Charakterisierung des morphologischen Entwicklungspotenzials von der Oozyte bis zum Embryo

M. Greuner[1], S. Winkler[2], B. Maxrath[3], M. Montag[4, 5], H. Schmiady(†)[6, *]

Ein entscheidender Faktor bezüglich des Ausgangs einer Kinderwunschtherapie ist die Auswahl und die Qualität der zu transferierenden Embryonen. Die mikroskopische, morphologische Beurteilung steht dabei heutzutage im Mittelpunkt der Routine. Eine prospektive Multicenter-Studie mit 564 Zyklen und der morphologischen Charakterisierung von 4778 MII-Oozyten hatte zum Ziel, die relevanten Marker der Oozyte und später der Vorkernstadien herauszuarbeiten und den Verlauf der Zellteilung und der daraus resultierenden Embryonen und Schwangerschaften zu dokumentieren.

Die Multicenter-Studie konnte zeigen, dass einzelne extra- oder intrazytoplasmatische Auffälligkeiten der Oozyte lediglich einen Einfluss auf die Befruchtungsrate, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die weitere Entwicklung haben. Die Anzahl an Anomalien charakterisiert aber sehr deutlich das Potenzial der Zelle.

Das Vorkernscoring wurde in der Studie bezüglich der Symmetrie der Vorkerne und der Nukleoli in den Vorkernen (Z-Score) durchgeführt und konnte ebenfalls signifikante Vorteile aufzeigen. Die sich entwickelnden Embryonen wurden aufgrund der Morphologie der Oozyte und Vorkernstadien ausgewählt. Die Multicenter-Studie konnte die hierarchische Bedeutung der einzelnen Scoringsysteme aufzeigen. Die Schwangerschaftsraten bei positiven Scores (Oozyte 37,3 %, Vorkernstadien 39,4 %, Embryonen 53,4 %) belegen, dass die Beobachtung des dynamischen Prozesses von der Oozyte bis zum Embryo (57,7 %) die besten Erfolgsaussichten hat.

Diese Ergebnisse werden mit der Übereinkunft des Istanbul Consensus Workshops (Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting) bezüglich der morphologischen Charakterisierung von der Oozyte bis zum Embryo verglichen.

Schlüsselwörter: Oozytenscore, sER, Riesenoozyten, Vorkernmuster, Nukleoli, Embryonenscore

Characterization of the Morphological Development Capacity from the Oocyte to the Embryo. With reference to the success or failure of an ART therapy the selection and the quality of the embryos that will be transferred are crucial. Still the microscopic, morphologic evaluation is the preferred method in the routine. A prospective multi-center study with 564 cycles and the morphologic characterisation of 4778 cells aimed at identifying the most relevant markers of the M-II and 2PN-oocyte and at documenting the development of the resulting embryos and pregnancies.

The multi-center study showed that individual extra or intracytoplasmatic abnormalities had an influence on the fertility rate but do not have any significant impact on the development of the oocyte. The number of abnormalities characterizes the potenzial of a cell.

The application of the PN-score was carried out according to the symmetry of the pronuclei and the nucleoli (Z-Score) in the pronuclei and showed significant advantages. Developing embryos were selected only by taking into consideration the morphology of the oocytes and the PN-stage. The multi-center study was able to depict the impact of the individual scoring systems. The pregnancy rates achieved in case of positive scores (oocytes 37.3%, pronuclear stages 39.4%, embryos 53.4%) prove that monitoring developmental progression from the oocyte to the embryo (57.7%) is the most successful strategy.

These results will be discussed in view of the recommendations of the Alpha/ESHRE Istanbul Consensus Workshop (Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting) on oocyte and embryo assessment. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2012; 9 (1): 13–9.**

Key words: oocytescore, sER, giant oocytes, PN pattern, nucleoli, embryoscore

Einleitung

Es gibt viele Ansätze der nicht-invasiven Suche nach Markern, um das Entwicklungspotenzial der entstandenen Embryonen zu charakterisieren. Untersuchungen zu Metabolomics [1], Proteomics [2] und Transcriptomics [3] stehen noch in den Anfängen, sodass die lichtmikroskopische, morphologische Beurteilung der Oozyte bis zum Embryo heutzutage die Routine darstellt. Bei der In-vitro-Fertilisation weisen aber nur ca. 10 % der gewonnenen Oozyten die Entwicklungskompetenz zu einem implantationsfähigen Embryo auf [4]. Ca. 25 % der Oozyten sind aneuploid [5], ca. 70 % der Embryonen enthalten 44 Stunden nach Fertilisation aneuploide Blastomeren [6].

Die nicht-invasive morphologische Beurteilung der Teilungsgeschwindigkeit [7, 8] und Fragmentation [9] der Embryonen wird international herangezogen, um das Entwicklungspotenzial der Embryonen zu beurteilen.

