

Aus der
Abteilung für Andrologie
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Schulze)
der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
(Direktorin: Prof. Dr. med. I. Moll)
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

**ICSI-Behandlungen im Vergleich: Kryo-TESE vs. Ejakulat-
Spermatozoen in Abhängigkeit von der
Spermatozoenmotilität und transferierten Embryonenanzahl**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Bettina Rudolf

aus Rostock

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Material und Methoden	7
2.1	Patienten	7
2.1.1	Kryo-TESE-ICSI-Kollektiv	7
2.1.2	Patientenkollektiv mit ICSI-Zyklen und Ejakulat-Spermatozoen	10
2.2	Statistische Analyse	11
3	Ergebnisse.....	12
3.1	Behandlung mit dem Kryo-TESE-ICSI-Verfahren	12
3.1.1	Patientinnenkollektiv	12
3.1.2	Fertilisationsrate	12
3.1.3	Schwangerschaftsrate	14
3.1.4	Geburtenrate	17
3.1.5	Abortrate	20
3.1.6	Zusammenhang zwischen histologischen Score-Count und Spermatozoenmotilität	22
3.2	ICSI-Behandlung mit Ejakulat-Spermatozoen	24
3.2.1	Patientinnenkollektiv	24
3.2.2	Fertilisationsrate	25
3.2.3	Schwangerschaftsrate	25
3.2.4	Geburtenrate	27
3.2.5	Abortrate	29
4	Diskussion.....	31
4.1	Fertilisationsrate	31
4.2	Schwangerschaftsrate	33
4.2.1	Einfluss der Anzahl transferierter Embryonen	34
4.3	Geburtenrate	37
4.4	Abortrate	39
5	Zusammenfassung	41
6	Literaturverzeichnis	43
7	Glossar	50
	Lebenslauf.....	52
	Erklärung.....	53

1 Einleitung

Auf dem Gebiet der assistierten Reproduktion stellt die Einführung der Intrazytoplasmatischen Spermatozoen-Injektion (ICSI) 1992 durch Palermo *et al.* [1992] einen Meilenstein dar. Durch das direkte Einbringen von jeweils nur einem Spermatozoon in eine Oozyte konnte von dieser Zeit an auch Paaren mit schwerer männlicher Fertilitätsstörung der Wunsch nach einem genetisch eigenen Kind erfüllt werden. Anfänglich wurde ICSI bei schwerer Oligo-Asthenoteratozoospermie eingesetzt. Die Schwangerschaftsraten waren vergleichbar mit denen von Paaren mit guten Spermatozoenparametern, die sich einer konventionellen IVF-Behandlung unterzogen.

Ein weiterer großer methodischer Fortschritt wurde durch die Isolierung von Spermatozoen oder Spermatischen direkt aus dem testikulären Gewebe (Testikuläre Spermatozoen-Extraktion, TESE) erzielt [Redgment *et al.*, 1994; Nagy *et al.*, 1995; Van Steirteghem *et al.*, 1998; Nijs *et al.*, 2000]. TESE gewährt auch bei infertilen Männern mit obstruktiver (OA) oder nicht-obstruktiver Azoospermie (NOA) die Option für eine ICSI-Behandlung der Partnerin. Bei normaler Spermatogenese und Azoospermie sind die Fertilisations- und Schwangerschaftsraten mit denen durch Ejakulat-Spermatozoen erzielten vergleichbar [Nagy *et al.*, 1995; Silber *et al.*, 1995]. Auch mit testikulären Spermatozoen von Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie wurden durch die ICSI-Behandlung akzeptable Fertilisations- und Schwangerschaftsraten erzielt.

Da nicht jeder Behandlungszyklus zu einer Schwangerschaft führt, waren anfänglich wiederholte operative Eingriffe zur Gewinnung von Spermatozoen erforderlich. Durch die Kryokonservierung von gewonnenem Hodengewebe konnte nachfolgend jedoch auf diesen Aufwand verzichtet werden. Bei dem 1997 eingeführten Hamburger Kryo-TESE-Konzept (Kryokonservierung von Hodengewebe und extrahierten testikulären Spermatozoen) erfolgt eine standardisierte Aufarbeitung des gewonnenen Hodenbiopsates nach dem Sandwich-Prinzip [Schulze *et al.*, 1997; Jezek *et al.*, 1998; Schulze *et al.*, 1998], bei dem die Biopsie in drei Schichten von jeweils 4 x 4 x 10 mm unterteilt wird. Eine Hälfte der oberen Schicht wird der histologischen Untersuchung zugeführt, die andere kryokonserviert. Das gesamte Gewebe der mittleren Schicht wird für die

enzymatische Probe-TESE eingesetzt, während das Gewebe der unteren Schicht kryokonserviert wird. Das kryokonservierte Hodengewebe steht für die ICSI-Behandlung zur Verfügung und ermöglicht sowohl eine optimale Planung der Oozytengewinnung und der damit im Zusammenhang stehenden Behandlung bei der Frau als auch die Möglichkeit wiederholter ICSI-Behandlungen für spätere Behandlungszyklen.

Die Behandlung unerfüllten Kinderwunsches bringt für die betroffenen Paare in psychischer, physischer, zeitlicher und finanzieller Hinsicht oft erhebliche Belastungen mit sich. Es ist deshalb erforderlich, im Rahmen der Therapieplanung auch über die individuellen Erfolgsaussichten beider Partner eine klare Aussage treffen zu können. Bei Männern mit Azoospermie ist dies von besonderer Bedeutung, um frustane Behandlungszyklen bei der Frau vermeiden zu können.

Derzeit gibt es jedoch keinen zuverlässigen klinischen oder präoperativen Parameter, der eine Aussage über das Vorkommen von Spermatozoen im Testisgewebe erlaubt. Lediglich der histologische Befund des Testisgewebes ist hier von prädiktiver Bedeutung [Mulhall *et al.*, 1997; Tournaye *et al.*, 1997; Ezeh *et al.*, 1999; Schulze *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2001].

Auch die Spermatozoenpräparation und -selektion kann das ICSI-Ergebnis beeinflussen. Über die optimale Methode zur Gewinnung geeigneter Samenzellen aus dem gewonnenen Hodengewebe ist die Diskussion noch nicht gänzlich abgeschlossen. Neben der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes („mincing“, „shredding“) [Abuzeid *et al.*, 1995; Gil-Salom *et al.*, 1995; Tucker *et al.*, 1995; Verheyen *et al.*, 1995], wird zunehmend die gewebsschonende enzymatische Digestion durch Kollagenase [Salzbrunn *et al.*, 1996; Crabbe *et al.*, 1997; Schulze *et al.*, 1998] angewandt.

Zusätzlich kann durch Einfrier- und Auftauprozesse der Spermatozoen ein signifikanter Verlust an Spermatozoen-Vitalität und -Motilität auftreten [Verheyen *et al.*, 1997], der wiederum das ICSI-Resultat beeinflussen kann.

Weiterhin spielt die Schwere der männlichen Fertilitätsstörung eine entscheidende Rolle. In den Untersuchungen von Vernaeeve *et al.* (2003) zeigte der Vergleich von NOA-Patienten zu OA-Patienten niedrigere Fertilisations- (48,5% vs. 59,7%), Schwangerschafts- (8,6% vs. 12,5%) und Geburtenraten (15,4% vs. 24,0%) auf. Die Autoren führen diese Ergebnisse auf eine erhöhte Aneuploidierate der Spermatozoen

zurück. So mehren sich die Hinweise, dass bei Männern mit schweren testikulären Funktionsstörungen trotz normalen Karyotypes die Spermatozoen eine höhere chromosomale Aneuploidierate aufweisen [Bernardini *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Levron *et al.*, 2001]. In Übereinstimmung hiermit fanden Osmanagaoglu *et al.* (2003) bei OA-Patienten kumulative Geburtenraten nach drei TESE-ICSI-Behandlungen von 48,0% und 31,0% bei NOA-Patienten.

Die in der Literatur mitgeteilten Behandlungsergebnisse bei Verwendung von frischen oder kryokonservierten testikulären Spermatozoen für die ICSI-Methode sind unterschiedlich und basieren oft nur auf kleinen Fallzahlen. Die Charakterisierung der Patienten ist in den meisten Studien wenig aussagekräftig, da diese oft nur auf klinischen Parametern ohne histologische Diagnose des Hodenparenchyms basiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Fragen nachzugehen, ob ein Zusammenhang zwischen Spermatozoenmotilität einerseits und Fertilisationsrate, Schwangerschafts-, Geburten- und Abortrate andererseits vorhanden ist und welchen Einfluss dabei die Anzahl der transferierten Embryonen auf die Schwangerschafts-, Geburten- und Abortrate besitzt. Dabei werden die ICSI-Behandlungen sowohl mit kryokonservierten testikulären Spermatozoen als auch mit frischen Ejakulat-Spermatozoen betrachtet. Da der Behandlungserfolg entscheidend von der Oozytenqualität mitbestimmt wird, die mit zunehmendem Alter abnimmt [Bartmann *et al.*, 2004; Pellestor 2004], wird auch der Einfluss des Lebensalters der Frauen in den Untersuchungen berücksichtigt. Darüber hinaus wird der Einfluss des histologischen Befundes der entnommenen Hodengewebprobe auf das Behandlungsergebnis untersucht, da hierzu in der Literatur keine detaillierten Angaben vorliegen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Als Grundlage der Untersuchungen dienten Daten von insgesamt 1802 Patientenpaaren, bei denen wegen einer andrologisch bedingten Sterilität im Zeitraum von 1996 bis 2001 Methoden der assistierten Reproduktion zum Einsatz kamen. Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit zwischen der Abteilung für Andrologie an dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) und dem Fertility Center Hamburg (FCH).

Verglichen wurden die Resultate von 788 ICSI-Behandlungszyklen unter Verwendung kryokonservierter testikulärer Spermatozoen (Kryo-TESE) mit denen von 1014 konventionellen ICSI-Zyklen, bei denen die mikroinjizierten Spermatozoen dem Ejakulat des männlichen Partners entstammten. Untersucht wurden die Fertilisations-, die Schwangerschafts-, die Geburten- und Abortraten in Abhängigkeit von der Spermatozoenmotilität. Außerdem wurde der Einfluss der Anzahl der transferierten Embryonen auf die Schwangerschafts-, die Geburten- und Abortraten erfasst. Im Folgenden werden die beiden Patientenkollektive sowie die zu deren Behandlung eingesetzten Methoden kurz dargestellt.

2.1.1 Kryo-TESE-ICSI-Kollektiv

In dieses Kollektiv wurden 788 Paare aufgenommen, bei denen andrologischerseits durch vorausgegangene Ejakulatanalysen entweder eine Azoospermie oder eine dermaßen niedrige Anzahl von Spermatozoen nachgewiesen wurde, dass ein hohes Risiko für ein Ausbleiben der Fertilisation durch ICSI-Behandlung gegeben war. Aus diesem Grunde wurden in der Abteilung für Andrologie am UKE Hodenbiopsien entsprechend dem Hamburger TESE-Konzept [Salzbrunn *et al.*, 1996] aufgearbeitet. Mit dem so gewonnenen kryokonservierten Material erfolgte anschließend die weitere Behandlung im FCH.

Nach vorangegangener hormoneller Stimulation der Follikel und Gewinnung von Oozyten durch Follikelpunktion bzw. nach Isolation von Spermatozoen aus dem TESE-Material (siehe: Protokoll von [Baukloh *et al.*, 1998]) kam die ICSI-Behandlung zur Anwendung. Nach erfolgter Fertilisation wurden die Embryonen (maximal drei

Embryonen lt. Embryonenschutzgesetz, ESG) bis zum intrauterinen Transfer, der im Allgemeinen drei bis fünf Tage nach der Oozytengewinnung stattfand, weiter kultiviert. 12 bis 14 Tage nach Transfer der Embryonen erfolgte die erste Blutentnahme zur Bestimmung des schwangerschaftsspezifischen Hormons HCG. Bei positivem Ausfall wurde die nächste Kontrolle nach zwei weiteren Tagen durchgeführt. Die erste Ultraschalluntersuchung zur Beurteilung der Schwangerschaft fand am Ende der 4. bzw. Anfang der 5. Schwangerschaftswoche *post conceptionem* statt.

In Abhängigkeit vom Lebensalter der Patientinnen erfolgte eine Einteilung in die Subkollektive der Frauen < 35 Jahren sowie \geq 35 Jahren. Diese Grenzziehung bei 35 Jahren berücksichtigt die Erkenntnis, dass die Aneuploidierate der Oozyten bei Frauen über 35 Jahren deutlich zunimmt [Bartmann *et al.*, 2004; Pellestor 2004].

Bei den Kryo-TESE-Zyklen erfolgte zudem eine Korrelationsüberprüfung zwischen dem Resultat der Spermatozoenextraktion aus den kryokonservierten Gewebeproben und dem histologischen Bewertungsscore (modifizierter Johnsen-Score) bei begleitend durchgeführter Semidünnschnitt-Histologie [Schulze *et al.*, 1997].

2.1.1.1 Spermatozoenqualität nach Extraktion aus kryokonservierten Hodengewebeproben

Die Aufarbeitung der kryokonservierten Gewebeproben erfolgte im FCH nach dem Protokoll von Baukloh (1998). Diese bestand aus folgenden Schritten:

1. Probe im 37° C -Wasserbad für etwa 3 Minuten auftauen
2. In 1 ml Kulturmedium (MediCult) aufnehmen und vorsichtig zerzupfen
3. Probe für 30 Minuten inkubieren (37 ° C, 5% CO-2)
4. Kollagenase (Sigma Type Ia) hinzufügen in einer Endkonzentration von 400 U/ml
5. 30 Minuten inkubieren, weiter zerzupfen ohne die Tubuli zu zerquetschen; für weitere 60 Minuten mit Kollagenase inkubieren (die Inkubationszeit kann je nach Resultat der postoperativen Test-TESE modifiziert werden, in Extremfällen auch über Nacht)
6. Die verbliebenen Tubuli ausdrücken, Debris mechanisch entfernen
7. Das Sediment resuspendieren, in ein Röhrchen überführen und zentrifugieren (500-800g, 10 Minuten)
8. Den Kollagenase-Überstand entfernen, das Pellet in einem kleinen Volumen Kulturmedium resuspendieren

9. Aliquots der Suspension in Mediumtropfen unter Öl überführen und mindestens 30 Minuten inkubieren
10. Spermien vom Tropfenrand einsammeln und in PVP überführen
11. ICSI wie üblich durchführen

Die Qualität der auf diese Weise extrahierten testikulären Spermatozoen wurde im Hinblick auf den Vitalitätsfaktor „Motilität“ in drei Kategorien aufgeschlüsselt.

- 1) **„motil“**: Es ließen sich hinreichend viele motile Spermatozoen isolieren. In alle zur Verfügung stehenden Oozyten konnten Spermatozoen injiziert werden, die zuvor motil, d.h. nachgewiesenermaßen vital waren.
- 2) **„teils immotil“**: Es waren nur wenige motile Spermatozoen nachweisbar. Einige Oozyten mussten auch mit immotilen (möglicher Weise avitalen) Spermatozoen injiziert werden.
- 3) **„immotil“**: Es konnten lediglich immotile Spermatozoen extrahiert werden. Für die ICSI mussten Spermatozoen mit unklarem Vitalitätsstatus verwendet werden.

