

Journal für
Urologie und Urogynäkologie

Zeitschrift für Urologie und Urogynäkologie in Klinik und Praxis

**Einsatz eines 1,48 µm Lasers für
die Immobilisation von
ejakulierten, epididymalen und
testikulären Spermatozoen in der
intrazytoplasmatischen
Spermieninjektion**

Ebner T, Dunzinger M, Moser M

Tews G, Wiesinger R

Journal für Urologie und

*Urogynäkologie 2002; 9 (4) (Ausgabe
für Schweiz), 12-16*

Journal für Urologie und

*Urogynäkologie 2002; 9 (4) (Ausgabe
für Österreich), 7-12*

Homepage:

www.kup.at/urologie

Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche

Indexed in Scopus

Member of the



www.kup.at/urologie

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P. b. b. 022031116M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

EINSATZ EINES 1,48 μM LASERS FÜR DIE IMMOBILISATION VON EJAKULIERTEN, EPIDIDYMALEN UND TESTIKULÄREN SPERMATOZOEN IN DER INTRAZYTOLASMATISCHEN SPERMIENINJEKTION

1,48 μM LASER
ZUR SPERMIEN-
IMMOBILISATION
BEI ICSI

Summary

The conventional method of immobilization of spermatozoa prior to ICSI is mechanical breakage of the tail by pressing it to the bottom of the injection dish. This prospective self-controlled study was set up to evaluate the potential of a non-contact 1.48 μm wavelength diode laser in terms of immobilization of ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa. Therefore, fertilization rate and further development potential of such zygotes were investigated. The patients included in our study showed estradiol levels > 2000 pg/ml, and thus, a relatively high number of MII-oocytes could be collected (9.9 ± 2.5). Approximately half of the

oocytes were injected with laser-treated sperms (study group) and the other with mechanically immobilized ones (control group). Neither in the group with spontaneous ejaculation nor in the group with operative exploration of epididymis or testis a significant difference between study and control cohort in terms of fertilization rate and embryo morphology could be observed ($p > 0.05$). Therefore, we conclude that the application of a non-contact diode laser for sperm immobilization is a potentially useful alternative to the conventional approach. However, for methodical reasons the conventional mechanical method should be the method of choice in TESE patients.

KURZFASSUNG

In IVF-Labors hat sich die mechanische Immobilisation mittels Injektionspipette durchgesetzt. In dieser prospektiven selbst-kontrollierten Studie wurde das Potential eines 1,48 μm Diodenlasers hinsichtlich der Immobilisation von ejakulierten, epididymalen und testikulären Spermien untersucht. Da für die Studie nur Patienten mit einem Östradiolspiegel von mehr als 2000 pg/ml rekrutiert wurden, ergab sich eine relative hohe Anzahl an MII-Oozyten ($9,9 \pm 2,5$). Für die Hälfte der Eizellen wurde Spermien zur Befruchtung verwendet, die mittels Lasers unbeweglich gemacht wurden, für die restlichen Oozyten wurden herkömmlich immobilisierte Spermatozoen herangezogen.

Sowohl in der Gruppe mit spontaner Ejakulation, als auch in den beiden operativen Patientenkohorten konnte

hinsichtlich Befruchtungsrate und Embryoqualität kein Unterschied zur herkömmlichen Methode festgestellt werden ($p > 0,05$). Daraus kann geschlossen werden, daß eine Immobilisation mittels eines 1,48 μm Diodenlasers eine potentielle Alternative zur mechanischen Methode darstellt. Trotzdem empfiehlt sich aus methodischen Gründen für testikuläre Spermatozoen nach wie vor die mechanische Immobilisation.

EINLEITUNG

Mit der Einführung und Etablierung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) in die Assistierte Reproduktion [1, 2] gelang es nun endlich auch, Patienten mit sehr wenigen, teils unbeweglichen und morphologisch mißgestalteten Spermien im Ejakulat (hochgradige Oligoasthenoteratozoospermie) den

langersehnten Kinderwunsch zu erfüllen. Zusätzlich eröffneten sich für Patienten mit der Diagnose Azoospermie völlig neue Perspektiven, indem man Spermatozoen entweder aus der Epididymis (MESA) mittels Aspiration [3] oder aus dem Hoden (TESE) durch Extraktion [4] gewinnt und intrazytoplasmatisch injiziert [5, 6]. Hinsichtlich der Befruchtungsrate spielt es anscheinend keine Rolle, ob die Azoospermie obstruktiver oder nicht-obstruktiver Natur ist [7].