In Deutschland kommt der Oozyte und dem Vorkernstadium eine besondere Bedeutung bei der Auswahl der Zellen für den Embryotransfer zu. Eine prospektive Multicenter-Studie mit 564 stimulierten Zyklen mit In-vitro-Fertilisation mittels sog. „intrazytoplasmatischer Spermatozoeninjektion“ (ICSI) führte bei 562 Zyklen zu einem Transfer. Hierbei wurden 5676 Kumulus-Oozyten-Komplexe gewonnen, um die morphologischen Kriterien der Gameten und Vorkernstadien einzeln und kombiniert herauszuarbeiten und die Zellen mit dem höchsten Entwicklungspotenzial zur Erzielung einer Schwangerschaft auszuwählen [10].

* Dieser Artikel ist Dr. Hardy Schmiady gewidmet, der durch sein Wirken die Reproduktionsbiologie mitgestaltet und den Erfolg dieser Arbeit erst ermöglicht hat.
„Was ein Mensch an Gutem in die Welt hinausgibt, geht nicht verloren.“ (Albert Schweitzer)

Eingegangen: 22. September 2011; akzeptiert nach Revision: 27. Dezember 2011

Aus der [1]Gemeinschaftspraxis Happel, Giebel, Russu, Otte, Saarbrücken, dem [2]Zentrum für Reproduktionsmedizin Jena, der [3]Gemeinschaftspraxis Tigges, Friol, Gnoth, Grevenbroich, der [4]Abteilung Gynäkologische Endokrinologie & Reproduktionsmedizin, Bonn, der [5]Abteilung Gynäkologische Endokrinologie & Fertilitätsstörungen, Heidelberg und der [6]Abteilung Gynäkologie mit Hochschulambulanz, Reproduktionsmedizin der Medizinischen Fakultät Charité, Universitätsmedizin Berlin

Korrespondenzadresse: Dr. rer. medic. Martin Greuner, Gemeinschaftspraxis Happel, Giebel, Russu, Otte, D-66113 Saarbrücken, Europaallee 15; E-Mail: m.greuner@ivf-saar.de

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen der Art der Auffälligkeit und der Befruchtungs- und Degenerationsrate sowie den Embryoscores [18, 19] (1146 Embryonen am Tag 2).

Auffälligkeit (Oozyten)	Befruchtungsrate	Degenerationsrate	Embryoscore am Tag 2 > 10
Keine 11,6 % (552)	77,0 %[a, b, c] (425)	2,9 %[e, f] (16)	69,8 %[h, i, j] (132)
Intrazytoplasmatisch 12,6 % (603)	67,3 %[a, d] (406)	2,3 %[e, g] (14)	64,9 %[h] (96)
Extrazytoplasmatisch 30,7 % (1463)	72,3 %[b, d] (1058)	5,6 %[f, g] (82)	67,8 %[i] (259)
Intra- und Extrazytoplasmatisch 45,1 % (2151)	67,5 %[c] (1452)	7,9 % (170)	60,2 %[j] (257)

[a, c] $p < 0{,}001$; [b, d, f, j] $p < 0{,}05$; [e, h, i] p = n. s.; [g] $p < 0{,}005$

Die Studie wurde an der Universitäts-Frauenklinik Bonn und den Gemeinschaftspraxen Tigges, Friol, Gnoth (Grevenbroich) sowie Fritzsche, Reiher, Hoffmann (Jena) und Thaele, Happel, Giebel (Saarbrücken) durchgeführt. Es wurden bezüglich der Oozyte intrazytoplasmatische (Granulierung des Zytoplasma, Einschlusskörper [11] und Vakuolen [12]) und extrazytoplasmatische (perivitelliner Spalt [13], Form der Oozyte, Polkörper [14] und Zona pellucida [15]) Faktoren [16] und bezüglich der Vorkernstadien der Z-Score nach Scott et al. 2000 [17] in Hinblick auf die Befruchtungs- und Degenerationsrate, die Embryonalentwicklung [18, 19] und die resultierenden Implantations- und Schwangerschaftsraten untersucht. Als Schwangerschaft wurde der Nachweis einer Fruchthöhle gewertet.

Bei einem internationalen Konsensus-Workshop der Alpha Scientists in Reproductive Medicine und ESHRE Special Interest Group Embryology (Istanbul Consensus Workshop [20, 21]) wurde aufgrund der Bedeutung der morphologischen Charakterisierung der Zellen ein Consensus paper verfasst, um ein international einheitliches Scoring zu etablieren. Die angewandten Scoringsysteme wurden aufgeführt und ein Konsensus zwischen den Teilnehmer auf ein einheitliches System von der Oozyte bis zum Embryo definiert.

Die Ergebnisse der Multicenter-Studie werden mit jenen des Konsensuspapers der Alpha Scientists in Reproductive Medicine und ESHRE Special Interest Group Embryology [20, 21] vergleichend diskutiert.

