

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

**Klinisch experimentelle Untersuchungen zum prädiktiven Wert
der Apoptoseaktivitätsbestimmung mittels
Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) an Cumuluszellen im
Rahmen der assistierten Fertilisation**

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

vorgelegt von
Katinka Rüping
aus Kiel

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ricardo Felberbaum

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Ekkehard Vollmer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.12.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	8
1.1 Die intracytoplasmatische Spermieninjektion	9
1.2 Hormonelle Stimulation	11
1.2.1 Gonadotropine	11
1.2.2 GnRH-Agonisten.....	12
1.2.3 GnRH-Antagonisten.....	13
1.3 Cumuluszellen	15
1.4 Apoptose.....	17
1.5 Comet Assay.....	19
2 Problemstellung	21
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Studienteilnehmer	22
3.2 Gewinnung der Oozyten	22
3.3 Gewinnung der Cumuluszellen	25
3.4 Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay).....	25
3.5 Korrelation der Apoptoseaktivität mit Faktoren der Sterilitätsbehandlung....	27
3.6 Statistische Auswertung	27
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Bestimmung der Korrelation zwischen dem Ausgang der Sterilitätsbehandlung und der Apoptoseaktivität.....	29
4.1.1 Zusammenhang vom Eintritt einer Schwangerschaft und der apoptotischen Aktivität aller Cumuli einer Patientin.....	29
4.1.2 Korrelation der Eizellfertilisierungsrate mit der Apoptoseaktivität in den Cumuli einer Patientin.....	30
4.1.3 Apoptoseaktivität in Cumuluszellen von befruchteten und nicht befruchteten Eizellen.....	30
4.1.4 Zusammenhang der Embryoqualität mit der Apoptoseaktivität in vereinzelter Eizell-Cumuluszell-Komplexen	31

4.2 Eizellreife in Abhängigkeit der apoptotischen Aktivität der dazugehörigen Cumuluszellen	34
4.3 Einfluss der kontrollierten ovariellen Stimulation (COH) auf die Apoptoserate der Cumuluszellen	34
4.3.1 Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationsprotokollen	34
4.3.2 Apoptoseaktivität in Korrelation zur Menge verbrauchter Gonadotropine...	35
4.3.3 Zusammenhang zwischen der Anzahl reifer Oozyten und der apoptotischen Aktivität der gepoolten Cumuluszellen einer Patientin	36
4.4 Zusammenhang zwischen dem Lebensalter der Patientinnen und der Apoptoseaktivität in den gepoolten Cumuluszellen	36
5 Diskussion	37
5.1 Ergebnisse	37
5.2 Schlussfolgerung	43
5.3 Ausblick	44
6 Zusammenfassung	45
7 Tabellarische Auflistung aller verwendeten Rohdaten	46
8 Literaturverzeichnis	49
9 Publikationsliste	54
10 Danksagung	55
11 Lebenslauf	56

Abkürzungsverzeichnis

IVF	In-vitro-Fertilisation
ET	Embryotransfer
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
ART	„Assisted reproductive techniques“
PZD	Partial Zona Dissection
SUZI	Subzonale Insemination
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
MESA	Mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
PESA	Perkutane Spermienaspiration
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
LH	Luteinisierendes Hormon
hMG	Humanes Menopausales Gonadotropin
hCG	Humanes Choriongonadotropin
rec. FSH	Rekombinantes FSH
OHSS	Ovarielles Hyperstimulationssyndrom
COC	Cumulus-cell-oocyte-complex
I alpha	Inter-alpha-inhibitor
LP	Link Protein
MAPK	Mitogen-assoziierte-Proteinkinase
GVB	Germinal-Vesicle-Breakdown
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
IGF	Insulin-like-Growth-Factor
Apaf	Apoptose-aktivierender-Faktor
Caspase	CysteinyI-Aspartat-spezifische-Proteinase
Bp	Basenpaare
DNS	Desoxyribonucleinsäure
MI/II	Mitose I/II
GV	Germinal Vesikel
PBS	Phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
LMP	Low-melting-point
TUNEL	Tdt-mediated dUTP nick end labeling

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Injektionsvorgang bei der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI)	10
Abb. 2:	Ovarielle Stimulation mit hMG und begleitender GnRH-Antagonistenmedikation („sog. Lübecker Protokoll“)	14
Abb. 3:	Antraler Follikel	15
Abb. 4:	Darstellung der morphologischen Eigenschaften des Apoptosevorganges	17
Abb. 5:	Darstellung der unterschiedlichen Mechanismen, durch die Apoptose ausgelöst werden kann	18
Abb. 6:	Darstellung der DNS-Fragmentierung	19
Abb. 7:	Vergleichende Darstellung der verschiedenen Zellarten im Comet Assay	20
Abb. 8:	„idealer“ Embryo im Vierzell-Stadium (IVF-Labor Frauenklinik Lübeck)	24
Abb. 9:	„schöner“ Embryo im Vierzellstadium (IVF-Labor Frauenklinik Lübeck)	24
Abb. 10:	„unregelmäßiger“ Embryo im Vierzellstadium (IVF-Labor Frauenklinik Lübeck)	24
Abb. 11:	Comet Assay Slide	25
Abb. 12:	Comet Assay: apoptotische und nicht apoptotische Cumuluszellen	28
Abb. 13:	Vergleich der Apoptoseaktivität in Cumuluszellen: schwanger / nicht schwanger	29
Abb. 14:	Darstellung der Fertilisierungsrate gegenüber der Apoptoseaktivität	30
Abb. 15:	Vergleich der Mittelwerte der apoptotischen Aktivität: Fertilisation / keine Fertilisation	31
Abb. 16:	Apoptoseaktivität und Embryoqualität	32
Abb. 17:	Verteilung der Apoptoseaktivität in den vier Embryoqualitäten	32
Abb. 18:	Darstellung der Rangordnung der Embryoqualitäten innerhalb einer Patientin	33
Abb. 19:	Vergleich der mittleren Apoptoseaktivität von „poor respondern“ (Verbrauch > 2500 IU) mit restlichen Patientinnen (Verbrauch < 2500 IU)	35

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Demographische Daten	22
Tab. 2:	Vergleich der apoptotischen Aktivität: schwanger / nicht schwanger	29
Tab. 3:	Vergleich der apoptotischen Aktivität: Fertilisation / keine Fertilisation	31
Tab. 4:	Mittelwerte der Eizellanzahl	32
Tab. 5:	Überprüfung der Signifikanz in den Unterschieden zwischen den Embryoqualitäten im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)	32
Tab. 6:	Apoptotische Aktivität und Eizellreifezustand GV (Germinal Vesikel), MI (Mitose I) und II (Mitose II).....	34
Tab. 7:	Apoptotische Aktivität in Abhängigkeit von der Stimulation.....	35
Tab. 8:	Vergleich der apoptotischen Aktivität von „poor respondern“ [Verbrauch > 2500 IU] und restlichen Patientinnen [Verbrauch < 2500 IU].....	35
Tab. 9:	Vergleich der mittleren apoptotischen Aktivität zwischen „poor respondern“ [<4 Eizellen] und restlichen Patientinnen [>4 Eizellen]	36
Tab. 10:	Apoptoseaktivität in Abhängigkeit vom Lebensalter	36
Tab. 11:	Darstellung der Ergebnisse der Studien von Lee, Kaneko, Host und vorliegende Studie	43

1 Einleitung

Ungewollte Kinderlosigkeit ist ein Problem, von dem weltweit 15-20 % aller Paare mit bestehendem Kinderwunsch betroffen sind. Es wird geschätzt, dass die Zahl betroffener Paare in Deutschland bei 1,5 Millionen liegt, wobei es keine gesicherten Zahlen zur Häufigkeit der Sterilität in Deutschland gibt. Bei den untersuchten Fällen zeigt sich, dass ca. 45 % der Fälle von ungewollter Kinderlosigkeit durch die Frau und 40 % der Fälle durch den Mann begründet sind; ca. 15 % sind ungeklärter Genese (Schill et al. 2000). In 35 % der Fälle findet man bei beiden Partnern eine eingeschränkte Fertilität. Bei den weiblichen Sterilitätsursachen stehen in Industrienationen die endokrinen Störungen mit 40 % an der Spitze, gefolgt von tubaren mit 20-30 %. Uterine, zervikale und vaginale Ursachen sind mit 4-6 % deutlich seltener zu finden. Ursache für die männliche Infertilität ist meist eine Störung der Spermatogenese, seltener ein kompletter Verschluss der ableitenden Samenwege, eine Ejakulations- oder Erektionsstörung. In 50 % der Fälle lässt sich keine Ursache der Fertilitätsstörung finden.

Ein sich nicht erfüllender Kinderwunsch hat oft weitreichendere psychologische Konsequenzen als die alleinige Tatsache der Kinderlosigkeit. Die meisten betroffenen Paare haben mit mehr oder weniger schweren psychologischen, familiären und sozialen Problemen zu kämpfen.

Auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin haben sich in den letzten 20 Jahren entscheidende innovative Entwicklungen ergeben. Steptoe und Edwards gelang die erste Schwangerschaft nach erfolgreicher In-vitro-Fertilisation (IVF) und anschließendem Embryo-Transfer (ET) mit daraus resultierender Geburt des Kindes im Jahre 1978 (Steptoe et al. 1978). Die Einführung der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) durch Palermo et al. 1992 konnte schließlich einen neuen Aspekt in der Therapie der männlichen Subfertilität bieten (Palermo et al. 1992).

Dennoch ist es so, dass zahlreiche Paare, die in der Reproduktionsmedizin Hilfe suchen, kinderlos bleiben. Die Fertilisationsrate nach IVF lag im Jahre 2003 bei 50,38 %, die nach ICSI bei 60,83 % (Deutsches-IVF-Register, Jahresbericht 2003). Der Nachweis einer klinischen Schwangerschaft gelang nach IVF in 24,80 % der Fälle. In nur 43,56 % der klinischen Schwangerschaften kam es zur Geburt eines

Kindes. In 19,68 % der Fälle trat ein frühzeitiger Abort ein. Nach ICSI lag die Schwangerschaftsrate mit 26,41 % und die Geburtenrate mit 45,28 % etwas höher als nach einer IVF-Behandlung. Die Abortrate wurde mit 18,42 % angegeben.

Vom Erfolg dieser Methoden kann nur dann gesprochen werden, wenn eine Schwangerschaft nicht nur induziert, sondern auch ausgetragen wird und mit der Geburt eines gesunden Kindes endet („Baby-Take-Home-Rate“). Diese lag im Jahre 2003 nach IVF bei 10,80 %, nach ICSI bei 11,84 %.

Aufgrund dieser noch niedrigen Erfolgsquoten ist man seit langem auf der Suche nach zuverlässigen Tests, um prädiktive Aussagen über einen möglichen Erfolg in der assistierten Reproduktion machen zu können.

Die Erfolge der artifiziellen reproduktiven Technologien (ART) hängen von vielen verschiedenen Faktoren ab. Zu diesen zählen das Alter der Patienten, das Hormonprofil während der Stimulationsbehandlung, die Rezeptivität des Endometriums und die Qualität und Reife von Spermium und Eizelle. Bisher gibt es noch keine Möglichkeit, die Eizellqualität direkt zu bestimmen, außer durch eine morphologische Beurteilung mittels Mikroskopie. Andere Methoden wie die Auswertung der Cumulusgröße oder die Hormonmessung in der Follikelflüssigkeit zur Beurteilung der Fertilisierbarkeit einer Oocyte erbrachten bisher keine verlässlichen Ergebnisse (Rattanachaiyanont et al. 1999).

Aufgrund des Embryonenschutzgesetzes vom 13.12.1990 ist es in Deutschland nicht erlaubt, befruchtete Eizellen zu selektieren, sobald diese das Vorkernstadium überschritten haben. Deshalb ist es besonders wichtig, Parameter zu finden, mit deren Hilfe man indirekt etwas über die Qualität der Eizelle in einem früheren Stadium aussagen kann. Da die Oocyte selbst für qualitative Untersuchungen nicht zur Verfügung steht, könnten die Cumuluszellen als solch ein Parameter dienen.

1.1 Die intracytoplasmatische Spermieninjektion

Cohen et al. gelang es erstmals, bei männlicher Subfertilität nach mechanischer Öffnung der Zona pellucida mittels einer Glaspipette eine Schwangerschaft zu erreichen („Partial Zona Dissection“, PZD). Eine Schwangerschaft nach subzonaler Insemination (SUZI), bei der einzelne Spermien direkt in den perivitellinen Raum

eingbracht werden, wurde das erste Mal 1987 von Laws-King erzielt. 1992 berichteten Palermo et al. über Fertilisationen mit nachfolgenden Schwangerschaften durch Mikroinjektion, d.h. durch die direkte Injektion eines Spermiums in das Cytoplasma der Eizelle bei der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) (Palermo et al. 1992).

Indikationen für die Mikroinjektion sind Akrosomendefekte, ausgeprägte Oligoasthenoteratozoospermie (OAT), immunologische Sterilität, retrograde Ejakulation und Anejakulation. Bei ausgeprägter OAT und selbst bei Azoospermie ist es heute möglich, mittels mikrochirurgischer epididymaler Spermienaspiration (MESA), testikulärer Spermienextraktion (TESE) oder perkutaner Spermienaspiration (PESA) Spermien zu gewinnen, um dann die Mikroinjektion durchzuführen.

Bei der intracytoplasmatischen Spermieninjektion wird das Oolemma als letzte Barriere zum Cytoplasma der Eizelle überwunden. Bei einer 200-fachen Vergrößerung wird die Samenzelle immobilisiert und mit einer Injektionspipette aufgenommen. Die Oozyte wird mit einer Haltepipette angesogen, so dass der Polarkörper entweder auf zwölf Uhr oder auf sechs Uhr zu liegen kommt. Die Injektionspipette wird in die Oozyte und das Cytoplasma eingestochen und die Samenzelle anschließend injiziert.

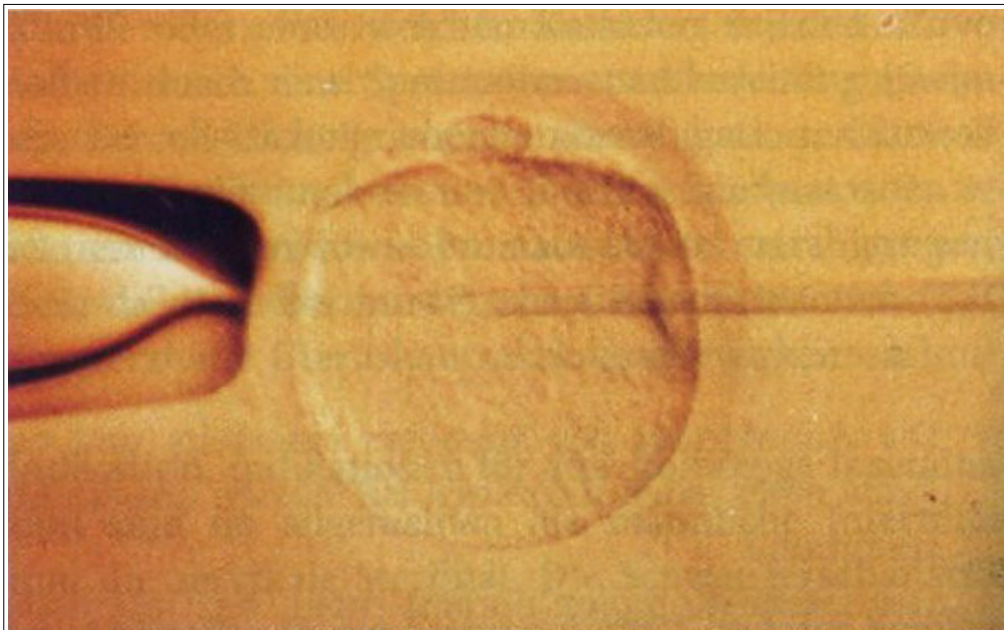


Abb. 1: Injektionsvorgang bei der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI)
[Schill et al. 2000]

Damit diese Methode Erfolg hat, ist es vor allem wichtig, dass die Eizelle mit ihren nukleären und zytoplasmatischen Faktoren in der Lage ist, den Fertilisierungsprozess zu ermöglichen. Die Grundlage einer erfolgreichen Sterilitätsbehandlung bildet die suffiziente hormonelle Stimulation mit Gewinnung zahlreicher Eizellen durch die Verwendung verschiedener hormoneller Pharmaka wie Gonadotropine, Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH)-Analoga als Agonisten oder Antagonisten und Antiöstrogene (Felberbaum und Diedrich 1999).

1.2 Hormonelle Stimulation

Der funktionelle Zyklus des Ovars wird geregelt durch das Organsystem von Hypothalamus und Hypophyse. Der Hypothalamus als übergeordnetes Organ setzt in pulsatiler Form das in den Neuronen seines mediolateralen Anteils freigesetzte Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) frei. Das GnRH gelangt über das hypophysäre Pfortadergefäßsystem zur Adenohypophyse. Es bindet dort an die GnRH-Rezeptoren der gonadotropen Zellen, die daraufhin die Gonadotropine, follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH), synthetisieren und sezernieren. Überschreitet die Konzentration von FSH im Serum einen bestimmten, individuell unterschiedlichen Schwellenwert, kommt es zur Rekrutierung der so genannten Follikelkohorte in beiden Ovarien. Der heranreifende dominante Follikel produziert vermehrt Östrogene und zwischenzeitlich sinken die FSH und LH Konzentrationen aufgrund des „negativen Feedbacks“ ab. Wird eine maximale Östrogenkonzentration von 150 bis 500 pg/ml Östradiol im Serum erreicht, wird LH aus der Adenohypophyse freigesetzt („positiver Feedback“). Als Folge dieses „LH-Peaks“ erfolgt ca. 10-12 Stunden später die Ovulation.