Um in der ICSI möglichst hohe Befruchtungsraten der Oozyten zu gewährleisten, sollten bei der Injektion zwei wesentliche Schritte eingehalten werden: einerseits die garantierte Ruptur des Oolemmas und andererseits die vorherige Immobilisation des Spermatozoons [8–11]. Letzteres wird standardmäßig durch mechanisches Brechen der Geißel mittels der Injektionspipette erreicht. Andere Ansätze, wie die wiederholte Aspiration des Spermiums in die Einstichpipette [10] oder die piezoelektrische Behandlung der männlichen Gameten [12], haben sich nicht bewährt. Eine Alternative zur Spermienimmobilisation, welche sich die thermische Energie eines Diodenlasers (1,48 μm) zunutze macht, ist beschrieben worden [13]. Solchermaßen immobilisierte Spermien waren in der Lage, Mausoozyten zu aktivieren.

In weiterer Folge zeigte sich, daß auch beim Menschen der Einsatz eines 1,48 μm Diodenlasers nicht nur zur mechanischen Methode vergleichbare Ergebnisse gewährleistet, sondern auch zahlreiche Vorteile bringt [14, 15]. Deshalb wurde in dieser selbst-kontrollierten, prospektiven Studie versucht, neben ejakulierten auch testikuläre und epididymale Spermatozoen mittels Laser zu immobilisieren und ihr Potential hinsichtlich Befruchtung und ersten Entwicklungsschritten abzuschätzen.

¹ Landesfrauenklinik, IVF-Labor, Linz; ² Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern, Abteilung für Andrologie, Linz

PATIENTEN UND METHODEN

Insgesamt waren 20 Paare in diese Studie involviert. Sechsmal wurden testikuläre Spermien verwendet, zweimal epididymale und in 12 Fällen konnte ein frisches Ejakulat herangezogen werden. Das mittlere Alter aller Patienten war $35,4 \pm 4,6$ Jahre, die Partnerinnen waren durchschnitts jünger ($31,9 \pm 4,0$).

Im Rahmen einer kontrollierten ovariellen Hyperstimulation wurden alle 20 Patientinnen mit einem langen Protokoll stimuliert, d. h. einer Downregulation mit GnRH-Agonisten (Decapeptyl[®], Ferring, Kiel, Deutschland bzw. Suprecur[®], Hoechst, Frankfurt, Deutschland) folgte eine Stimulation mit rekombinantem Gonadotropin (Puregon[®], Organon, Oss, Niederlande). Sobald Ultraschall und Blutwerte den bevorstehenden Eisprung ankündigten, wurde dieser mit 5000 IE hCG (Pregnyl[®], Organon, Oss, Niederlande) ausgelöst. Die vaginale Punktion der Ovarien erfolgte ultraschallkontrolliert 36 Stunden nach hCG-Gabe.

Die Oozyten wurden von der Follikelflüssigkeit in ein BM1-Kulturmedium gegeben (NMS Bio-Medical, Praroman, Schweiz), wo sie für mindestens drei Stunden verblieben (37 °C, 6 % CO₂). Anschließend wurden als Vorbereitung für die Injektion alle Eizellen enzymatisch von den umgebenden Cumuluszellen befreit (Hyaluronidase, MediCult, Kopenhagen, Dänemark).