Die Oozyte

In der pränatalen Entwicklung der Frau wandern die Urkeimzellen in die Gonadenanlagen und differenzieren sich zu Oogonien und dann zu den primären Oozyten. Nach der Replikation der DNA treten diese in die Prophase der 1. Reifeteilung. Dies geschieht im 3. Monat der Schwangerschaft. Bei der Geburt befinden sich die primären Oozyten in dieser Prophase und verharren im Diktyotän. Die Gesamtzahl der primären Oozyten wird auf 700.000 bis 2 Millionen geschätzt. Bis zur Pubertät wird die Mehrzahl atretisch und zu Beginn der Pubertät sind nur noch 40.000 vorhanden. Nach der Pubertät in der reproduktiven Phase der Frau kommen dann weniger als 500 Oozyten zum Abschluss der 1. Reifeteilung und zur Ovulation [22]. Dies bedeutet, dass einige Oozyten, die im Leben erst spät zur Reife gelangen, sehr lange im Diktyotänstadium verbleiben und evtl. schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt sind [22]. Die Oozyte verfügt über den zytoplasmatischen Apparat zur weiteren Embryonalentwicklung (zytoplasmatische Organellen wie Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum oder Golgi-Apparat [23]). Bei der In-vitro-Fertilisation ist es für den Embryologen wichtig, mittels einer nichtinvasiven morphologischen Beurteilung der Oozyten das Entwicklungspotenzial abzuschätzen.

In der Multicenter-Studie konnte nach erfolgreicher Stimulation mittels Agonisten- [24] oder Antagonistenprotokoll [25] 34–36 Stunden nach Ovulationsinduktion eine transvaginal sonographisch kontrollierte Follikelpunktion durchgeführt werden. Beide Protokolle (Down-Regulation und Antagonist) sind bei korrekter Anwendung bezüglich der Erfolgsaussichten gleich zu bewerten [26]. 5676 Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden direkt nach Auffindung in Medium (IVF20, G1.2, G2.2, Universal-IVF-Medium oder HamsF 10) überführt und in einem Inkubator mit hoher Luftfeuchtigkeit bei 37 °C und 5–6% CO_2 kultiviert. Zwei Stunden nach Punktion erfolgte die Denudierung und Reifebeurteilung der Zellen mit anschließender Einzelkultur. 4778 MII-Oozyten konnten bezüglich intra- und extrazytoplasmatische Faktoren beurteilt werden.

Die Multicenter-Studie zeigte, dass einzelne Faktoren, die zur Charakterisierung der Eizellen herangezogen werden, separat keinen signifikanten Einfluss auf die Schwangerschaftsrate hatten [27, 28].

Bei der Differenzierung nach Oozyten ohne und solche mit intra- und/oder extrazytoplasmatischen Anomalien zeigten sich signifikante Unterschiede in Hinblick auf die Befruchtungsrate (Oozyten ohne Anomalien Befruchtungsrate 77 %, mit extrazytoplasmatischen 72,3 % und mit intrazytoplasmatischen 67,3 %) und besonders, wenn intrazytoplasmatische und extrazytoplasmatische Faktoren zusammen auftraten, bezüglich der weiteren Entwicklung der Embryonen. Tabelle 1 verdeutlicht den Einfluss der unterschiedlichen Faktoren.

Der Prozess der zytoplasmatischen Reifung [29] ist noch nicht geklärt, die unterschiedlichen Erscheinungsformen des Zytoplasmas könnten diese Entwicklung widerspiegeln. Die Abnormitäten im Zytoplasma könnten die Funktion der Mikrotubuli [30] und der Spindel [16] negativ beeinflussen. Dies würde die geringeren Befruchtungsraten erklären.

Anders verhielt es sich bei den extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten (PVS, Polkörper, Form der Oozyte und Zona pellucida), deren Vorhandensein sich in signifikant höheren Degenerationsraten widerspiegelte. Diese Faktoren führen bei der Durchführung der ICSI eher zu Degenerationen, wie auch die Arbeit von Ebner et al. [31] zeigte (Oozyten mit intrazytoplasmatische Anomalien Degenerationsrate 5,1 % gegenüber extrazytoplasmatischen 12,5 %) [32]. Die extrazytoplasmatischen Faktoren zusammengefasst hatten keinen signifikant unter-

Tabelle 2: Auswertung der Zyklen mit 2 Embryonen beim Transfer bezüglich der Anzahl an Defekten bei den Oozyten, die weiterkultiviert wurden.

2 Embryonen aus Oozyten	Zyklen	Implantationsrate (n)	Schwangerschaftsrate (n)
Mind. 1 Oozyte mit max. 1 Auffälligkeit	284	23,6 %[a] (134)	37,3 %[b] (106)
Jede Oozyte mit mindestens 2 Auffälligkeiten	133	16,5 %[a] (44)	26,3 %[b] (35)

[a, b] $p < 0,05$

schiedlichen Einfluss auf die Embryonalentwicklung der Zelle. Die Schwangerschaftsrate der Zyklen mit 2 Embryonen beim Transfer, die ausschließlich aus Oozyten mit extrazytoplasmatischen Auffälligkeiten entstanden waren, war mit 30,7 % statistisch nicht geringer als die Gesamtheit der Transfers mit 2 Embryonen (33,9 %).

