

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

ZECH I, VANDERZWALMEN P, ZECH N

*Entwicklung von Embryonen nach intrazytoplasmatischer
Spermieninjektion (ICSI) bei "non-male factor" Infertilität in
Relation zur Injektionstechnik*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (3) (Ausgabe
für Schweiz), 9-13*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (3) (Ausgabe
für Österreich), 13-18*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

ENTWICKLUNG VON EMBRYONEN NACH INTRAZYTOPLASMATISCHER SPERMIENINJEKTION (ICSI) BEI „NON-MALE FACTOR“ INFERTILITÄT IN RELATION ZUR INJEKTIONSTECHNIK

ENTWICKLUNG VON EMBRYONEN NACH ICSI BEI „NON-MALE FACTOR“ IN RELATION ZUR INJEKTIONSTECHNIK

Summary

Only about 40 % of all normally in-vitro fertilized oocytes (2PN) develop to the blastocyst stage in culture. In a selected group of young patients with many oocytes retrieved the transfer of blastocysts often results in significantly higher implantation rates (up to 75 % clinical pregnancies). The blastocyst formation rate may be influenced by many different factors. Some of them are cytoplasmic factors of the oocyte, the fertilization technique, culture methods and media, sperm parameters, the ICSI injection procedure and the oocyte region where the spermatozoon is deposited during ICSI.

To investigate some of those factors, we retrospectively evaluated the embryo development in 57 cycles for an effect of the ICSI procedure compared to conventional in-vitro insemination. Embryo quality was graded according to morphological parameters. Only patients with non-male factor infertility were included (determined by semen analysis). After 2–3 days in culture the percentage of grade A and B embryos was not different between IVF and ICSI. However, significantly more

IVF embryos reached a grade A blastomere stage compared to the ICSI group (80 % vs. 63 %). In an additional prospective randomised study a statistically significant effect in favour of IVF was seen on day 3, when 54 % of embryos in the IVF-group compared to 38 % after ICSI could reach 6 to 8 cell-stage with grade A-B. Of the IVF-embryos, 45 % were in the blastocyst stage on day 5 compared to 32 % with ICSI ($p < 0.05$). This trend of better results with IVF was also notable after culture to the expanded blastocyst stage (20 % after IVF vs. 8 % after ICSI). In order to further clarify the differences found between IVF and ICSI a prospective randomised ICSI study with sibling oocytes was performed. During ICSI the spermatozoa were injected randomly in either one of two morphologically distinguishable regions inside the oocyte (granular and non-granular). When spermatozoa were injected into the non-granular region, higher rates of blastocyst formation were observed as compared to after injection into the granular area. In conclusion, our data indicate influences of the fertilization technique on embryo development in culture.

wurde die Entwicklung klassifiziert. Zum Ausschluß eines männlichen Faktors wurden nur Infertilitätspatienten mit normalen Spermienbefunden analysiert. Der Prozentsatz von Grad A- und B-Embryonen nach 2–3 Tagen in Kultur unterschied sich nicht zwischen IVF und ICSI, allerdings erreichte von den IVF-Embryonen ein signifikant höherer Anteil Grad A-Qualität (80 % IVF zu 63 % ICSI). In einer prospektiven Studie, ebenfalls mit „non-male factor“-Patienten, erreichten ab dem dritten Tag in Kultur 54 % der Embryonen in der IVF-Gruppe verglichen zu 38 % in der ICSI-Gruppe ein 6–8-Zell-Stadium/ Grad A-B. Von den IVF-Embryos befanden sich am fünften Tag 45 % im Blastozystenstadium, verglichen mit 32 % nach ICSI (expandierte Blastozysten: 20 % nach IVF zu 8 % nach ICSI). Um weitere Einblicke in diese beobachtete Differenz zu erlangen, haben wir eine prospektive ICSI-Studie mit „Geschwister“-Oozyten von „non-male factor“-Patienten durchgeführt. Dabei wurden Spermien entweder in eine granuläre oder eine agranuläre Zytoplasmaregion der Eizelle injiziert. Nach Injektion in die agranuläre Region erreichten deutlich mehr Embryonen das Blastozystenstadium. Unsere Daten deuten auf einen Einfluß der Fertilisierungstechnik auf die frühe Embryoentwicklung *in vitro*.