Parallel zur Eizellgewinnung wurden die durch Masturbation gewonnenen Ejakulate aufbereitet (n = 12) und mittels einer Swim-up-Technik eine ausreichende Anzahl an morphologisch intakten, progressiv beweglichen Spermien separiert. Im Falle einer Azoospermie wurde entweder eine frische Gewebeprobe des Hodens (n = 3) oder Nebenhodens (n = 2) entnommen, oder es wurde auf

kryokonserviertes Material aus einer vorangegangenen diagnostischen TESE zurückgegriffen (n = 3). Sämtliche frischen TESE-Proben wurden vorweg mit BM1-Medium überschichtet und mit zwei sterilen Kanülen zerkleinert, ehe mit dem sterilen Deckel eines Kulturschälchens unter großem Druck die Spermatozoen aus den Hodenkanälchen herausgequetscht wurden. Die Präparation der Nebenhodenpräparate stellte sich ungleich einfacher dar. In beiden Fällen wurde das mit Spermatozoen und zerkleinertem Gewebe angereicherte Medium mehrmals verdünnt und zentrifugiert (Waschschritte) und abschließend das Pellet in wenigen Mikrolitern Medium resuspendiert. Im Falle der Verwendung von kryokonserviertem Material aus dem Hoden wurde dieses zumindest 5 Stunden vor der eigentlichen ICSI aufgetaut.

Während bei der Patientengruppe mit ejakulierten Spermien eine kleine Probe der präparierten Spermien direkt in einen viskösen Tropfen aus Polyvinylpyrrolidon (PVP, MediCult, Kopenhagen, Dänemark) gegeben wurde, um so ihre Beweglichkeit vor der Immobilisation einzuschränken, mußte bei TESE- und MESA-Patienten aufgrund der von Haus aus eingeschränkten Motilität jedes Spermium einzeln lokalisiert und in den PVP-Tropfen transferiert werden. Pro Patientin wurden für die Hälfte der Oozyten laserimmobilisierte Spermien herangezogen, während die andere Hälfte mit Spermien behandelt wurden, die mechanisch unbeweglich gemacht worden waren. Die Spermien der Kontrollgruppe wurden im PVP-Tropfen mittels der gläsernen Injektionspipette entlang der Vertikalachse orientiert. Die mechanische Immobilisation durch die Glaspipette erfolgte bei 400-facher Vergrößerung durch zumindest zweimaliges Pressen der Geißel gegen den Boden des ICSI-Schälchens.

In der Studiengruppe ist bei Verwendung des 1,48 μ m Diodenlasers

(Fertilase[®], MTM, Montreux, Schweiz) kein direkter Kontakt mit dem Spermatozoon nötig. Bei der Immobilisation wurde eine „double shot“-Technik [13, 16] angewandt. Hierbei wird mit einem ersten Laserpuls in der Nähe der Geißelmitte (15 ms, 1,5 mJ) das Spermium paralytisiert und mit einem anschließenden Puls (10 ms, 1,0 mJ) direkt auf das Geißelende die Membran des Spermiums permeabilisiert.

Die ICSI wurde in standardisierter Form durchgeführt [1, 2] und die Oozyten konnten 18 Stunden danach auf das Vorhandensein zweier Pronuclei, dem Zeichen der erfolgten Befruchtung, überprüft werden (Tag 1). Weitere 24 Stunden später (Tag 2) wurde die Morphologie der erzielten Embryonen erhoben (Anzahl der Blastomeren, Grad an Fragmentierung), um den exakten Tag des Transfers festzulegen. In der Regel wurde danach getrachtet, die Embryonen bis zum Tag 5 zu kultivieren, um sie im Blastozystenstadium zu transferieren. Wenn jedoch die Anzahl der Befruchtungen (< 5) oder die Qualität der geteilten Embryonen nicht entsprechend war, wurde der Transfer am dritten Tag durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test bzw. χ^2 -Test, wobei ein P-Wert kleiner als 0,05 einen signifikanten Unterschied beschrieb. Um die Stichprobenanzahl zu erhöhen, wurden die Daten der MESA- und TESE-Patienten gepoolt.

ERGEBNISSE

Da hauptsächlich Patientinnen an der Studie teilnahmen, deren Östradiolwert am Tag der Ovulationsinduktion > 2000 pg/ml war, wurden 198 reife Oozyten gefunden ($9,9 \pm 2,5$). Insgesamt wurden in 87 Eizellen Spermien injiziert, die mittels Laser immobilisiert wurden

(frisch: 50; MESA: 12; TESE: 25), 111 mal wurden herkömmlich immobilisierte Spermatozoen verwendet.