In dieser Auswertung zeigte sich sehr deutlich, dass das Auftreten von intrazytoplasmatischen und extrazytoplasmatischen Faktoren zusammen einen signifikanten Einfluss auf die weitere Entwicklung der Zelle hatte. Dies spiegelt sich auch in einer geringeren Schwangerschaftsrate (21,9 %) wider. Aus diesem Grund wurden die Zellen nicht bezüglich der Art, sondern in Hinsicht auf die Anzahl an verschiedenen Anomalien untersucht. Die Differenzierung der Oozyten nach der Anzahl an Defekten unabhängig welcher Art, verdeutlicht, dass die Anhäufung an Auffälligkeiten die weitere Entwicklung signifikant beeinflusst. Tabelle 2 zeigt dies in Bezug auf die deutlich niedrigeren Implantations- und Schwangerschaftsraten.

Es ist nicht die Art der Auffälligkeit, sondern die Anzahl an Auffälligkeiten, die das Entwicklungspotenzial charakterisiert, wobei den intrazytoplasmatischen Faktoren eine größere Rolle zukommt.

Im Istanbul Consensus Workshop wurde die optimale Oozyte als kugelförmig definiert, von einer Zona pellucida umgeben, mit einem ovalen Polkörper und einem unauffälligen pervitellinen Spalt sowie mit einem homogenen Zytoplasma ohne Vakuolen oder Einschlusskörper. Es konnte sich darauf geeinigt werden, dass bezüglich einzelner Merkmale lediglich das Auftreten von glattem Endoplasmatischem Retikulum (smooth endoplasmic reticulum [sER]) und Riesenzellen als negativ zu bewerten sind. Es wurde nicht auf extra- oder intrazytoplasmatische Auffälligkeiten sowie die Anzahl an Auffälligkeiten eingegangen.

Das Vorkernstadium

Die menschliche Oozyte befindet sich nach der Ovulation bzw. in der Kinderwunschtherapie bei der In-vitro-Fertilisation nach der Follikelpunktion in der Regel in der arretierten Methaphase der 2. Reifeteilung der Meiose (MII). Aufgrund des Eindringens des Spermatozoons in die reife Oozyte bzw. der Injektion des Spermatozoons bei der ICSI kommt es zur biochemischen Aktivierung der Oozyte [33]. Induziert durch Spermien-spezifische Phospholipase-C zeta [34] kommt es zu Änderungen des Membranpotenzials und einem intrazellulären Ca^{2+}-Anstieg [35] und zum Abschluss der zweiten meiotischen Teilung. Der zweite Polkörper mit den Chromatiden eines haploiden Chromosomensatzes wird ausgeschleust und es bildet sich der weibliche, haploide Vorkern (Pronukleus). Parallel kommt es zu periodischen Rotationen des Ooplasmas. Diese zytoplasmatischen Wellen erfolgen im Zeitraum der Dekondensation des Chromatins des Spermatozoons. Es kommt zur Bildung des haploiden paternalen Vorkerns. Mithilfe der Mikrotubuli wird der weibliche Pronukleus Richtung männlichem Pendant gezogen, was zur Aneinanderlagerung beider Vorkerne mit Migration zum Zellzentrum [36] führt.

Die G1-Phase beginnt ca. 2–3 h nach Spermatozooninjektion und nach 16–18 h ist eine morphologische mikroskopische Beurteilung der Vorkernstadien [17, 37, 38] möglich.

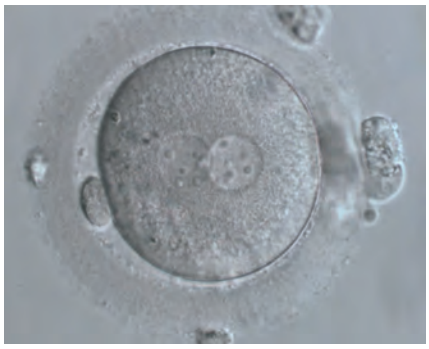
Die Beurteilung kann bezüglich der Anzahl, der Größe und der Symmetrie der Vorkerne erfolgen. Die Anzahl, Anordnung und Verteilung der Nukleoli [39, 40] in den Vorkernen erlauben eine weitere Einschätzung des Entwicklungspotenzials der Zelle [41]. Das Auftreten eines Halo-Effektes [42, 43] ist ein weiterer Faktor, der zur Auswahl herangezogen werden kann. Nach 18–20 h ist die Pronukleusbildung abgeschlossen [44]. In den nächsten 6 h (S-Phase) findet die identische Reduplizierung der haploiden Chromosomensätze jedes Pronukleus statt und es kommt zur Auflösung der Vorkernmembranen. Nach Auflösung der Vorkernmembranen erfogt die Aneinanderlagerung der homologen Chromosomen von männlichem und weiblichem Vorkern, danach im Spindelapparat der Eizelle die Bildung der Metaphaseplatte der Chromosomen als Vorbereitung der ersten Furchungsteilung, d. h. der mitotischen Teilung der jetzt diploiden Zygote. Erst mit der Furchung der Zellmembran und der Einschnürung zur ersten Furchungsteilung ist die Befruchtungskaskade abgeschlossen und es beginnt die embryonale Entwicklung.