2.1.1.2 Spermatogenetischer Status in den Hodenbiopsien

Die Bewertung des spermatogenetischen Status in den histologischen Präparaten erfolgte in der Abteilung für Andrologie mittels eines modifizierten Bewertungs-Score nach Johnsen [Johnsen 1970; De Kretser *et al.*, 1976; Schulze *et al.*, 1999; Holstein *et al.*, 2003], der in Tabelle 1 dargestellt ist:

Tabelle 1: Histologischer Score Count nach Johnsen	
10	Intakte Spermatogenese: viele reife Spermatozoen und Spermationszonen
9	Leichte Hypospermatogenese: reduzierte Zahl reifer Spermatozoen; wenige Spermationszonen
8	Deutliche Hypospermatogenese: wenig reife Spermatozoen, keine Spermationszonen
7	Nur unreife Spermatozoen; keine Spermationszonen
6	Wenige unreife Spermatozoen
5	Keine Spermatozoen; Arrest auf dem Niveau der primären Spermatozyten; viele Spermatozyten säumen das Tubuluslumen
4	Arrest auf dem Niveau der primären Spermatozyten; nur wenige Spermatozyten nachweisbar
3	Arrest auf dem Niveau der Spermatogonien; Typ-A-Spermatogonien teilen sich, entwickeln sich aber nicht weiter
2	Keine Keimzellen; nur Sertolizellen sind vorhanden
1	Keine Elemente des Keimepithels vorhanden; komplette Tubulusatrophie (Tubulusschatten)

2.1.2 Patientenkollektiv mit ICSI-Zyklen und Ejakulat-Spermatozoen

Das Vergleichskollektiv setzte sich aus Patientenpaaren zusammen, bei denen aus andrologischer Indikation die Durchführung der ICSI-Behandlung erforderlich war. Bei den betroffenen Männern lag ein Oligo-Asthenoteratozoospermie-Syndrom (OAT-Syndrom) vor, mit folgenden Kriterien:

- 1) Spermatozoenkonzentration: < 5 Mio./ ml
- 2) Morphologie: < 10% normal figurierte Spermatozoen

3) Motilität: < 20% progressiv motile Spermatozoen.

Insgesamt wurden 1014 Behandlungszyklen, die zwischen 1996-2001 durchgeführt wurden, in die Untersuchung einbezogen.

2.2 Statistische Analyse

Die statistische Berechnung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem WinSTAT Statistik-Add-In für Microsoft®Excel. Zur Überprüfung von Unterschieden wurde der Kruskal-Wallis H-Test [Weiß 2002] mit der Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit (p) für nicht verbundene Stichproben verwendet.

Für alle statistischen Untersuchungen galt, dass eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) als signifikant und von 1% ($p < 0,01$) als hochsignifikant angesehen wurde.

Für die Graphiken wurde Microsoft®Excel 2002 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Behandlung mit dem Kryo-TESE-ICSI-Verfahren

3.1.1 Patientinnenkollektiv

In Abbildung 1 ist das analysierte Patientinnenkollektiv, bei dem die für die ICSI-Behandlung erforderlichen Spermatozoen aus Kryo-TESE-Material gewonnen wurden, in zwei Altersgruppen (< 35 Jahre; ≥ 35 Jahre) aufgeschlüsselt.

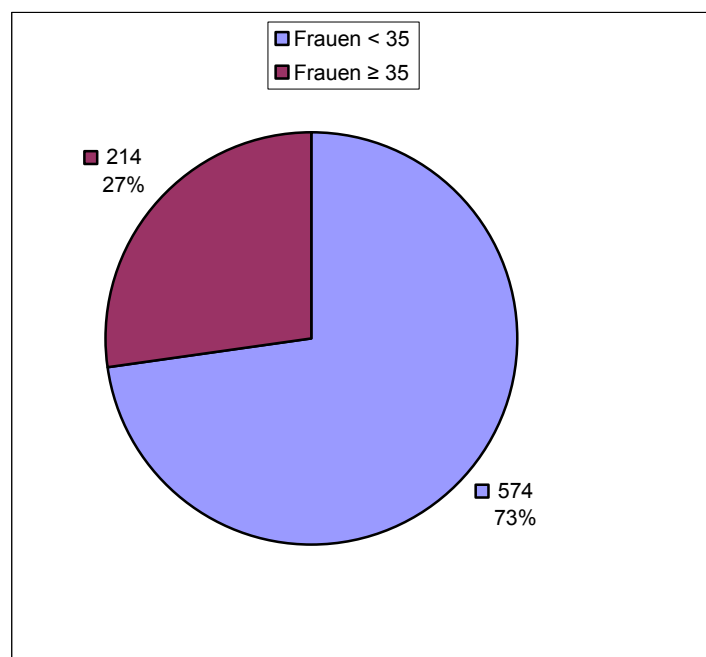


Abbildung 1: Anzahl der untersuchten Patientinnen in Abhängigkeit vom Alter bei Kryo-TESE-ICSI im Zeitraum von 1996-2001 (n=788)

Von insgesamt 788 Frauen waren 574 jünger als 35 Jahre. Das Durchschnittsalter in diesem Kollektiv betrug 29,8 Jahre (Median: 30,0 Jahre). 214 Frauen befanden sich im Alter von ≥ 35 Jahren. Das Durchschnittsalter lag in dieser Gruppe bei 37,5 Jahre (Median: 37,0 Jahre).

3.1.2 Fertilisationsrate

Zunächst wurden für die untersuchten Kollektive die Fertilisationsraten in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität ermittelt. Unter *Fertilisation* wurde das Verschmelzen der Pronuclei nach Einbringen der Samenzelle in die Eizelle mit Hilfe der ICSI-Methode verstanden. Die *Fertilisationsrate* kennzeichnet die Anzahl der befruchteten

Oozyten in Prozent im Verhältnis zu den insgesamt durch die ICSI-Methode behandelten Oozyten.

Hierfür wurden die aus den Testiskryokonservaten gewonnenen Spermatozoen nach ihrer Beweglichkeit in drei „Qualitätskategorien“: *motil* (**M-Gruppe**), *teils immotil* (**TI-Gruppe**) und *immotil* (**I-Gruppe**) eingeteilt. Daraufhin wurde überprüft, mit welcher Wahrscheinlichkeit es bei den jeweiligen Spermatozoenkategorien zu einer Fertilisation gekommen ist und ob Unterschiede in Bezug auf die Fertilisationsrate zwischen den beiden Alterskollektiven (< 35 Jahre/ ≥ 35 Jahre) bestehen.

In Abbildung 2 ist die Fertilisationsrate pro Oocyte für die Frauen < 35 Jahren wiedergegeben.

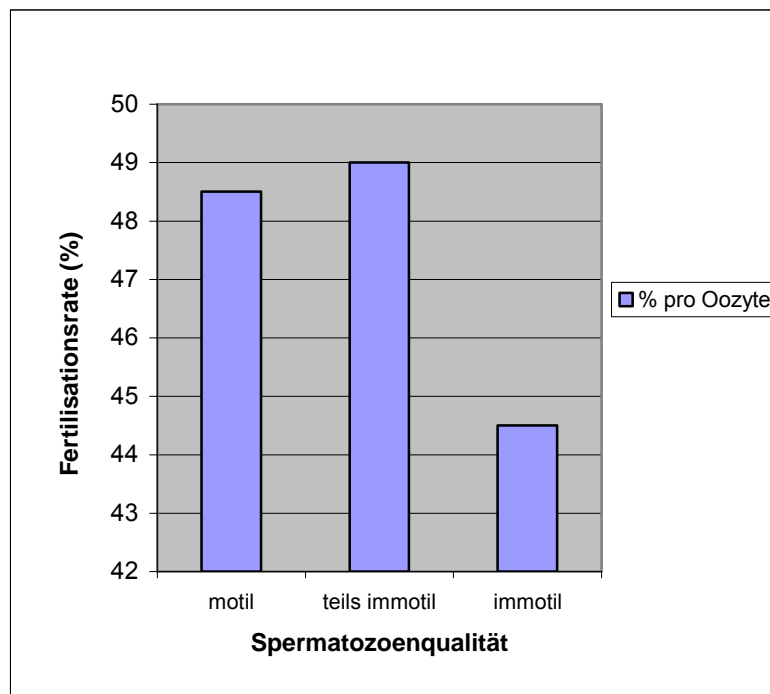


Abbildung 2: Fertilisationsrate (%) bei der Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität bei Frauen < 35 Jahren im Zeitraum 1996-2001 (n=541)

Beim Einsatz von *motilen* und *teils immotilen* Spermatozoen sind die Fertilisationsraten mit 48,5% bzw. 49,0% nahezu identisch. Bei der Verwendung *immotiler* Spermatozoen liegt diese dagegen auf etwas niedrigerem Niveau (44,5%). Die Unterschiede der Fertilisationsraten in Abhängigkeit von der Spermatozoenmotilität lassen sich bei den Frauen unter 35 Jahren statistisch nicht sichern (H-Test: $p < 0,172$) und sind bei der Verwendung *motiler* und *teils immotiler* Spermatozoen nur marginal.

Die Fertilisationsrate pro Oozyte für die Frauen ≥ 35 Jahre ist in Abbildung 3 dargestellt.

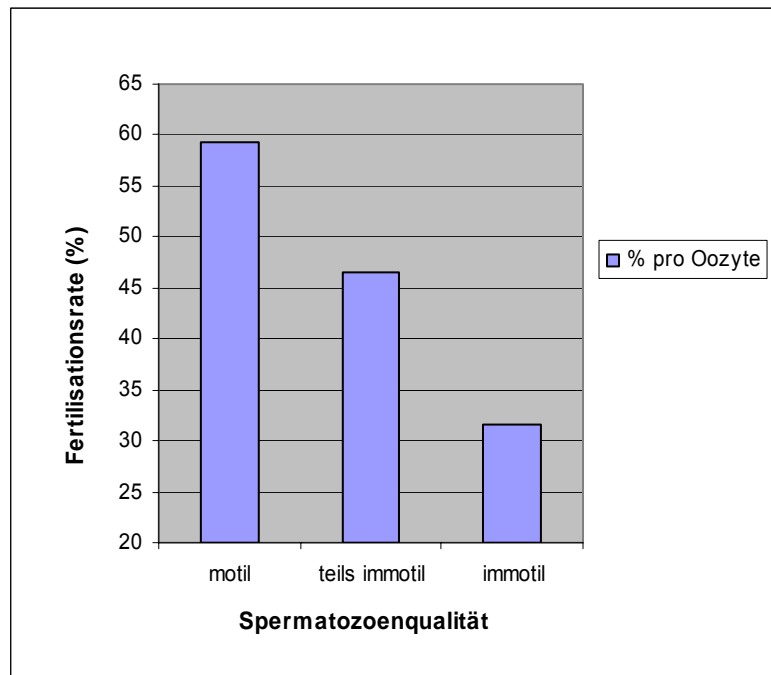


Abbildung 3: Fertilisationsrate (%) bei der Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität bei Frauen ≥ 35 Jahren im Zeitraum 1996-2001 (n=205)

Bei Verwendung *motiler* Spermatozoen ist die Fertilisationsrate mit 59,3% am höchsten. Beim Einsatz *teils immotiler* Spermatozoen erreicht diese nur noch 46,6% und liegt mit 31,6% bei *immotilen* Spermatozoen am niedrigsten.

Die Unterschiede der Fertilisationsraten in Abhängigkeit von der Spermatozoenmotilität lassen bei den Frauen über 35 Jahren eine eindeutige Tendenz erkennen. In der M-Gruppe liegt die Fertilisationsrate mit am höchsten, bereits niedriger in der TI-Gruppe, in der I-Gruppe am niedrigsten. Diese Unterschiede sind statistisch hoch signifikant ($p < 7,9 \cdot 10^{-8}$).

3.1.3 Schwangerschaftsrate

Die *Schwangerschaftsrate* kennzeichnet den prozentualen Anteil der eingetretenen Schwangerschaften in Relation zu den erfolgten Embryotransfers. Auf der Basis des Embryonenschutzgesetzes ist der intrauterine Transfer von maximal 3 Embryonen möglich.

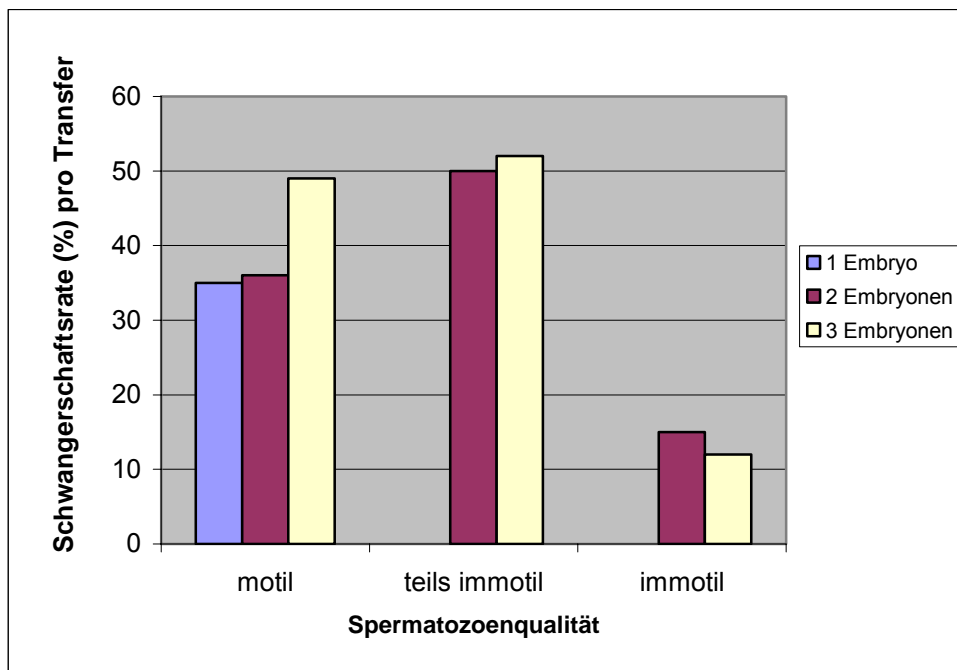


Abbildung 4: Schwangerschaftsrate (%) bei Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und Anzahl der transferierten Embryonen bei Frauen < 35 Jahren (n=526)

Abbildung 4 veranschaulicht, dass sich bei den Frauen unter 35 Jahren bei der Fertilisation in der M-Gruppe nach Transfer von einem oder zwei Embryonen nahezu identische Schwangerschaftsraten ergeben (35,3% bzw. 35,8%). Nach Transfer von drei Embryonen liegt die Schwangerschaftsrate mit 48,7% höher. Innerhalb von dieser Gruppe sind die Unterschiede statistisch jedoch nicht signifikant (Embryonentransfer 1/2: $p < 0,810$; Embryonentransfer 2/3: $p < 0,086$; Embryonentransfer 1/3: $p < 0,530$).