KURZFASSUNG

In vitro entwickeln sich nur etwa 40 % aller fertilisierten Eizellen (2PN) bis zur Blastozyste. Bei jungen Infertilitätspatientinnen mit vielen befruchtungsfähigen Eizellen können durch *in vitro*-Kultur und Embryotransfer im Blastozystenstadium signifikant höhere Implantationsraten erreicht werden (mehr als 75 % klinische Schwangerschaften). Die Fähigkeit einer Zygote, sich zur Blastozyste

weiter zu entwickeln, wird von vielen Faktoren bestimmt. Unter anderem zählen dazu Komponenten im Zytoplasma der Eizelle, die Fertilisierungstechnik, die Kulturbedingungen, Samenparameter, die ICSI-Injektionstechnik und die Region der Eizelle, in die das Spermium deponiert wird.

Zur Analyse einiger dieser Faktoren haben wir bei 57 Zyklen retrospektiv den Entwicklungsverlauf der Embryonen nach ICSI bzw. nach konventioneller *in vitro*-Insemination verglichen. Anhand morphologischer Kriterien

EINLEITUNG

1992 wurde die ICSI als Technik der Wahl zur Behandlung von männlicher Infertilität eingeführt [1]. Tarlatzis [2] publizierte Ergebnisse von insgesamt 24.000 ICSI-Zyklen, wobei er zeigen konnte, daß die fortdauernde Schwangerschaftsrate pro Zyklus bei 21 % liegt. Aus den Daten von Bonduelle et al. [3] geht hervor, daß die Inzidenz von erblichen und kongenitalen Mißbildungen (2–4 %) mit

Hilfe der ICSI nicht höher als in der allgemeinen Bevölkerung liegt.

Aufgrund dieser Publikationen könnte gefolgert werden, daß ICSI einer größeren Patienten-Gruppe angeboten werden müßte, um das Risiko einer möglichen fehlgeschlagenen Fertilisierung zu minimieren. Jedoch gibt Edwards [4] zu bedenken, daß die ICSI-Technik einige Risiken und Gefahrenquellen birgt und man insgesamt mit einer schlechteren Embryonalentwicklung rechnen muß. Griffith et al. [5] berichten über eine verminderte Entwicklungsfähigkeit von „ICSI-Embryonen“ (20%) zur Blastozyste im Vergleich zu „IVF-Embryonen“ (50%). Diese verminderte Entwicklungsfähigkeit macht sich allerdings erst ab dem Tag 2–3 bemerkbar. Bisher kann noch nicht differenziert werden, ob für diese schlechteren Resultate nach ICSI primär der sogenannte „paternale Effekt“ („male-factor“) oder die „ICSI-Prozedur“ verantwortlich ist.

Bei der ICSI-Technik könnte die Injektionsprozedur an sich, aber auch das „Außer-acht-lassen“ von physiologischen Ursachen diese verminderte Entwicklungsfähigkeit herbeiführen. Verschiedene Autoren [5–8] demonstrierten, daß die „in vitro“-Entwicklung von IVF-Embryonen verglichen zu ICSI-Embryonen wesentlich besser verläuft (32% vs. 23% [6], 52% vs. 30% [8] und 42% vs. 28% [5]), was auf einen paternalen Effekt schließen läßt. Die Wahrscheinlichkeit von genetischen Defekten in Spermien von infertilen Männern ist höher, ebenso sind Schädigungen des Spermium-Zentrosoms häufiger.