In der Praxis wird das Vorkernscoring auf der Basis der Anzahl, Anordnung und Verteilung der Nukleoli [39, 40] in den Vorkernen als prognostisches Auswahlverfahren [17, 41] häufig eingesetzt.

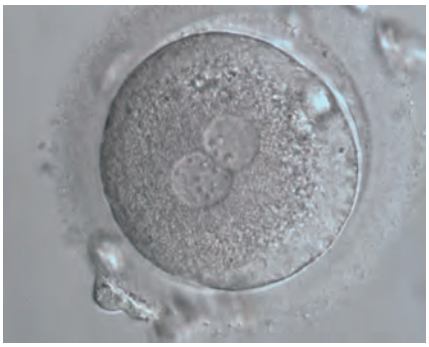
In der Multicenter-Studie wurde das Vorhandensein und die Anzahl der Vorkerne in der Zelle bestimmt und das Z-Scoring nach Scott [17] immer 16–18 h nach Injektion des Spermatozoons an 3342 Vorkernstadien durchgeführt (Abb. 1). Zudem wurde die Lage der Vorkerne in der Oozyte und das Vorhandensein eines Halos [42, 43] dokumentiert, um die Relevanz als Entscheidungskriterium für die Auswahl der zu transferierenden Zellen festzustellen.

Transfers mit Embryonen, die nur aus Z2-Vorkernstadien stammten, kamen nicht häufig vor und solche mit nur Z4-Stadien kamen nur 2-mal vor, daher konnten diese nicht separat ausgewertet werden. Im Vergleich der „reinen“ Transfers mit nur Embryonen aus Z1- oder Z3-Vorkernstadien wird das unterschiedliche Entwicklungspotenzial in Form der Implantations- und Schwangerschaftsraten wie in Tabelle 3 abgebildet deutlich, indem die Z1-Vorkernstadien eine signifikant höhere Erfolgschance haben.

Z1: Gleiche Anzahl (3–7), Größe und Polarisation der Nukleoli in den Vorkernen



Z2: In etwa gleiche Anzahl (3–7) und Größe, aber nicht-polarisierte Nukleoli



Z3: Verschiedene Anzahl und/oder nicht-polarisierte Nukleoli in den Vorkernen

Z4: Vorkerne unterschiedlich groß oder nicht aneinander gelagert

Abbildung 1: Darstellung der Vorkernmuster (Z-Score [1])

Tabelle 3: Transfers mit 1–3 Embryonen, wobei nur eine Art des Z-Scores beim Transfer vertreten war.

Z-Score	Zyklen	Implantationsrate	Schwangerschaftsrate
nur Z1	133	23,2 %[a]	34,6 %
nur Z3	134	13,0 %[a]	25,4 %

[a] $p < 0{,}005$

Die Betrachtung der Transfers in Hinblick auf das Vorhandensein eines bestimmten Scores bestätigt, dass die Zellen mit einer symmetrischen Anordnung der Nukleoli die höchsten Implantations- und Schwangerschaftsraten aufzeigten. Ist die Anordnung der Nukleoli symmetrisch und an der Äquatorialplatte angeordnet (Z1), ist das Entwicklungspotenzial am höchsten (Tab. 4). Der Z-Score beschreibt das Entwicklungspotenzial der Zelle.

Ein Halo trat in der Studie häufiger bei Vorkernstadien mit einem Z1-Score auf, jedoch konnte ein positives Signal des Halos wie in der Literatur in den Arbeiten von Ebner et al. [42] und Stalf et al. [43] in Bezug auf die Embryoqualität und die resultierenden Schwangerschaften nicht festgestellt werden [10].

Der separate Vergleich des Oozytenscorings (Tab. 2) und Vorkernscorings (Tab. 4) zeigt, dass beide ihre Bedeutung haben.

Die Kombination beider Scoringsysteme ermöglicht eine genauere Charakterisierung der Zelle. So zeigen die Transfers mit Embryonen, die aus mindestens einer Oozyte mit höchstens einer Auffälligkeit und mit mindestens einem Z1-Vorkernscore entstanden sind, hohe Implantations- (IR-) und Schwangerschaftsraten (SSR). Dies ist ersichtlich in Tabelle 5.