Die Fertilisation in der TI-Gruppe führt nach Transfer von zwei Embryonen zu höheren Schwangerschaftsraten als dies in der M-Gruppe der Fall ist (50,0% vs. 35,8%). Dieser Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant ($p < 0,364$). Der Transfer von drei Embryonen führt auch in dieser Gruppe zur höchsten Schwangerschaftsrate (51,6%), wobei kein statistisch gesicherter Unterschied innerhalb der Gruppe beim Vergleich mit nur zwei Embryonen besteht (50,0%, $p < 0,955$).

Nach Fertilisation durch *immotile* Spermatozoen liegen die Schwangerschaftsraten insgesamt deutlich niedriger, als dies bei besser beweglichen Samenzellen der Fall ist. Die Unterschiede zwischen der M- und I-Gruppe sind statistisch hoch signifikant (bei 3 Embryonen: $p < 4,2 \cdot 10^{-6}$; bei 2 Embryonen: $p < 0,01$). Das Gleiche gilt für den Vergleich zwischen der TI-Gruppe und I-Gruppe. Auch hier sind die Unterschiede statistisch hoch signifikant (bei 2 Embryonen: $p < 0,007$; bei 3 Embryonen: $p < 0,5 \cdot 10^{-3}$).

Wie aus der Abbildung 5 ersichtlich wird, sinkt bei den Frauen ≥ 35 Jahren mit abnehmender Motilität der injizierten Spermatozoen die Schwangerschaftsrate. Außerdem ist zu erkennen, dass die Schwangerschaftsrate direkt proportional mit der Anzahl transferierter Embryonen steigt.

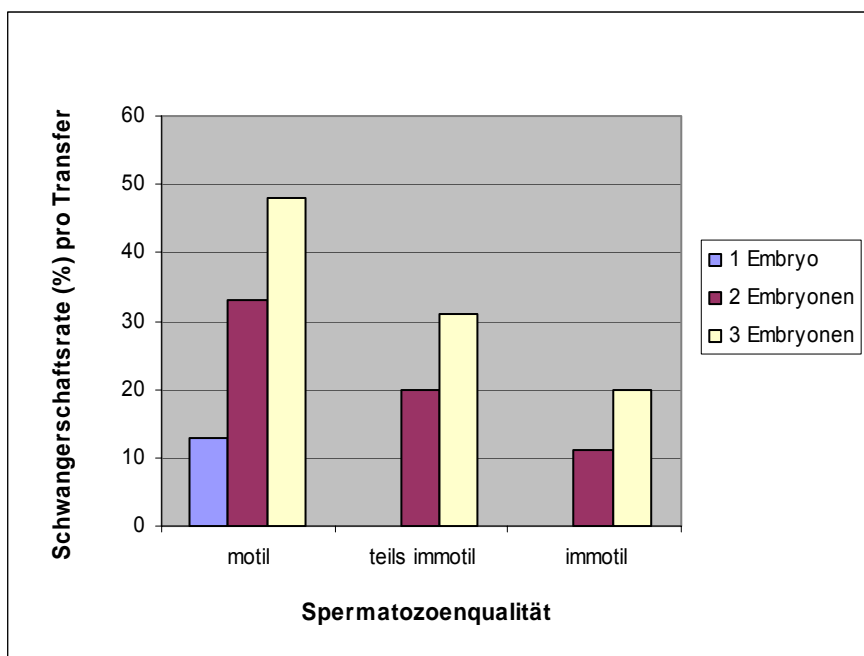


Abbildung 5: Schwangerschaftsrate (%) bei Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und Anzahl der transferierten Embryonen bei Frauen ≥ 35 Jahre (n=203)

In der M-Gruppe nimmt die Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen zu und liegt nach Transfer von drei Embryonen mit 48,0% höher als nach Transfer von einem Embryo (13,3%) oder zwei Embryonen (33,3%). Die Unterschiede beim Transfer von einem Embryo und drei Embryonen sind statistisch signifikant ($p < 0,050$). Jedoch besteht kein signifikanter Unterschied beim Transfer von einem Embryo und zwei Embryonen ($p < 0,35$). Das Gleiche trifft für den Transfer von zwei und drei Embryonen zu ($p < 0,36$).

In der TI-Gruppe führt der Transfer von zwei Embryonen zu niedrigeren Schwangerschaftsraten als in der M-Gruppe (20,0% vs. 33,3%). Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p < 0,750$). Ein gleichsinniger Trend zeigt sich nach Transfer von drei Embryonen (31,0% vs. 48,0%, $p < 0,286$).

Nach Fertilisation durch *immotile* Spermatozoen liegen nach Transfer einer identischen Embryonenanzahl niedrigere Schwangerschaftsraten vor, als in der M- und TI-Gruppe. Nach Transfer von drei gegenüber zwei Embryonen werden innerhalb der I-Gruppe

höhere Schwangerschaftsraten (20,0% vs. 11,1%, $p < 0,306$) verzeichnet. Nach Transfer von drei Embryonen unterscheidet sich die Schwangerschaftsrate nicht von der, die nach Transfer von zwei Embryonen in der TI-Gruppe erzielt wird. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p < 0,685$).

3.1.4 Geburtenrate

Weder durch die Fertilisationsrate noch durch die Schwangerschaftsrate ist eine definitive Aussage über den gewünschten Behandlungserfolg, der in der Geburt eines gesunden Kindes zu sehen ist, möglich. Im Folgenden werden die Schicksale der eingetretenen Schwangerschaften betrachtet. Dabei gilt es, einen möglichen Einfluss der Spermatozoenmotilität und der Anzahl der transferierten Embryonen auf den Ausgang der Schwangerschaft in den Kollektiven der Frauen < 35 Jahren und denen ≥ 35 Jahren zu erfassen.

In den Berechnungen zur Geburten- und Abortrate wurden auch die Schwangerschaften mit unbekanntem Ausgang berücksichtigt.

Unter der *Geburtenrate* wird definitionsgemäß der prozentuale Anteil der Schwangerschaften verstanden, der mit der Geburt eines Kindes endet.

Die Geburtenraten in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und der Anzahl der transferierten Embryonen bei den Frauen unter 35 Jahren sind in Abbildung 6 dargestellt.

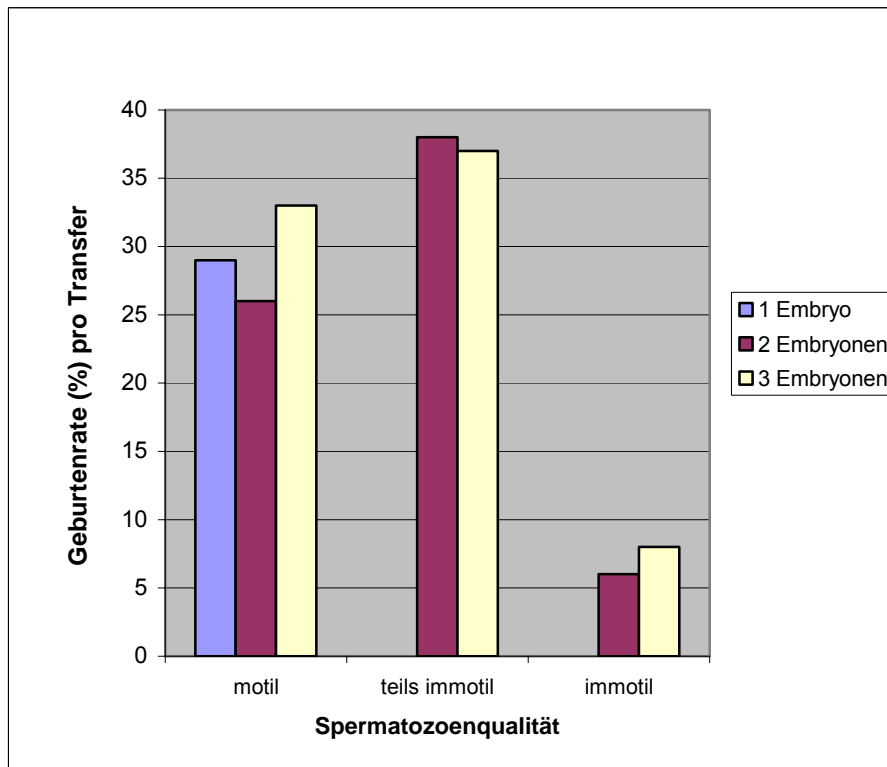


Abbildung 6: Geburtenrate (%) bei der Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und Anzahl der transferierten Embryonen bei Frauen < 35 Jahren (n=514)

In der M-Gruppe unterscheiden sich die Geburtenraten nur gering und liegen insgesamt bei 26,0% und höher. Eine eindeutige Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen wird nicht ersichtlich, wenngleich nach Transfer von drei Embryonen mit 33,1% die Erfolgsrate am höchsten liegt. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p < 0,368$).

Bei den Frauen aus der TI-Gruppe lag die Geburtenrate nach Transfer von zwei oder drei Embryonen auf identisch hohem Niveau von 37,0% und damit insgesamt höher als in den Vergleichskollektiven. Die Unterschiede zwischen der M-Gruppe und der TI-Gruppe sind statistisch nicht signifikant ($p < 0,290$). Jedoch bestehen statistisch signifikante Unterschiede in der Geburtenrate zwischen der TI-Gruppe und der I-Gruppe. Hier besteht sowohl bei einem Transfer von zwei Embryonen ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,002$) als auch bei drei Embryonen ($p < 0,016$).

Die Fertilisation durch *immotile* Spermatozoen führt mit 5,7% nach Transfer von zwei bzw. 7,7% nach Transfer von drei Embryonen zu den niedrigsten Geburtenraten. Im Vergleich zur M-Gruppe mit drei Embryonen besteht ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,5 \cdot 10^{-3}$).

In Abbildung 7 sind die Geburtenraten in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und der Anzahl der transferierten Embryonen bei den Frauen ≥ 35 Jahren wiedergegeben.

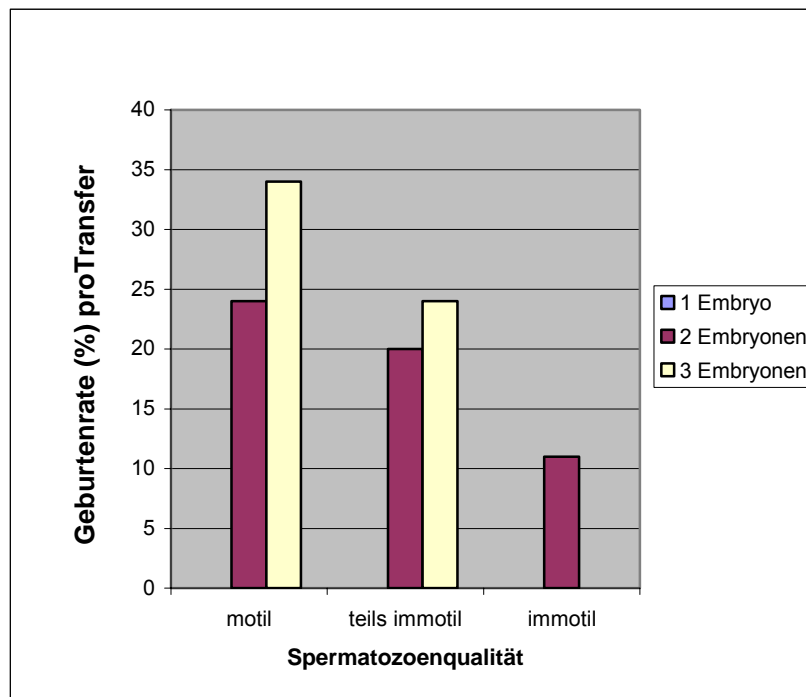


Abbildung 7: Geburtenrate (%) bei Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und Anzahl der transferierten Embryonen bei Frauen ≥ 35 Jahren (n=202)

Bei den Patientinnen ≥ 35 Jahren weist die M-Gruppe insgesamt die höchsten Geburtenraten auf. Nach Transfer von drei Embryonen liegt die Erfolgsrate mit 33,7% höher als nach Transfer von zwei Embryonen mit 23,8%. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p < 0,522$). Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen dem Transfer von einem Embryo und drei Embryonen ($p < 0,022$).

In der TI-Gruppe betragen die Geburtenraten 20,0% nach Transfer von zwei und 24,1% nach Transfer von drei Embryonen. Damit liegen sie vergleichsweise niedriger als bei Verwendung *motiler* Spermatozoen. In beiden Gruppen führen drei transferierte Embryonen zu den jeweils besten Ergebnissen. Diese Unterschiede lassen sich statistisch jedoch nicht sichern ($p < 0,813$).

Nach einem Transfer von zwei Embryonen liegt die Geburtenrate der I-Gruppe bei 11,1% und ist damit etwa doppelt so niedrig wie in der M- und TI-Gruppe. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p < 0,542$; $p < 0,660$). Schwangerschaften, die nach Transfer von drei Embryonen in der I-Gruppe eintraten, endeten nicht mit einer Geburt, wie auch aus den nachfolgend dargestellten Abortraten ersichtlich wird.

3.1.5 Abortrate

Die *Abortrate* charakterisiert den prozentualen Anteil der Schwangerschaften, die als Fehlgeburt verloren gehen.

In Abbildung 8 ist die Abortrate in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und der Anzahl der transferierten Embryonen bei Frauen < 35 Jahren dargestellt.

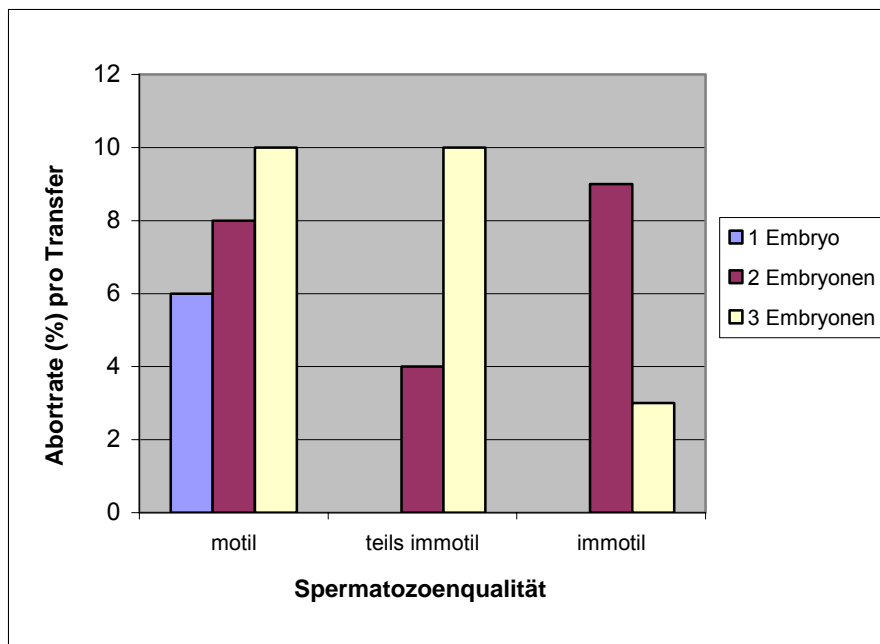


Abbildung 8: Abortrate (%) bei Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und Anzahl der transferierten Embryonen bei Frauen < 35 Jahren (n=514)

Bei den Frauen < 35 Jahren liegt unabhängig von der Spermatozoenmotilität eine niedrige Abortrate von 10,0% und kleiner vor. Diese ist bei Verwendung *motiler* Spermatozoen und nach Transfer nur eines Embryos mit 5,9% am niedrigsten und wird nach drei transferierten Embryonen mit 9,6% am höchsten dokumentiert. Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p < 0,544$).