Was die ICSI-Technik für sich alleine, das heißt, ohne den Einfluß eines „paternalen“ Faktors, anbelangt waren in der Publikation von Griffith [5] 80% der ICSI-Embryonen im Vergleich zu 50% der IVF-Embryonen nicht fähig, Blastozysten zu bilden. Potentiell schädigende Effekte der ICSI-Technik sind zum einen **vor** der Injektion zu suchen, wie beispielsweise das Entfernen der Cumulus-

und Corona-Zellen (Hyaluronidase-Behandlung, Manipulation der Oozyte durch wiederholtes Ein- und Auspipettieren, Größe der Pipette mit parthenogenetischer Aktivierung und Polkörper-Verschiebung). Aber auch **während** der Injektion sind schädigende Effekte nicht auszuschließen, wie etwa bei der Spermien-Immobilisation in PVP und die damit bedingte Injektion von PVP und anderen schädlichen Stoffen mit potentiell mutagenen Effekten in das Eizellzytoplasma. Ebenso spielt die Größe der Injektionspipette und der unphysiologische Fertilisierungsvorgang (keine Membranfusion und dadurch bedingtes Ausbleiben der natürlichen Aktivierung der Eizelle, Asynchronität zwischen dem Timing der Eizellaktivierung und der Spermieninjektion etc.) eine Rolle.

Als weiterer wichtiger Einflußfaktor muß die von Antczak und Van Blerkom [9] postulierte Existenz der Polarität in Eizellen berücksichtigt werden. Laut diesen Autoren ist die Eizelle in eine äquatoriale Ebene, in einen „animal pole“, wo Faktoren wie Leptin und STAT3 vorherrschen, und in einen „vegetal pole“, der vor allem Zellorganellen beherbergt, gegliedert. Beim Einführen der ICSI-Technik wurde wenig Augenmerk auf diese Eizell-Polarität gelegt. Die Injektion selbst, wie auch die Zytoplasmaaspiration, könnten die Polarität der Eizelle zerstören. Ebenso weiß man noch wenig über potentiell schädigende Effekte, die von der Lokalisation der Spermien-deposition herrühren.

Einige Publikationen verglichen den Einfluß der Stelle der Spermien-deposition in der Eizelle: die „6 Uhr-Injektionsposition“ im Vergleich zur „12 Uhr-Position“ [10, 11]. Blake et al. [12] konnten zeigen, daß eine Positionierung der Samenzelle bei „11 Uhr“ und „7 Uhr“ günstiger für das weitere Überleben der Embryonen war. Auch der Abstand zwischen Spermium und der Spindel spielt eine Rolle.

Verglichen werden sollte zudem die Zytoplasmaaspiration mit einer direkten Deposition. Verschiedene Autoren [6, 10, 13] analysierten den Effekt der Zytoplasmaaspiration mit der Art des Brechens der Eizellhülle, wobei normales Brechen, plötzliches Brechen, sowie schweres Brechen unterschieden und verglichen wurden. Beim plötzlichen Brechen sinkt die Überlebensrate, die Anzahl normaler 2 PN-Stadien ist niedriger, die Anzahl digyner Eizellen höher. Wenn die Hülle schwer bricht, ist eine schlechte Embryonenmorphologie am Tag 2 zu beobachten. Eine Zytoplasmaaspiration ist sinnvoll, da gezeigt wurde, daß mehr Eizellen das 2 PN-Stadium erreichen und weniger Degenerationen in der weiteren Entwicklung zu beobachten sind. Jedoch muß darauf hingewiesen werden, daß das Volumen des aspirierten Zytoplasmas das Entwicklungspotential zur Blastozyste entscheidend beeinflusst [6]. Ein Aspirationsvolumen < 6 pl führte zu einer weiteren Entwicklung zum Blastozystenstadium von 55–100%, bei größeren Volumina sank die Rate auf bis zu 33% ab. Es kann darüber spekuliert werden, ob eine Aspiration von Zytoplasma die Ooplasmastrukturen beschädigt und sich in der Folge in einer reduzierter Entwicklung der Embryonen niederschlägt.

In der vorliegenden Studie soll analysiert werden, ob das Konzept der Polarität einen Einfluß auf die Ergebnisse von injizierten Eizellen hat, sowie ob Erfolg als auch Mißerfolg der Oozytenmanipulation mit den verschiedenen ICSI-Prozeduren in Verbindung gebracht werden können.