Im Istanbul Consensus Workshop wurde von Lynette Scott die unterschiedliche Beurteilung des Vorkernscorings angeführt [20, 21], wobei die Veröffentlichungen von ihr [17, 37, 45] und weiteren Autoren [38, 46–48] eine Korrelation und einen prognostischen Nutzen zur Einschätzung des Entwicklungspotenzials sahen, wogegen Salumets et al. 2001 [49], James et al. 2006 [50] und Weitzmann et al. 2005 [51] dies nicht bestätigen konnten. Der Istanbul Consensus Workshop erbrachte den Konsens, dass neben dem Befruchtungscheck des Vorhandenseins von 2 Vorkernen eine Beurteilung der Symmetrie der Vorkerne und Nukleoli durchgeführt werden soll. Diese erfolgt in 3 Kategorien: Symmetrisch, nicht symmetrisch und abnormal, wobei als abnormal Vorkerne ohne Nukleoli und solche mit nur einem großen Nukleoli klassifiziert werden.

Die Entwicklung und Verteilung der Nukleoli ist zeitabhängig und die Einteilung in die 3 Klassen ist die Konsequenz, wenn man keinen Scoringzeitpunkt festsetzt.

Tabelle 4: Therapieausgang in Abhängigkeit vom Z-Score der Vorkernstadien beim Transfer von 1–3 Embryonen, wobei das Vorhandensein gegen das Nicht-Vorhandensein eines Z-Scores ausgewertet wurde. Zyklen mit nur Z4-Vorkernstadien wurden nicht mit aufgeführt.

Z-Score	Zyklen	Implantationsrate (Fruchthöhlen)	Schwangerschaftsrate (Schwangerschaften)
Mindestens 1 × Z1	316	21,0 %[a, c] (144)	37,3 %[d, f] (118)
Mindestens 1 × Z2 (Kein Z1)	104	18,9 %[a, b] (40)	27,9 %[d, e] (29)
Mindestens 1 × Z3 (Kein Z1, Z2)	140	12,3 %[b, c] (37)	24,3 %[e, f] (34)

[a, e] p = n.s.; [b] $p < 0{,}05$; [c] $p < 0{,}005$; [d] $p < 0{,}1$; [f] $p < 0{,}01$

Tabelle 5: Darstellung der Implantations- (IR-) und Schwangerschaftsraten (SSR) der Studie nach unterschiedlichen Auswahlverfahren beim Transfer von 2 Embryonen.

Auswahlkriterium	Zyklen	IR (n)	SSR (n)
Mindestens (mind.) 1 Oozyte mit höchstens 1 Defekt	284	23,6 % (134)	37,3 %[b] (106)
Mind. 1 Vorkernstadium mit Z1-Score	226	25,0 % (113)	39,4 %[a, c] (89)
Mind. 1 Oozyte, höchstens 1 Defekt und mind. 1 Vorkernstadium Z1-Score	151	26,8 % (81)	42,4 %[a, d, e] (64)
Beide Embryonen aus Oozyten mit mind. 2 Defekten und kein Vorkernstadium Z1-Score	60	11,7 % (14)	18,3 %[e] (11)
Kumulativer Embryoscore > 50 am Tag 3	118	35,2 % (83)	53,4 %[b, c, d] (63)
Mind. 1 Oozyte, höchstens 1 Defekt, 1 Vorkernstadium Z1-Score, Embryoscore Tag 3 > 50	52	37,5 % (39)	57,7 % (30)

[a] p = n. s.; [b] p < 0,005; [c] p < 0,01; [d] p < 0,1; [e] p < 0,001

Tabelle 6: Embryograding [9, 10] (Embryoscore = Anzahl Blastomere × Faktor)

Grad	Faktor	Fragmente	Blastomeren	Zytoplasma
A	4	–	Gleichförmig, rund Symmetrisch angeordnet	Gleichmäßig Leicht granuliert
B	3	Bis 10 %	Leichte Größenunterschiede Form etwas unregelmäßig	Ungleichmäßig Granuliert
C	2	20–50 %	Ungleichmäßig groß, großer PVS Ungleichmäßig verteilt Reduzierte Blastomerenhaftung	Dunkle Granula Vakuolen
D	1	> 50 %	Nur eine Blastomere sichtbar Ungleichförmige Blastomeren Großer PVS Blastomeren ungleich verteilt	Dunkle Granula Vakuolen

Der Embryo

In der Multicenter-Studie wurde ein Embryonenscore (aufgeführt in Tabelle 6) nach Hill et al. [18] und Steer et al. [19] ermittelt. Es wurde keine Embryonenauswahl durchgeführt, sodass der Embryoscore nur beobachtenden Charakter hatte. Die Auswertung der Transfers mit 2 Embryonen mit einem Embryoscore > 50 am Tag 3 ([18, 19], Tab. 6) verdeutlichte den Einfluss der Embryonenauswahl. Die IR (35,2 %) und SSR (53,4 %) waren signifikant höher verglichen mit der Auswahl, die auf der Oozyten- oder Vorkernebene erfolgte. Es muss aber bedacht werden, dass die Vorkernstadien für den Embryotransfer unter Berücksichtigung der vorhandenen Erkenntnisse (Kombination der Oozyten-Vorkernbeurteilung) ausgewählt wurden und zu den Ergebnisse des kombinierten Oozyten- und Vorkernscorings nur noch eine bessere Tendenz (p = 0,073) erkennbar war.