Schwangerschaften in der TI-Gruppe enden in 3,8% nach Transfer von zwei und in 9,7% nach Transfer von drei Embryonen mit einem Abort. Dieser Unterschied ist ebenfalls nicht statistisch zu sichern ($p < 0,237$).

Traten die Schwangerschaften nach Fertilisation durch *immotile* Spermatozoen ein, so liegt die Abortrate bei 8,5% nach Transfer von zwei und bei 2,6% nach Transfer von drei Embryonen. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p < 0,378$).

Die Verwendung von drei transferierten Embryonen in der M- und I-Gruppe weist dagegen einen statistisch signifikanten Unterschied auf ($p < 0,047$).

Die Abortrate in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und Zahl der transferierten Embryonen bei Frauen ≥ 35 Jahren geht aus Abbildung 9 hervor.

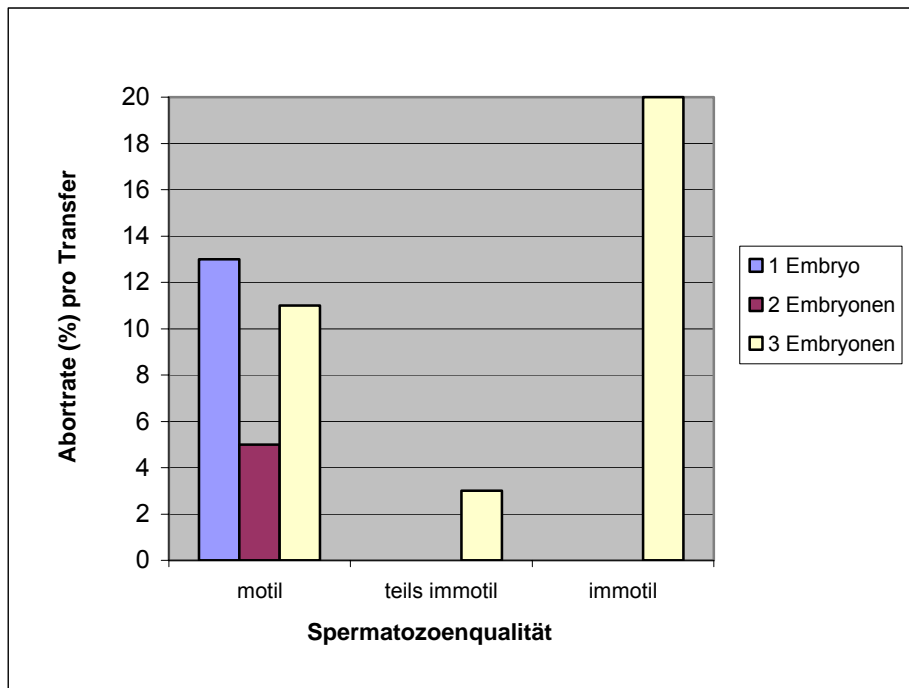


Abbildung 9: Abortrate (%) bei Kryo-TESE-ICSI in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität und Anzahl der transferierten Embryonen bei Frauen ≥ 35 Jahren (n=202)

Die Abortrate beträgt in der M-Gruppe 13,3% nach Transfer von einem Embryo und 10,9% nach Transfer von drei Embryonen. Nach Transfer von zwei Embryonen liegt die Rate mit 4,8% am niedrigsten. Diese Unterschiede sind statistisch jedoch nicht signifikant ($p < 0,679$). Schwangerschaften nach induzierter Fertilisation bei *teils immotilen* Spermatozoen enden nach Transfer von drei Embryonen in weniger als 5,0% mit einem Abort. Statistisch ist der Unterschied ebenfalls nicht signifikant ($p < 0,882$).

In der I-Gruppe enden die nachfolgenden Schwangerschaften in 20,0% mit einem Abort. Die Abortrate in dieser Untergruppe der über 35 Jahre alten Frauen liegt damit am höchsten. Es bestehen statistisch signifikante Unterschiede beim Transfer von drei Embryonen zwischen der TI- und I-Gruppe ($p < 0,041$).

3.1.6 Zusammenhang zwischen histologischen Score-Count und Spermatozoenmotilität

Der Zusammenhang zwischen modifizierten Johnsen-Score und Spermatozoenmotilität in den Behandlungszyklen bei Frauen < 35 Jahren ist in Abbildung 10 dargestellt.

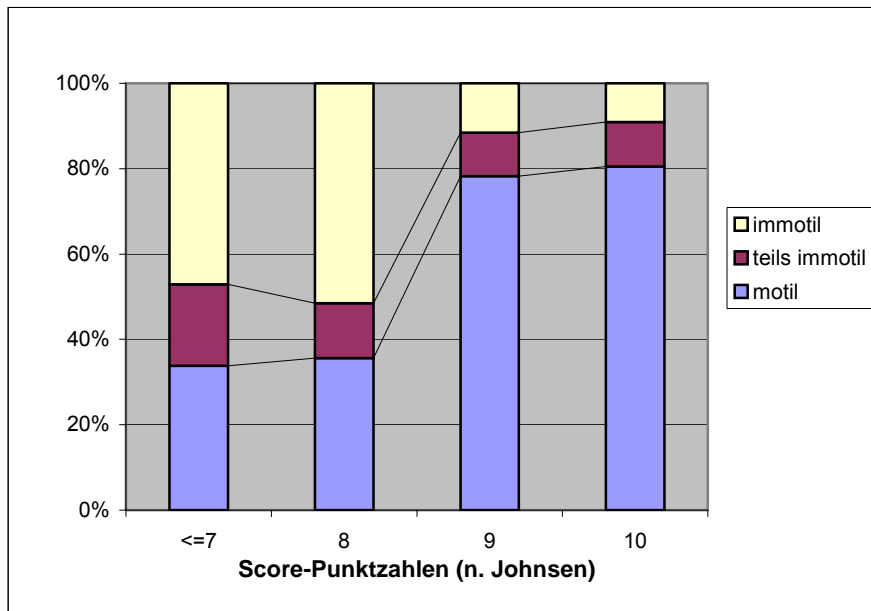


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Score-Benotung und Spermatozoenqualität bei Kryo-TESE-ICSI-Behandlungen von Frauen < 35 Jahren im Zeitraum von 1996-2001 (n=396)

Mit zunehmenden Score-Punktzahlen bzw. abnehmenden pathomorphologischen Veränderungen der Spermatogenese nimmt auch der Anteil der *motilen* gegenüber den *teils immotilen* und *immotilen* Spermatozoen in den Biopsieextrakten zu. Diese Zunahme geschieht zwischen Score 8 und 9 sprunghaft. So beträgt der Anteil der *motilen* Spermatozoen bei einem Score von ≤ 7 33,8%, bei Score 8 35,6% und steigt für Score 9 und 10 auf 78,2% bzw. 80,5% an. Bezüglich der Fälle mit Score-Benotung ≤ 7 ist anzumerken, dass sich aus dem Testisgewebe und den Kryokonservaten noch reife Spermatiden („testikuläre Spermatozoen“) extrahieren ließen, obwohl sie in den zugehörigen histologischen Präparaten nicht nachweisbar waren.

Die Zunahme des Anteils *motiler* Spermatozoen bei Score 9 und 10 geht mit einer deutlichen Abnahme des Anteils *immotiler* Spermatozoen (11,6% bzw. 9,1%) im Vergleich zu Score 7 und 8 (47,1% bzw. 51,5%) einher.

Der als *teils immotil* charakterisierte Anteil liegt bei Score ≤ 7 mit 19,1% am höchsten, beträgt aber selbst bei einem Score 9 und 10 noch 10,2% bzw. 10,4%. Bei dem

Vergleich von Score 8 zu Score 9, in Abhängigkeit von allen Spermatozoenqualitäten, konnten die Unterschiede statistisch gesichert werden ($p < 4,4 \cdot 10^{-12}$).

Der Zusammenhang zwischen Johnsen-Score und Spermatozoenmotilität in den Behandlungszyklen bei Frauen ≥ 35 Jahren ist in Abbildung 11 veranschaulicht.

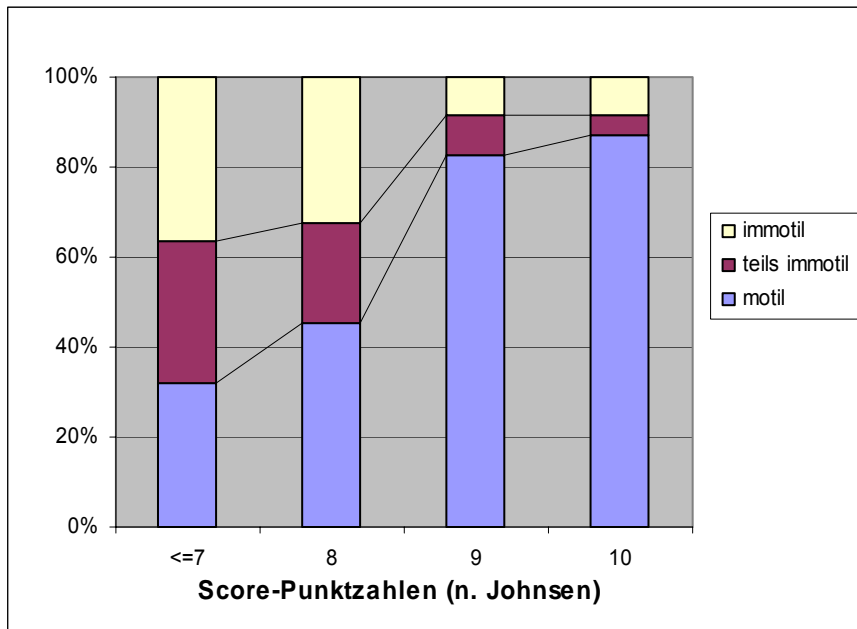


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Score-Benotung und der Spermatozoenmotilität bei Kryotese-ICSI- Behandlungen von Frauen ≥ 35 Jahren (n=170)

In diesen Behandlungszyklen besteht ein gleichsinniger Zusammenhang zwischen Zunahme des Johnsen-Scores und des Anteils der *motilen* gegenüber den *teils immotilen* und *immotilen* Spermatozoen in den Hodenbiopsaten. Diese Zunahme ist auch hier ab Score 9 im Vergleich zu niedrigeren Benotungen deutlich sichtbar. Der Anteil der *motilen* Spermatozoen beträgt bei einem Score von ≤ 7 31,8%, bei Score 8 45,2% und steigt für Score 9 und 10 auf 82,8% bzw. 87,2% an.

Die Zunahme des Anteils *motiler* Spermatozoen bei Score 9 und 10 geht mit einer deutlichen Abnahme des Anteils *immotiler* Spermatozoen (8,6% bzw. 8,5%) im Vergleich zu Score 7 und 8 (36,4% bzw. 32,3%) einher.

Der Prozentsatz der als *teils immotil* charakterisierter Spermatozoen liegt bei Score ≤ 7 mit 31,8% am höchsten, gefolgt von 22,6% bei Score 8. Am niedrigsten ist dieser bei einem Score von 10 mit 8,5%. Bei dem Vergleich von Score 1-8 zu Score 9-10, in Abhängigkeit von allen Spermatozoenqualitäten, konnten die Unterschiede statistisch gesichert werden ($p < 1,7 \cdot 10^{-9}$).

3.2 ICSI-Behandlung mit Ejakulat-Spermatozoen

3.2.1 Patientinnenkollektiv

Die vorhandenen TESE-ICSI-Resultate wurden mit den Ergebnissen von 1014 Behandlungszyklen verglichen, bei denen die ICSI mit ejakulierten Spermatozoen erfolgte.

Analog zu den „TESE-ICSI-Patientinnen“ wurden auch hier, bezogen auf das Lebensalter (< 35 Jahre, ≥ 35 Jahre), zwei Subkollektive gebildet. Die für die ICSI-Behandlungen eingesetzten Spermatozoen waren in allen Fällen motil.

In Abbildung 12 sind die prozentualen Anteile der beiden Subkollektive dargestellt.

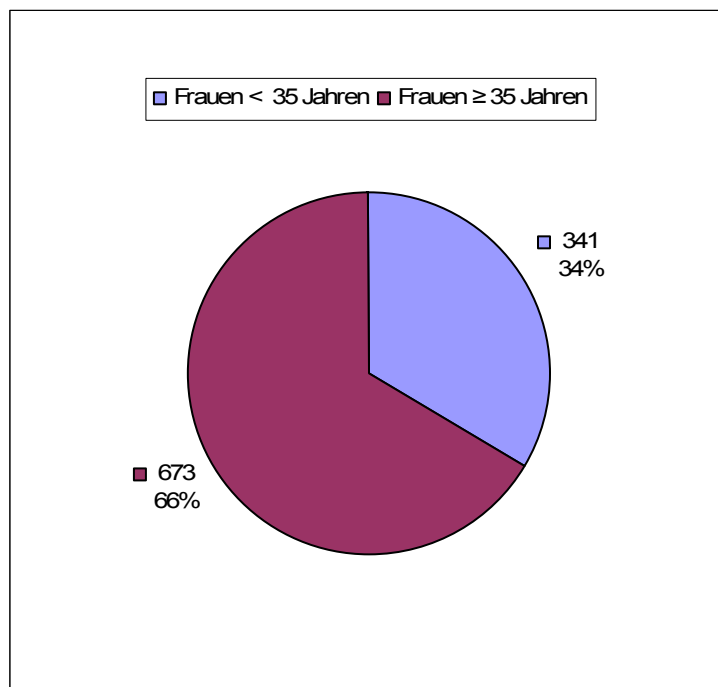


Abbildung 12: Anzahl der Patientinnen in den Subkollektiven bei ICSI mit Ejakulat-Spermatozoen

Das Subkollektiv der unter 35 Jährigen umfasst 341 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 31,7 Jahren (Median: 32). Dem zweiten Subkollektiv über 35 Jahre alter Frauen gehören 673 Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 38,4 Jahren (Median: 38) an. Für das Gesamtkollektiv beträgt der Mittelwert für das Alter 36,2 Jahre (Median: 36).

3.2.2 Fertilisationsrate

Die Fertilisationsrate nach ICSI-Behandlung unter Verwendung von Ejakulat-Spermatozoen ist in Abbildung 13 wiedergegeben.

