselben polarisationsmikroskopischen Verfahren, welches zur Spindeldarstellung eingesetzt wird, können noch weitere Qualitätsmerkmale einer Eizelle erfasst werden. Keefe und Autoren zeigten als erste, dass unter polarisationsmikroskopischer Betrachtung die Zona pellucida von Hamstereizellen eine multilaminäre Struktur aufweist [14]. Ein vergleichbarer Aufbau wurde auch bei menschlichen Eizellen beobachtet [23]. Charakteristisch ist ein struktureller Aufbau, der sich aus drei Schichten mit unterschiedlich starker Lichtbrechung ergibt, wobei die innerste Schicht in der Regel immer die höchste Lichtbrechung aufweist (Abb. 3a, b). Weitere Untersuchungen belegten, dass die innere Schicht der menschlichen Zonae sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrer Homogenität in verschiedenen Eizellen sehr variabel sein kann [25]. In derselben Publikation konnte diese Arbeitsgruppe in einer retrospektiven Studie zeigen, dass Behandlungszyklen, bei denen Embryonen von Eizellen mit einer hohen Zona-Lichtbrechung der inneren Schicht zurückgesetzt wurden, im Vergleich zu solchen mit geringer Lichtbrechung (Abb. 3c, d) eine signifikant höhere Schwangerschaftsrate aufzeigten.

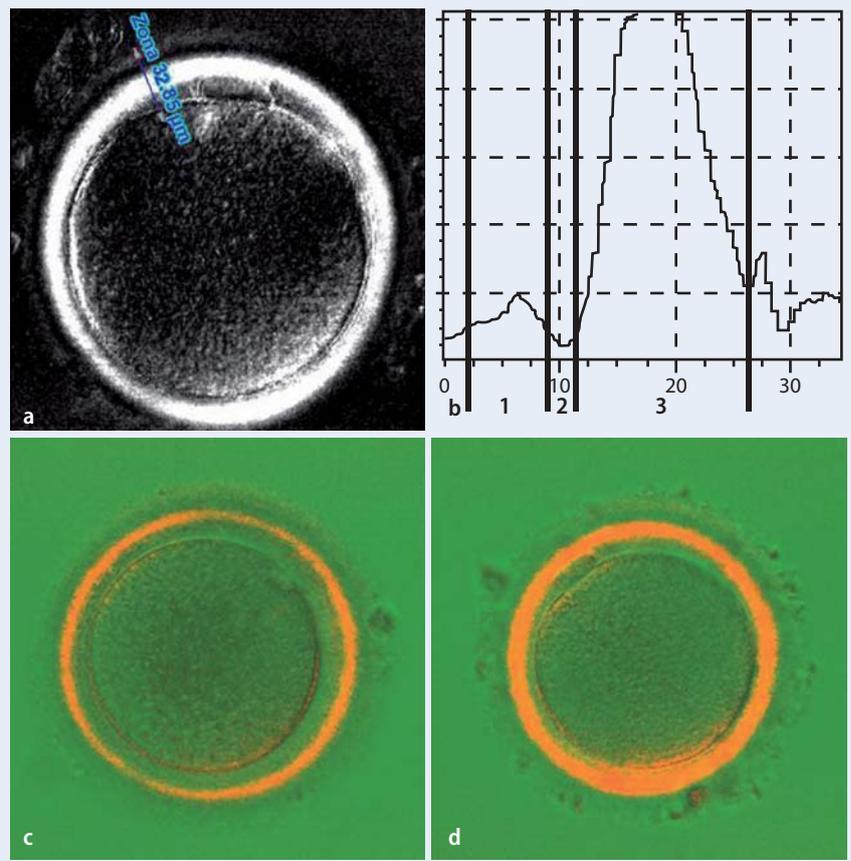


Abb. 3 a Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer Eizelle mit den verschiedenen Zonalayern (Octax ICSI Guard™, MTG, Altdorf). Die Markierungslinie kennzeichnet das Messfenster für die Intensitätsmessungen. b Die äußere (1), mittlere (2) und innere (3) Zonenschicht. Eizelle mit einer schlechten (c) und guten (d) Lichtbrechungsintensität der inneren Zonenschicht. Aufgrund der Autokalibrationsfunktion des darstellenden Systems können die unterschiedlichen Qualitätszuordnungen der Eizellen auch ohne aufwändige Messung visuell durchgeführt werden

Diese Ergebnisse wurden von der Bonner Arbeitsgruppe in einer prospektiven Studie bestätigt (Tab. 1) [22]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass optimale Eizellen, d. h. solche mit einer hohen Lichtbrechung der inneren Schicht, am Tag 3 zu einer signifikant höheren Rate an optimalen Embryonen (8-Zeller, Grad A) führen.

Obwohl der biochemische und zellbiologische Hintergrund der lichtbrechenden Eigenschaften der Zona pellucida noch ungeklärt ist, eignet sich diese Struktur als Beurteilungskriterium für die Qualität von Eizellen. Nimmt man dies als zusätzliche Qualitätsüberprüfung einer IVM, so können damit bestehende Protokolle zur in vitro Maturation validiert und gegebenenfalls weiter optimiert werden.