1.2.1 Gonadotropine

Humanes Menopausales Gonadotropin (hMG) wird aus dem Urin postmenopausaler Frauen extrahiert und steht als subkutan oder intramuskulär zu applizierende Substanz mit 75 I.E. FSH und 75 I.E. LH pro Ampulle zur Verfügung.

Die Stimulation mit Gonadotropinen war vor der Einführung der GnRH-Analoga die häufigste Stimulationsart. Sie war indiziert bei Clomifen- und Clomifen/hMG-

Versagern und gegebener andrologischer Indikation. Die Ovulationsinduktion erfolgt mittels hCG bei einem Follikeldurchmesser von ca. 20 mm und Östradiolwerten von 300-400 pg/ml pro Follikel. Ein wesentliches Problem dieser Behandlungsmethode stellt die individuell stark unterschiedliche Reaktion der Patientinnen auf die Gonadotropine dar (March 1993). Es kommt zur Inkongruenz zwischen Östradiolanstieg und tatsächlicher Follikelreifung. Der positive Feedback-Mechanismus führt auch hier zu einem vorzeitigen LH-Anstieg und der Stimulationszyklus muss abgebrochen werden.

Seit einigen Jahren steht als neueste Entwicklung in der Behandlung mit Gonadotropinen das rekombinante FSH (rec. FSH) für die ovarielle Stimulation zur Verfügung. Es zeigt viel versprechende Erfolge in Kombination mit GnRH-Antagonisten.

1.2.2 GnRH-Agonisten

Der vorzeitige Anstieg der LH-Konzentration bei alleiniger Stimulation mit Gonadotropinen und Antiöstrogenen bewirkt eine Verschlechterung der Eizell- und Embryoqualität (Loumaye 1990; Stanger et al. 1985). Durch eine Stimulation mit GnRH-Agonisten kann ein solcher Nachteil behoben und die Rate abzubrechender Stimulationszyklen bis auf 2 % gesenkt werden (Schmutzler et al. 1990). Die Ablösung von humanem Choriongonadotropin (hCG) als Ovulationsauslöser soll außerdem das Auftreten des ovariellen Hyperstimulationssyndrom (OHSS) reduzieren (Tay 2002). GnRH-Agonisten sind in der Lage, einen endogenen Anstieg von LH und FSH zu erzeugen. Dieser Effekt ist physiologischer als die Gabe von exogenem hCG.

Nach der Entdeckung des GnRH-Moleküls 1971 von Schally et al. wurde das Dekapeptid strukturell an den Positionen 6 und 10 verändert und konnte somit therapeutisch eingesetzt werden (Schally et al. 1971; Burgus et al. 1972). Durch die Modifizierung wurde eine höhere Rezeptorbindungsaffinität an den gonadotropen Zellen der Adenohypophyse geschaffen und ein rascher enzymatischer Abbau des Moleküls verhindert (Koch et al. 1977).

Der GnRH-Agonist hat eine 100-200fach höhere Affinität zu den GnRH-Rezeptoren als das natürliche Peptid.

Heute werden verschiedene Behandlungsprotokolle angewendet. Es wird das so genannte lange Protokoll vom kurzen und ultrakurzen Protokoll unterschieden. Das lange Protokoll zielt auf eine komplette Hypophysensuppression hin, während das kurze und ultrakurze Protokoll den initialen Gonadotropinanstieg im Sinne der Follikelstimulation nutzen (Macnamee et al. 1989; Loumaye et al. 1988; Smitz et al. 1992). Das lange Protokoll ist das effektivste der drei und wird zur Zeit am häufigsten genutzt (Tan 1996).

Die ovarielle Stimulation mit hMG und GnRH-Agonisten kann eine Insuffizienz der Lutealphase hervorrufen. Eine Unterstützung dieser Phase erfolgt mit der weiteren Gabe von 5000 IU hCG i.m. am 2. und 5. Tag nach Follikelpunktion. Dadurch ist es möglich eine zeitgerechte Entwicklung des Endometriums und eine entsprechende Erhöhung der Schwangerschaftsraten zu erzielen (Smitz et al. 1988).

Die Kombination von GnRH-Agonisten mit humanen urinären oder rekombinanten Gonadotropinen hat sich als hoch effizient herausgestellt (Smitz et al. 1992; Loumaye et al. 1994). Allerdings hat das lange Protokoll den Nachteil, dass eine lange, mit relativ hohen Kosten verbundene Behandlungsperiode vorausgeht, bevor eine Desensitivierung der Hypophyse erfolgt.

Die Gonadenfunktion wird stark gehemmt und es zeigen sich die typischen Nebenwirkungen des Östradiolentzugs wie Schweißausbrüche, Hitzewallungen und Kopfschmerzen.

1.2.3 GnRH-Antagonisten

Parallel mit der Einführung der GnRH-Agonisten wurde das GnRH-Molekül zusätzlich an den Positionen 1, 2, 3 und 8 strukturell modifiziert. Es entstand ein Analogon, das mit ähnlicher Affinität kompetitiv an die hypophysären GnRH-Rezeptoren bindet, aber keine Ausschüttung von Gonadotropinen bewirkt. Die antagonisierende Wirkung an der Hypophyse setzt sofort ohne zwischenzeitlich stimulierenden Effekt ein (Coy et al. 1982). Die Sekretion von Gonadotropinen wird innerhalb von Stunden reduziert. Dieser Mechanismus ist abhängig vom

Gleichgewicht zwischen appliziertem Antagonisten und endogenem GnRH und ist deshalb in hohem Maße dosisabhängig (Felberbaum et al. 1995). Die erste Generation der Antagonisten verursachte anaphylaktoide Reaktionen aufgrund von Histaminfreisetzungen. Diese Probleme wurden jedoch in Studien über die neueste dritte Antagonistengeneration nicht mehr beobachtet (Klingmüller et al. 1993; Behre et al. 1994).

Ganirelix (Organon, OSS, Netherlands) und Cetrorelix (Serono, Frankfurt/M, Germany) sind die beiden modernen GnRH-Antagonisten der dritten Generation, die zur Zeit klinische Anwendung finden. Bei beiden Präparaten wurden an den Positionen 1, 2, 3, 6 und 10 Aminosäuren substituiert. Bei Ganirelix wurde außerdem Position 8 strukturell modifiziert.

Die Stimulation beginnt mit zwei Ampullen hMG oder rec. FSH am 2. Zyklustag, wobei am 5. Zyklustag eine Dosisanpassung entsprechend der individuellen Response der Patientin erfolgen kann. Ab dem 7. Zyklustag wird täglich ein GnRH-Antagonist in der minimal effektiven Dosis von 0,25 mg verabreicht, bis die Kriterien zur Ovulationsinduktion erfüllt sind (siehe Abb.2). Die Ovulationsinduktion wird mit 10.000 IU hCG i.m. durchgeführt, sobald der Leitfollikel einen Durchmesser von 18-20 mm aufweist und die Östradiolkonzentration 300-400 pg/ml beträgt (siehe auch langes Agonisten-Protokoll).

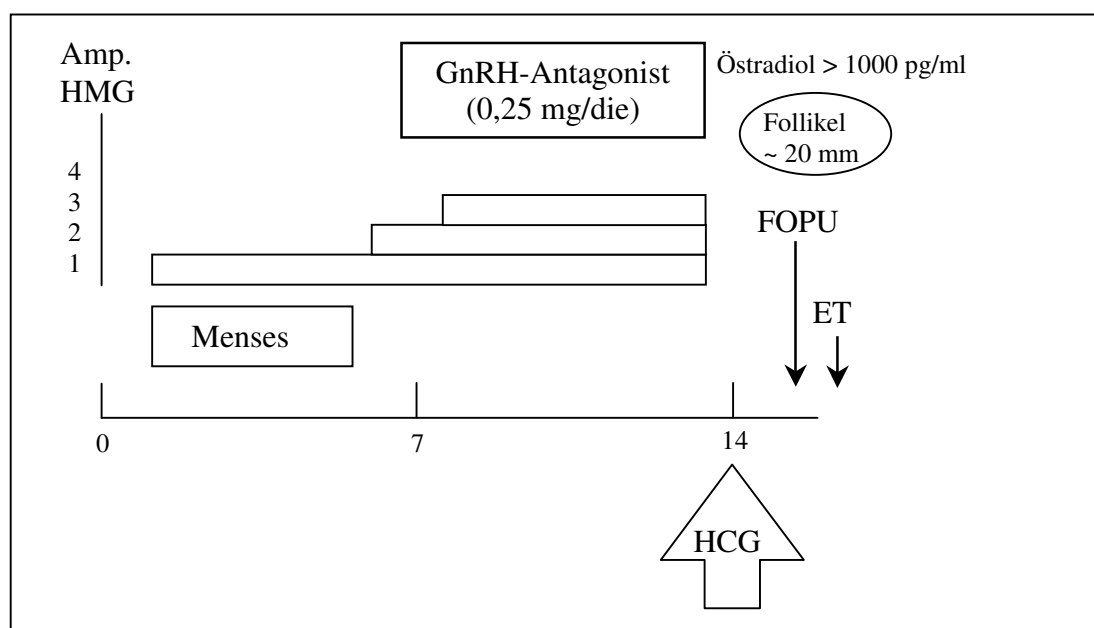


Abb. 2: Ovarielle Stimulation mit hMG und begleitender GnRH-Antagonistenmedikation („sog. Lübecker Protokoll“) [Felberbaum et al. 2000]

1.3 Cumuluszellen

In den meisten Säugetierspezies umgeben Cumuluszellen die Oozyte während der Befruchtungsperiode. Werden die Cumuluszellen entfernt, führt dies oft zu einem Abfall der erfolgreichen Befruchtungsraten (Van Soom et al. 2002). Es ist bis heute noch immer nicht bekannt, welche Mechanismen dafür sorgen, dass der Cumulus Oophorus die Befruchtung der Eizelle positiv beeinflusst. Van Soom et al. postulierten drei Möglichkeiten: a) Den Cumuluszellen gelingt es mittels mechanischer Wirkung, abnormal geformte Spermatozoen zurückzuhalten und nur solche zu leiten, die überaktiv sind. b) Die Cumuluszellen schaffen ein Milieu rund um die Oozyte, das die Kapazitation und das Eindringen des Spermiums in die Eizelle erleichtert. c) Die Cumuluszellen können schädlichen Veränderungen der Zona pellucida oder des Oozytencytoplasma vorbeugen.

Im Ovar besteht zwischen der Oozyte und dem Cumulussyncytium eine enge Beziehung über große Gap Junctions. Gap Junctions sind interzelluläre Kanäle, die es benachbarten Zellen erlauben kleine Moleküle ($< 1 \text{ kDa}$) untereinander auszutauschen.

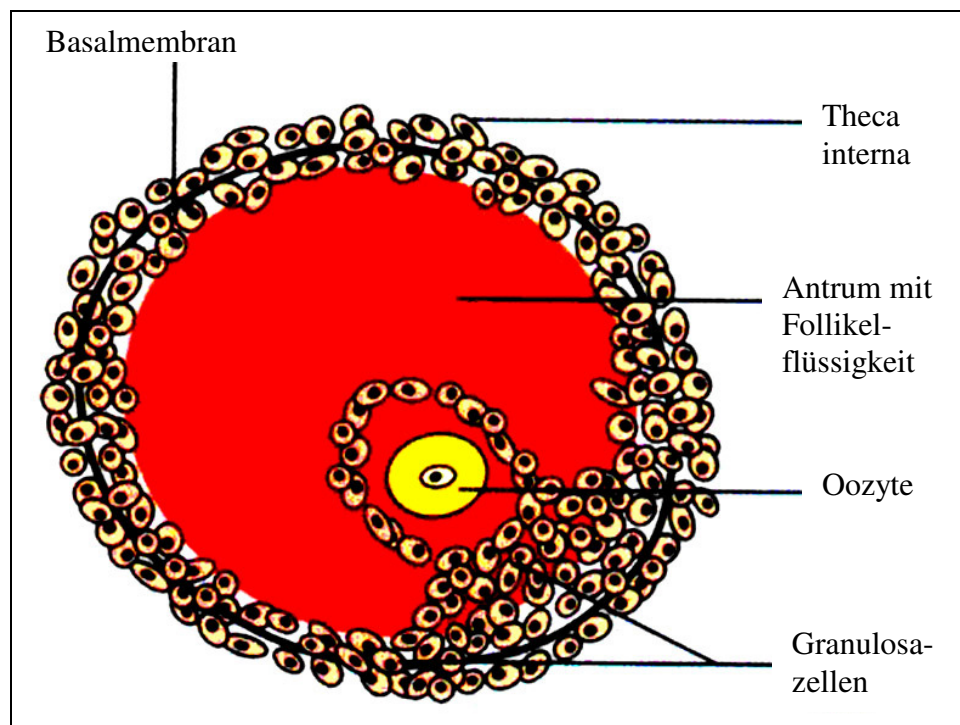


Abb. 3: Antraler Follikel [Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim]

Sun et al. kultivierten in einem in vitro-Maus-Experiment frisch isolierte „cumulus-cell-oocyte-complexes“ (COC) in verschiedenen Kombinationen von FSH, inter-alpha-inhibitor (I alpha I) und Link Protein (LP), um deren Cumuluszellexpansion zu untersuchen. FSH oder LP allein waren nicht in der Lage, die Cumuluszellexpansion zu stimulieren. Die Behandlung mit I alpha I in Kombination mit FSH jedoch konnte die COC Expansion steigern und nach zusätzlicher Gabe von LP konnten erheblich gesteigerte Expansionslevel verzeichnet werden. Die Zugabe von LP stabilisiert die Komplexe zwischen I alpha I und Hyaluronidase in der umgebenden Cumuluszellmatrix und unterstützt so möglicherweise das Wachstum des COC (Sun et al. 2002).

Auch Wachstumsfaktoren, apoptotische Vorgänge und Proteinkinasen spielen eine Rolle in der Entwicklung des Follikels, des Cumulus Oophorus und dessen Interaktionen mit der Oocyte. Sirotkin et al. kultivierten Cumuluszellen und Oocyten vom Schwein für 40 Stunden zusammen mit Insulin-like-Growth-Factor IGF-I, IGF-II und EGF. Es konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von IGF-I oder EGF die Apoptoserate der Cumuluszellen signifikant senkte ($p < 0,001$).

In der Studie von Su et al. zeigte sich, dass auch die Mitogen-Assoziierte-Proteinkinase (MAPK) einen Einfluss auf die Cumuluszellkomplex-Expansion sowie auf die meiotische Aktivität (Germinal-Vesicle-Breakdown (GVB)) in Oocyten hat. Ein gonadotropin-induzierter GVB bedarf in vitro der Beteiligung von MAPK-Aktivität in den Cumuluszellen, jedoch nicht in der Oocyte. Darüber hinaus ist auch für die Expansion des COC einer MAPK-Beteiligung nötig (Su et al. 2002).

1.4 Apoptose

Durch den Anstieg der FSH-Konzentration in der ersten Zyklushälfte kurz vor dem mittzyklischen LH-Anstieg wird der enge Kontakt der Cumuluszellen zur Oozyte unterbrochen (Hoest et al. 2000). Zum Zeitpunkt der Ovulation schließen sich die Gap Junctions und die Cumuluszellen unterliegen dem Vorgang der Apoptose. Dieser Vorgang, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, läuft sehr schnell ab, so dass die maximale Apoptoserate der Cumuluszellen nur in einem engen Zeitfenster detektiert werden kann.

Der Vorgang der Apoptose spielt auch in der Selektionierung und Rekrutierung von Eizellen aus dem Primordialpool eine große Rolle. Weiterhin scheint sie ein wichtiger Faktor bei der Zellzahlminderung während des Alterns zu sein (De Pol et al. 1997).

Die Apoptose beginnt, indem die Zelle die Verbindung zu den benachbarten Zellen verliert, kleiner wird und sich damit aus dem Zellverband herauslöst. Sie verliert ihre Mikrovilli, die Zellmembran alteriert und exprimiert Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche. Die Membran bleibt ebenso wie die Organellen der Zelle intakt. Das Chromatin im Nukleus fragmentiert, das Cytoplasma der Zelle kondensiert und es bilden sich Apoptosekörperchen, die in vivo sofort von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden, so dass jegliche Entzündungsreaktion unterbleibt.

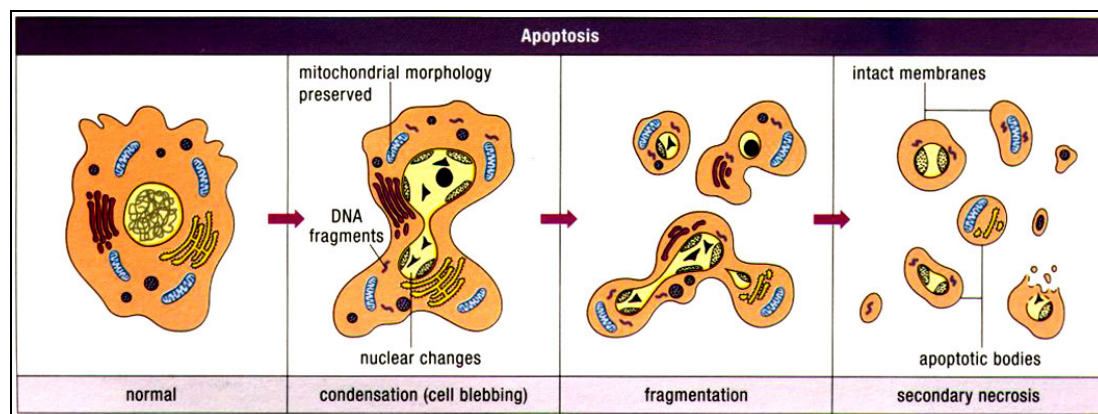


Abb. 4: Darstellung der morphologischen Eigenschaften des Apoptosevorganges [Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]

Im Gegensatz dazu findet die Nekrose als eine zweite Form des Zelltodes statt, wenn die Zelle extremen physikalischen und biochemischen Bedingungen ausgesetzt ist. Die Zelle schwillt an, die Zellmembran rupturiert frühzeitig und es werden

cytoplasmatische Enzyme freigesetzt, die eine inflammatorische Reaktion hervorrufen können.