Die mittlere Befruchtungsrate aller Eizellen lag bei 65,7 %, wobei in keiner der beiden Gruppen (Spontanejakulation, gepoolte MESA und TESE) ein signifikanter Unterschied zwischen Studiengruppe (Laser) und Kontrollgruppe (mechanisch) festzustellen war (Tabelle 1 und 2). Ebenso zeigte sich, daß hinsichtlich der Embryomorphologie keine Verschlechterung durch eine Laserbehandlung der Spermien zu erwarten ist ($p > 0,05$).

Es zeigte sich jedoch, daß die gepoolten Spermien aus Nebenhoden und Hoden eine signifikant niedrigere Befruchtungsrate ergaben, als spontan ejakulierte ($p < 0,04$). Anlässlich der Analyse der Embryomorphologie am Tag 2 zeigte sich zudem, daß die Anzahl der Blastomeren in der Gruppe der operativ gewonnenen Spermatozoen signifikant niedriger war ($p < 0,05$), als bei herkömmlicher Gewinnung. Der Fragmentierungsgrad schien nicht betroffen zu sein.

DISKUSSION

Zwar ist bekannt, daß selbst parthenogenetische Mechanismen beim Menschen zu einer Aktivierung der Eizelle führen können [17], doch ist für die weitere Entwicklung der Zygote die Präsenz eines Spermiums unabdingbar. Bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion reicht der Stimulus durch das Anstechen der Glaspipette zwar aus, um den intrazellulären Kalziumspiegel zu ändern [18], dies genügt jedoch nicht, um die Eizelle vollständig zu aktivieren. Es wird allgemein angenommen, daß ein Spermien-assoziiertes Faktor zur vollständigen Aktivierung wesentlich beiträgt [11, 18, 19]. Um eine Wechselwirkung solch eines zytoplasmatischen Faktors mit der Eizelle zu

Tabelle 1: Ergebnisse der Patienten mit spontaner Ejakulation ($p > 0,05$). Degenerierte Eizellen und Zygoten mit mehreren Pronuclei sind nicht enthalten.

	Diodenlaser	Pipette
ICSI-Ergebnis (Tag 1)		
Anzahl der reifen Oozyten	50	60
Befruchtungen (2PN)	35 (70,0 %)	44 (73,3 %)
Unbefruchtete Oozyten	10 (20,0 %)	10 (16,7 %)
Embryoqualität (Tag 2)		
Anzahl der Blastomeren	3,8 \pm 1,0	3,8 \pm 1,2
Grad an Fragmentierung (%)	15,1 \pm 10,4	14,6 \pm 9,8

Tabelle 2: Gepoolte Ergebnisse der Patienten mit Spermienaspiration aus dem Nebenhoden und testikulärer Spermienextraktion ($p > 0,05$). Degenerierte Eizellen und Zygoten mit mehreren Pronuclei sind nicht enthalten.

	Diodenlaser	Pipette
ICSI-Ergebnis (Tag 1)		
Anzahl der reifen Oozyten	37	51
Befruchtungen (2PN)	21 (56,8 %)	30 (58,8 %)
Unbefruchtete Oozyten	12 (32,4 %)	16 (31,4 %)
Embryoqualität (Tag 2)		
Anzahl der Blastomeren	3,4 \pm 1,0	3,4 \pm 0,9
Grad an Fragmentierung (%)	14,5 \pm 8,4	15,0 \pm 10,2

ermöglichen, muß folglich die Membran des Spermiums destabilisiert werden, damit der besagte Faktor Zugang zum Ooplasma findet. Gleichzeitig ist ein Kontakt von ooplasmatischen Faktoren, welche mit der Dekondensation des Spermienkopfes in Zusammenhang gebracht werden [20], mit dem Spermium gewährleistet.