PATIENTEN UND METHODEN

Die Untersuchung gliedert sich in zwei Teile: Teil I besteht aus einer retrospektiven und einer prospektiven randomisierten Studie. Analysiert wurde das Entwicklungspotential fertilisierter Eizellen bis zum Blastozystenstadium.

zystenstadium jeweils nach ICSI oder IVF unter standardisierten Kulturbedingungen. Die Spermien stammten ausschließlich von Männern mit normalen Samenparametern (lt. WHO-Guidelines, 1999) zum Zeitpunkt der Punktion. Das Alter der Patientinnen (jünger als 37 Jahre) und das Vorhandensein einer „non-male factor“-Infertilität waren Einschlusskriterien. Die Embryokultur erfolgte nach

standardisierten Bedingungen mit sequentiellen Medien. Die retrospektive Studie umfaßte 63 Paare, wovon 57 an Tag 3 einen Embryotransfer erhielten und 6 an Tag 5. Berücksichtigt wurden die Kulturbedingungen sowie die ICSI-Prozedur, die Ergebnisse wurden verglichen zu herkömmlicher IVF oder ICSI. Zur Analyse der Embryonen wurden Kriterien von Scott et al. [15] miteinbezogen

(Abb. 1). Die Tag 5-Graduierung erfolgte nach Kriterien von Gardner et al. [17].

Teil II der Studie beschäftigte sich mit dem Effekt der Zytoplasmaaspiration und der Spermatozoendeposition in bezug auf eine deutlich erkennbare Granularität in der Eizelle, in welcher mitochondriale Strukturen vermutet werden und die nicht oder nur indirekt mit dem Konzept einer Polarität in Verbindung steht. Es handelt sich um eine prospektive, randomisierte Studie mit 29 Patienten mit normalen Samenparametern. Insgesamt wurden 156 Oozyten mit ICSI und 176 mit IVF fertilisiert. Die Embryokultur erfolgte ebenfalls in sequentiellen Medien nach standardisierten Bedingungen. Von den 156 ICSI-Oozyten wurden bei 57 in den granulierten Zytoplasmabereich injiziert und bei 68 in die agranuläre Region.

Eine statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Student's t-test.

Tabelle 1: Embryoentwicklung bis Tag 3: Vergleich zwischen konventioneller IVF und ICSI in „Schwester“-Oozyten von „non-male“-Faktor Infertilität (PN = Pronuclei).

Retrospektive Analyse von 57 Zyklen	ICSI	IVF
Entnommene Oozyten	283	221
Oozyten für ICSI	251	
Oozyten für IVF		221
2 PN (%) / entnommene Oozyten	181 (64 %) nicht sign.	159 (72 %)
Grad A Embryonen		
An Tag 2	107 (59 %) nicht sign.	90 (57 %)
An Tag 3	52 (29 %) * p < 0,05	65 (41 %)

Tabelle 2: Embryoentwicklung bis Tag 5: Retrospektiver Vergleich zwischen konventioneller IVF und ICSI in „Schwester“-Oozyten von non-male Faktor Infertilität (PN = Pronuclei).

Mütterliches Alter: 32,7 + 2,33 (29–35 Jahre)
Behandlungszyklen n: 6
Insgesamt gewonnene Eizellen: 73

Art der Behandlung	ICSI	IVF
Gewonnene Eizellen	41	32
Eizellen für ICSI	34	
Inseminierte Eizellen		32
2 PN / gewonnener Eizellen (%)	26 (63)	19 (59)
Geteilte Embryonen am Tag 2 (%)	24 (92)	18 (95)
Embryo-Qualität am Tag 3		
6- und 8- Zeller Grad A-B/2PN (%)	10 (38)	9 (50) nicht sign.
Blastozysten u. expandierte Blastozysten am Tag 5 (%)	4 (12)	4 (21) nicht sign.