Die Apoptose, als ein aktiver Prozess bereits 1972 von Kerr et al. beschrieben, kann durch verschiedene physiologische und physikalische Mechanismen initiiert werden (Kerr et al. 1972; Östling und Johanson 1984). Es können hormonelle Faktoren wie z.B. der fas-Ligand oder der Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) an die korrespondierenden Rezeptoren (z.B. CD95) der Zelloberfläche binden und damit den Apoptosevorgang auslösen. Andererseits können auch schädigende Faktoren wie Chemotherapeutika, radikale Toxine, Hypoxie oder Bestrahlungen auf die Zelle einwirken und dadurch den gleichen Vorgang auslösen. Es wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Diese Freisetzung ist abhängig vom Verhältnis apoptosehemmender Faktoren (z.B. BCL-2-Proteine) zu apoptosefördernden Faktoren (z.B. BAX-Proteine). Cytochrom C, auch als Apoptose-aktivierender-Faktor 2 (Apaf-2) bezeichnet, bindet an den Apoptose-aktivierenden-Faktor 1 (Apaf-1) und aktiviert somit den Apoptose-aktivierenden-Faktor 3 (Apaf-3), der auch als Cysteinyl-Aspartat-spezifische-Proteinase 9 (Caspase 9) bezeichnet wird.

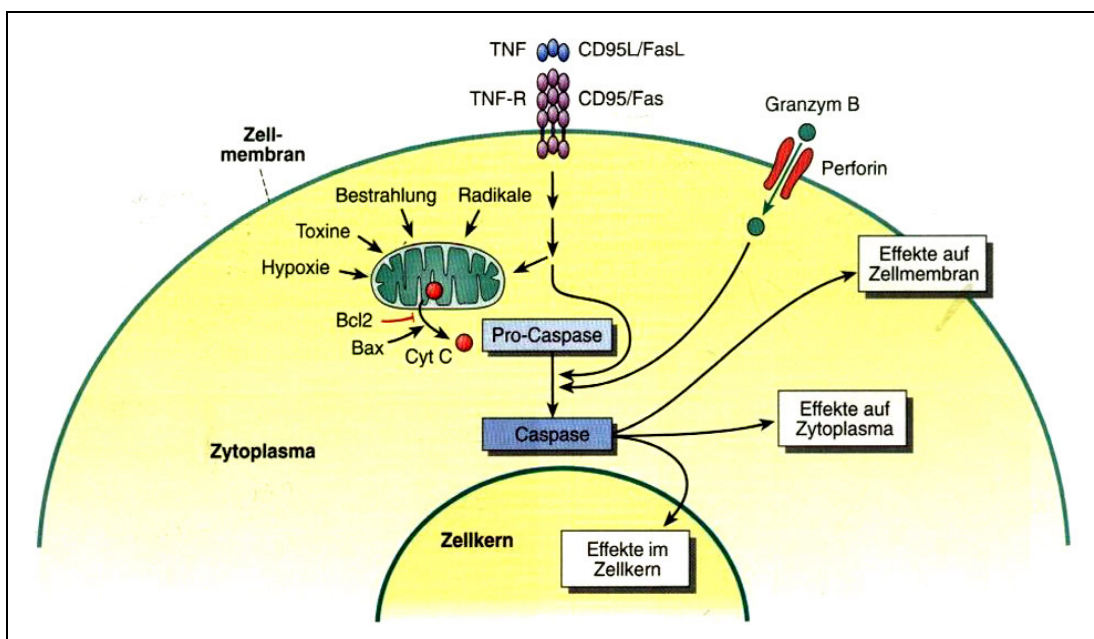


Abb. 5: Darstellung der unterschiedlichen Mechanismen, durch die Apoptose ausgelöst werden kann [Denk et al. 2001]

Diese Caspasen aktivieren Endonukleasen, die zur Fragmentierung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) führen. Die DNS wird an charakteristischen Stellen zwischen den Nukleosomen in einem Abstand von 180 Basenpaaren (Bp) geschnitten.

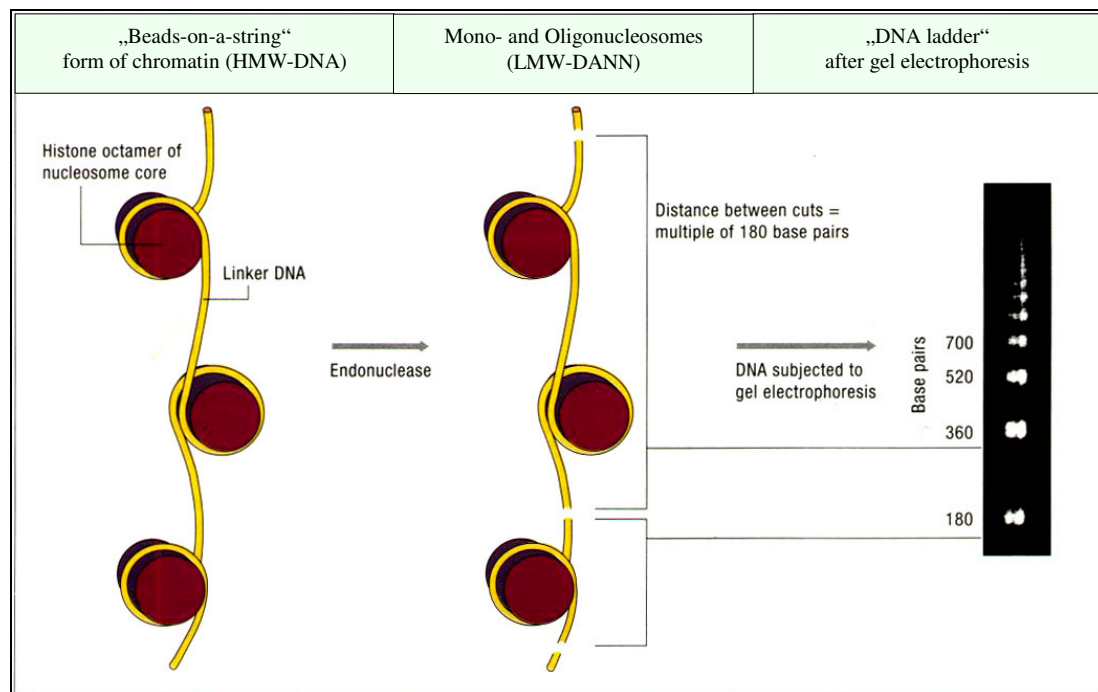


Abb. 6: Darstellung der DNS-Fragmentierung [Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim]

1.5 Comet Assay

Bereits 1984 entwickelten Östling und Johanson (Östling und Johanson 1984) eine mikroelektrophoretische Technik zur Darstellung von DNS-Schäden in einzelnen Zellen. Diese Methode wurde damals zur Evaluierung radiogener Effekte an Patientenmaterial entwickelt. Unter Verwendung eines neutralen Puffers konnten Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden und es zeigte sich, dass die Länge des Schweifes mit der Strahlendosis zunahm (Östling und Johanson 1984). Weiterentwickelt wurde der Comet Assay durch Singh und Olive Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts.

Im Comet Assay werden vereinzelte Zellen in einem Agarosebett auf Objektträgern immobilisiert und durch Anlegen elektrischer Spannung wandern ausgeschnittene DNS-Moleküle in Richtung der Kathode. Intakte DNS verbleibt im Kern und zusammen mit der mobilisierten geschädigten DNS entsteht die Kometenform.

Beim Vorgang der Apoptose wird die DNS an charakteristischen Stellen zu Fragmenten von 180 Basenpaaren (Bp) oder einem Vielfachen davon geschnitten. Diese Tatsache wird im Comet Assay wie auch in vielen anderen Verfahren genutzt, um Apoptose zu detektieren. In der neutralen Einzelzell-Elektrophorese wandern die zahlreichen kleinen, durch Doppelstrangbrüche entstandenen Fragmente in Richtung der Kathode, so dass ein typischer tropfenförmiger Kometenschweif entsteht. Die apoptotische Zelle lässt sich aufgrund der Entstehung dieses charakteristischen Schweifes sehr gut von einer nekrotischen Zelle unterscheiden, bei der die durch Einzelstrangbrüche chaotisch entstehenden DNS-Fragmente aus dem Zellkern wandern. Hierbei entsteht eine Kometenform mit einem spitz zulaufenden Schweif. Nichtgeschädigte Zellen zeigen im Comet Assay einen intakten Kern ohne Schweif (siehe Abb. 7).

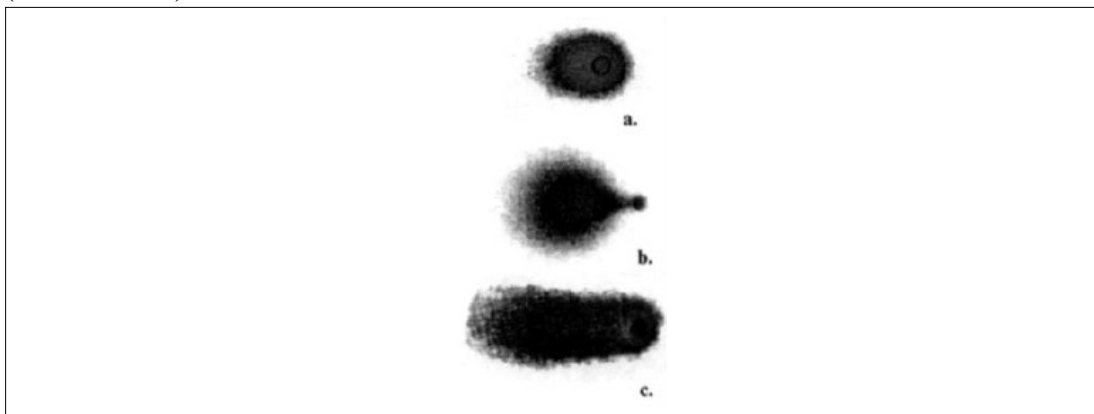


Abb. 7: Vergleichende Darstellung der verschiedenen Zellarten im Comet Assay; (a. nicht geschädigte Zelle; b. apoptotische Zelle; c. nekrotische Zelle) [Kizilian et al. 1999]

Das Ausmaß der chromosomalen Schäden kann durch den sogenannten „tail moment“ bestimmt werden. Dieser wird aus dem Produkt der Kometenlänge und dem anteiligen DNS-Gehalt des Kometen berechnet (McKelvey-Martin VJ et al. 1993). Der Comet Assay bietet eine schnelle Screeningmethode, um den Anteil apoptotischer Zellen einer Population zu ermitteln.

Der Comet Assay kann in alkalischem oder neutralem Milieu durchgeführt werden. Die alkalische Form des Comet Assays detektiert neben den Doppelstrangbrüchen auch Einzelstrangbrüche der DNS und dient somit der Toxizitätsanalyse und der resultierenden nekrotischen Form des Zelltodes. Die neutrale Methode dient dem Nachweis von den für die Apoptose typischen DNS-Doppelstrangbrüchen und ist damit geeigneter zum Nachweis von Apoptose als die alkalische Methode.

2 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, unter Anwendung des Comet Assays zur Bestimmung der apoptotischen Aktivität von Cumuluszellen, die im Rahmen einer ICSI-Behandlung gewonnen wurden, zu überprüfen, inwieweit diese Aktivität als neuer Indikator zur Beurteilung der Eizellqualität und als prädiktiver Faktor für das Behandlungsergebnis verwendet werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Studienteilnehmer

In dieser Studie wurden Cumuluszellen von 86 Patientinnen untersucht, die zusammen mit ihren Partnern im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung an einem ICSI-Programm teilgenommen haben. Die zufällig ausgewählten Patientinnen befanden sich zwischen Februar und Oktober 2002 in Behandlung bei Ärzten der Abteilung für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck. Das Patientenkollektiv ist mit seinen demographischen Daten in Tabelle 1 ausführlich dargestellt.

Die Analyse des Spermioграмms wurde im andrologischen Labor der Abteilung nach WHO-Standards durchgeführt. Bei den Männern galten folgende Einschlusskriterien: eine Spermienkonzentration unter 20 Mio./ml, eine Progressivmotilität unter 20 % und weniger als 10 % normal geformte Spermatozoen. Bei den Frauen galt lediglich das Vorliegen von polyzystischen Ovarien als Ausschlusskriterium. Es gab keine Alters- oder Gewichtsbeschränkungen. Vor Beginn der Behandlung unterschrieben alle Paare eine Einverständniserklärung und erklärten sich damit bereit, ihre Daten für diese Studie zur Verfügung zu stellen.

	Durchschnitt $\pm$ Stand. Abw.	Min.	Max.
Alter (Jahre)	32,35 $\pm$ 5,24	21	46
Body Mass Index (kg/m ²)	24,29 $\pm$ 4,20	18,2	40,5
vorherige Zyklen (Anzahl)	1,12 $\pm$ 1,24	0	8
Stimulationseinheiten (IU)	2548 $\pm$ 2726	150	24800
transferierte Embryos (Anzahl)	2,22 $\pm$ 0,79	0	3

Tab. 1: Demographische Daten

3.2 Gewinnung der Oozyten

36 Stunden nach der subkutanen Applikation von 10.000 IU hCG, durch die der letzte Schritt der Eizellreifung induziert wurde, erfolgte die Follikelpunktion. Dabei wurden die Follikel unter sonographischer Kontrolle einzeln punktiert und vier der Follikel getrennt gesammelt. Es schloss sich zunächst die mechanische Denudierung an, bei der mittels zweier Spritzen mit aufgesetzten sterilen Kanülen (Marke Micro-lanceTM 3, 0,4 x 19 Nr. 20) die Cumuluszellen nah der Corona von der Oocyte

abgetrennt wurden, um die Eizellen zu fertilisieren und die Cumuluszellen zu analysieren. Eizellen und Cumuluszellen wurden korrespondierend beziffert, um eine Möglichkeit zu erlangen, die Ergebnisse zuzuordnen. Die Oozyten wurden entsprechend ihres Entwicklungszustandes in drei Reifegrade unterteilt: Germinal Vesikel (GV), Mitose I (MI) und Mitose II (MII). Diese drei Stadien lassen sich durch folgende Kriterien voneinander abgrenzen: Der Germinal Vesikel enthält noch einen Zellkern und einen vollständigen diploiden Chromosomensatz. Bei der Oozyte im Reifegrad MI ist noch kein Polkörper zu erkennen, während die Oozyte im Reifezustand MII durch die Ausbildung eines Polkörpers mit einem Chromosomensatz charakterisiert ist. Bei der darauf folgenden intracytoplasmatischen Spermieninjektion wurden fast ausschließlich Oozyten im Reifegrad MII injiziert. Nur in Ausnahmefällen wurden auch Oozyten im Reifegrad MI fertilisiert.

Die injizierten Eizellen wurden für 18-20 Stunden im Inkubationsmedium (HAM's F-10; 70 µg Penicillin und Streptomycin; 0,25 mg Calciumlactat; 2 mg/ml NaHCO₃; 10 % v/v Nabelschnurserum) bei 37 °C unter 5 % CO₂ im Brutschrank (Water-Jacketed Incubator, Nuare) inkubiert. 18-20 h nach der ICSI erfolgte die Überprüfung der Fertilisierung der injizierten Eizellen morphologisch unter dem Mikroskop anhand des Auftauchens von zwei Pronuclei. Es wurden maximal drei Oozyten mit zwei normalen Vorkernen kultiviert. Nicht fertilisierte Eizellen oder solche mit Triploidien wurden sorgfältig dokumentiert. Nach deutschem Embryonenschutzgesetz ist die weitere Inkubation und damit die embryonale Entwicklung von nur drei fertilisierten Eizellen möglich, die zufällig ausgewählt wurden. Überschüssige Eizellen wurden im Vorkernstadium kryokonserviert oder mussten verworfen werden. Zwei Tage nach der Injektion wurde der Embryonentransfer (ET) durchgeführt. Kurz vor dem ET wurde die Qualität der Embryonen bestimmt. Es wurden in Anlehnung an Steer et al. drei morphologische Qualitäten unterschieden: 1: ideal (runde, wohlgeformte, gleichgroße Blastomeren ohne Fragmentationen), 2: schön (ungleichgroße Blastomeren mit bis zu 50 % Fragmentationen) und 3: unregelmäßig (> 50 % blastomerische Fragmentationen) (Steer et al. 1992) (siehe Abbildungen 8-10). Nach weiteren 14 Tagen wurde mittels hCG-Bestimmung im mütterlichen Serum das Vorliegen einer Schwangerschaft kontrolliert. HCG-Werte über 50 IU/ml wurden als eine biochemische Schwangerschaft dokumentiert.