Routinemäßig wird heutzutage diese Destabilisation der Geißel mechanisch mittels direktem Kontakt durch eine Glaspipette durchgeführt. Obwohl diese Prozedur für den geübten Embryologen innerhalb einer Minute auszuführen ist [21], kommt es immer wieder zu Schwierigkeiten, wenn eine Glaspipette nicht parallel zum Boden des ICSI-Schälchens ausgerichtet ist. In diesem Fall kann ein Spermium nicht gezielt immobilisiert werden. Es muß entweder eine neue Pipette eingespannt werden, oder man versucht durch wiederholtes Aufsaugen des Spermiums in die

ICSI-Pipette die Geißel zu brechen [10]. Ersteres ist relativ zeitintensiv, letzteres führt zwar relativ rasch zur Immobilisation, jedoch ist die Befruchtungsrate von solchermaßen behandelten Spermien niedriger, vermutlich weil durch das wiederholte Aufsaugen zwar die 9+2 Struktur der Mikrotubuli zerstört wird, nicht jedoch die Membran des Spermiums.

Bei Verwendung des Ferti-Lasers wird dieses räumliche Problem vermieden, da kein direkter Kontakt mit dem Spermium nötig ist. Zusätzlich fällt die Orientierung des Spermatozoons entlang der vertikalen Achse weg, es können sogar Spermien immobilisiert werden, welche nicht am Boden des Gefäßes schwimmen. Es zeigte sich, daß die Gesamtdauer der Manipulation während einer ICSI durch Einsatz eines Laser signifikant verringert werden kann [14]. Ein weiterer Vorteil ist, daß aufgrund des höheren Vergrößerungsfaktors des

Laserobjektives (45-fach) und der zusätzlichen Vergrößerung des Monitors eine genauere Bestimmung der Spermienmorphologie hinsichtlich WHO-Kriterien [22] gelingt. Zu guter Letzt könnte sogar die Verwendung von PVP vermieden werden [13], welche kontrovers diskutiert wird [23].

Da der 1,48 μ m Diodenlaser eine thermische Wirkung am Spermium ausübt [24], könnte vermutet werden, daß eine unmittelbare Gefahr für die DNS des Spermatozoons bestünde, doch erstens werden die beiden Energiepulse weit entfernt vom Spermienkopf gesetzt und zweitens ist die Wellenlänge des Lasers so gewählt, daß ein entsprechender Sicherheitsabstand zum Absorptionsmaximum der DNS besteht. Außerdem wird durch Einführung der „double shot“-Technik die verwendete Energie nochmals reduziert. Tatsächlich ergaben elektronenmikroskopische Untersuchungen, daß die lokale Schädigung durch die Wärme 1 μ m nicht übersteigt [25].

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Immobilisation mittels 1,48 μ m Diodenlasers prinzipiell für Spermatozoen jeglicher Herkunft eine wichtige Alternative darstellt. Sie bringt nicht nur vergleichbare Ergebnisse [13–15], sondern offenbart auch einige Vorteile, die den Arbeitsablauf vereinfachen und beschleunigen können. Trotzdem zeigte die Praxis, daß es zumindest bei der Verwendung von testikulären Spermien zu keiner Zeitersparnis kommt. Da die Beweglichkeit testikulärer Spermatozoen meist nicht ausreicht, um sich im PVP-Tropfen von umgebendem Gewebe freizuschwimmen, müssen die Gameten zuerst mittels ICSI-Pipette freipräpariert werden, um dann einzeln in den PVP-Tropfen

überführt zu werden. Da die gesamte Prozedur mit Hilfe der Einstichpipette stattfindet, empfiehlt sich in diesen TESE-Fällen aus methodischen Gründen von vornherein die Verwendung der Pipette als Immobilisationshilfe, obwohl mittels Laser vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