ERGEBNISSE

Embryonalentwicklung nach IVF oder ICSI in einer retrospektiven Analyse

Die retrospektive Analyse, welche sich über einen Zeitraum von 2 Jahren erstreckte, inkludierte 63 Paare, welche unsere Kriterien erfüllten. ICSI wurde an Metaphase II-Eizellen durchgeführt. Danach wurden die Eizellen in Kultur überführt, unabhängig vom Ort der Spermien-Deposition und des Volumens der Zytoplasma-Aspiration. Von 63 Paaren (63 Zyklen) wurden Tag 3- und Tag 5-Transfers in 57 (Tabelle 1) und 6 Zyklen (Tabelle 2) durchgeführt.

Eine erste Serie (Tabelle 1) von 57 Zyklen, in welcher an 504 Eizellen zufällig ICSI (n = 283) oder IVF (n = 221) durchgeführt wurde, erlaubte eine retrospektive Untersuchung über die Auswirkungen der ICSI-Prozedur. Nach 2 Tagen in Kultur

Abbildung 1: Embryobeurteilung am Tag 1. Arbeitsblatt zur morphologischen Charakterisierung der Embryonen nach Kriterien verschiedener Autoren in Kombination.

	Polarität	Scott 1		Tesarik	Scott 2	Punkte gesamt
		Pronuclei	Zytoplasma	Nucleoli		
ZYGOTE I					geteilt	10
etc.					Syngamic	5
					Nicht geteilt	0

ENTWICKLUNG VON EMBRYONEN NACH ICSI BEI „NON-MALE FAC- TOR“ IN RELATION ZUR INJEKTIONS- TECHNIK

wurde prozentuell kein statistischer Unterschied von Grad A- und B-Embryonen festgestellt. 59% bzw. 57% der Embryonen entwickelten sich zum 2- und 4-Zell-Stadium nach ICSI oder IVF. Tabelle 1 zeigt, daß der Unterschied in der Teilung und im Entwicklungspotential am Tag 3 augenscheinlich ist. Kein Unterschied wurde in der Anzahl an Tag 2-Embryonen beobachtet, die sich zum Tag 3 teilten (46% nach ICSI vs. 51% nach IVF, nicht signifikant). Andererseits wurde ein signifikanter Unterschied in der Rate von Embryonen, die sich bis zum 8-Zell-Stadium teilten, gesehen. In dieser retrospektiven Studie beobachteten wir, daß sich 63% (n = 52) nach der ICSI zum 8-Zeller teilten und 80% (n = 65) der Tag 3-Embryonen der IVF-Gruppe

bis zum 8-Zell-Stadium ($p > 0,02$) wuchsen. Dieser negative Effekt der ICSI-Prozedur wurde nicht in allen Fällen beobachtet. Tabelle 2 zeigt, daß in einer Serie von 6 Zyklen, in welchen man Embryonen bis zum Tag 5 kultivierte, kein prozentueller Unterschied an gewonnenen Blastozysten nach ICSI oder IVF ersichtlich wurde, obwohl man eine kleine Erhöhung an Blastozysten nach IVF beobachtet.

Zygotenentwicklung in Relation zur Stelle der Zytoplasma-Aspiration

Teil II der Studie beschäftigte sich mit dem Effekt der Zytoplasmaaspiration und der Spermatozoendisposition in bezug auf eine deutlich erkennbare Granularität in der Eizelle, in wel-

cher mitochondriale Strukturen vermutet werden und die nicht oder nur indirekt mit dem Konzept einer Polarität in Verbindungen stehen (Tab. 3; Abb. 2 und 3).

DISKUSSION

Die Befunde des ersten Teils der Studie zeigen, daß ICSI die Embryonalentwicklung von „Schwester“-Oozyten im Falle einer „non-male-factor“-Infertilität im Vergleich mit herkömmlicher IVF unterschiedlich beeinflusst.

In der retrospektiven Studie wurde ein signifikanter Unterschied in der Embryonalentwicklung nach 3 Tagen in der Kultur beobachtet.