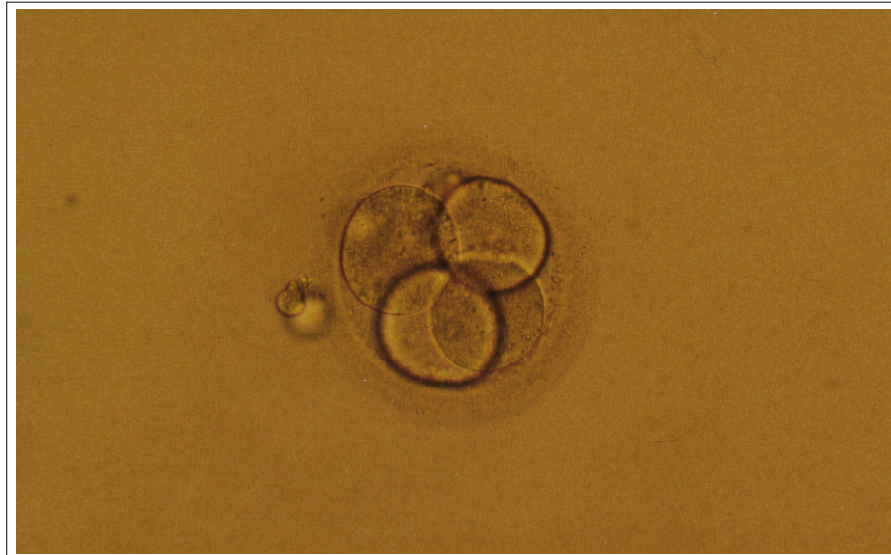


Abb. 8: „idealer“ Embryo im Vierzell-Stadium (IVF-Labor Frauenklinik Lübeck)



Abb. 9: „schöner“ Embryo im Vierzellstadium (IVF-Labor Frauenklinik Lübeck)

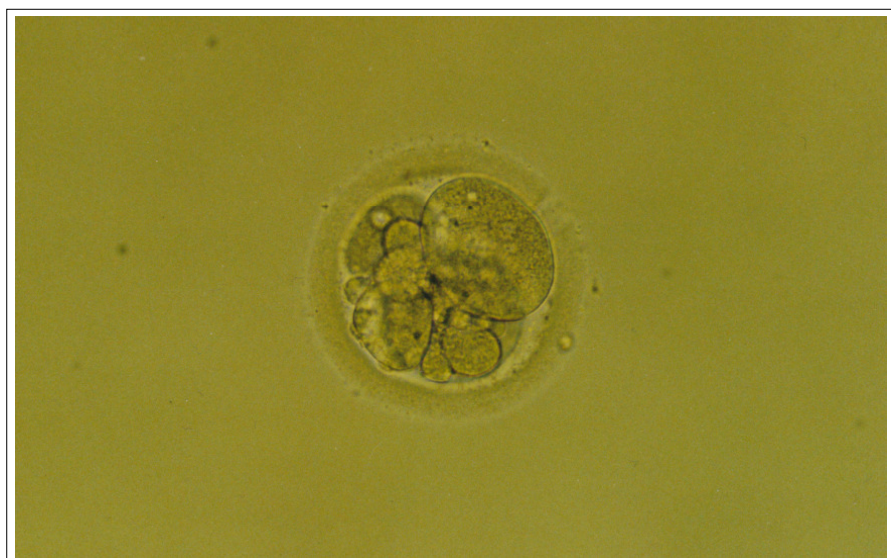


Abb. 10: „unregelmäßiger“ Embryo im Vierzellstadium (IVF-Labor Frauenklinik Lübeck)

3.3 Gewinnung der Cumuluszellen

Nach der mechanischen Denudierung der Eizellen wurden die Cumuluszellkomplexe getrennt voneinander in 4 Schritten in je 1 ml Mg^{++} - und Ca^{++} - freier „phosphate buffered saline“ (PBS) / Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA) gewaschen. Sie wurden anschließend mit 1 Vol. Mg^{++} - und Ca^{++} -freier Hyaluronidase (0.02 % [w/v], 88 U/ml) gemischt und vereinzelt. Da der Apoptosevorgang Ca^{++} -abhängig ist, wurde den Medien EDTA zugesetzt, um Ca^{++} -Ionen zu chelatieren.

3.4 Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)

Der Comet Assay wurde nach der neutralen Variante des Protokolls der Firma Trevigen (R&D Systems, Wiesbaden) durchgeführt.



Abb. 11: Comet Assay Slide [Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA]

Von den vereinzelt Cumuluszellen wurden pro Oozyte für jeden Comet Assay ca. 1000 Cumuluszellen einer Oozyte mit 50 μ l „low melting point“ (LMP)-Agarose (1 % in PBS) gemischt und auf einem beschichteten Objektträger (Comet Slide) immobilisiert.

Die LMP-Agarose wurde zuvor in einem heißen Wasserbad geschmolzen und in einem Heizblock auf 42 °C abgekühlt. Zum Erstarren der in Agarose gemischten Zellsuspension wurden die Objektträger für 10 min in den Kühlschrank gelegt. Anschließend wurden die Objektträger für 30 min in einem Lysispuffer, bestehend aus 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA pH 10, 10 mM Tris Base, 1 % Natrium Lauryl Sarcosinat und 1 % Triton X-100 bei 4 °C im Kühlschrank (dunkel) inkubiert. Dabei wurden die Zellmembranen zerstört, Proteine von der DNS gelöst und die DNS entwunden. Die Comet Slides wurden zweimal 5 min in Tris-Borat-EDTA (TBE)-

Elektrophoresepuffer gewaschen. 10 x TBE-Puffer setzte sich zusammen aus 108 g Tris Base, 55 g Borsäure und 9,3 g EDTA, gelöst in 900 ml deionisiertem Wasser.

Daraufhin wurde eine Elektrophorese (10 min bei 14 Volt) durchgeführt. Die Slides wurden 5 min in 70 % Ethanol inkubiert und anschließend an der Luft getrocknet. Dadurch wurde die Agaroseschicht in eine plane Ebene gebracht, um die Zellen in der Mikroskopie besser beurteilen zu können.

Zum Färben der DNS wurden 50 µl SYBR-Green (1 ml SYBR Green I nucleic acid gel stain, 10000 x concentrate in DMSO, BMA Bio Whittaker Molecular Applications) auf jeden Ansatz gegeben. Die Analyse erfolgte mit einem Lichtmikroskop. Apoptotische Zellen waren durch einen typischen, tropfenähnlichen Kometen leicht von nicht apoptotischen Zellen zu unterscheiden.

Für jeden Cumuluszellkomplex fand eine Auswertung von 15 Gesichtsfeldern mit 200facher Vergrößerung unter dem Mikroskop statt. Um die apoptotische Aktivität der Cumuluszellen zu bestimmen, erfolgte die Ermittlung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen.

3.5 Korrelation der Apoptoseaktivität mit Faktoren der Sterilitätsbehandlung

Die Gesamtapoptoseaktivität aller Cumuluszellen einer Patientin wurde mit dem Behandlungsergebnis im Sinne der Fertilisierungsrate und der Schwangerschaftsrate korreliert. Ebenfalls schloss sich eine Suche nach Zusammenhängen zwischen der apoptotischen Aktivität aller Cumuluszellen und den verschiedenen Stimulationsprotokollen, der Menge der verbrauchten Gonadotropine und dem Alter der Patientin an. Die Apoptoseaktivität der vereinzelter Eizell-Cumuluszell-Komplexe wurde mit der Eizellreife und der Embryoqualität korreliert. Des Weiteren wurde berechnet, ob die Cumuluszellen befruchteter Eizellen im Durchschnitt eine andere Apoptoseaktivität aufwiesen als die Cumuluszellen nicht befruchteter Eizellen.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen und Berechnungen erfolgten nach freundlicher Beratung durch Herrn Dr. Fröhlich, Mitarbeiter des Instituts für Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck, mit Hilfe des Statistikprogramms Graph Pad Prism.

Von allen erhobenen Parametern wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

Bei den erhobenen Daten handelt es sich um unverbundene, nicht normalverteilte Stichproben. Zur Berechnung von signifikanten Unterschieden fand der aus dem Kreis der Rang-Summen-Tests stammende U-Test von Mann und Whitney Verwendung, da dieser sich besonders für den Vergleich nicht normalverteilter, unverbundener Stichproben eignet. Das Vorliegen von Signifikanzen wurde auf p-Werte $< 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Die apoptotischen Zellen stellen sich nach Anfärbung mit SYBR-Green im Fluoreszenzmikroskop als typische, tropfenähnliche Kometen dar. Sie lassen sich anhand ihres charakteristischen Schweifes gut von nicht apoptotischen Zellen unterscheiden (siehe Abb. 12).

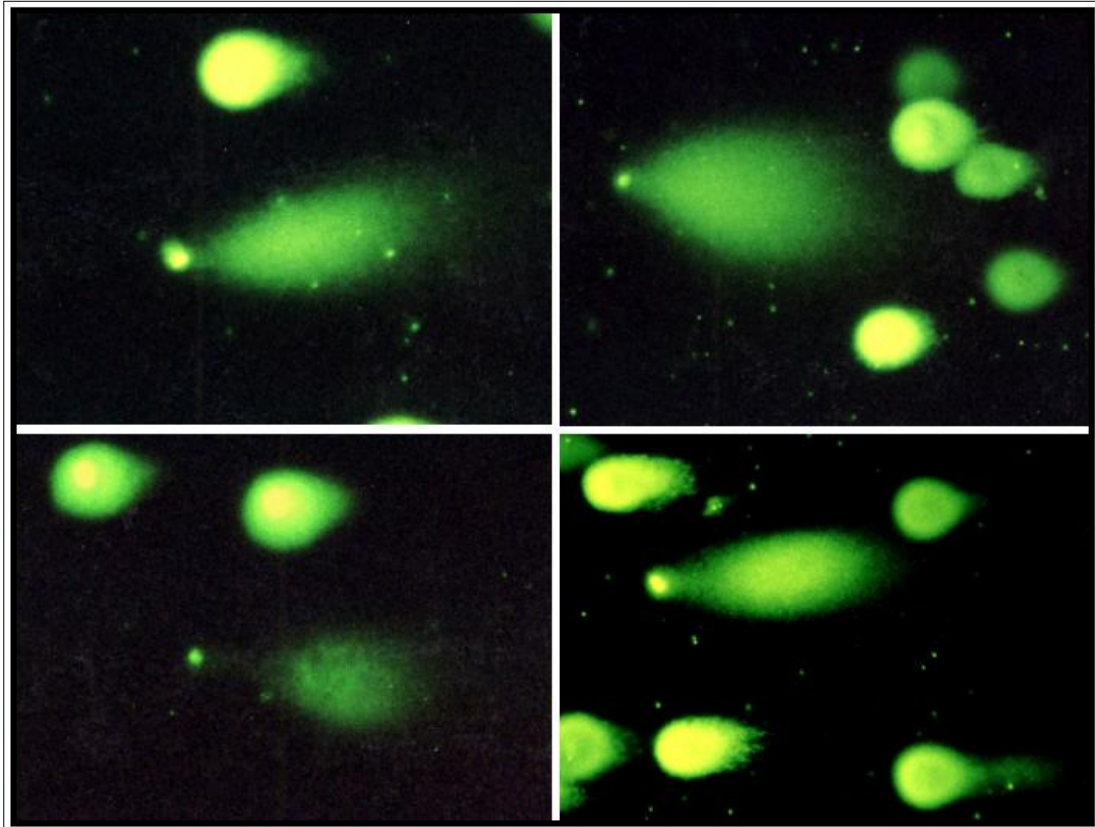


Abb. 12: Comet Assay: apoptotische und nicht apoptotische Cumuluszellen

4.1 Bestimmung der Korrelation zwischen dem Ausgang der Sterilitätsbehandlung und der Apoptoseaktivität

4.1.1 Zusammenhang vom Eintritt einer Schwangerschaft und der apoptotischen Aktivität aller Cumuli einer Patientin

Um die Gesamtapoptoseaktivität aller Cumuli einer Patientin zu bestimmen, wurde der Mittelwert der Anteile apoptotischer Zellen von allen Cumuluszellen einer Patientin gebildet. Die Werte einzeln behandelter Cumuli wurden anteilig in diesen Gesamtwert eingebracht. Als eine biochemische Schwangerschaft wurden hCG-Werte über 50 IU/ml im mütterlichen Serum dokumentiert.

Es stellte sich heraus, dass die Cumuluszellen der Patientinnen, die erfolgreich schwanger wurden ($n = 18$), eine niedrigere Apoptoseaktivität aufwiesen (Mean: 4,83 %) als die der Patientinnen, die nicht schwanger werden konnten (Mean: 6,48 %). Bei Anwendung des Mann Whitney Tests ergibt sich allerdings keine statistische Signifikanz (siehe Tab. 2).

Schwangerschaft eingetreten?	n	Mittelwert + SD	p-Wert
schwanger	18	4,83 % $\pm$ 2,50 %	0,1489
nicht schwanger	68	6,48 % $\pm$ 4,07 %	

Tab. 2: Vergleich der apoptotischen Aktivität: schwanger / nicht schwanger; [n = Anzahl der Patientinnen]; Überprüfung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

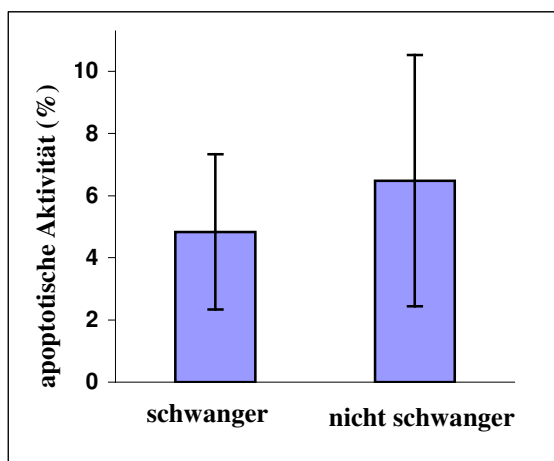


Abb. 13: Vergleich der Apoptoseaktivität in Cumuluszellen: schwanger / nicht schwanger

4.1.2 Korrelation der Eizellfertilisierungsrate mit der Apoptoseaktivität in den Cumuli einer Patientin

Die Fertilisierungsrate jeder Patientin gibt an, wie viele der gewonnenen Eizellen durch ICSI befruchtet werden konnten. Die Raten variierten zwischen 0 und 100 %. Ein minimaler Abfall der Apoptoseaktivität in allen Cumuluszellen einer Patientin bei erhöhter Fertilisierungsrate ohne statistische Relevanz konnte festgestellt werden (siehe Abb.14).

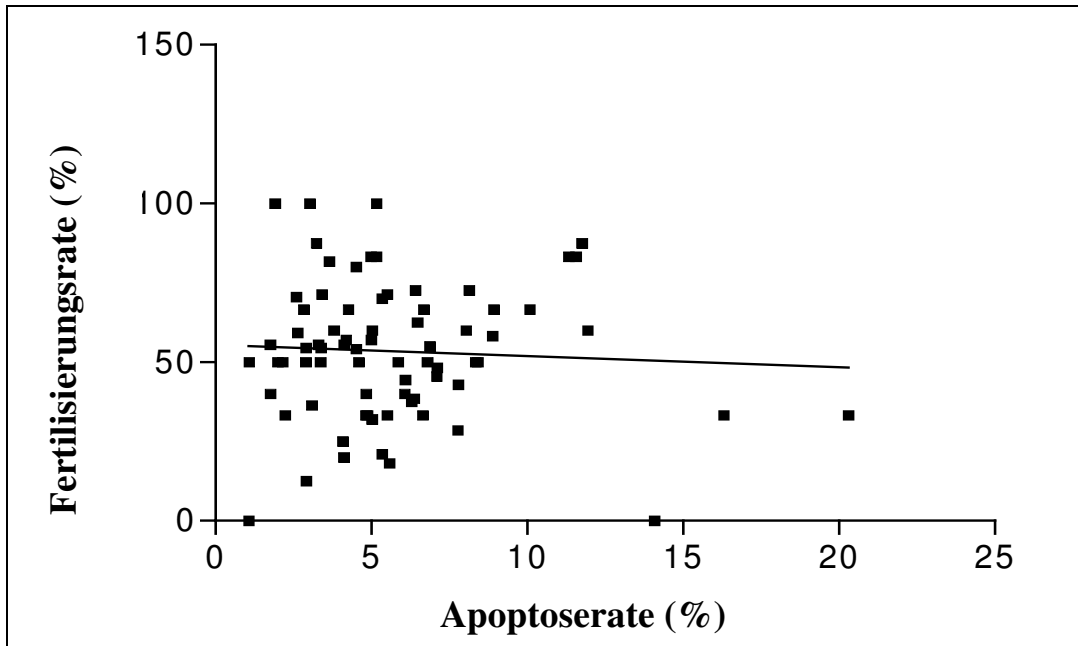


Abb. 14: Darstellung der Fertilisierungsrate gegenüber der Apoptoseaktivität

4.1.3 Apoptoseaktivität in Cumuluszellen von befruchteten und nicht befruchteten Eizellen

In dieser Studie wurden von 72 Patientinnen 246 Oozyten und deren Cumuluszellen streng separat gesammelt und untersucht. Von diesen 246 Oozyten konnten 130 befruchtet werden, entsprechend einer Fertilisierungsrate von 52,85 %.

Bei der Untersuchung der einzelnen Eizellen stellte sich heraus, dass die Cumuluszellen der Oozyten, die befruchtet werden konnten, eine niedrigere Apoptoserate aufwiesen als die Cumuluszellen von Oozyten, die nicht befruchtet werden konnten. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$) (siehe Tab. 3 und Abb. 15).