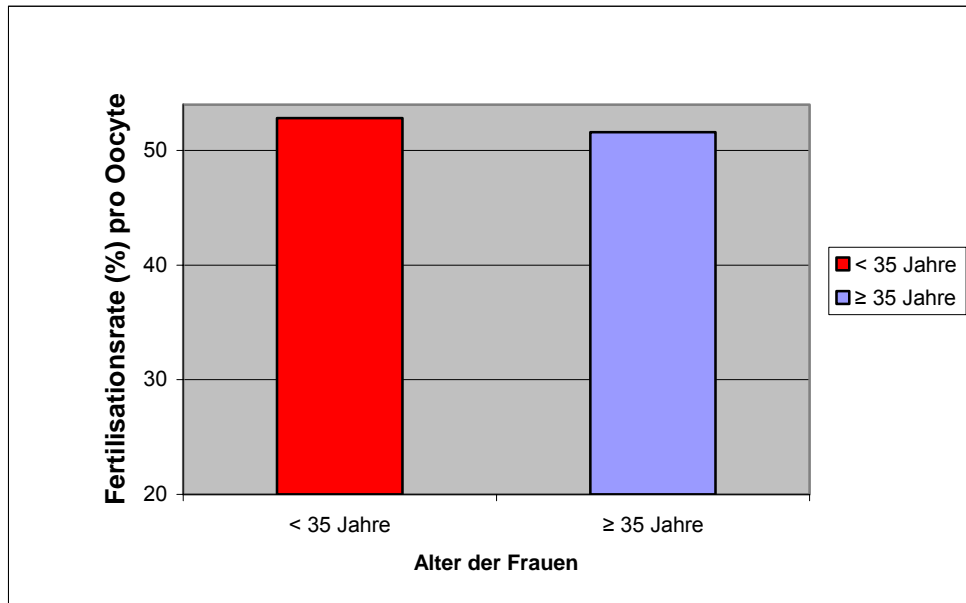


Abbildung 13: Fertilisationsrate (%) bei der Ejakulat-Spermatozoen-ICSI-Behandlung bei den betrachteten Subkollektiven im Zeitraum von 1996-2001 (n=1014)

Es ist ersichtlich, dass die Fertilisationsraten pro Oozyte bei Verwendung von Ejakulat-Spermatozoen zur ICSI-Behandlung unabhängig von den Alterskollektiven mit 52,8% bzw. 51,6% nahezu identische Werte aufweisen ($p < 0,571$, n. s.).

3.2.3 Schwangerschaftsrate

Die Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen bei Verwendung von Ejakulat-Spermatozoen für die ICSI-Behandlung bei Frauen < 35 Jahren gehen aus Abbildung 14 hervor.

Nach Transfer von nur einem Embryo wird bei den Frauen, die jünger als 35 Jahre sind, eine Schwangerschaftsrate von 26,3% erzielt. Nach Transfer von zwei oder drei Embryonen liegen die Schwangerschaftsraten mit 56,2% bzw. 49,0% höher ($p < 0,099$ bzw. $p < 0,261$ bzw. $p < 0,278$, n. s.).

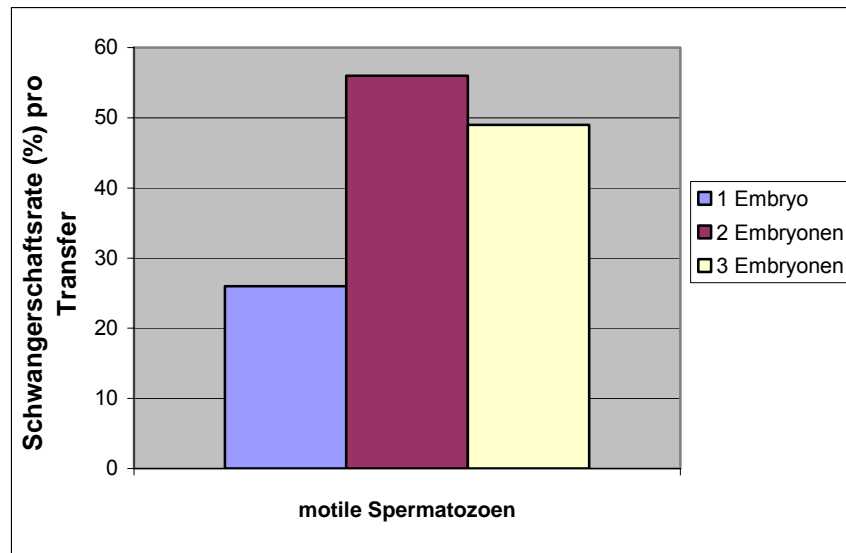


Abbildung 14: Schwangerschaftsrate (%) in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen nach Ejakulat-Spermatozoen-ICSI-Behandlung bei Frauen < 35 Jahre (n= 337)

Für die Gruppe der Frauen ≥ 35 Jahre sind die Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen nach vorangegangener ICSI-Behandlung unter Verwendung von Ejakulat-Spermatozoen in Abbildung 15 wiedergegeben.

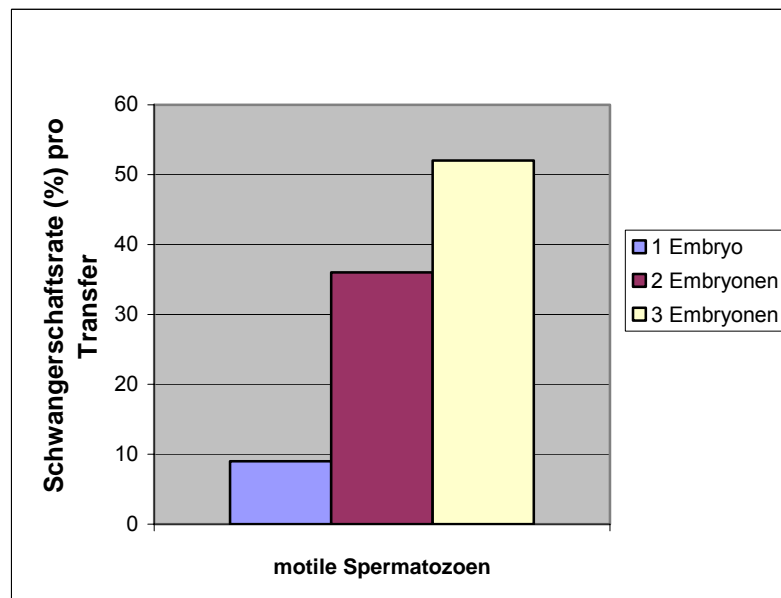


Abbildung 15: Schwangerschaftsrate (%) in Abhängigkeit von der transferierten Embryonenanzahl bei Frauen ≥ 35 Jahren nach ICSI-Behandlung mit Ejakulat-Spermatozoen (n=644)

Nach Transfer von einem Embryo kommt es in 8,5% zum Eintritt einer Schwangerschaft. Nach Transfer von zwei Embryonen ist bei 36,3% der Frauen eine Schwangerschaft zu verzeichnen und nach Transfer von drei Embryonen ist dies in 51,8% der Fall. In dieser Gruppe wird klar ersichtlich, dass mit zunehmender Anzahl der transferierten Embryonen die Schwangerschaftsrate ansteigt. Die Unterschiede zwischen dem Transfer von einem und zwei bzw. einem und drei Embryonen sind statistisch hoch signifikant ($p < 0,002$ bzw. $p < 2,3 \cdot 10^{-5}$). Auch der Unterschied zwischen Transfer von zwei und drei Embryonen ist statistisch gesichert ($p < 0,022$).

3.2.4 Geburtenrate

Die Geburtenraten in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen bei den Frauen unter 35 Jahren sind in Abbildung 16 dargestellt.

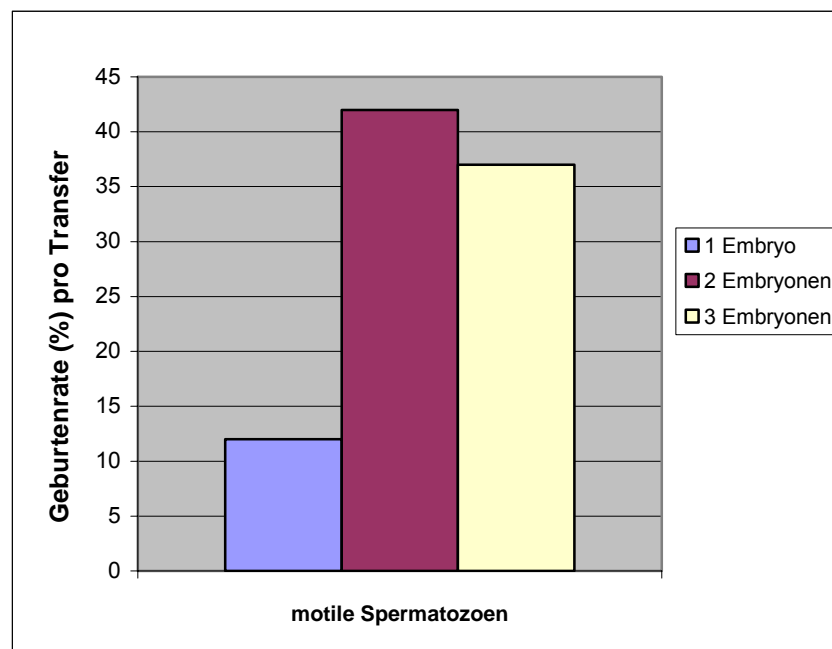


Abbildung 16: Geburtenrate (%) in Abhängigkeit von der transferierten Embryonenanzahl bei Frauen < 35 Jahren nach erfolgter ICSI-Behandlung mit Ejakulat-Spermatozoen (n=320)

Nach Transfer eines Embryos endet bei den Frauen unter 35 Jahren die erzielte Schwangerschaft in 11,8% der Fälle mit einer Geburt. Schwangerschaften nach Transfer von zwei oder drei Embryonen werden in 42,2% bzw. 36,8% durch eine Geburt beendet. Die Unterschiede der Geburtenraten zwischen letzteren beiden sind statistisch

nicht signifikant. Das Gleiche gilt auch im Vergleich zum Transfer von einem Embryo ($p < 0,070$).

Die für die Frauen ≥ 35 Jahre ermittelten Geburtenraten sind aus Abbildung 17 ersichtlich.

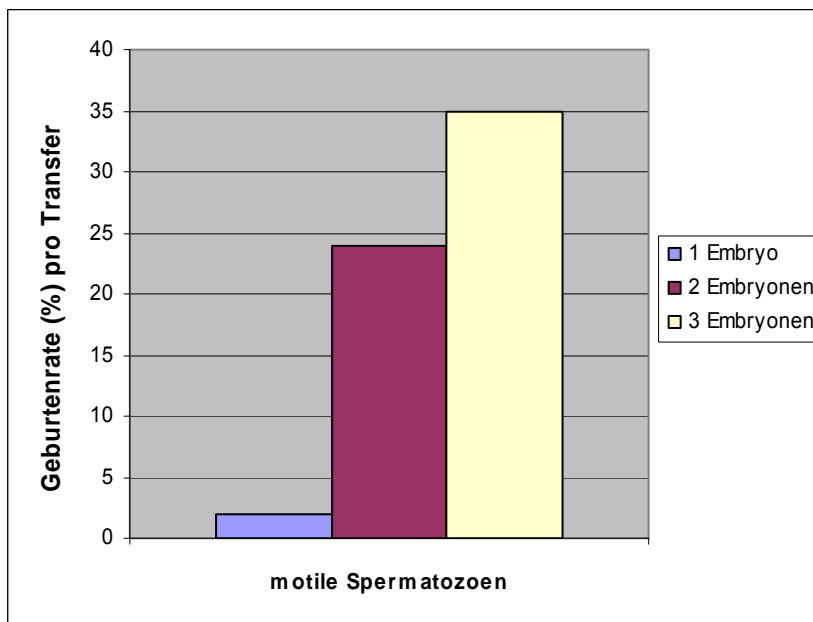


Abbildung 17: Geburtenrate (%) in Abhängigkeit von der transferierten Embryonenanzahl bei Frauen ≥ 35 Jahren nach ICSI-Behandlung mit Ejakulat-Spermatozoen (n=629)

Nach Transfer von einem Embryo enden die Schwangerschaften in 2,2% mit einer Geburt. Bei Schwangerschaften, die nach dem Transfer von zwei oder drei Embryonen entstehen, kommt es in 24,2% bzw. 35,4% zur Geburt. Hier unterscheidet sich die Höhe der Geburtenraten statistisch hoch signifikant beim Vergleich von einem Embryo und zwei Embryonen sowie einem Embryo und drei Embryonen ($p < 0,002$ bzw. $p < 0,3 \cdot 10^{-3}$). Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen dem Transfer von zwei und drei Embryonen ($p < 0,155$).

3.2.5 Abortrate

In Abbildung 18 sind die Abortraten in Abhängigkeit von der Anzahl transferierter Embryonen bei Frauen < 35 Jahren dargestellt.

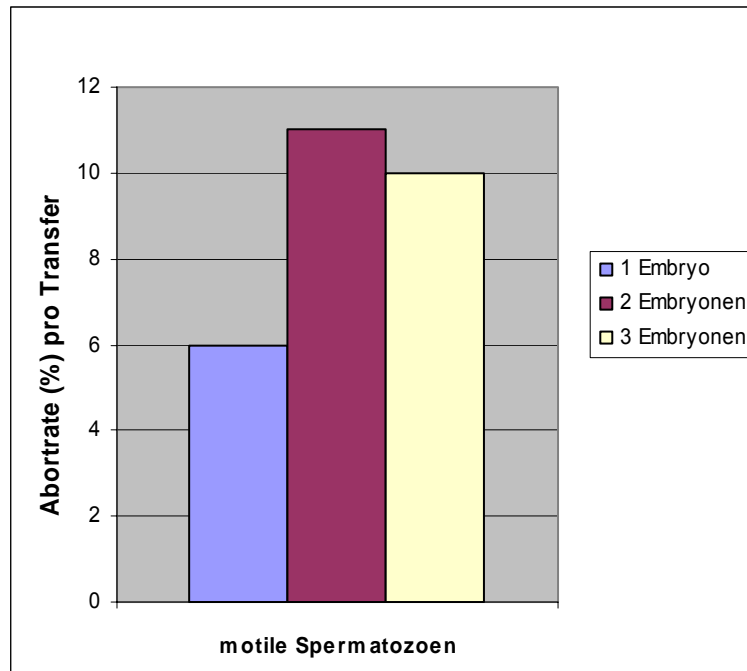


Abbildung 18: Abortrate (%) in Abhängigkeit von der transferierten Embryonenanzahl bei Frauen < 35 Jahren nach erfolgter ICSI-Behandlung mit Ejakulat-Spermatozoen (n=320)

Bei den Frauen < 35 Jahren unterscheidet sich die Höhe der Abortraten nur geringfügig in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen. Schwangerschaften nach Transfer von einem oder zwei Embryonen führen in 5,9% und 10,6% zum Abort. Nach Transfer von drei Embryonen ist dies in 9,8% der Fall ($p < 0,788$, n. s.).