Fazit für die Praxis

Die IVM kann derzeit noch nicht als Routineverfahren betrachtet werden. Insbe-

sondere die gegenüber herkömmlichen Stimulationsschemata niedrigeren Schwangerschaftsraten belegen, dass die IVM noch optimiert werden muss. Die Beurteilung der Zona-Intensität könnte sich als ein bedeutender Qualitätsparameter bei der IVM etablieren und möglicherweise auch eine bessere Einschätzung des Potenzials der IVM bei den verschiedenen Patientengruppen bzw. Indikationen erlauben. Für die Fertilitätsprotektion bei jungen, onkologischen Patientinnen sollte die IVM mit anschließender Kryokonservierung der gereiften Eizellen durch Vitrifikation in den Katalog der optionalen Möglichkeiten aufgenommen werden, da die derzeit angebotenen anderweitigen Therapien ebenfalls keine ausreichende Garantie auf die Erfüllung eines späteren Kinderwunsches bieten können.

Hier steht eine Anzeige.



Korrespondierender Autor

Dr. M. Montag

Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie
und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum
Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn
Markus.Montag@ukb.uni-bonn.de

Interessenkonflikt. Keine Angaben

Literatur

1. Barnes FL, Kausche A, Tiglias J (1996) Production of embryos from in-vitro matured primary human oocytes. *Fertil Steril* 65: 1151–1156
2. Beerendonk CCM, van Dop PA, Braat DDM, Merkus JWMM (1998) Ovarian hyperstimulation syndrome: facts and fallacies. *Obstet Gynecol Survey* 53: 439–449
3. Cha KY, Chian RC (1998) Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 4: 103–120
4. Cha KY, Han SY, Chung HM et al. (2000) Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 73: 978–983
5. Cha KY, Yoon TK, Kim T, Chung HM (2004) Vitrification of human oocytes. In: Gardner DK, Weissmann A, Howles CM, Shoham Z (eds) *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, 2nd edn. Taylor & Francis, London New York, pp 257–266
6. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL (2000) Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 15: 165–170
7. Chian RC, Buckett WM, Jalil AKH et al. (2004) Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertil Steril* 82: 1676–1678
8. Child T, Phillips S, Abdul-Jalil A et al. (2002) A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization in women with PCOS. *Hum Reprod* 15: 165–170
9. Chung HM, Hong SW, Lim JM et al. (2000) In vitro blastocysts formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 73: 545–551
10. Isachenko V, Montag M, Isachenko E et al. (2005) Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum Reprod* 20: 492–496
11. Isachenko V, Isachenko E, Montag M et al. (2005) Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reprod Biomedicine Online* 10: 350–354
12. Isachenko V, Montag M, Isachenko E et al. (2006) Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril* 85: 741–747
13. Katayama KP, Stele J, Kuwayama M et al. (2003) High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 80: 223–224
14. Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R (1997) Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod* 12: 1250–1252
15. Lerner-Geva L, Geva E, Lessing JB et al. (2003) The possible association between in vitro fertilization treatments and cancer development. *Int J Gynecol Cancer* 13: 23–27
16. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S (2000) Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy in in-vitro oocyte maturation. *Hum Reprod* 15: 1685–1690
17. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S (2000) Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum Reprod* 15 [Suppl 5]: 11–17
18. Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, Lindenberg S (2001) Maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *Reprod BioMedicine Online* 3: 112–116
19. Mikkelsen AL, Lindenberg S (2001) Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 122: 587–592
20. Montag M, van der Ven K, Dorn C et al. (2006) Birth following double cryopreservation of human oocytes at metaphase II and pronuclear stages. *Fertil Steril* 85: 751.e5–751.e7
21. Montag M, Schimming T, van der Ven H (2006) Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod BioMedicine Online* 12: 442–446
22. Montag M, Schimming T, Gassner P, van der Ven H (2006) Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential. *Hum Reprod* 21 [Suppl 1]: 67
23. Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR (2004) Noninvasive polarized light microscopy distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertile Steril* 81 [Suppl 1]: 850–856
24. Porcu E, Fabbri R, Damiano G et al. (2000) Clinical experience and application of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 169: 33–37
25. Shen Y, Staf T, Mehnert C et al. (2005) High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod* 20: 1596–1606
26. Suikkari AM, Tilppala M, Tuuri T et al. (2000) Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod* 15: 747–751
27. Trounson A, Wood C, Kaunsche A (1994) In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 62: 353–362
28. Von Otte S, Schöpfer B, Schultze-Mosgau A et al. (2005) In vitro Reifung von Oozyten. Eine neue Therapieoption der assistierten Reproduktion. *Gynäkol Endokrinol* 3: 238–244
29. Von Wolff M, Eberhardt I, Strowitzki T (2006) In vitro Maturation – Indikationen, Risiken und Chancen einer neuen assistierten Reproduktionstechnik. *Zentralbl Gynakol* 128: 1–9
30. Wu J, Zhang L, Wang X (2001) In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 121: 389–393
31. Wynn P, Picton HM, Krapez JA et al. (1998) Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod* 13: 3132–3138