Befruchtung gelungen?	n	Mittelwert + SD	p - Wert
nicht befruchtet	116	6,59 % $\pm$ 5,16 %	0,0449
befruchtet	130	4,95 % $\pm$ 2,99 %	

Tab. 3: Vergleich der apoptotischen Aktivität: Fertilisation / keine Fertilisation; [n = Anzahl der Eizellen]; Überprüfung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

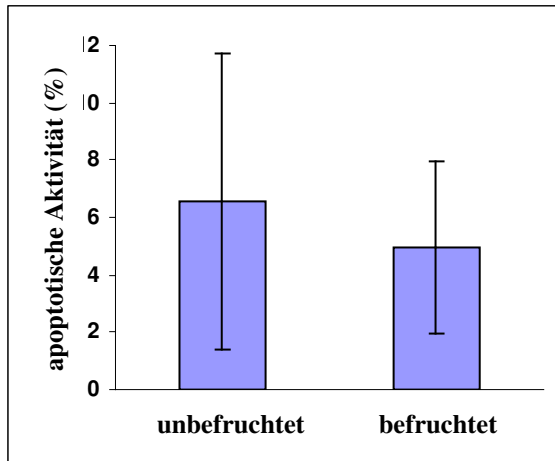


Abb. 15: Vergleich der Mittelwerte der apoptotischen Aktivität: Fertilisation / keine Fertilisation

4.1.4 Zusammenhang der Embryoqualität mit der Apoptoseaktivität in vereinzelt Eizell-Cumuluszell-Komplexen

Mitarbeiter des IVF-Labors bestimmten 48 h nach der ICSI-Behandlung mittels morphologischer Kriterien die Embryoqualität unter dem Lichtmikroskop (siehe Kap. 3.2), wobei eine Einteilung der fertilisierten Eizellen in die drei Qualitäten unregelmäßig, schön und ideal vorgenommen wurde.

Die Cumuluszellen der nicht fertilisierten Oozyten wiesen die höchste apoptotische Aktivität auf (Mean: 6.59 %), während sich die niedrigste Aktivität bei idealen Embryonen zeigte (Mean: 4.73 %). Zwischen diesen beiden Werten besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0.047$). Die Mittelwerte der apoptotischen Aktivität der Cumuluszellen fielen mit zunehmender Embryonenqualität ab (unregelmäßig 5.63 % > schön 4.99 % > ideal 4,73 %) (siehe Abb. 16 und Tab. 4). Diese Tendenz ist jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0.6101$) (siehe Tab. 5).

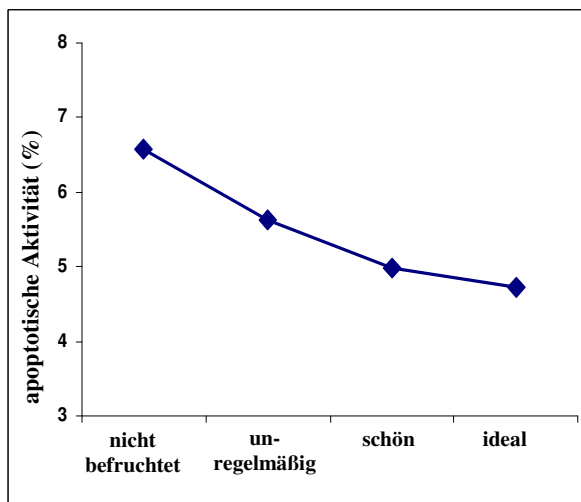


Abb. 16: Apoptoseaktivität und Embryoqualität

	nicht befruchtet ①	unregelmäßig ②	schön ③	ideal ④
n = 246	116	14	61	55
Mittelwerte apoptot. Aktivität	6,59 %	5,63 %	4,99 %	4,73 %

Tab. 4: Mittelwerte der Eizellanzahl

	Embryoqualitäten		p - Werte
Überprüfung auf Signifikanz nach Mann - Whitney zwischen...	nicht befruchtet ①	⇒ unregelmäßig ②	0,7269
	nicht befruchtet ①	⇒ schön ③	0,1469
	nicht befruchtet ①	⇒ ideal ④	0,0473
	unregelmäßig ②	⇒ schön ③	0,6101
	unregelmäßig ②	⇒ ideal ④	0,3667
	schön ③	⇒ ideal ④	0,5879

Tab. 5: Überprüfung der Signifikanz in den Unterschieden zwischen den Embryoqualitäten im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

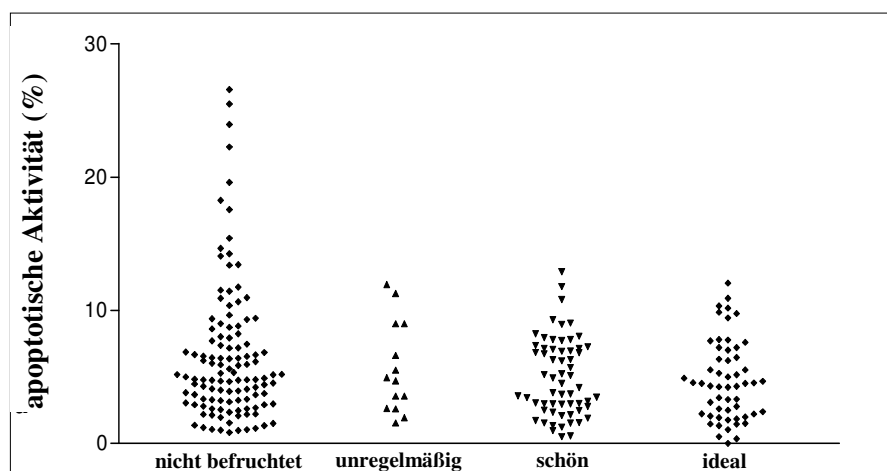


Abb. 17: Verteilung der Apoptoseaktivität in den vier Embryoqualitäten

Aufgrund der starken intraindividuellen Schwankungen der Apoptoseaktivität in den Cumuluszellen wurde für jede Patientin, von der drei oder vier Cumuli vereinzelt untersucht werden konnten ($n = 68$), eine Rangfolge aufgestellt, um erkennen zu können, ob die Embryonen mit der schlechtesten Qualität einer Patientin tendenziell die höchste Apoptoserate aufwiesen, bzw. die besten Embryonen auch die niedrigste. Das heißt, der Cumulus-Eizell-Komplex mit der höchsten Apoptoserate innerhalb dieser Patientin erhielt die Rangnummer eins, der Cumulus-Eizell-Komplex mit der niedrigsten apoptotischen Aktivität die Nummer drei oder vier. Die Abb. 18 zeigt, dass die Embryonen mit den schlechten Qualitäten in den meisten Fällen eine niedrige Rangordnung erhalten haben, was bedeutet, dass sie innerhalb einer Patientin die höchste apoptotische Aktivität der Cumuluszellen aufwiesen.

So könnte sich für jede individuelle Patientin eine erhöhte Wahrscheinlichkeit ergeben, dass der Cumulus-Eizell-Komplex mit der niedrigsten apoptotischen Aktivität auf eine gute Qualität der dazugehörigen Eizelle hindeutet, während eine Eizelle, deren Cumuluszellkomplex die höchste Apoptoseaktivität aufweist, eine schlechtere Qualität haben könnte.

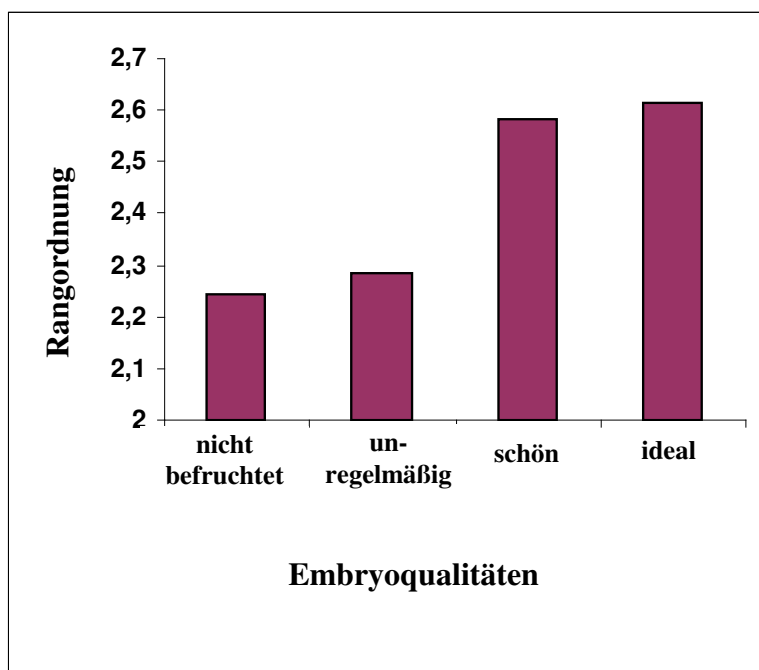


Abb. 18: Darstellung der Rangordnung der Embryoqualitäten innerhalb einer Patientin

4.2 Eizellreife in Abhängigkeit der apoptotischen Aktivität der dazugehörigen Cumuluszellen

Die Reife der Eizellen wurde unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Es wurden die drei Reifestadien Germinalvesikel (GV), Mitose I (MI) und Mitose II (MII) festgestellt. Bei der Betrachtung der apoptotischen Aktivität in Cumuluszellen ließ sich erkennen, dass die GV im Mittel eine etwas höhere Apoptoseaktivität (Mean: 6.04 %) ihrer Cumuluszellen aufwiesen als die Cumuluszellen der Eizellen mit dem Reifegrad MI (Mean: 5.39 %) und MII (Mean: 5.73 %). Die p-Werte ergaben keine Signifikanzen (siehe Tab. 6).

Reifezustand	n	Mittelwert + SD	Überprüfung der Signifikanz	p-Wert
GV ①	9	6,04 % ± 4,11 %	① ⇨ ②	0,3854
MI ②	13	5,39 % ± 5,76 %	② ⇨ ③	0,2604
MII ③	224	5,73 % ± 4,17 %	① ⇨ ③	0,7738

Tab. 6: Apoptotische Aktivität und Eizellreifezustand GV (Germinal Vesikel), MI (Mitose I) und II (Mitose II); [n]: Anzahl getesteter Oozyten; Überprüfung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

4.3 Einfluss der kontrollierten ovariellen Stimulation (COH) auf die Apoptoserate der Cumuluszellen

4.3.1 Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationsprotokollen

Im Zeitraum der Durchführung dieser Arbeit fanden in der Sterilitätsbehandlung drei verschiedene Stimulationsprotokolle Anwendung. Zwei der Protokolle wurden mit dem GnRH-Antagonisten Cetrotide durchgeführt, das dritte in Form des „langen Protokolls“ mit einem GnRH-Agonisten. Bei den Antagonisten-Protokollen wurden zwei verschiedene Formen verwandt: Die Kombination von GnRH-Antagonist mit rec. FSH und alternativ die Kombination von GnRH-Antagonist mit hMG. Um zu erkennen, ob sich die verschiedenen Hormonbehandlungen unterschiedlich auf die apoptotische Aktivität der Cumuluszellen auswirken, wurden die einzelnen Stimulationsprotokolle miteinander verglichen. Man erkennt, dass sich die apoptotischen Aktivitäten, die als Mittelwert aller Cumuli einer Patientin ermittelt wurden, kaum zwischen den einzelnen Protokollen unterschieden (siehe Tab. 7).

Stimulationsprotokoll	n	Mittelwert + SD	Überprüfung der Signifikanz	p-Wert
Cetrotide + rec. FSH ①	61	6,10% ± 3,61%	① ⇨ ②	0,7335
Cetrotide + hMG ②	22	6,14% ± 4,58%	② ⇨ ③	0,7762
langes Protokoll ③	4	4,89% ± 3,04%	③ ⇨ ①	0,6040

Tab. 7: Apoptotische Aktivität in Abhängigkeit von der Stimulation; [n]: Anzahl der Patientinnen; Überprüfung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

4.3.2 Apoptoseaktivität in Korrelation zur Menge verbrauchter Gonadotropine

Der Bedarf an Gonadotropinen, gemessen in IU, variierte stark zwischen den Patientinnen. Der minimale Bedarf lag bei 150 IU und das Maximum bei 13050 IU pro Zyklus. Patientinnen, die mehr als 2500 IU benötigen, um ausreichend reife Eizellen zu produzieren, werden als „poor responder“ bezeichnet ($n = 30$). Es stellte sich heraus, dass diese Patientinnen eine signifikant höhere apoptotische Aktivität ihrer Cumuluszellen (Mean: 7,35 %) aufwiesen als Patientinnen, die mit weniger Einheiten auskamen (Mean: 5,48 %). Der p-Wert beträgt 0,0393 und zeigt damit eine statistische Signifikanz (siehe Tab. 8).

Verbrauch an Gonadotropinen	n	Mittelwert + SD	p - Wert
> 2500 IU	30	7,35 % ± 4,32 %	0,0393
< 2500 IU	56	5,48 % ± 0,34 %	

Tab. 8: Vergleich der apoptotischen Aktivität von „poor respondern“ [Verbrauch > 2500 IU] und restlichen Patientinnen [Verbrauch < 2500 IU]; [n]: Anzahl der Patientinnen; Überprüfung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

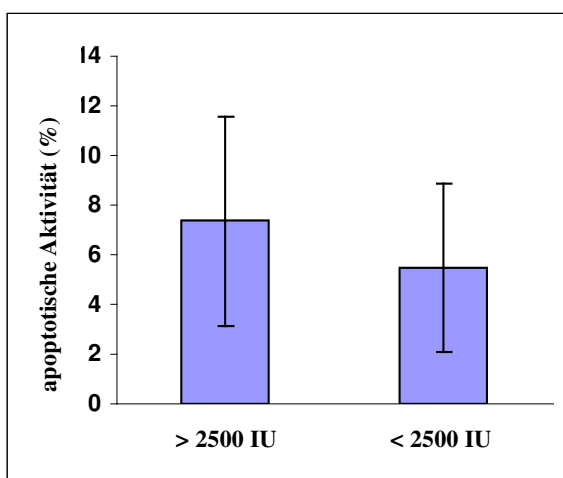


Abb. 19: Vergleich der mittleren Apoptoseaktivität von „poor respondern“ (Verbrauch > 2500 IU) mit restlichen Patientinnen (Verbrauch < 2500 IU)

4.3.3 Zusammenhang zwischen der Anzahl reifer Oozyten und der apoptotischen Aktivität der gepoolten Cumuluszellen einer Patientin

Wie in Kap. 4.3.2. gezeigt, variierte der Bedarf an Gonadotropinen, gemessen in IU, stark. Ebenso gab es große individuelle Unterschiede in der Follikelbildung unter der Hormonbehandlung. Die Anzahl variierte unter den 86 Patientinnen von einem Minimum von einer reifen Eizelle bis zu einem Maximum von 29 reifen Eizellen. Eine Anzahl von < 4 reifen Eizellen galt als ein weiteres Kriterium für einen „poor responder“ ($n = 15$). Im Vergleich stellte sich heraus, dass die „poor responder“ eine geringfügig höhere apoptotische Aktivität (Mean: 6,36 %) aufwiesen als die anderen (Mean: 6,08 %). Mit einem p-Wert von 0,6572 ist dieses Ergebnis nicht als statistisch signifikant anzusehen (siehe Tabelle 9).

Anzahl reifer Eizellen	n	Mittelwert + SD	p - Wert
< 4	15	6,36 % $\pm$ 5,26 %	0,6572
> 4	71	6,08 % $\pm$ 3,52 %	

Tab. 9: Vergleich der mittleren apoptotischen Aktivität zwischen „poor respondern“ [< 4 Eizellen] und restlichen Patientinnen [> 4 Eizellen]; [n]: Anzahl der Patientinnen; Überprüfung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

4.4 Zusammenhang zwischen dem Lebensalter der Patientinnen und der Apoptoseaktivität in den gepoolten Cumuluszellen

Das Alter der Patientinnen in dieser Studie variierte zwischen 21 und 46 Jahren. Ordnet man die Patientinnen in Altersgruppen von 21-30 Jahre, 31-35 Jahre und 36-46 Jahre und vergleicht die Apoptoseaktivität der Cumuluszellen (siehe Tab. 10), so ist nur ein geringer, nicht signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Altersgruppen zu erkennen.

Altersgruppen	n	Mittelwert + SD	Überprüfung der Signifikanz	p - Wert
21-30 Jahre ①	26	6,42 % $\pm$ 4,12 %	① $\Rightarrow$ ②	0,4035
31-35 Jahre ②	34	5,89 % $\pm$ 4,16 %	② $\Rightarrow$ ③	0,2665
36-46 Jahre ③	26	6,16 % $\pm$ 3,22 %	③ $\Rightarrow$ ①	0,9489

Tab. 10: Apoptoseaktivität in Abhängigkeit vom Lebensalter; [n]: Anzahl der Patientinnen; Überprüfung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

5 Diskussion

5.1 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob die apoptotische Aktivität von Cumuluszellen einen möglichen Prädiktor für das Behandlungsergebnis einer Sterilitätsbehandlung durch ICSI darstellt. Der enge Kontakt der Cumuluszellen mit der Oozyte und ihr stetiger Substrataustausch bis kurz vor dem Eisprung legen nahe, dass Vorgänge im Entwicklungsprozess der Cumuluszellen einen Einfluss auf die Entwicklung der Eizellen haben. Zahlreiche Studien haben untersucht, ob der natürliche Zelltod der Cumuluszellen eine Rolle im Entwicklungs- und Reifungsprozess der Eizelle spielt (Van Soom et al. 2002; Arellano et al. 2002; Kidder et al. 2002; Sun et al. 2002; Su et al. 2002; De Pol et al. 1997; Host et al. 2000). Verschiedene Techniken zur Ermittlung der apoptotischen Aktivität in Cumuluszellen fanden dabei Anwendung. Aus der Mehrheit der Publikationen geht hervor, dass eine hohe apoptotische Aktivität in Cumuluszellen mit Faktoren korreliert, die sich negativ auf das Ergebnis einer Sterilitätsbehandlung auswirken. Bisher verwendete nur eine Arbeitsgruppe den Comet Assay (Raman et al. 2001). Diese Gruppe fand in einer Gruppe von 15 Patientinnen einen positiven Zusammenhang von Apoptose in den Cumuluszellen und der Fertilisierungsrate der gewonnenen Eizellen einer Frau. Wir strebten an, mit einem größeren Patientinnenpool und der Untersuchung einzelner Eizell-Cumuluszell-Komplexe diese Behauptung unter Verwendung des Comet Assay zu überprüfen.