Die höchsten Schwangerschaftsraten zeigten jene Zyklen, bei denen auf der Oozytenebene mindestens eine Zelle höchstens einen Defekt und auf der Vorkernebene mindestens ein Z1-Vorkernstadium vorhanden waren und sich aus diesen Zellen Embryonen mit einem kumulativen Embryoscore am Tag 3 > 50 entwickelten (Implantationsrate 37,5 %, Schwangerschaftsrate 57,7 %). Diese Ergebnisse (Tab. 5) zeigen, dass die Entwicklung der Zellen bedacht werden muss, also der Oozytenvorkern- und Embryoscore zusammen [52]. Dies verdeutlicht, dass der dynamische Prozess der Zellentwicklung entscheidend ist für das Entwicklungspotenzial der Zelle.

International erfolgt die Auswahl der Zellen zum großen Teil aufgrund der Morphologie der Embryonen. Die Veröffentlichung des Istanbul Consensus Workshop zeigt unterschiedliche Scoringsysteme auf – vom Embryo am Tag 2 [53] und 3 [54] bis zur Morula [55] und Blastozyste [56, 57]. Der Istanbul Consensus Workshop konnte sich auf ein einheitliches Scoringsystem einigen [20, 21], welches in Tabelle 7 aufgeführt wird.

Diskussion

Die Identifikation von morphologischen prognostischen Faktoren zur Findung der Zellen mit dem höchsten Entwicklungspotenzial zum Embryotransfer ist für eine erfolgreiche Kinderwunschtherapie von großer Bedeutung. Diese Multicenter-Studie hat besonders die Kriterien auf der Ebene der Oozyte und der Vorkernstadien herausgearbeitet, wobei der internationale Konsensus-Workshop der Alpha Scientists in Reproductive Medicine und ESHRE Special Interest Group Embryology ein Scoringsystem von der Oozyte bis zur Blastozyste definiert.

Auf der Ebene der Oozyte zeigen beide Arbeiten, dass einzelne Faktoren (ausgenommen Rieseneizellen [58, 59] und das Auftreten von sER [60, 61]) keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Zellen haben. Dies steht im Einklang mit den Arbeiten von De Sutter et al. [27] und Serhal et al. [28]). Die Multicenter-Studie verdeutlicht, dass nicht die Art, sondern die Anzahl an Auffälligkeiten das Entscheidende für die Qualität der Eizelle ist. Dies zeigt deutlich Tabelle 2 beim Vergleich der Implantations- und Schwangerschaftsraten.

Auf der Ebene der Vorkernstadien zeigen die Anzahl und Verteilung der Nukleoli in den Vorkernen das Entwicklungspotenzial der Zelle an. Gleich große, aneinander gelagerte Vorkerne mit symmetrisch angeordneten Nukleoli zeigen die meisten Embryonen mit einem guten Embryoscore und hohen Schwangerschaftsraten. Dies wird im Scoringsystem des Istanbul Consensus Workshops ebenso gewertet. Mit fortschreitender Entwicklung der Zelle nimmt die Aussagekraft bezüglich des Entwicklungspotenzials der Zelle zu (Tab. 5), sodass sie auf der Ebene der Embryonalentwicklung am stärksten ist.

Die höchsten Schwangerschaftsraten wurden in der Studie allerdings bei kombinierten Scoringsystemen gefunden. Dies zeigt die Bedeutung der genauen Charakterisierung des dynamischen Prozesses der Entwicklung der Zelle auf [62, 63]. In Zukunft ist es daher wichtig, mithilfe von Time-lapse-Aufnahmen die Teilungsfrequenzen und Verläufe [64] zu charakterisieren, um genau herauszu-

Tabelle 7: Konsensus-Scoringsysteme für Embryonen an unterschiedlichen Tagen nach Spermiumzugabe.

Score	Klassifizierung	Beschreibung
	Tag-2- und Tag-3-geteilte Embryonen	
1	Gut	< 10-%-Fragmente Teilungsspezifische Zellgröße Keine Multinukleation
2	Normal	< 10–25-%-Fragmente Teilungsspezifische Zellgröße der Mehrheit der Zellen Keine Multinukleation
3	Schlecht	Viele Fragmente (> 25 %) Stadiumabhängige untypische Zellgrößen Anzeichen für Multinukleation
	Tag-4-Embryonen	
1	Gut	Beginn des 4. Zellzyklus Anzeichen von Kompaktierung bezüglich des gesamten Embryos
2	Normal	Beginn der 4. Zellzyklus Anzeichen von Kompaktierung bezüglich der Mehrheit des Embryovolumens
3	Schlecht	Weniger als die Hälfte des Embryos kompaktiert, 2–3 Zellen als separate Blastomeren
	Blastozystenscoring	
1		Frühe Blastozyste
2		Blastozyste
3		Expandierte Blastozyste
4		Geschlüpfte (hatched) Blastozyste
	Innere Zellmasse	
1	Gut	Markant erkennbar mit vielen, dicht beieinander liegenden, kompakten Zellen
2	Normal	Leicht erkennbar mit vielen Zellen in lockeren Gruppen
3	Schlecht	Schwer erkennbar mit wenigen Zellen
	Trophektoderm	
1	Gut	Viele Zellen, die ein geschlossenes Epithel bilden
2	Normal	Wenige Zellen, die ein Epithel bilden
3	Schlecht	Sehr wenige Zellen