Die Daten der prospektiven Studie, welche in einer standardisierten Art und Weise durchgeführt wurde, weisen keinen signifikanten Unterschied nach ICSI auf, auch wenn eine Tendenz zu einer verminderten Blastozysten-Bildung festgestellt wurde.

Dennoch gilt es, die Diskrepanz zwischen höherer Implantationsrate und Schwangerschaftsrate in der ICSI-Gruppe [14] und auf der anderen Seite eine verminderte Embryonal-

Tabelle 3: Embryoentwicklung bis Tag 5: Prospektiver Vergleich zwischen konventioneller IVF und ICSI in „Schwester“-Oozyten von non-male Faktor Infertilität (PN = Pronuclei).

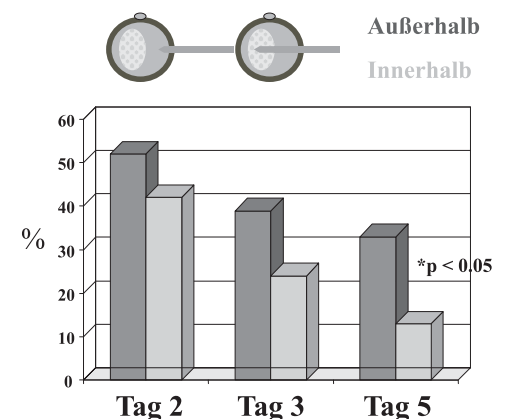
Prospektive Analyse von 18 Zyklen	ICSI	IVF
Oozyten	72	86
Oozyten für ICSI	61 (85 %)	
Oozyten für IVF		86
2 PN (%) / gewonnene Oozyten	49 (68 %) nicht sign.	61 (71 %)
Grad A Embryos an Tag 2	25 (51 %) nicht sign.	35 (57 %)
an Tag 3	18 (37 %) nicht sign.	26 (43 %)
an Tag 5 (Blastozyste (B) – expandierte B)	12 (24 %) nicht sign.	17 (28 %)
Frühe B + Blastozyste + expandierte B	14 (29 %) nicht sign.	22 (36 %)

Abbildung 2: Entwicklung der Zygoten in Relation zur Zytoplasmaaspiration- und Injektionsstelle.

	Injizierte Oozyten (n)	2 PN	Polarität	Nucleus	Nucleoli	Halo	Syngamie
	59	46 (78%)	4.7	4.5	2.3	4.2	2.3
	56	43 (77%)	6.7	4.2	2.3	4.1	2.1
			ns	ns	ns	ns	ns

(ns = nicht signifikant)

Abbildung 3: Grad A Embryonen an Tag 2, 3 und 5 nach Injektion innerhalb oder außerhalb der granulierten Region



entwicklung bis zum Blastozystenstadium aufzuklären.

Teil II der Studie beschäftigte sich mit dem Entwicklungspotential von Eizellen nach Injektion von Samenzellen in einer der zwei Regionen, welche durch zwei Arten der Granularität charakterisiert wurden.

Eine höhere Blastozystenrate wird erreicht, wenn man sowohl die Aspiration und Re-Injektion von Zytoplasma als auch die Deposition des Spermatozoon in einer Region durchführt, welche frei von Granularität ist.

Wir vermuten, daß durch eine von der Injektion hervorgerufene Störung in der granulären Zone die weitere Embryonalentwicklung entscheidend beeinflusst wird.

Eine aktuelle Publikation [16] führt die menschliche Eizellreifung auf eine Änderung der mitochondrialen Aggregationsmuster, die sich durch zwei Arten von Granularität auszeichnen zurück. Die Lokalisation dieser zwei Muster läßt eine gewisse Eizellpolarisation, welche nicht im Zusammenhang mit der Position des Polkörperchens steht, vermuten.

Gegenstand der Forschung bleibt, ob die Schädigung, die während der Injektion auftritt, von einem negativen Effekt der Zytoplasma-Aspiration herührt oder mit einer Deposition des Spermiums in einer weniger empfindlicheren Region zusammenhängt.