Unsere Ergebnisse mit dem Comet Assay stehen im Widerspruch zu der oben genannten Publikation. Eine hohe apoptotische Aktivität in Cumuluszellen scheint mit einer schlechteren Eizellqualität und einem schlechteren Ergebnis der ICSI-Behandlung einherzugehen.

In der vorliegenden Studie konnte anhand der Untersuchungen aller Cumuluszellen einer Patientin gezeigt werden, dass die Apoptoseaktivität der Cumuluszellen von Patientinnen, die durch die Behandlung schwanger wurden, tendenziell niedriger war als die der Frauen, die nicht schwanger werden konnten (siehe Kap. 4.1.1). Der Unterschied ist allerdings sehr gering und als statistisch nicht signifikant einzustufen.

Da der Erfolg einer IVF-Behandlung von vielen Faktoren abhängt, wie z.B. dem Alter der Patientin, der Eizell- und Spermatozoenqualität, dem Hormonprofil, dem Embryotransfer und der Endometriumrezeptivität, scheint dieses Ergebnis nicht zu überraschen. Es stimmt mit den Behauptungen der Gruppe Lee et al. überein, die eine signifikant geringere Apoptoserate bei erfolgreich behandelten Patientinnen finden konnten ($p < 0,001$) (siehe Tab. 11) (Lee et al. 2001). Diese Gruppe untersuchte die apoptotische Aktivität von Cumuluszellen von 91 reifen Eizellen, die in 34 IVF/ET-Zyklen gewonnen wurden. Allerdings wurde in dieser Studie die Apoptose im TUNEL-(Tdt-mediated dUTP nick end labeling-) Assay analysiert.

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass die Apoptoseaktivität in allen Cumuluszellen einer Patientin bei guter Fertilisierungsrate minimal niedriger liegt als bei schlechteren Fertilisierungsraten (siehe Kap. 4.1.2). Dieses Ergebnis steht in klarem Kontrast zu dem Ausgang der Studie von Raman et al. Diese fanden eine positive Korrelation zwischen der Fertilisierungsrate und der Apoptose in Cumuluszellen (Raman et al. 2001). Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass Raman et al. den Comet Assay mit einer abweichenden Auswertungstechnik zur Bestimmung der apoptotischen Aktivität verwendeten. Alle Cumuluszellen einer Patientin wurden zusammen untersucht und die Größe und Intensität (tail-moment) der Kometen bestimmt. Die Gesamtapoptoserate der 15 untersuchten Patientinnen korrelierte positiv mit der erhaltenen Fertilisierungsrate. Nach unserer Auffassung ist die Bewertung der Intensität einzelner „tail-moments“ zur Bestimmung der apoptotischen Aktivität in Cumuluszellen nicht geeignet. Der Vorgang der Apoptose ist nicht umkehrbar und der Status der DNS-Fragmentation ist für die Bestimmung der Apoptoseaktivität nicht relevant. Allein das Auftreten von Kometen kann zur Bestimmung der Apoptoseaktivität herangezogen werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin zu überprüfen, ob die Art der vorausgegangenen hormonellen Stimulation einen Einfluss auf die apoptotische Aktivität der Cumuluszellen besitzt (siehe Kap. 4.3). Dabei wurden sowohl die verschiedenen Stimulationsprotokolle als auch die Mengen der verwendeten Gonadotropine (gemessen in IU) auf eine mögliche Korrelation zur apoptotischen Aktivität aller Cumuluszellen einer Patientin hin untersucht. Es zeigte sich, dass es kaum Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Stimulationsprotokollen gab

(siehe Tab. 7). Zwei der drei verwendeten Protokolle wurden mit GnRH-Antagonisten durchgeführt, während das dritte Protokoll GnRH-Agonisten zur Verhinderung einer spontanen Ovulation verwendete. Laut der Studie von Billig et al. verursachen GnRH-Agonisten eine zeit- und dosisabhängige vermehrte apoptotische DNS-Fragmentierung im Ovar von Ratten (Billig et al. 1994). Andere Gruppen zeigten, dass es unter Einsatz von GnRH-Agonisten zwar zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl an Embryonen kam, dass aber der Anteil an Embryonen mit guter Qualität abnahm (Testart et al. 1989). Kaneko et al. zeigten in ihrer Studie an 20 Patientinnen, dass die apoptotische Aktivität von Granulosazellen in einem Agonisten-Zyklus signifikant höher war als in einem natürlichen Zyklus ($p < 0,0002$), während die Stimulation nur mit hMG und hCG ohne Verwendung eines GnRH-Analogons eine wesentlich niedrigere Apoptoserate aufwies als in einem natürlichen Zyklus ($p < 0,01$) (siehe Tab. 11) (Kaneko et al. 2000). Inwieweit diese Feststellungen klinische Relevanz besitzen, ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

In der vorliegenden Studie wurden nur vier Patientinnen mit dem sog. „langen Agonisten Protokoll“ behandelt, so dass ein Vergleich zwischen den beiden Gruppen von GnRH-Analoga anhand dieser Studie wenig aussagekräftig ist. Es lässt sich jedoch feststellen, dass es auch innerhalb der zwei verschiedenen Antagonisten-Protokolle offensichtlich keine Unterschiede in der apoptotischen Aktivität der Cumuluszellen gibt. Die apoptotische Aktivität der Cumuluszellen ist also beim Einsatz von rec. FSH ähnlich wie beim Einsatz der Kombination rec. FSH und LH in Form des hMG. Somit scheint der Zusatz von LH keinen Effekt auf die Apoptoseaktivität der Cumuluszellen zu besitzen.

Im Gegensatz dazu scheint die Menge der verabreichten Gonadotropine einen entscheidenden Zusammenhang mit dem natürlichen Zelltod der Cumuluszellen aufzuweisen (siehe Tab. 8). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen „gut“ und „schlecht“ auf die Stimulation ansprechenden Patientinnen (sogenannte „good responder“ und „poor responder“): Die Cumuluszellen von Patientinnen, die mit mehr als 2500 IU stimuliert werden mussten, um eine ausreichende follikuläre Reifung zu erzielen, wiesen eine signifikant höhere Apoptoseaktivität auf als die der Patientinnen, die mit weniger als 2500 IU stimuliert werden konnten ($p < 0,039$). Es ist anzunehmen, dass nicht erst die Mengen der Gonadotropine die Apoptoserate

erhöhen, sondern dass die Eigenschaft der Patientin als sog. „poor responder“ eine erhöhte Apoptoserate und damit eine schlechtere Eizellqualität mit sich bringt.

Patientinnen, die weniger als vier reife Eizellen ausbildeten, können ebenfalls als „poor responder“ bezeichnet werden. Hier konnte im Vergleich zu Patientinnen, die mehr als vier Eizellen nach der Hormonbehandlung ausbildeten, keine signifikant unterschiedliche apoptotische Aktivität der Cumuluszellen festgestellt werden (siehe Kap. 4.3.3). Im Gegensatz dazu zeigten Lee et al. in ihrer Studie, dass die apoptotische Aktivität in Cumuluszellen bei den Patientinnen signifikant niedriger war, bei denen fünf oder weniger Eizellen gewonnen werden konnten ($p < 0,05$) (siehe Tab. 11) (Lee et al. 2001). Hier könnte jedoch auch eine zu milde Stimulation bei eigentlichen „good responders“ eine Erklärung dieses Ergebnisses sein.

Zusätzlich spielt das Alter der Patientin eine bedeutende Rolle für das Behandlungsergebnis der Sterilitätsbehandlung im Rahmen der ICSI. Die Aussicht auf Erfolg in der ART wird mit zunehmendem Lebensalter der Patientin mit Kinderwunsch schlechter. Die Qualität der Eizellen sinkt und die endometrialen Verhältnisse sind aufgrund der veränderten Hormonausschüttung nur noch suboptimal für das Einnisten und Heranreifen befruchteter Eizellen geeignet. Hier konnte allerdings kein Unterschied in den Apoptoseraten herausgearbeitet werden.

Die Gruppe Lee et al. konnte tatsächlich zeigen, dass das Alter der Patientin das Auftreten von Apoptose beeinflusst. Patientinnen, die über 40 Jahre alt waren, zeigten eine signifikant höhere Apoptoserate ihrer Cumuluszellen als die jüngeren Patientinnen unter 40 Jahren. Auch die Studie von Sadraie et al. an 28 ICSI-Patientinnen zeigt, dass die Granulosazellen älterer Frauen eine höhere apoptotische Aktivität aufweisen als die Zellen jüngerer Frauen (Sadraie et al. 2000).

Diese Korrelation konnte in der vorliegenden Arbeit nicht aufgezeigt werden. Die drei Altersgruppen wiesen alle eine ähnliche apoptotische Aktivität ihrer Cumuluszellen auf (siehe Kap. 4.4). Auch die Gruppe um Raman et al. konnte keine Korrelation zwischen dem Alter der Patientin und der Apoptoseaktivität feststellen (Raman et al. 2001). Da aber das biologische Alter der Patientin nicht nur die Eizellqualität, sondern auch die Endometriumrezeptivität, den hormonellen Status und die psychische Situation der Patientin beeinträchtigt, kann die Eizellqualität

nicht als alleiniger Faktor für die Erfolgswahrscheinlichkeit der Sterilitätsbehandlung betrachtet werden.

Anhand der oben diskutierten Ergebnisse wird deutlich, dass die Gesamtaoptoserate aller Cumuluszellen einer Patientin nur bedingt dazu geeignet ist, eine prädiktive Aussage über das Ergebnis der Sterilitätsbehandlung zu treffen. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, die apoptotische Aktivität der Cumuluszellen für jede einzelne Eizelle zu untersuchen.

Bei der Untersuchung einzelner Eizell-Cumuluszell-Komplexe fanden wir eine negative Korrelation zwischen der apoptotischen Aktivität der Cumuluszellen und der Qualität der dazugehörigen Eizelle, reflektiert durch die beobachtete Fertilisationsrate. Cumuluszellen, deren Eizelle befruchtet werden konnte, zeigten eine signifikant niedrigere Apoptoseaktivität als Cumuluszellen, deren zugehörige Eizelle nicht befruchtet werden konnte ($p = 0,0449$) (siehe Kap. 4.1.3). Zudem wurde tendenziell deutlich, dass eine erhöhte Apoptoseaktivität in Cumuluszellen mit einer schlechteren Qualität des erzielten Embryos einhergeht (siehe Kap. 4.1.4). Ein signifikanter Unterschied war jedoch nur zwischen den Embryonen mit der Qualität „ideal“ und den Eizellen, die nicht befruchtet werden konnten zu bemerken ($p = 0,0473$). Es wurden nach 72 Follikelpunktionen insgesamt 246 Eizellen einzeln untersucht, von denen 130 Eizellen befruchtet werden konnten. Dies entspricht einer Fertilisierungsrate von 52,85 %. Die befruchteten Eizellen entwickelten sich in der Mehrzahl zu idealen oder schönen Embryonen. Bei den 14 unregelmäßigen Embryonen, die zum Transfer kamen, zeigten die Cumuluszellen eine tendenziell erhöhte Apoptoseaktivität auf im Vergleich zu den Cumuluszellen von schönen oder idealen Embryonen (unregelmäßig: 5,63 % vs. schön: 4,99 % vs. ideal: 4,73 %) (siehe Tab. 4). Aufgrund der geringen Anzahl der unregelmäßigen Embryonen ist dieses Ergebnis nur richtungsweisend und erreicht keine statistisch signifikante Aussage.

Anhand der Bestimmung der Rangordnungen bei einer Patientin (siehe Abb. 18) kann man jedoch deutlich sehen, dass die Eizelle, die den Embryo mit der besten Qualität hervorbringt, die niedrigste Apoptoseaktivität ihrer Cumuluszellen aufweist.

Andere Studien bestätigten ebenfalls eine negative Korrelation zwischen der Apoptoseaktivität und der Eizellqualität. Host et al. beispielsweise wiesen in einer

prospektiv randomisierten Studie an insgesamt 164 Eizell-Cumuluszell-Komplexen nach, dass in den Oozyten, die letztlich mittels ICSI fertilisiert werden konnten, die Apoptoserate der dazugehörigen Cumuluszellen signifikant geringer war als in den nicht fertilisierten Eizell-Cumuluszell-Komplexen ($p < 0,0082$) (siehe Tab. 11) (Host et al. 2000). Diese Gruppe detektierte apoptotische Zellen mithilfe des TUNEL-Assays.

Auch in der Studie von Lee et al. konnte eine positive Korrelation zwischen der Apoptoseaktivität und verminderter Eizellqualität nachgewiesen werden (Lee et al. 2001).

Daraus kann abgeleitet werden, dass die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Embryos mit einer guten Qualität höher ist, wenn der Reproduktionsmediziner diejenige Eizelle im 2 Pronukleusstadium zur weiteren Kultivierung auswählt, deren Cumuluszellen die niedrigste Apoptoseaktivität im Comet Assay aufweisen. Die Richtigkeit dieser Behauptung zu überprüfen, bleibt jedoch weiteren Studien vorbehalten.

Zusätzlich zur Qualität der Eizelle wurde erforscht, ob der Reifegrad der Oozyte mit der Apoptoseaktivität der dazugehörigen Cumuluszellen korreliert. Dies ist allerdings nicht der Fall. Die Cumuluszellen von Eizellen im Stadium des Germinalvesikels weisen zwar im Mittel eine höhere apoptotische Aktivität auf, eine statistische Signifikanz besteht jedoch nicht (siehe Kap. 4.2). Die Studie von Moffatt et al. zeigt ähnliche Ergebnisse. Diese Gruppe untersuchte die Expression von Apoptoseproteinen wie Fas, Fas-L, Bcl-x_L und TIAR auf Cumuluszellen von 23 Patientinnen im Rahmen einer ICSI-Behandlung und stellte fest, dass diese nicht durch den Reifezustand der Eizelle beeinflusst wird (Moffatt et al. 2002). Host et al. konnten jedoch nachweisen, dass die Apoptoserate in Cumuluszellen von Eizellen im Stadium des Germinalvesikels und der Metaphase I Oozyten signifikant höher war als in Cumuluszellen der Metaphase II Oozyten ($p < 0,0001$) (siehe Tab. 11) (Host et al. 2000).

Auftreten von Apoptose in Cumuluszellen in der ART					
Schwangerschaft	-	natürlicher Zyklus	-	Germinal Vesikel	+
Alter	+	hMG+hCG	-	Metaphase I	+
Anzahl gewonnener Eizellen über 5	+	GnRH+hMG+hCG	+	Metaphase II	-
Embryoqualität	-	Fertilisierung	-	Fertilisierung	-
		Alter	+		
Lee KS, South Korea 2001		Kaneko T, Japan 2000		Host E, Denmark 2000	Vorliegende Studie Lübeck 2002

Tab. 11: Darstellung der Ergebnisse der Studien von Lee, Kaneko, Host und vorliegende Studie
[+ = positive Korrelation; - = negative Korrelation]

5.2 Schlussfolgerung

Auf der Grundlage eines relativ großen Patientinnenpools von 86 Patientinnen und der Verwendung des Comet Assay zur Bestimmung der Apoptoseaktivität in Cumuluszellen von zur ICSI verwendeten Eizellen stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Einklang mit der Mehrheit der Publikationen zu diesem Thema. Durch die Analyse der Apoptoseaktivität in Cumuluszellen einzelner Eizellen konnten genauere Aussagen über die Korrelation der Apoptoseaktivität und der dazugehörigen Eizelle getroffen werden. Damit kann dem Reproduktionsmediziner eine Methode aufgezeigt werden, die das Auswählen der Eizellen im Pronukleusstadium erleichtert. Eine erhöhte Apoptoseaktivität in Cumuluszellen von Eizellen, die zur ICSI verwendet werden sollen, ist offensichtlich mit einem schlechteren Behandlungsergebnis verknüpft, bedingt durch schlechtere Qualität der Eizellen und der gewonnenen Embryonen.

Inwieweit diese Technik, die prinzipiell in den klinischen Routineablauf integriert werden könnte, sich etablieren wird, bleibt jetzt abzuwarten.

5.3 Ausblick

Um eine umfassende prädiktive Aussage über den weiteren Verlauf der ART-Behandlung zu treffen, muss auch die Qualität der männlichen Spermatozoen betrachtet werden, denn auch sie spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung eines gesunden Embryos. Es wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Studien, die Apoptoseaktivitäten der Spermatozoen und der Eizellen eines Paares parallel zu untersuchen und dann vergleichende Aspekte zum Ergebnis der IVF-Behandlung zu betrachten. Es gibt bereits einige Arbeiten, die sich damit auseinandersetzen, ob Apoptose tatsächlich einen prädiktiven Faktor in der Entwicklung der Spermatozoen darstellt. Morris et al. konnten unter Anwendung des Comet Assays nachweisen, dass eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von Apoptose in Spermatozoen und der schlechten Entwicklung des Embryos nach ICSI besteht (Morris et al. 2002). Auch andere Gruppen zeigten einheitlich bei Nachweis von Apoptose mithilfe des TUNEL Assays, dem Nachweis von Apoptosemarkern wie Fas, Bcl-x und p53 und durch Anfärbung der Zellen mit Annexin V, dass eine hohe Apoptoserate mit einer schlechten Spermatozoenqualität einhergeht (Sakkas et al. 2002; Marchetti et al. 2002; Shen et al. 2002; Host et al. 2000).