In Abbildung 19 sind die Abortraten bei den Frauen ≥ 35 Jahren nach erfolgter ICSI-Behandlung unter Verwendung von Ejakulat-Spermatozoen veranschaulicht.

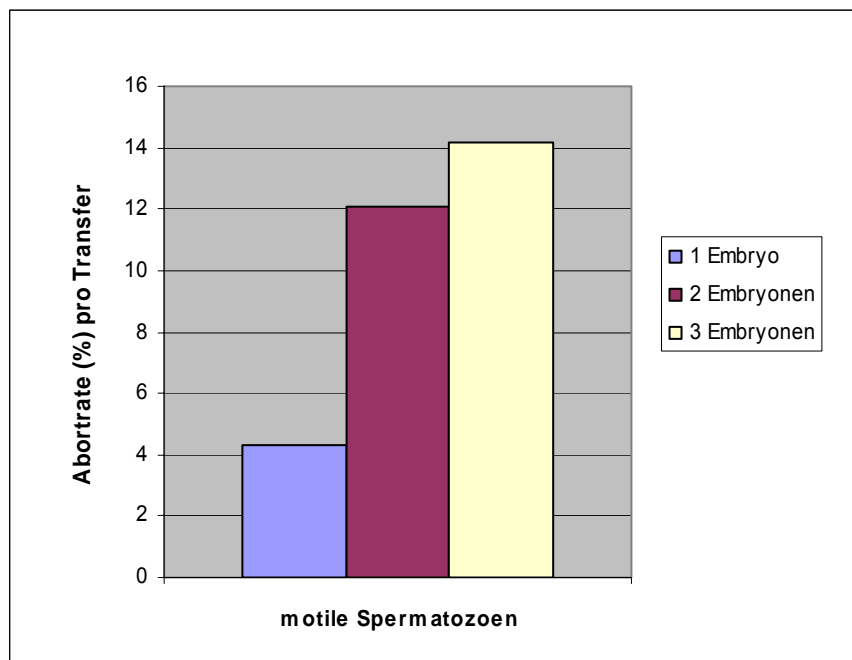


Abbildung 19: Abortrate (%) in Abhängigkeit von der transferierten Embryonenanzahl bei Frauen ≥ 35 Jahren nach erfolgter ICSI-Behandlung mit Ejakulat-Spermatozoen (n=629)

Wie ersichtlich, enden bei den ≥ 35 Jahre alten Frauen Schwangerschaften nach Transfer eines Embryos in 4,3% mit einem Abort. Dieser Anteil erhöht sich in der Gruppe der nach zwei transferierten Embryonen schwanger gewordenen Frauen auf 11,6% und bei drei Embryonen auf 14,2%. Der Unterschied der Abortraten ist statistisch nicht signifikant ($p < 0,159$).

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, mögliche Unterschiede zwischen den ICSI-Behandlungen mit kryokonservierten testikulären Spermatozoen und frischen Ejakulat-Spermatozoen in Abhängigkeit von der Spermatozoenmotilität und der Anzahl der transferierten Embryonen festzustellen. Hierzu wurden die Fertilisations-, Schwangerschafts-, Geburten- und Abortraten sowie das Alter der Frauen in die Untersuchungen einbezogen. Darüber hinaus wurde der Einfluss des histologischen Befundes der entnommenen Hodengewebsprobe auf das Behandlungsergebnis untersucht.

Die Schwere der männlichen Fertilitätsstörung gibt den Ausschlag darüber, ob die ICSI-Behandlung mit frischen Ejakulat-Spermatozoen oder mit Kryo-TESE-Spermatozoen durchgeführt werden kann. Obwohl in beiden Kollektiven im Vergleich zu ungestörter männlicher Fertilität erhebliche pathologische Abweichungen vorliegen, ist die Störung im Kryo-TESE-Kollektiv noch gravierender, da bei nicht-obstruktiver Azoospermie (NOA) im Hodengewebe oft nur vereinzelt kleine Foci mit noch vorhandener Spermatogenese angetroffen werden.

4.1 Fertilisationsrate

Für die Untersuchungen in der **Kryo-TESE-ICSI-Gruppe** wurden die operativ gewonnenen Spermatozoen nach ihrer Beweglichkeit in drei Untergruppen eingeteilt: *motil*, *teils immotil* und *immotil*. Eine Einteilung in die TI-Gruppe (*teils immotile* Spermatozoen) war aufgrund der praktischen Gegebenheiten erforderlich, da in einigen testikulären Gewebeproben neben immotilen auch motile Spermatozoen gefunden wurden. Für die ICSI-Behandlung wurden dann, sofern allein ausreichend, die motilen Spermatozoen aufgrund deren besseren Fertilisationsprognose genutzt.

Die im Deutschen IVF-Register (DIR) wiedergegebene Fertilisationsrate bei 192371 ICSI behandelten Oozyten ohne TESE oder Kryo-TESE liegt bei 63,17% [DIR, Jahrbuch 2004]. Bei Anwendung von TESE- oder Kryo-TESE-Spermatozoen in 1772 Behandlungszyklen wird die Fertilisationsrate mit 91,03% angegeben. Diese Angabe bezieht sich jedoch nicht, wie üblich, auf die Anzahl der injizierten Oozyten, sondern auf die Anzahl der Behandlungszyklen. In diesen Zyklen musste mindestens eine

Oozyte fertilisiert sein. Ein direkter Vergleich mit den hier vorliegenden Befunden ist auch aufgrund der im DIR fehlenden differenzierten Darstellung in Abhängigkeit von der Spermatozoenqualität nicht möglich.

In der eigenen Untersuchung lag die Fertilisationsrate pro Oozyte bei den **Frauen unter 35 Jahren** in allen Motilitätsgruppen um 45,0% (*motil*: 48,5%, *teils immotil*: 49,0%, *immotil*: 44,5%, n.s.). Der statistisch nicht nachweisbare Unterschied der Motilität auf die Fertilisationsrate bei den Frauen unter 35 Jahren könnte Ausdruck der größeren „Reparationsfähigkeit“ jüngerer Oozyten im Vergleich zu älteren sein, durch die störende Spermatozoeneinflüsse kompensiert werden könnten.

Für die **Frauen über 35 Jahren** sind statistisch hoch signifikante Unterschiede bei den Fertilisationsraten pro Oozyte in Abhängigkeit von der Spermatozoenmotilität zu verzeichnen. Bei der Verwendung *motiler* Spermatozoen liegt die Fertilisationsrate mit 59,3% am höchsten, bei *teils immotilen* Spermatozoen um 46,6% und bei *immotilen* Spermatozoen mit 31,6% am niedrigsten. Dieses Resultat lässt sich als Ausdruck der an die Spermatozoenmotilität gekoppelten Vitalität werten. Die bessere Fertilisationsrate bei Verwendung von motilen Spermatozoen unterstreicht die Bedeutung des Parameters „Motilität“ (=Vitalität) für die Befruchtung. Auf den Zusammenhang zwischen Motilität der Spermatozoen und pathomorphologischen Veränderungen der Spermatogenese wird durch die vorliegenden Untersuchungen erstmals hingewiesen. Die pathomorphologischen Veränderungen, die durch den modifizierten histologischen Score-Count nach Johnsen beschrieben werden, führen bei stärkerer Ausprägung zu einem statistisch signifikanten Verlust *motiler* und einer Zunahme des Anteils der *teils immotilen* und *immotilen* Spermatozoen in den Hodenbiopsaten. Bei weniger ausgeprägten pathomorphologischen Veränderungen nimmt der Anteil der *motilen* gegenüber den *teils immotilen* und *immotilen* Spermatozoen in den Biopsieextrakten sprunghaft zwischen Score 8 und 9 zu. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ist die Einbeziehung des modifizierten Johnsen-Scores für die prognostische Einschätzung des Behandlungserfolges von großer Bedeutung.

Die Fertilisationsrate pro Oozyte bei ICSI-Behandlung mit **frischen Ejakulat-Spermatozoen** ergab unabhängig von den Alterskollektiven nahezu identische Werte um 52,0% (Frauen unter 35 Jahre: 52,8%, Frauen über 35 Jahre: 51,6%, n.s.). Die im Deutschen IVF-Register (DIR) angegebenen durchschnittlichen Fertilisationsraten von 63% liegen über unseren Ergebnissen. Verantwortlich hierfür könnte die insgesamt

geringere Ausprägung der männlichen Fertilitätsstörung der im DIR erfassten Patienten sein.

Verheyen *et al.* (2004) geben für die Kryo-TESE-Behandlung Fertilisationsraten von 58,4%. an. Mátyás *et al.* (2005) erzielen bei der Verwendung von kryokonservierten motilen und immotilen Spermatozoen Fertilisationsraten von 66,1% vs. 52,3%. Da letztere Ergebnisse jedoch nur auf 75 untersuchten Zyklen basieren, besitzen diese Befunde eine eingeschränkte statistische Aussagekraft. Unabhängig hiervon konnten die Autoren zeigen, dass die Embryonenqualität schlechter ist, wenn immotile Spermatozoen zur Fertilisation verwendet wurden. Dieses Ergebnis konnte durch die eigenen Untersuchungen bei den Frauen über 35 Jahren der Kryo-TESE-Gruppe und bei der Vergleichsgruppe mit Ejakulat-Spermatozoen bestätigt werden.

4.2 Schwangerschaftsrate

Die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer bei den **Frauen unter 35 Jahren** zeigt, dass bei Verwendung von *motilen* Spermatozoen beim Transfer von ein bzw. zwei Embryonen diese annähernd gleich hoch ist (35,3% bzw. 35,8%). Bei Transfer von drei Embryonen ist die Schwangerschaftsrate mit 48,7% höher (n.s.). Die im DIR von 2004 angegebene durchschnittliche Schwangerschaftsrate bei Frauen unter 35 Jahren liegt in der Nicht-TESE-ICSI-Gruppe um 36% bei Transfer von 2 Embryonen und mindestens Überschuss von zwei Oozyten im Pronukleus-Stadium. Für einen Vergleich sind diese Angaben jedoch nur bedingt geeignet, da in diese Daten die Angaben von 120 deutschen IVF-Zentren eingegangen sind, deren Ergebnisse z. T. erheblich vom Mittelwert abweichen. Vergleichbar hingegen sind unsere Ergebnisse mit denen von Schwarzer *et al.* (2003) und von Verheyen *et al.* (2004), die über Schwangerschaftsraten von 29,0% bzw. 20,8% berichten. Wie bei den eigenen Untersuchungen liegen auch deren Analysen ein längerer Beobachtungszeitraum und eine große Anzahl von Behandlungszyklen zugrunde.

Nach Fertilisation durch *teils immotile* Spermatozoen führt der Transfer von zwei Embryonen zu höheren Schwangerschaftsraten als dies beim Einsatz von *motilen* Spermatozoen der Fall ist (50,0% vs. 35,8%). Statistisch ließ sich dies aufgrund der kleinen Fallzahlen der TI-Gruppe nicht sichern. Es zeigt sich aber, dass hier das männliche Fertilitätspotential sich dann nicht zu unterscheiden scheint, wenn in beiden Gruppen motile Spermatozoen zur ICSI-Behandlung eingesetzt werden können. Da dies

aber nicht immer der Fall ist, könnte eine weitere Erklärung für das günstige Ergebnis der TI-Gruppe unter anderem sein, dass die verwendeten immotilen Spermatozoen dennoch vital waren und dementsprechend zur Befruchtung geführt haben. Durch experimentelle Untersuchungen ließ sich nachweisen, dass nur die immotilen Spermatozoen, die Vitalität aufweisen, auch zur Fertilisation führen [Nagy *et al.*, 1995]. Die Studien von Terriou *et al.* (1993), bei denen immotile, aber vitale Spermatozoen für die subzonale Mikroinjektion eingesetzt wurden, unterstützen die Hypothese, dass die Vitalität der Spermatozoen eine entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche ICSI-Behandlung darstellt.

Deutlich niedrigere Fertilisations- und Schwangerschaftsraten bei Anwendung testikulärer Spermatozoen fanden auch Ben-Yosef *et al.* (1999) und Stalf *et al.* (2005) beim Vergleich von immotilen mit motilen Spermatozoen. Der Einfrier- und Auftauprozess bei Kryo-TESE-Spermatozoen könnte einen Defekt des Zentrosoms nach sich ziehen, dessen Intaktsein Voraussetzung für eine regelrechte Syngamie und frühe Embryonalentwicklung ist [Palermo *et al.*, 1997]. Immotile Spermatozoen sind vermutlich gegenüber Einfrier- und Auftauprozessen weniger resistent als motile Zellformen. Trotz erfolgter Fertilisation ist mit der Entwicklung „qualitativ schlechterer“ Embryonen zu rechnen. Dies könnte eine Ursache der niedrigeren Schwangerschaftsrate sein. Von Bedeutung ist auch die Art der Aufbereitung des testikulären Gewebes. In einer Multicenter-Studie deutscher IVF-Zentren wurde der Einfluss der mechanischen und enzymatischen Spermatozoenpräparation aus Kryo-Hodenbiopsien und frischen Hodenbiopsien untersucht [Baukloh 2002]. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Fertilisationsrate und die Embryonenqualität bei immotilen Spermatozoen nach enzymatischer Gewinnung durch Kollagenase besser ausfallen als nach mechanischer Aufbereitung.

4.2.1 Einfluss der Anzahl transferierter Embryonen

Die bei **Frauen unter 35 Jahren** im DIR mitgeteilten **Schwangerschaftsraten** nach ICSI-Behandlung liegt im Gesamtdurchschnitt bei etwa 30,0%. Wurde als Selektionskriterium der Transfer von zwei Embryonen und ein Überschuss von wenigstens zwei Oozyten im Pronukleusstadium zugrunde gelegt, beträgt diese etwa 35,0%. Der Transfer eines Embryos führte in 15,33%, der von zwei in 32,11% und der von drei Embryonen in 31,33% zum Eintritt einer klinischen Schwangerschaft. Für die

TESE inklusive Kryo-TESE-Gruppe wird die Schwangerschaftsrate im DIR ohne weitere Differenzierung mit 25,34% angegeben.

Dafopoulos *et al.* (2005) finden bei 297 Kryo-TESE-Zyklen weder ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der transferierten Embryonen noch dem Lebensalter der Patientinnen und der Wahrscheinlichkeit für den Eintritt einer Schwangerschaft.