Literatur

- Palermo GP, Joris H, Devroey H, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17–8.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8: 1061–6.
- Temple-Smith PD, Southwick GJ. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from epididymis. *J in vitro fertil Embryo Transfer* 1985; 2: 119–22.
- Brackett BG, Hall JL, Oh YK. In vitro fertilization ability of testicular, epididymal and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fertil Steril* 1978; 29: 571–82.
- Schoysman R, Van der Zwalmen P, Nijs M et al. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in-vitro fertilization programme (letter). *Hum Reprod* 1993; 8: 1339–40.
- Tournaye H, Devroey P, Liu J et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new affective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994; 61: 1045–51.
- Devroey P, Nagy P, Tournaye H et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 1015–8.
- Catt J, Ryan J, Pike I et al. Fertilization rates using intracytoplasmic sperm injection are greater than subzonal insemination but are dependant on prior treatment of sperm. *Fertil Steril* 1995; 64: 764–9.
- Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E et al. ICSI and severe mal-factor infertility: breaking the sperm tail prior to injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 484–6.
- Van den Bergh M, Bertrand E, Biramane J, Englert Y. Importance of breaking a spermatozoons tail before intracytoplasmic injection: a prospective randomized trial. *Hum. Reprod* 1995; 10: 2819–20.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B et al. Two essential steps for a successful intracytoplasmic injection: Injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolemma. *Hum Reprod* 1996; 11: 540–7.
- Huang T, Kimura Y and Yanagimachi R. The use of a piezo micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection of human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 320–8.
- Montag M, Rink K, Delacrétaç G et al. Laser-induced immobilization and plasma membrane permeabilization in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 846–52.
- Ebner T, Yaman C, Moser M et al. Laser assisted immobilization of spermatozoa prior to intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod* 2001; 16: 2628–31.
- Ebner T, Yaman C, Moser M et al. Successful birth after laser assisted immobilization of spermatozoa prior to ICSI. *Fertil Steril* 2002; 78: 417–8.
- Rink K, Delacrétaç G, Salathé RP et al. 1.48 μ m diode laser microdissection of the zona pellucida of mouse zygotes. *Proceedings SPIE* 1994; 2134A: 412–22.
- De Sutter P, Dozortsev D, Cieslak J et al. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *J Assist Reprod Genet* 1992; 9: 328–37.
- Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9: 511–8.
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P et al. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod* 1995; 10: 403–7.
- Van Blerkom J, Davis P and Merriam J. A retrospective analysis of unfertilized and presumed parthenogenetically

1,48 μ M LASER
ZUR SPERMIEN-
IMMOBILISATION
BEI ICSI

Univ.-Doz. Dr. Thomas Darryl Ebner

Geboren 1966 in Toronto, Kanada. 1985 Studium der Zoologie und Biochemie an der Paris Lodron-Universität Salzburg. 1992 Sponsion. 1994 Promotion. 2002 Habilitation am Zoologischen Institut der Universität Salzburg (Venia: Reproduktionsbiologie). Titel der Habilitationsschrift „Non-invasive selection at different stages of preimplantation development in intracytoplasmic sperm injection“.

Mitglied in der Europäischen Gesellschaft für Human Reproduction and Endocrinology (ESHRE), der American Society for Reproductive Medicine (ASRM) und Alpha-Austria.

Ca. 30 Publikationen zum Thema „Klinische Embryologie“. Reviewertätigkeit für Human Reproduction. Prof. Dr. Walter Pilgerstorfer-Preisträger 2000. Organon-ART-Preisträger 2001.

Korrespondenzadresse:

Univ.-Doz. Dr. Thomas Ebner
Landesfrauenklinik Linz, IVF-Labor
A-4020 Linz, Lederergasse 47
e-mail: thomas.ebner@gespag.at



activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. Hum Reprod 1994; 9: 2381–8.

21. Palermo G, Cohen J, Alikani M et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. Fertil Steril 1995; 63: 1231–40.

22. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1992; 44.

23. Strehler E, Baccetti B, Sterzik K et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae seminologicae). Hum. Reprod 1998; 13: 120–3.

24. Rink K, Delacrétaç G, Salathé RP et al. Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida with an objective delivered 1.48 μ m diode laser. Lasers Surg Med 1996; 18: 52–62.

25. Germond M, Nocera D, Senn A et al. Microdissection of mouse and human pellucida using a 1.48 μ m diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. Fertil Steril 1995; 25: 604–11.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung 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](#)