6 Zusammenfassung

In Deutschland verbietet das bestehende Embryonenschutzgesetz, befruchtete Eizellen im Embryonenstadium zu selektieren. Die Entwicklung neuer Methoden zur Beurteilung von Oozyten im Vorkernstadium ist daher von großer Bedeutung, um die Behandlungschancen einer reproduktionsmedizinischen Behandlung zu verbessern.

Ohne die Oocyte selbst zu manipulieren, lassen sich im Rahmen der ICSI die Cumuluszellen zur Untersuchung der apoptotischen Aktivität heranziehen. Während der Eizellreifung haben die Cumuluszellen die Aufgabe, die Oocyte zu versorgen und Signale von außen an sie weiterzuleiten. Die Integrität der Cumuluszellen könnte demnach Einfluss auf die qualitative Entwicklung der Oocyte haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen tendenziell erkennen, dass die Entwicklung einer Oocyte zu einem Embryo mit guter Qualität wahrscheinlicher ist, wenn deren Cumuluszellen niedrige apoptotische Aktivitäten aufweisen. Dieses Erkenntnis könnte deutschen Reproduktionsmedizinern helfen, geeignete Oozyten im 2 Pronukleusstadium zu wählen und den weiteren Behandlungsverlauf zu optimieren. Deutlich wurde, dass Cumuluszellen, deren Eizellen nicht befruchtet werden konnten, eine höhere apoptotische Aktivität aufwiesen als Cumuluszellen, deren Eizellen erfolgreich befruchtet werden konnten. Eine hohe Apoptoseaktivität in Cumuluszellen scheint also mit einer schlechten Qualität der dazugehörigen Eizelle zusammen zu hängen. Zusätzlich konnte eine hohe apoptotische Aktivität in Cumuluszellen festgestellt werden, wenn die Patientinnen mit einer hohen Anzahl an hormonellen Einheiten stimuliert wurden.

Der Comet Assay wird auch in Zukunft im IVF-Labor der Frauenklinik der Universität zu Lübeck angewendet werden um herauszufinden, ob sich diese neue viel versprechende Methode zur Verbesserung der Behandlungschancen in der ART über einen längeren Zeitraum hinweg bewährt und so in die klinische Routine eingebracht werden kann.

7 Tabellarische Auflistung aller verwendeten Rohdaten

Altersgruppen:
21J. - 30J. = 1
31J. - 35J. = 2
36J. - 46J. = 3

Hormonelle Stimulation:
Cet. = Cetrotide
Gon.F = Gonal F
Meno. = Menogon
Pur. = Puregon
Syn. = Synarela
Enan. = Enantone
Zol. = Zoladex
Luv. = Luveris

Schwanger:
Nein = 1
Ja = 2

Qualität Eizelle:
schlecht = 1
OK / normal = 2

Qualität Embryo:
keine Befruchtung = 1
unregelmäßig = 2
schön = 3
ideal = 4

Kryo = X

Patienten-Nr.	Altersgruppe	Hormonelle Stimulation	Stim.-Einheiten (in IU)	Anzahl Eizellen	Anzahl MII	Anzahl MI	Anzahl GV	Schwanger?	Cumulus 1					Cumulus 2					Cumulus 3					Cumulus 4					Cumulus rest					Schnitt %
									Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	
1	1	Cet.+Gon.F	2325	12	12	2	0	2																										
2	1	Cet.+Gon.F	1650	26	25	0	1	2																										
3	1	Cet.+Gon.F	2475	18	16	1	1	1																										
4	3	Cet.+Meno.	4275	3	2	0	1	1																										
5	2	Cet.+Meno.	1650	12	12	0	0	1																										
6	3	Cet.+Gon.F	1500	6	6	0	0	1																										
7	3	Cet.+Gon.F	4950	7	6	0	0	1																										
8	2	Cet.+Gon.F	4500	5	5	0	0	1																										
9	1	Cet.+rec FSH	900	20	19	1	0	1																										
10	1	Cet.+Gon.F	2700	4	4	0	0	1	2	3	3	2	9,03	2	3	3	2	12,90	2	3	1	3	11,43	2	3	3	2	7,14						10,13
11	2	Cet.+Gon.F	2025	6	6	0	0	1																										
12	1	Cet.+Gon.F	1200	8	7	1	0	2						2	3	4	2	10,90	2	3	4	2	9,85											
13	2	Cet.+Gon.F	1350	9	9	0	0	1	2	3	3	2	6,73	2	3	1	0	15,41	2	3	3	2	7,35	2	3	4	2	6,23						8,93
14	3	Cet.+Gon.F	600	7	6	0	1	2	2	3	4	2	4,51	2	3	1	0	9,40	2	3	4	2	7,60	1	1	1	0	9,63						7,79
15	1	Cet.+Gon.F	1650	7	6	0	0	2	2	3	1	0	5,00	2	3	4	2	5,53	2	3	4	2	4,26	2	3	4	2	7,21						5,50
16	2	Cet.+Gon.F	1800	5	5	0	0	1	1	3	1	0	17,56	1	3	1	0	23,95	1	3	1	0	8,73	1	3	1	0	6,02						14,07
17	3	Cet.+Gon.F	4501	25	20	1	4	1	2	3	1	0	7,17	2	3	3	2	3,01	2	3	1	0	1,04	2	3	1	0	8,82						5,01
18	2	Cet.+Gon.F+rec.LH	1200+900	12	10	2	0	1	2	3	3	2	5,09	2	2	1	0	2,07	2	3	3	2	1,23	2	3	X	2	2,88						2,82
19	2	Cet.+Pur.	1500	3	3	0	0	1	2	3	1	0	3,06	2	3	2	2	5,51	2	3	1	0	7,92											5,50
20	3	Cet.+Gon.F	1500	29	20	3	5	2	2	3	3	2	4,93	2	3	3	2	7,26	2	1	1	0	14,24	2	3	1	0	4,90	2	3	X	2	4,22	7,11

Tabellarische Auflistung aller verwendeten Rohdaten

Patienten-Nr.	Altersgruppe	Hormonelle Stimulation	Stim.-Einheiten (in IU)	Anzahl Eizellen	Anzahl MII	Anzahl MI	Anzahl GV	Schwanger?	Cumulus 1					Cumulus 2					Cumulus 3					Cumulus 4					Cumulus rest					Schnitt %
									Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	
21	2	Cet.+Gon.F+rec.LH	4500+75	3	2	0	0	1	2	3	2	2	2,64	2	3	1	0	10,63																6,64
22	2	Cet.+Gon.F	2400	9	7	1	1	1	1	3	4	2	6,47	1	3	1	0	3,90	1	3	1	0	3,29	1	3	4	2	7,71						5,34
23	1	Cet.+Pur.	1350	7	7	0	0	1	2	3	4	2	12,03	2	3	4	2	9,76						2	3	1	0	13,43						11,74
24	2	Cet.+Gon.F	5400	3	3	0	0	1	1	3	3	2	6,94	1	3	1	0	4,29	1	3	3	2	1,53										4,25	
25	1	Cet.+Gon.F	1500	8	8	0	0	1	2	3	2	2	9,00	2	3	1	0	2,79	2	3	2	2	8,99	2	3	2	2	2,61						5,85
26	1	Cet.+Gon.F	3225	5	4	1	0	1	1	3	1	0	6,67	1	3	1	0	2,92	1	3	1	3	3,66	1	3	1	0	4,68	1	3	1	0	2,61	4,11
27	3	Cet.+Gon.F	2700	4	4	0	0	1						1	3	2	2	11,26	1	3	2	2	4,94	1	3	1	0	19,61						11,94
28	3	Cet.+Gon.F	2275	14	13	0	1	1	2	3	4	2	2,23	1	3	X	2	1,37	1	3	4	2	4,22	1	3	1	3	5,27	1	3	X	5x2	4,02	3,79
29	3	Cet.+rec.FSH	3150	11	9	0	0	1	2	3	4	2	2,60	2	3	X	2	1,24	2	3	4	2	10,33	2	3	X	2	10,58	2	3	X	4x2	6,59	6,41
30	1	Cet.+Gon.F	1650	7	6	1	0	1	2	2	1	0	3,76	2	3	X	2	6,53	2	3	4	2	2,22	2	3	4	2	4,30	2	3	X	2x2	2,35	3,41
31	1	Cet.+Gon.F	1350	8	4	0	4	1	2	3	1	0	5,17	2	3	3	2	3,58	2	1	1	0	6,65	2	1	1	0	1,54	2	2	3	1x2	3,93	4,08
32	2	Cet.+Gon.F+HMG	1650+150	8	8	0	0	1	2	3	1	0	2,46	2	3	1	0	4,00	2	3	4	2	5,00	2	3	1	0	1,52	2	3	1	0	2,57	2,91
33	2	Cet.+HMG	2400	8	7	0	1	1																									1,07	1,07
34	2	Cet.+HMG HP	3000	3	1	0	2	1																									16,30	16,30
35	1	Cet.+Gon.F	2550	10	10	0	0	2	2	3	4	2	7,77	2	3	X	2	5,99	2	3	3	2	6,21	2	3	X	2	7,54	2	3	X	4x2	2,93	4,51
36	3	Cet.+Gon.F	2700	20	17	0	0	2	2	3	1	0	5,34	2	3	1	2	6,44	2	3	1	2	5,91						2	3	4	10x2	4,82	5,02
37	2	Cet.+Gon.F	1350	15	14	0	1	1	2	3	3	2	1,72	2	3	3	2	1,54	2	3	4	2	3,33	2	3	X	2	2,12	2	3	X	8x2	2,76	2,59
38	1	Cet.+Gon.F	1350	19	18	0	1	2	2	3	4	2	7,80	2	3	4	2	10,17	2	3	1	0	4,54	2	3	1	0	8,23	2	3	1	2x3	3,46	5,34
39	2	Cet.+Gon.F	1350	6	6	0	0	2	2	3	1	0	9,31	2	3	1	0	4,81	2	3	1	0	2,34	2	3	1	4	4,47	2	3	4	2x2	4,09	4,85
40	2	Cet.+Gon.F	1425	6	6	0	0	1	2	3	4	2	4,55	2	3	3	2	3,69	2	3	3	2	3,81	2	3	1	3	6,36	2	3	1	3+0	6,30	5,16
41	3	Cet.+Meno.	1800	2	2	0	0	1	1	3	3	2	3,00	1	3	3	2	3,05																3,02
42	2	Cet.+Pur.	2475	22	17	0	1	2	2	3	4	2	2,06	2	3	4	2	0,52	2	3	1	0	4,82	2	3	1	0	8,02	2	3	4	3x2	2,77	2,90
43	3	Cet.+Gon.F	1200	6	5	1	0	1	2	3	4	2	1,33	2	3	3	2	6,31	2	3	4	2	7,01	2	3	4	3	5,28						4,98
44	1	Cet.+Gon.F	2700	3	3	0	0							1	3	1	0	26,55	1	3	1	0	14,06											20,30
45	3	Cet.+Gon.F	675	9	8	1	0	2	2	3	1	0	3,81	2	3	4	2	3,44	3	2	1	3	1,34	2	3	4	2	3,09	2	3	4	2+3	0,80	1,74
46	3	Cet.+Gon.F	1650	11	11	0	0	1	2	3	X	2	10,79	2	3	X	2	10,46	2	3	X	2	7,09	2	3	X	2	4,20						8,13
47	3	Deca+Gon.F+Luv.	4500+975	2	2	0	0	1	2	3	2	2	3,55	2	3	1	0	2,21																2,88
48	1	Cet.+Pur.	1500	27	23	4	0	2																					2	3	4	4x3+12x2	2,63	2,63
49	2	Deca+Gon.F	6750	6	6	0	0	1	2	3	3	2	7,80						2	3	3	2	8,06	2	3	1	0	7,18	2	3	1	2x3	16,80	11,33
50	2	Cet.+Meno.	1650	15	15	0	0	2	2	3	4	2	1,05	2	3	X	2	2,25	2	3	3	2	0,57	2	3	3	2	3,71						1,90
51	2	Cet.+Pur.	1350	11	10	0	1	2	1	3	1	0	2,91	2	3	3	2	4,51	2	3	3	2	2,09	2	3	2	2	1,93	2	3	3	3x2	3,67	3,38
52	2	Cet.+Gon.F	900	8	8	0	0	1	2	3	4	2	0,36	2	3	4	2	1,76	2	3	4	2	2,51	2	3	X	0	2,44	2	3	X	4x2	4,69	3,23
53	1	Cet.+Gon.F	600	12	12	0	0	1						2	3	3	2	8,24	2	3	3	2	7,15	2	3	1	0	10,91	2	3	X	7x2	12,60	11,55

Tabellarische Auflistung aller verwendeten Rohdaten

Patienten-Nr.	Altersgruppe	Hormonelle Stimulation	Stim.-Einheiten (in IU)	Anzahl Eizellen	Anzahl MII	Anzahl MI	Anzahl GV	Schwanger?	Cumulus 1					Cumulus 2					Cumulus 3					Cumulus 4					Cumulus rest					Schnitt %
									Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	Qualität Eizelle	Eizell-Reife	Qualität Embryo	Anzahl Vorkerne	Anteil Kometen zu Gesamtzellzahl in %	
54	3	Cet.+Pur.	2700	5	5	0	0	1	2	3	3	2	1,91	2	3	1	0	6,15	2	3	3	2	7,95	2	3	1	0	10,95	2	3	3	2	13,23	8,04
55	3	Cet.+Meno.	3075	6	5	1	0	1						2	3	3	2	11,79	2	3	3	2	6,28	2	2	1	0	22,26	2	3	1	3	5,02	10,07
56	2	Cet.+Pur.	2100	20	18	0	2	1	2	3	4	2	1,99	2	3	4	2	5,53	2	3	1	0	3,94	2	3	1	3	3,33	2	3+1	X	2x3+9x2	7,03	6,87
57	3	Cet.+Pur.	1350	8	6	1	1	1	2	3	1	0	5,85	2	3	1	3	25,49	2	3	3	2	6,83	2	1	1	0	7,71	2	3	2	2x2	2,10	6,79
58	3	Syn.+Gon.F+Meno.	1800+900	2	1	1	0	1	2	3	3	2	2,97	2	2	1	0	1,01																1,99
59	2	Zol.+Gon.F+Luv.	13050+2175	4	3	1	0	1	1	2	1	0	2,20	1	3	2	2	3,55	1	3	1	0	7,45	1	3	3	2	5,17						4,59
60	2	Cet.+Gon.F	1500	22	13	1	2	1	2	3	3	2	2,48	2	3	1	0	2,55	2	3	1	0	4,79	2	3	3	2	2,34	2	3	X	6x2	3,11	3,08
61	2	Cet.+Gon.F	150	5	5	0	0	1	2	3	3	2	0,52	2	3	3	2	1,36	2	3	1	3	3,13	2	3	1	3	2,68	2	3	1	0	1,06	1,75
62	1	Cet.+Pur.	1800	6	3	1	2	1						1	1	1	0	1,14	2	3	2	2	1,55	2	2	1	0	2,19	2	3	3	2	3,13	2,23
63	2	Cet.+Gon.F	2250	14	12	2	0	1	2	3	3	2	3,47	2	3	3	2	7,73	2	3	3	2	2,96	2	3	X	2	3,73	2	2x2+8x3	1	0	4,17	4,19
64	2	Cet.+Gon.F	3500	9	7	1	0	1	2	3	2	2	6,61	2	3	3	2	2,51	2	3	4	2	1,51	2	2	1	0	4,11	2	3	1	2x3	4,55	4,12
65	2	Cet.+Gon.F	2700	3	1	0	2	1	1	1	1	0	4,79	1	1	1	0	4,42	2	3	3	2	5,23											4,81
66	1	Cet.+Meno.	3450	1	1	0	0	1	2	3	4	2	5,16																					5,16
67	2	Enan.+Meno.	1800	9	9	0	0	1	2	3	4	2	6,33	2	3	3	2	6,82	1	3	1	0	4,08	2	3	3	2	5,71	1	3	1	4x0+1x3	6,35	6,08
68	1	Cet.+Pur.	975	3	3	0	0	1	2	3	1	0	1,37	2	3	1	0	0,99	2	3	1	0	0,82											1,06
69	1	Cet.+Pur.	1500	8	7	0	0	2	2	3	1	0	2,60	2	3	1	0	11,74	2	3	3	2	2,97	1	1	1	0	4,22	2	3	3	2x2	7,19	6,29
70	2	Cet.+Pur.	1600	11	10	1	0	1	1	3	1	3	3,34	1	3	1	0	5,15	1	3	2	2	11,93	2	3	1	3	1,96	2	5x3+1x2	2	2x2	7,94	7,09
71	2	Cet.+Meno.HP	1350	4	3	1	0	2	2	3	3	2	10,81	2	3	3	2	9,28	2	3	1	0	7,35	2	2	1	0	5,93						8,34
72	3	Cet.+Meno.	3000	10	9	0	0	1	2	3	4	2	4,32	2	3	3	2	0,96	2	3	1	3	6,54	3	3	1	3	4,64	2	3	1	0	7,61	6,06
73	2	Cet.+Meno.	2250	9	8	1	0	1	2	3	3	2	3,44	2	3	X	2	2,45	2	3	3	2	2,16	2	2	3	2	1,57	2	3	X	2	4,01	3,30
74	1	Cet.+Meno.	1650	7	7	0	0	1	2	3	3	2	3,17	2	3	3	2	7,06	2	3	1	0	18,25	2	3	1	0	3,67	2	3	1	0	7,42	7,77
75	3	Gon.F+rec.LH	3300+825	3	3	0	0	1	2	3	3	2	4,21	2	3	3	2	8,94	2	3	1	0	6,87											6,67
76	3	Cet.+Meno.	5100	2	2	0	0	1	2	3	4	2	1,94	2	3	1	2	4,75																3,35
77	1	Enan.+Gon.F	3900	12	12	0	0	1	2	3	4	2	4,67	2	3	4	2	4,51	2	3	1	0	6,84	2	3	4	2	7,20	2	3	X	4x2	10,42	8,88
78	1	Cet.+Pur.	1650	24	20	2	2	1	2	3	4	2	3,30	2	3	4	2	4,58	2	3	4	2	2,38	2	2	1	0	6,41	2	3	X	10x2	4,59	4,51
79	3	Cet.+Gon.F	3000	11	9	2	1	1	2	3	1	0	3,25	2	3	1	0	2,14	2	2	1	0	8,61	2	2	1	0	1,19	2	2x1+4x3	3	2x2	6,60	5,58
80	1	Cet.+Gon.F	1800	10	9	1	0	1	2	3	1	0	5,20	2	3	1	0	6,23	2	3	1	0	10,36	2	3	3	2	6,93	2	2+9x3	3	3x2	3,27	4,83
81	3	rec.FSH+Meno.HP	1200	4	3	1	0	1																				2	3x3+1x2	4	2x2	2,15	2,15	
82	1	Cet.+Meno.	1650	2	1	1	0	1	2	3	3	2	7,81	2	2	1	0	9,00																8,40
83	3	Cet.+Meno.HP	2025	8	7	0	1	1	1	3	1	3	6,55	1	3	1	3	11,51	1	3	1	0	13,39	1	3	3	2	2,78	1	3	3	2x2	3,67	6,46
84	2	Cet.+Pur.	1200	11	9	2	1	1	2	3	2	2	4,71	2	3	4	2	1,47	2	3	1	0	4,74											3,64
85	3	Cet.+Pur.	3300	13	13	0	0	1	2	3	4	2	1,46	2	3	1	0	6,41	2	3	1	0	2,97	2	3	1	0	14,65						6,37
86	2	Cet.+Pur.	2600	7	6	0	0	2	2	3	4	2	0,00	1	3	1	0	5,61	2	3	4	2	4,90	2	3	4	2	9,43						4,99