Die hier vorliegenden Befunde zeigen, dass bei Frauen unter 35 Jahren nach Transfer von drei Embryonen bei der M- und TI-Gruppe mit 48,7% und 51,6% die höchsten Schwangerschaftsraten erreicht wurden. In der I-Gruppe hingegen ist dieser Trend nicht nachweisbar. Unabhängig davon, ob zwei oder drei Embryonen transferiert wurden, liegen die Schwangerschaftsraten mit 15,5% bzw. 11,5% niedrig und unterscheiden sich praktisch nicht voneinander. Der Unterschied der Schwangerschaftsraten im Vergleich zur M- und TI-Gruppe hingegen ist statistisch hoch signifikant (*motil*: $p < 4,2 \cdot 10^{-6}$; *teils immotil*: $p < 0,5 \cdot 10^{-3}$). Auch Mátyás *et al.* (2005) finden bei ihren Untersuchungen deutliche Unterschiede für die Höhe der Schwangerschaftsrate bei Verwendung motiler Spermatozoen mit 21,8% im Vergleich zu immotilen Spermatozoen. Schwangerschaften nach Mikroinjektion immotiler Spermatozoen beobachten diese Autoren nicht. Sie weisen aber eine signifikante Zunahme der Schwangerschaftsraten mit steigender Anzahl der transferierten Embryonen guter Qualität nach. Untersuchungen über den Ausgang dieser Schwangerschaften haben die Autoren nicht durchgeführt.

Casper *et al.* (1996) berichten in Übereinstimmung mit den hier vorhandenen Befunden über erzielte Schwangerschaften mit nachfolgender Geburt bei Verwendung immotiler Spermatozoen. Moghadam *et al.* (2005) hingegen finden keinen statistischen gesicherten Unterschied in Abhängigkeit von der Spermatozoenmotilität für die Fertilisations- und Schwangerschaftsraten. Auch weisen diese Autoren keinen Unterschied in Bezug auf die genannten Erfolgskriterien zwischen obstruktiver und nicht-obstruktiver männlicher Fertilitätsstörung nach. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss jedoch die geringe Anzahl der über einen Zeitraum von 1995 bis 2004 beobachteten Behandlungszyklen von nur 100 berücksichtigt werden.

Die ab dem ungefähr **35. Lebensjahr** der Frau ansteigende Aneuploidierate und Veränderung des Spindelapparates der Oozyten ist entscheidend für die Reduktion der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate im Vergleich zu jüngeren Frauen [Munne *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2005]. Von diesen chromosomalen Fehlverteilungen ereignen sich 70% während der mütterlichen Meiose [Lenzi *et al.*, 2005]. Eine Ursache für die erhöhte Aneuploidierate bei Frauen über 35 Jahren können

DNS-Mutationen in den Mitochondrien der Oozyte sein [Bartmann *et al.*, 2004]. Des Weiteren könnten auch sog. Cohäsine für einen höheren Anteil von aneuploiden Oozyten bzw. Embryonen bei älteren Frauen verantwortlich sein. Diese führen zu einer Störung der molekularen Chromatinkohäsion und letztlich zu Aneuploidien [Pellestor 2004].

Durch die hier vorliegenden Untersuchungen wird deutlich, dass die Schwangerschaftsrate für die M-Gruppe bei Frauen über 35 Jahren mit steigender Anzahl der transferierten Embryonen (ein Embryo: 13,3%, zwei Embryonen: 33,3%, drei Embryonen: 48,0%) zunimmt. In der TI-Gruppe liegen die entsprechenden Schwangerschaftsraten (0,0%, 20,0%, 31,0%) niedriger. Diese wiederum sind bei dem Einsatz von *immotilen* Spermatozoen noch geringer (0,0%, 11,1%, 20,0%). Die Tendenz ist jedoch in allen drei Gruppen einheitlich. Bei Transfer von mehr als nur einem Embryo kommt es mit größerer Wahrscheinlichkeit auch zum Transfer von genetisch normalen Embryonen und damit zum besseren Behandlungserfolg.

Eine Unterscheidung der untersuchten Patientinnen nach ihrem Alter wird nur in wenigen Publikationen vorgenommen. Altay *et al.* (2002) fanden nach TESE-ICSI-Behandlung bei Frauen im Alter von 20 bis 29 Jahren Schwangerschaftsraten von 30,6%, bei 30 bis 34 Jahre alten Frauen von 20,7% und bei Frauen über 35 Jahren von 15,2%. Die einzelnen Altersgruppen umfassten jedoch nur 32, 41 bzw. 31 Patientinnen, so dass aufgrund der kleinen Fallzahl und der Tatsache, dass es sich um frische TESE-Spermatozoen handelte, eine direkte Vergleichbarkeit mit unseren Befunden nicht gegeben ist.

Bei Verwendung von **frischen Ejakulat-Spermatozoen** aus der Vergleichsgruppe wird bei den **Frauen unter 35 Jahren** nach Transfer von einem Embryo eine Schwangerschaftsrate von 26,3% erzielt, die nach Transfer von zwei bzw. drei Embryonen mit 56,2% bzw. 49,0% vergleichsweise höher liegt. Diese Unterschiede konnten statistisch jedoch nicht gesichert werden.

Bei den **Frauen über 35 Jahren** lässt sich, wie auch bei den Fertilisationsraten, wiederum eine einheitliche Tendenz erkennen. Es kann gezeigt werden, dass mit zunehmender Anzahl der transferierten Embryonen die Schwangerschaftsrate ansteigt (8,5% bzw. 36,3% bzw. 51,8% bei ein, zwei bzw. drei Embryonen). Diese Unterschiede sind statistisch hoch signifikant. Die im DIR mitgeteilte Schwangerschaftsrate der 36

bis 40 jährigen Frauen nach ICSI-Behandlung und Transfer von ein, zwei oder drei Embryonen beträgt 11,5%, 27,5% bzw. 30,5% und für die über 40 Jahre alten Frauen 7%, 12,9% bzw. 17%.

4.3 Geburtenrate

Wie auch nach spontaner Konzeption liegt bei assistierter Reproduktion die Geburtenrate niedriger als die Schwangerschaftsrate.

Dem Verlust einer Schwangerschaft vor der Geburt eines Kindes liegen unterschiedliche Ursachen zugrunde. Die meisten Schwangerschaften gehen im ersten Trimenon der Gravidität verloren. Verantwortlich hierfür sind in erster Linie genetische Ursachen. Für den Verlust fortgeschrittener Schwangerschaften sind genetische Störungen selten; im Vordergrund stehen dann Störungen wie Plazentainsuffizienz, Nabelschnurkomplikationen und Infektionen [Hinney 2001]. Für die genetischen Störungen, die mit einem Verlust der Schwangerschaft einhergehen, sind Aneuploidien von Oozyten und Spermatozoen verantwortlich. Das Auftreten von Aneuploidien in den Oozyten und Embryonen weist eine eindeutige Zunahme mit dem Alter der Frau auf [Munne *et al.*, 1995]. Eine entsprechende Altersabhängigkeit zeigt sich auf männlicher Seite nicht [Kumtepe *et al.*, 2003]. Bei Männern mit ausgeprägten Fertilitätsstörungen ist jedoch mit einer erhöhten Aneuploidierate der Spermatozoen zu rechnen [Calogero *et al.*, 2001]. Über den Einsatz der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) zur Abschätzung der Aneuploidierate der Spermatozoen liegen bereits Ergebnisse vor [Rives *et al.*, 2004, Rives 2005].

Bei dem **Frauenkollektiv unter 35 Jahren** unterscheiden sich die Geburtenraten pro Embryotransfer in der M-Gruppe nur marginal. Eine eindeutige Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen wird nicht ersichtlich. Nach Transfer von zwei Embryonen liegen die Geburtenraten niedriger als nach einem oder drei transferierten Embryonen (29,4%, 25,8%, 33,1%, n. s.).

Bei den Frauen aus der TI-Gruppe lag die Geburtenrate nach Transfer von zwei bzw. drei Embryonen auf identisch hohem Niveau von 37,0%. Damit liegt die Geburtenrate pro Embryotransfer in der TI-Gruppe insgesamt höher als im M-Vergleichskollektiv. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Auch aufgrund der kleinen Fallzahlen der TI-Gruppe wird das Ergebnis relativiert. Allerdings muss ebenfalls bedacht werden, dass trotz des noch jungen Lebensalters der Patientinnen die

Oozytenqualität nicht durchweg gut sein muss. Auch andere Faktoren können sich nachteilig auswirken. Hierzu zählen z.B. androgenabhängige Ovarialfunktionsstörungen, Insulinresistenz sowie Fertilisationsgifte wie Nikotin, zyklische Kohlenwasserstoffe und Dioxin.

Die Geburtenraten nach ICSI-Behandlung mit *immotilen* Spermatozoen sind niedrig: 5,7% nach Transfer von zwei bzw. 7,7% nach Transfer von drei Embryonen. Hier spiegelt sich die Schwere der männlichen Fertilitätsstörung wieder. Die Geburtenraten der I-Gruppe und der TI-Gruppe unterscheiden sich sowohl nach Transfer von zwei als auch von drei Embryonen statistisch hoch signifikant; im Vergleich zur M-Gruppe ist dieser Unterschied nur nach Transfer von drei Embryonen hoch signifikant.

Bei den **Frauen über 35 Jahren** ist bei der Geburtenrate eine typische Tendenz hinsichtlich der Spermatozoenqualität und transferierter Embryonenanzahl zu erkennen. Bei Verwendung *motiler* Spermatozoen werden die insgesamt höchsten Geburtenraten nachgewiesen. Nach Transfer von drei Embryonen liegt die Erfolgsrate mit 33,7% höher als nach Transfer von zwei Embryonen (23,8%, n. s.). In der TI-Gruppe kommt es noch in 20,0% nach Transfer von zwei und in 24,1% nach Transfer von drei Embryonen zur Geburt. Damit ist die Geburtenrate in der TI-Gruppe vergleichsweise niedriger als in der M-Gruppe. Noch deutlicher wird der Einfluss des Alters der Oozyten in Verbindung mit der Spermatozoenmotilität auf die Geburtenrate in der I-Gruppe sichtbar, die nach Transfer von zwei Embryonen nur noch bei 11,1% (n.s.) liegt. Es lässt sich postulieren, dass die Schwere der männlichen Fertilitätsstörung mit zunehmendem Alter der Oozyten sich deutlicher niederschlägt.

Die im DIR 2004 mitgeteilte pauschale Geburtenrate nach TESE und Kryo-TESE bei 397 Schwangerschaften beträgt 47,10%. Schwarzer *et al.* (2003) ermittelten bei Männern mit nicht-obstruktiven Azoospermie (NOA) die niedrigste Geburtenrate mit 19%. Bei obstruktiver Azoospermie (OA) lag die Geburtenrate bei 27% und bei Ejakulationsversagen bei 33%.

Bei der **ICSI-Behandlung mit frischen Ejakulat-Spermatozoen** bei **Frauen unter 35 Jahren** endet die erzielte Schwangerschaft nach Transfer von zwei bzw. drei Embryonen in 42,2% bzw. 36,8% mit einer Geburt und liegt damit höher als nach Transfer nur eines Embryos mit 11,8%. Bei den **über 35 Jahre alten Frauen** steigt die Höhe der Geburtenrate deutlich in Abhängigkeit davon, ob ein, zwei oder drei

Embryonen transferiert wurden (2,2%, 24,2% bzw. 35,4%). Die sehr niedrige Geburtenrate nach Transfer von einem Embryo unterscheidet sich statistisch hoch signifikant im Vergleich zum Transfer von zwei bzw. drei Embryonen. Der Unterschied zwischen dem Transfer von zwei und drei Embryonen ist hingegen statistisch nicht signifikant. Beim Vergleich der Geburtenraten, die im DIR angegeben sind, wird der Schweregrad der männlichen Fertilitätsstörungen der hier vorliegenden Untersuchungen deutlich. So resultieren bei den vorliegenden Untersuchungen vergleichsweise niedrigere Geburtenraten pro klinische Schwangerschaft, als dies im DIR 2004 für die alleinige Ejakulat-Spermatozoen-ICSI-Gruppe mit 44,71% der Fall ist.

4.4 Abortrate

Die Abortrate ist altersabhängig und steigt jenseits des 35. Lebensjahres deutlich an. Auskunft über die Abortrate pro klinische Schwangerschaft nach ICSI-Behandlung ohne TESE in Abhängigkeit vom Lebensalter und der Anzahl der übertragenen Embryonen bietet das Deutsche IVF-Register 2004. Die Abortrate beträgt nach dieser Quelle für alle ICSI-Behandlungen 24,76% nach Transfer eines Embryos, 18,96% nach Transfer zweier und 21,81% nach Transfer von drei Embryonen. Bei den Frauen im Alter von 20 bis 34 Jahren liegen die Abortraten 20,5%, 16,3% bzw. 16,0% nach Transfer von jeweils ein, zwei bzw. drei Embryonen. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen bei den **Frauen unter 35 Jahren** unabhängig von der Spermatozoenmotilität eine niedrige Abortrate um 10,0%. Ein Zusammenhang zwischen Anzahl der transferierten Embryonen und Abortrate lässt sich nicht nachweisen.

Bei den **Frauen über 35 Jahren** ist der altersabhängige Anstieg der Abortrate nur bei Einsatz *immotiler* Spermatozoen nachweisbar und beträgt in dieser Gruppe 20,0%. In der M- und TI-Gruppe lässt sich der zu erwartende altersabhängige Anstieg der Abortrate hingegen nicht belegen.

Im Vergleichskollektiv der **ICSI-Behandlungen mit frischen Ejakulat-Spermatozoen** unterscheiden sich bei **Frauen unter 35 Jahren** die Abortraten in ihrer Höhe nicht in Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen und auch nicht vom Kryo-TESE-Kollektiv. Das gleiche trifft für die **Frauen über 35 Jahren** zu. Nach dem Transfer eines Embryos enden in diesem Kollektiv in 4,3% die Schwangerschaften mit einem Abort. Bei zwei Embryonen erhöht sich der Anteil der Abortrate auf 11,6% bzw.

bei drei Embryonen auf 14,2%. Die im DIR 2004 zusammengefassten Daten für Frauen vom 35. bis 39. Lebensjahr ergeben höhere Abortraten von 24,6%, 24,5% bzw. 23,5% nach Transfer eines, zweier bzw. dreier Embryonen. In der Gruppe der Frauen über 40 Jahre liegt die Abortrate nach dieser Quelle bei 38%. Aufgrund der zahlreichen Faktoren, die für diese Unterschiede infrage kommen können, lässt sich eine plausible Erklärung nicht zwanglos finden. Die Höhe der Abortrate nach TESE wird im DIR mit 30,8% und nach Kryo-TESE-Behandlung mit 20,8% angegeben.

5 Zusammenfassung

Vor der Einführung der Kryo-TESE-ICSI-Behandlung war bei Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie (NOA) eine Therapie der Sterilität nicht möglich. Durch die Kryo-TESE-ICSI-Methode gelingt es mit funktionell noch nicht voll ausgereiften testikulären Spermatozoen Oozyten zu fertilisieren und dadurch ähnlich gute Ergebnisse zu erzielen, wie dies mit frischen Ejakulat-Spermatozoen der Fall ist. Die Kombination der testikulären Spermatozoenextraktion (TESE) mit der Kryokonservierung ermöglicht die Durchführung mehrerer intrazytoplasmatischer Spermatozoeninjektionen (ICSI) nach nur einem operativen Eingriff.