Wenn die granuläre Region den Reifestatus der Eizelle reflektiert, müssen wir die Entwicklung von Eizellen in diesem Zusammenhang (Granularität vorhanden oder nicht) berücksichtigen.

Literatur

- Palermo G, Joris H, Devroey P. et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17–8.
- Tarlatzis BC, Bili H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE ICSI Task Force. *European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 1): 165–77.



Ismene Zech, MAS Clinical Embryology

Geboren 1972 in Bludenz (A). Studium der Klinischen Embryologie von 1999 bis 2001 an der Universität in Krems (A) und Cambridge (GB). Seit 1997 am Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie in Bregenz (A) unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Herbert Zech. Arbeitsschwerpunkte: *in vitro*-Fertilisation, intrazytoplasmische Spermmainjektion, Kryokonservierung von Embryonen, Spermien, testikulären Spermien, Testikuläre Spermatozoenextraktionen. Mitglied von Alpha Europa.

Korrespondenzadresse:

Ismene Zech
Institut für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie
A-6900 Bregenz, Römerstraße 2

- Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11 (Suppl 4): 131–55; discussion 156–9.
- Edwards RG. Widening perspectives of intracytoplasmic sperm injection. *Nat Med* 1999; 5: 377–8. Comment in: *Nat Med* 1999; 5: 431–3.
- Griffiths T, Murdoch A, Herbert M. Embryonic development *in vitro* is compromised by the ICSI procedure. *Hum. Reprod* 2000; 15: 1592–6.
- Dumoulin J, Coonen E, Bras M et al. Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod* 2001; 2: 306–12.
- Miller J, Smith T. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development *in vitro*. *Hum Reprod* 2001; 16: 18–24.
- Shoukir Y, Chardonens D, Campana A et al. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998; 13: 1632–7.
- Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influence on early development: the regulatory proteins leptin and STAT 3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 1067–86.
- Nagy P, Liu J, Joris H et al. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at

- intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1995; 10: 3171–7.
- Van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Hermans J et al. Intracytoplasmic sperm injection: position of the polar body affects pregnancy rate. *Hum Reprod* 1999; 10: 2565–9.
- Blake M, Garrisi J, Tomkin G. et al. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril* 2000; 73: 31–7.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolema. *Hum Reprod* 1996; 11: 540–7.
- Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, Ignoul-Vanvuchelen R, Bergers-Jansen JM, Derhaag JG, Geraedts JP, Evers JL. Comparison of *in-vitro* development of embryos originating from either conventional *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000; 15: 402–9.
- Scott L, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003–13.
- Wilding M, Dale B, Marino M, Di Matteo L, Aliviggi C, Pisaturo M, Lombardi L, De Placido G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 909–17.
- Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000; 6: 9–23.

NEUES AUS DEM VERLAG

Abo-Aktion

Wenn Sie Arzt sind, in Ausbildung zu einem ärztlichen Beruf, oder im Gesundheitsbereich tätig, haben Sie die Möglichkeit, die elektronische Ausgabe dieser Zeitschrift kostenlos zu beziehen.

Die Lieferung umfasst 4–6 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Das e-Journal steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) zur Verfügung und ist auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

➔ **Bestellung kostenloses e-Journal-Abo**

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)

Krause & Pachernegg GmbH · Verlag für Medizin und Wirtschaft · A-3003 Gablitz

Wir stellen vor:



Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Offizielles Organ: – Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen (AGRBM); – Berufsverband der Reproduktionsmedizinischen Zentren Deutschlands (BRZ); – Dachverband Reproduktionsbiologie und -medizin (DVR); – Dt. Gesellschaft für Andrologie (DGA); – Dt. Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF); – Dt. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM); – Deutsches IVF-Register (DIR); – Embryologenforum Austria (EFA); – Österr. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie (OEGRM); – Sektion Reproduktionsbiologie und -medizin der Dt. Gesellschaft für Endokrinologie (SRBM/DGE)

Homepage: <http://www.kup.at/reproduktionsmedizin>