8 Literaturverzeichnis

1. Al-Hasani S, Ludwig M, Palermo I, Küpker W, Sandmann J, Johannisson R (1999). Intracytoplasmic injection of round and elongated spermatids from azoospermic patients: results and review. *Hum Reprod*, 14 Suppl 1: 97-107.
2. Arellano RO, Martinez-Torres A, Garay E (2002). Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol Reprod*, 67(3): 837-46.
3. Behre HM, Böckers A, Schlingheider A, Nieschlag F (1994). Sustained suppression of serum LH, FSH and testosterone and increase of highdensity lipoprotein cholesterol by daily injections of the GnRH-antagonist Cetrorelix over 8 days in normal men. *Clin Endocrinol*, 40: 241-8.
4. Benifla J.L, Sifer C, Bringuier A.F, Blanc-Layrac G, Camus E, Madelenat P, Feldmann G (2002). Induced apoptosis and expression of related proteins in granulosa cells from women undergoing IVF: a preliminary study. *Hum Reprod*, 17(4): 916-920.
5. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K und Hsueh AJ (1996). Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*, 2: 103-117.
6. Billig H, Futura I und Hsueh AJW (1994). Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: Biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology*, 134: 245-52.
7. Burgus R, Butcher M, Amoss M et al. (1972). Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRE). *Proc Natl Acad Sci USA*, 69: 278-82.
8. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G und Stetina R (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193.
9. Coy DH, Horvath A, Nekola MV, Coy EJ, Ercheigyi J, Schally AV (1982). Peptide antagonists of LH-RH: large increases in antioviulatory activities produced by basic D-amino acids in the six position. *Endocrinol*, 110: 1445-7.
10. De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L (1997). Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod*, 12: 2235-41.
11. Denk H, Zatloukal K. Zelltod. In: Böcker, Denk, Heitz (2001). Pathologie. 2.Aufl., 56-60, Urban und Fischer, München Jena.
12. Diedrich K, Felberbaum R, Ludwig M, Bauer O. Aktuelle Aspekte der assistierten Reproduktion.
In: Focus MUL Thema „Reproduktionsmedizin“ (1998). Heft 4, 202-205, Hansisches Verlagskontor H Scheffler, Lübeck.
13. Dittkoff EC, Cassidenti DL, Paulson RJ, Sauer MV, Wellington LP, Rivier J, Yen SSC, Lobo RA (1991). The gonadotropin-releasing hormone antagonist (Nal-Glu) acutely blocks the luteinizing hormone surge but allows for resumption of folliculogenesis in normal women. *Am J Obst Gynec*, 165: 1811-7.
14. Driancourt MA, Thuel B (1998). Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod Nutr Dev*, 38: 345-62.
15. Einspanier R, Schonfelder M, Muller K, Stojkovic M, Kosmann M, Wolf E, Schams D (2002). Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes (COC). *Mol Reprod Dev*, 62(1): 29-36.
16. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.

17. Felberbaum R, Reissmann T, K pker W et al. (1995). Preserved pituitary response under ovarian stimulation with hMG und GnRH-antagonists (Cetrorelix) in women with tubal infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 61: 151-155.
18. Felberbaum R, Diedrich K (1999). Ovarian stimulation for in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with gonadotrophins and gonadotrophin-releasing hormone analogues: agonists and antagonists. *Hum Reprod*, 14 Suppl 1: 207-21.
19. Felberbaum R, Diedrich K. Die ovarielle Stimulation in der assistierten Reproduktion-Empfehlungen für ein modernes Management.
In: F. H. Fischl (2000). Kinderwunsch: Möglichkeiten, Erfüllbarkeit und Machbarkeit in unserer Zeit. 2.Aufl., 71-92, Krause und Pachernegg, Gablitz.
20. Host E, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000). Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79: 936-40.
21. Jose de los Santos M, Anderson DJ, Racowsky C, Hill JA (2000). Presence of Fas-Fas ligand system and bcl-2 gene products in cells and fluids from gonadotropin-stimulated human ovaries. *Biol Reprod*, 63: 1811-6.
22. Kaneko T, Saito H, Takahashi T, Ohta N, Saito T, Hiroi M (2000). Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J Assist Reprod Genet*, 17(10): 580-5.
23. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4): 239-57.
24. Kidder GM, Mhawi AA (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 123(5):613-20.
25. Kizilian N, Wilkins RC, Reinhardt P, Ferrarotto C, McLean JRN, McNamee JP (1999). Silver-Stained Comet Assay for Detection of Apoptosis. *BioTechniques* 27: 926-930
26. Klingm ller D, Schepke M, Enzweiler C, Bidlingmaier F (1993). Hormonal response to the new potent GnRH-antagonist Cetrorelix. *Acta Endocrinol*, 128: 15-8.
27. Koch Y, Baram T, Hazum F, Fridkin M (1977). Resistance to enzymatic degradation of LH-RH analogs possessing increased biological activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 74: 488-92.
28. Kousta E, White DM, Franks S (1997). Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Human Reproduction Update*, 3 (4): 359-65
29. Krebs D. Moderne Reproduktionstechniken.
In: Krebs D, Schneider HPG. Endokrinologie und Reproduktionsmedizin III. In: Wulf KH, Schmidt-Matthiesen H (1994). Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe. Band 3, 249-79, Urban und Schwarzenberg, München
30. K pker W, Schlegel PN, Al-Hasani S, Fornara P, Johannisson R, Sandmann J, et al. (2000). Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 73(3): 453-8.
31. K pker W, Al Hasani S, Bauer O, Diedrich K (1994). New technologies of assisted fertilization. *Fertilit t*, 10: 216-220.
32. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW (2001). Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*, 18(9): 490-8.

33. Loumaye E, de Cooman S, Anoma M, Psalti I, Depreester S, Schmitt M, Thomas K (1988). Short term utilization of a gonadotropin releasing hormone agonist (Buserelin) for induction of ovulation in an in vitro fertilization program. *Ann NY Acad Sci*, 541: 96-102.
34. Loumaye E (1990). The control of endogenous secretion of LH by gonadotropin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*, 5: 357-76.
35. Loumaye E, Porchet HC, Beltrami V et al. Ovulation induction with recombinant human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone.
In: Filicori M, Flamigni C (1994). Ovulation Induction. Basic Science and Clinical Advances. 227-236, Elsevier Science, The Netherlands.
36. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K (2001). Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*, 265(4):175-82.
37. Macnamee MC, Howles CM, Edwards RG, Taylor PJ, Elder KT (1989). Short term luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment: prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 52: 26-49.
38. March CM (1993). Ovulation Induction. *J Reprod Med*, 38: 335-46.
39. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reprod*, 17(5): 1257-1265.
40. McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288: 47-63.
41. Moffatt O, Drury S, Tomlinson M, Afnan M, Sakkas D (2002). The apoptotic profile of human cumulus cells changes with patient age and after exposure to sperm but not in relation to oocyte maturity. *Fertil Steril*, 77(5): 1006-1011.
42. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet Assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reprod*, 17(4): 990-998.
43. Nader S, Berkowitz AS, Maklad N, Wolf DP, Held B (1986). Characteristics of patients with and without gonadotropin surges during follicular recruitment in an in vitro fertilization/embryo transfer program. *Fertil Steril*, 45: 75-78.
44. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T, et al. (1997). Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*, 68: 312-317.
45. Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat Res*, 122: 86-94.
46. Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, DeZiegler D, Taieb J, Seiva J, Frydman R (1994). The single or dual administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*, 62: 468-76.
47. Oosterhuis GJE, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I (1998). Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*, 70: 747-9.
48. Ostling O, Johanson KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1): 291-8.

49. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810): 17-8.
50. Perez GI, Tilly JL (1997). Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Hum Reprod*, 12: 2781-3.
51. Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS (1984). Induction of ovulation for in vitro fertilization using buserelin and gonadotropins. *Lancet*, 2: 1284-5.
52. Raman RS, Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, et al. (2001). Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 16(5): 831-5.
53. Rattanachaiyanont M, Leader A, Leveille MC (1999). Lack of correlation between oocyte-corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 71(5): 937-40.
54. Roche Molecular Biochemicals, Apoptosis and Cell Proliferation, 2nd revised edition, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
55. Rutherford AJ, Subak-Sharpe RJ, Dawson KJ (1988). Improvement of in vitro fertilization after treatment with buserelin, an agonist of luteinising hormone releasing hormone. *Br Med J*, 296: 1765-68.
56. Sadraie SH, Saito H, Kaneko T, Saito T, Hiroi M (2000). Effects of aging on ovarian fecundity in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J Assist Reprod Genet*, 17(3): 168-73.
57. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*, 66(4): 1061-7.
58. Shen H-M, Dai J, Chia S-E, Lim A, Ong C-N (2002). Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reprod*, 17(5): 1266-1273.
59. Sirotkin AV, Dukesova J, Pivko J, Makarevich AV, Kubek A (2002). Effect of growth factors on proliferation, apoptosis and protein kinase A expression in cultured porcine cumulus oophorus cells. *Reprod Nutr Dev*, 42(1): 35-43
60. Singh NP, McCoy MT, Tice EL und Schneider EL (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
61. Smits J, Devroy P, VanWasberghe L, Wisanto A, Van Steirteghem AC (1988). Luteal supplementation regimes after combined GnRH-Agonist/hMG superovulation. *J Reprod Fertil Abstr Ser*, 2: 18.
62. Smits J, Ron-El R, Tarlatzis BC (1992). The use of gonadotropin releasing agonists for in vitro fertilization and other assisted procreation techniques: experience from three centres. *Hum Reprod* 7 Suppl.1: 49-66.
63. Steer CV, Millis CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG (1992). The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 7 (1): 117-119.
64. Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ (2002). Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, 143(6): 2221-32.

65. Sun GW, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T (2002). Link protein as an enhancer of cumulus cell-oocyte complex expansion. *Mol Reprod Dev*, 63(2): 223-31.
66. Schally AV, Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A (1971). Structure of porcine LH and FSH releasing factor 1. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 43: 1334-9.
67. Schill T, Strik D, Germer U. Sterilität und Infertilität.
In: Diedrich (2000). Frauenheilkunde und Geburtshilfe. 1.Aufl., 89-122, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
68. Schmutzler RK, Diedrich K (1990). Basic and clinical aspects of GnRH agonists in reproduction. *Int Gyn Obstet* 32(4):311-24.
Stanger JD, Yovich IL (1985). Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *B J Obstet Gynec*, 92: 385-93.
69. Steptoe PC, Edwards RG (1978). Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2(8085):366.
70. Tan SL (1996). Gonadotropin releasing hormone agonists in assisted reproductive therapy. *J Br Fertil Soc*, 1: 137-142.
71. Tay CC (2002). Use of gonadotrophin-releasing hormone agonists to trigger ovulation. *Hum Fertil(Camb)*,5(1):G35-7.
72. Testart J, Belaisch-Allart JC, Forman R, Gazengel A, Strubb N, Hazput A, et al. (1989). Influence of different stimulation treatment on oocyte characteristics and in vitro fertilization ability. *Human Reprod*, 4: 22-29.
73. Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim*, 37(3):144-51.
74. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde M-P, Van Assche E, Devroey P (1993). Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than subzonal insemination. A report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod*, 8: 1055-1060.
75. Vinatier D, Dufour PH und Subtil D (1996). Apoptosis: A programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 67: 85-102.
76. Wood TC, Wildt DE (1997). Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. *J Reprod Fertil*, 110: 355-60.

9 Publikationsliste

- Vortrag bei der 2. Tagung des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF) am 15. - 17. November 2002 in Münster (Preis für den besten Vortrag).
- 119. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG) in Kiel. 13. - 15. Juni 2003, Poster.
- Alisch A, Rüping K, Köster F, Schöpfer B, Baum M, Finas D, Felberbaum R, Dor S, Al-Hasani S, Diedrich K.
Cumulus cell apoptosis as a predictor for oocyte quality in artificial reproduction technique
Zentralbl Gynakol. 2003 Nov;125(11):452-7.
- European Society for Human Reproduction & Embryology (ESHRE), Januar 2003 in Madrid, Vortrag (Abstract ausgewählt unter den fünf besten).
- Berlin 2004: Scientific Programme
The neutral comet assay as a test for the apoptotic activity in cumulus cells, Poster.

10 Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. K. Diedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. med. R. Felberbaum, ehemaliger stellvertretender Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die wertvolle Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. F. Köster, der mir eine unentbehrliche Hilfe bei der Erlernung der Methode, der Kooperation mit dem IVF-Labor und der Planung im gesamten Verlauf der Arbeit war. Ich bedanke mich ganz herzlich für seine unermüdliche praktische und auch gedankliche Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. med. vet. S. Al-Hasani, Frau Dr. rer. nat. B. Schöpfer und Frau R. Sturm für die Bereitstellung und Aufarbeitung der Cumuluszellen, sowie für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit im IVF-Labor.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. M. Baum aus Tel Aviv, der gemeinsam mit Herrn Dr. rer. nat. F. Köster die Methode des Comet Assay an der Frauenklinik in Lübeck etablierte.

Frau C. Schulz und Frau B. Nehls danke ich ganz herzlich für die nette, hilfsbereite Zusammenarbeit und die schönen Stunden im Labor.

Herrn Dr. Fröhlich, Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Biometrie und Statistik, danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, die mir während meines gesamten Studiums immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein herzlichstes Dankeschön geht an meinen verstorbenen Freund Sebastian, meine lieben Freunde Katrin und Martin, meine Tante Uli und Peer Knacke, die mit tatkräftiger Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katinka Rüping
Geburtsdatum	geb. am 07.12.1979
Geburtsort	Kiel
Familienstand	ledig
Familie	Jörg Rüping, Rechtsanwalt und Notar Dr. med. Heidemarie Rüping, Ärztin für Allgemeinmedizin Anna Rüping; Jurastudentin



Schulbildung

1986-1990	Grundschule in Fehrdorf bei Schleswig
1990-1999	Gymnasium Domschule Schleswig
1996-1997	Internatsaufenthalt im Clifton College in Bristol/England

Hochschulausbildung

Oktober 1999	Immatrikulation an der Universität zu Lübeck
September 2001	Ärztliche Vorprüfung an der Universität zu Lübeck
August 2002	Erste Ärztliche Prüfung an der Universität zu Lübeck
Famulaturen	Gynäkologie und Geburtshilfe Uniklinik Lübeck Medizinische Klinik EVK Mülheim/Ruhr Obstetrics/Gynaecology Whittington Hospital London Anästhesie EVK Mülheim/Ruhr Entwicklungshilfeprojekt Konna e.V. Mali/Westafrika Allgemeinarztpraxis Kardiologische Gemeinschaftspraxis
September 2004	Zweite Ärztliche Prüfung an der Universität zu Lübeck
2004-2005	Praktisches Jahr 1. Tertial: Anästhesie Sana Kliniken Eutin 2. Tertial: Chirurgie Stellenbosch University Kapstadt Chirurgie Westküstenklinikum Heide 3. Tertial: Innere Medizin Westküstenklinikum Heide
November 2005	Dritte Ärztliche Prüfung an der Universität zu Lübeck
Dezember 2005	Verteidigung der Dissertation zur Dr. med.