Von den insgesamt 788 durch Kryo-TESE-ICSI behandelten Frauen waren 574 jünger und 214 älter als 35 Jahre. Die zur Fertilisation angewandten Kryo-TESE-Spermatozoen wurden aufgrund ihrer Motilitätseigenschaften in die Gruppen *motil* (M-Gruppe), *teils motil* (TI-Gruppe) und *immotil* (I-Gruppe) eingeteilt. Das Vergleichskollektiv unter Anwendung von frischen Ejakulat-Spermatozoen umfasste insgesamt 1014 Frauen, von denen 341 jünger und 673 älter als 35 Jahre waren.

Bei den **Frauen unter 35 Jahren** wurden in der M- und TI-Gruppe ähnlich hohe Fertilisations- (48,5% vs. 49,0%), Schwangerschafts- (48,7% vs. 51,6%) und Geburtenraten (33,1% vs. 36,7%) erzielt, wie bei der Behandlung mit frischen Ejakulat-Spermatozoen. Eine eindeutige Abhängigkeit von der Anzahl der transferierten Embryonen war nicht vorhanden. Bei Verwendung *immotiler* Spermatozoen wurden dagegen vergleichsweise deutlich geringere Behandlungsergebnisse erzielt. Die Unterschiede sind statistisch signifikant. Die Abortrate war für alle Gruppen (um 10,0%) niedrig.

Bei den **Frauen über 35 Jahren** steigt die Höhe der Fertilisationsrate mit zunehmender Motilität (*immotil* 31,6%, *teils immotil* 46,6%, *motil* 59,3%) der Kryo-TESE-Spermatozoen an. Die Unterschiede sind statistisch hoch signifikant. Ebenso weisen die Schwangerschafts- und Geburtenrate in dieser Altersgruppe einen Anstieg in Abhängigkeit von der Spermatozoenmotilität und der Anzahl der transferierten Embryonen auf (Schwangerschaftsrate: *immotil* 20,0%, *teils immotil* 31,0%, *motil* 48,0% nach Transfer von drei Embryonen; Geburtenrate: *immotil* 0%, *teils immotil* 24,1%, *motil* 33,7% nach Transfer von drei Embryonen). Die Mikroinjektion *immotiler*

Spermatozoen führt zu einer statistisch signifikanten Verschlechterung der Behandlungsergebnisse. Mit frischen Ejakulat-Spermatozoen werden bei der ICSI-Behandlung vergleichbar gute Ergebnisse erzielt, wie durch die Mikroinjektion *motiler* oder *teils immotiler* Kryo-TESE-Spermatozoen.

Ab dem 35. Lebensjahr der Patientinnen stellen das Alter der aspirierten Oozyten, die Anzahl der transferierten Embryonen und die Schwere der männlichen Fertilitätsstörung wichtige Prognoseparameter für die Abschätzung des Behandlungserfolges dar.

Durch die vorliegenden Untersuchungen wird erstmalig ein Zusammenhang zwischen Motilität der Spermatozoen und pathomorphologischen Veränderungen der Spermatogenese nachgewiesen. Diese Veränderungen werden durch einen modifizierten histologischen Score-Count nach Johnsen beschrieben. Bei stärkeren pathomorphologischen Veränderungen ist ein statistisch signifikanter Verlust *motiler* und eine Zunahme des Anteils der *teils immotilen* bzw. *immotilen* Spermatozoen in den Hodenbiopsaten zu verzeichnen. Bei weniger ausgeprägten pathomorphologischen Veränderungen nimmt der Anteil der *motilen* gegenüber den *teils immotilen* bzw. *immotilen* Spermatozoen in den Biopsieextrakten sprunghaft zwischen Score 8 und 9 zu. Die Einbeziehung des modifizierten Johnsen-Scores erlangt somit für die prognostische Einschätzung des Behandlungserfolges wesentliche Bedeutung.

Aufgrund der Aufteilung der Patienten in Untergruppen stehen trotz der hohen Ausgangszahlen teilweise nur kleine Fallzahlen zur Verfügung, so dass die Aussagekraft der statistischen Berechnungen in diesen Fällen eingeschränkt ist. Ein Vergleich mit den in der Literatur mitgeteilten Befunden war nur bedingt möglich, da bislang keine Studie mit einem entsprechenden Differenzierungsgrad publiziert worden ist.

6 Literaturverzeichnis

Abuzeid MI, Chan YM, Sasy MA, Basata S, Beer M (1995) Fertilization and pregnancy achieved by intracytoplasmatic injection of sperm retrieved from testicular biopsies. *Fertil Steril* 64: 644-646

Altay B, Kefi A, Tavmergen E, Cikili N, Semerci B, Tavmergen Goker E (2002) The effects of female age on the outcome of testicular sperm extraction and intracytoplasmatic sperm injection in infertile patient with azoospermia. *Internat Urol Nephrol* 33: 95-99

Bartmann AK, Romano GS, Ramos ES, Ferriani RA (2004) Why do older women have poor implantation rates? A possible role of mitochondria. *J Assist Reprod Genet* 21: 79-83

Baukloh V, German Society for Human Reproductive Biology (2002) Retrospective multicentre study on mechanical and enzymatic preparation of fresh and cryopreserved testicular biopsies. *Hum Reprod* 17: 1788-1794

Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I, Lessing JB, Amit A (1999) Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 14: 1794-1801

Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL (2000) Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod* 15: 2165-2172

- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R (2001) High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 16: 1433-1439
- Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML (1996) The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 65: 972-976
- Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munne S, Levron J, Wu L, Brenner C, Warner C, Willadsen S (1998) Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Molecular Hum Reprod* 4: 269-280
- Collins J, Crosignani PG et al. [ESHRE Capri Workshop Group] (2005) Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 11: 261-276
- Crabbe E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC (1997) The use of enzymatic procedures to recover testicular germ cells. *Hum Reprod* 12: 1682-1687
- Dafopoulos K, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Orief Y, Schöpfer B, Nikolettos N, Diedrich K, Al-Hasani S (2005) Factors affecting outcome after ICSI with spermatozoa retrieved from cryopreserved testicular tissue in non obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online* 10: 455-460
- De Kretser DM, Holstein AF (1976) Testicular biopsy and abnormal germ cell. In Hafez, E.S.E. (ed) *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. Mosby, St. Louis, pp. 332-343
- DIR (2004) *Deutsches IVF-Register, Jahrbuch, Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (Hrsg.), Ärztekammer Schleswig-Holstein, Bad Segeberg*
- Ezeh UI, Taub NA, Moore HD, Cooke ID (1999) Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 14: 1005-1012

- Gil-Salom M, Minguez Y, Rubio C, Remohi J, Pellicer A (1995) Intracytoplasmatic testicular sperm injection: an effective treatment for otherwise intractable obstructive azoospermia. *J Urol* 154: 2074-2077
- Hinney B (2001) Habituelle Abortneigung. Abklärung und Therapie. *Gynäkologe* 34: 339-356
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 107-123
- Jezek D, Knuth UA, Schulze W (1998) Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod* 13: 1230-1234
- Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2-25
- Kumtepe Y, Yakin K, Kahraman S, Sertyel S, Vanlioglu F, Cengiz S, Dönmez E (2003): Male age is not an independent factor to affect the outcome of assisted reproductive techniques. *Intern Journal Andrology* 26: 161-165
- Lenzi ML, Smith J, Snowden T, Kim M, Fishel R, Poulos BK, Cohen PE (2005): Extreme heterogeneity in the molecular events leading to establishment of chiasmata during meiosis in human oocytes. *Am J Hum Genet* 76: 112-127
- Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J (2001) Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in-vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 76: 479-484

- Martin RH , Greene C, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Chernos J (2000)
Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 15: 1121-1124
- Mátyás Sz, Papp Gy, Kovács P, Balogh I, Rajczy K, Kopa Zs, Bernard A, Kováts T, Krizsa F, Szmátóna G, Gáti I, Kaali SG (2005) Intracytoplasmatic sperm injection with motile and immotile frozen-thawed testicular spermatozoa (the Hungarian experience). *Blackwell Publishing Ltd. Andrologia* 37: 25-28
- Moghadam KK, Nett R, Robins JC, Thomas MA, Awadalla SG, Schreiber MD, Williams DB (2005) The motility of epididymal or testicular spermatozoa does not directly affect IVF/ICSI pregnancy outcomes. *J Androl* 26: 619-623
- Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oates RD (1997)
Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology* 49: 91-95
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1996): Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Int J Gynecol Obstet* 52: 329-329
- Nagy Z, Liu J, Janssenwillen C, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995)
Comparison of fertilization, embryo development and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular sperm. *Fertil Steril* 63: 808-815
- Nijs MH, Van Der Elst CJ (2000) Biological aspects of testicular sperm extraction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92: 1-6
- Osmanagaoglu K, Vernaev V, Kolibianakis E, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Devroey P (2003) Cumulative delivery rates after ICSI treatment cycles with freshly retrieved testicular sperm: a 7-year follow-up study. *Hum Reprod* 18: 1836-1840

- Palermo GD, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340: 17-18
- Palermo GD, Colombero LT, Rosenwaks Z (1997) The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod* 2: 19-27
- Pellestor F (2004): Maternal age and chromosomal abnormalities in human oocytes. *Med Sci (Paris)* 20: 691-706
- Redgment CJ, Yang D, Tsirigotis M, Yazdani N, Al Shawaf T, Craft IL (1994) Experience with assisted fertilization in severe male factor infertility and unexplained failed fertilization in vitro. *Hum Reprod* 9: 680-683
- Rives NM, Mousset-Simeon N, Sibert L, Duchesne V, Mace L, Milazzo JP, Mazurier S, Mace B (2004) Chromosome abnormalities of spermatozoa. *Gynecol Obstet Fertil* 32: 771-778
- Rives NM (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111: 358-362
- Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF, Schulze W (1996) A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Hum Reprod* 11: 752-755
- Schulze W, Knuth UA, Jezek D, Benson DM, Fischer R, Naether OGJ, Baukloh V, Ivell R (1997) Intratesticular sperm extraction. Basis for a successful treatment of infertility men with ejaculatory azoospermia. In Ivell, R. and Holstein, A.F. (eds) *The Fate of the Male Germ Cell*. Plenum Press, New York, USA, pp.81- 87.
- Schulze W, Hohenberg H, Knuth UA (1998) Cryopreservation of testicular tissue: a highly effective method to provide sperm for successful TESE/ ICSI procedures. In

- Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Young JB (eds) Fertility and Reproductive Medicine. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 621-626
- Schulze W, Thoms F, Knuth UA (1999) Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod* 14: 82-96
- Schwarzer JU, Fiedler K, von Hertwig I, Krüsmann G, Würfel W, Schleyer M, Mühlen B, Pickl U, Löchner-Ernst D (2003) Sperm retrieval procedures and intracytoplasmatic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. *Urol Int* 70: 119-123
- Seo JT, Ko WJ (2001) Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl* 24: 306-310
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P (1995) High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmatic sperm injection with spermatozoa obtained from testicular biopsy. *Hum Reprod* 10: 148-152
- Stalf T, Mehnert C, Hajimohammad A, Manolopoulos K, Shen Y, Schuppe HC, Diemer T, Schill WB, Weidner W, Tinneberg HR (2005) Influence of motility and vitality in intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Andrologia* 37: 125-130
- Terriou P, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Carlon N, Navarro A, Roulier R (1993) Subzonal sperm insemination and total or extreme asthenozoospermia: an effective treatment for an uncommon cause of male infertility. *Fertil Steril* 60: 1057-1061
- Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Goossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P (1997) Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients. *Hum Reprod* 12: 80-86

- Tucker MJ, Morton PC, Witt MA, Wright G (1995) Intracytoplasmatic injection of testicular and epididymal spermatozoa for treatment of obstructive azoospermia. Hum Reprod 10: 486-489
- Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Janssenwillen C, Staessen C, Verheyen G, Camus M, Tournaye H, Devroey P (1998) Results of intracytoplasmatic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. Hum Reprod 13: 134-142
- Verheyen G, De Croo I, Tournaye H, Pletinex I, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995) Comparison of four mechanical methods to retrieve spermatozoa from testicular tissue. Hum Reprod 10: 2956-2959
- Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, Tournaye H, Van Steirteghem AC (1997) Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. Fertil Steril 67: 74-80
- Verheyen G, Vernaev V, Van Landuyt T, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem AC (2004) Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia? Hum Reprod 19: 2822-2830
- Vernaev V, Tournaye H, Osmanagaoglu K, Verheyen G, Van Steirteghem AC, Devroey P (2003) Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. Fertil Steril 79: 529-533
- Weiß C (2002) Basiswissen Medizinische Statistik, 2. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York

7 Glossar

DIR.....	Deutsches IVF-Register
Ejakulat-ICSI-Gruppe.....	Patientinnen, bei denen frische Ejakulat-Spermatozoen zur Injektion in die Oozyten verwendet wurden
ESG.....	Embryonenschutzgesetz
FCH.....	Fertility Center Hamburg
FISH.....	Fluoreszenz-in situ-Hybridisation
HCG.....	Humanes Choriongonadotropin (HCG)
ICSI.....	Intrazytoplasmatische Spermatozoen-Injektion
IVF.....	In-vitro-Fertilisation
Kryo-TESE-ICSI-Gruppe.....	Patientinnen, bei denen kryokonservierte Spermatozoen nach TESE zur Injektion in die Oozyten verwendet wurden
Motilität.....	Vitalitätsfaktor der Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden eingeteilt in: <i>motil</i> (M-Gruppe), <i>teils immotil</i> (TI-Gruppe), <i>immotil</i> (I-Gruppe)
NOA.....	nicht-obstruktive Azoospermie
n.....	Anzahl
n. s.	Statistisch nicht signifikant
OA.....	obstruktive Azoospermie
OAT.....	Oligo-Astheno-Teratozoospermie
PVP.....	Polyvinylpyrrolidone
TESE.....	Testikuläre Spermatozoen-Extraktion
UKE.....	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
vs.	versus

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Schulze, Direktor der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die Überlassung des Themas und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Den Herren Dr. med. (IL) R. Fischer, Dr. med. O.G.J. Naether und Prof. Dr. med. K. Rudolf, Fertility Center Hamburg (FCH), danke ich für die Überlassung der Patientinnen-Daten.

Bei Frau Dipl.-Biol. Vera Baukloh, FCH, möchte ich mich für die Beratung, insbesondere bei den mathematisch-statistischen Auswertungen, bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bettina Rudolf
Geburtsdatum/ort: 02.03.1978/ Rostock
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984-1991 St.- Georg- Schule Rostock
1992-1994 Gymnasium am Goetheplatz in Rostock
1994-1997 Heisenberg- Gymnasium in Hamburg
06/1997 Abitur

Hochschulausbildung

1997-2003 Studium im Fachbereich Zahnmedizin am
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
18.10.1998 Naturwissenschaftliche Prüfung
01.10.2000 Prüfung für die Zahnärztliche Vorprüfung
11.07.2003 Zahnärztliche Prüfung/ Staatsexamen
07/2003 Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

01.01.2004-15.10.2005 Assistenz Zahnärztin bei Dipl. Stom. Dürfeldt in
Rosswein
Seit 17.10.2005 Assistenz Zahnärztin bei Dr. Assig in Dresden

Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht mit einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 02.02.2006

Bettina Rudolf