finden, welche Teilungsmuster und Teilungsgeschwindigkeiten das Potenzial der Zelle beschreibt.

Der Istanbul Consensus Workshop hat diesbezüglich Zeitfenster definiert, wann die Zelle welche Entwicklungsstadien erreicht haben soll (Tab. 8).

Neben den zu transferierenden Embryonen dürfen aber auch der Einfluss des Zyklus und die Bedeutung der Bedingungen bei der Frau nicht vernachlässigt werden.

Tabelle 8: Zeitpunkte, an denen bestimmte Entwicklungsstadien von der befruchteten Eizelle zum Embryo beobachtet werden sollen.

Beobachtung	Zeitpunkt in Stunden nach Insemination	Erwartetes Entwicklungsstadium
Befruchtungskontrolle	17 ± 1	Vorkernstadium
Syngamie	23 ±1	50 % der Zellen in Syngamie, 20 % Zweizeller
Early Cleavage	26 ±1 nach ICSI 28 ± 1 nach IVF	2-Zell-Stadium
Tag 2	44 ± 1	4-Zell-Stadium
Tag 3	68 ± 1	8-Zell-Stadium
Tag 4	92 ± 2	Morula
Tag 5	116 ± 2	Blastozyste

Relevanz für die Praxis

Die Auswahl möglichst eines (zur Vermeidung von Mehrlingsschwangerschaften) implantationsfähigen Embryos zum Embryotransfer ist das Ziel der Kinderwunschtherapie. Hierfür ist es essenziell, Marker herauszuarbeiten, die dies erkennen. Die Embryonalentwicklung ist ein dynamischer Prozess, wobei der Beginn stark von der Qualität der Oozyte abhängt. Die Anzahl an Auffälligkeiten (Tab. 2) beschreibt dabei das Entwicklungspotenzial, ebenso wie das Z-Scoring (Tab. 3, 4) auf der Vorkernebene. Die fortlaufende Embryonalentwicklung zeigt die Chancen des Embryos (Embryoscore Tab. 5) auf das Erreichen einer Schwangerschaft an [62, 65], wobei zu bestimmten Zeitpunkten bestimmte Entwicklungsstadien erreicht sein sollten. Diese hat der Istanbul Consensus Workshop der Alpha Scientists in Reproductive Medicine und ESHRE Special Interest Group Embryology herausgearbeitet (Tab. 8). Time-lapse-Imaging [64] hat in diesem Zusammenhang ein großes Potenzial, um den entwicklungsfähigen Embryo zu erkennen. In der Praxis wird es entscheidend sein, relevante Marker und Zeitpunkte zu definieren, um den Single-Embryotransfer erfolgreich zu machen.

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, keinen Interessenkonflikt mit der Veröffentlichung dieser Publikation zu haben.

Literatur:

1. Devreker F. Uptake and release of glucose, pyruvate and lactate, non-invasive embryo quality assessment. Eshre Campus 2005; 77–91.

2. Brewis IA. Proteomics in reproductive research: The potential importance of proteomics to research in reproduction Hum Reprod 1999; 14: 2927–9.

3. Kere J, Hofmann B. Comprehensive molecular analysis of oocytes and embryos. Hum Reprod 2011; 26 (Suppl 1): i56.

4. Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. Artificial reproductive technology achievements for optimizing embryo quality. Ann N Y Acad Sci Dec 2004; 1034: 252–61.

5. Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte development competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. J Assist Reprod Genet 1998; 15: 226–34.

6. Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, Nyboe Andersen A, Selleskog U, Nielsen D, Grondahl C, Kim H, Arce J. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. Hum Reprod 2003; 18: 2575–81.

7. Thurin A, Hardarson T, Hausken J, Jablonowska B, Lundin K, Pinborg A, Bergh C. Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients. Hum Reprod 2005; 20: 1876–80.

8. Van Montfoort AP, Dumoulin J, Kester A, Evers J. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfer. Hum Reprod 2004; 19: 2103–8.

9. Hardarson T, Lofman C, Coull G, Sjogren A, Hamberger L, Edwards R. Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. Reprod Biomed Online 2002; 5: 36–8.

10. Greuner M. Untersuchung morphologischer Kriterien der Gameten und Vorkernstadien zur Erzielung einer Schwangerschaft. Dissertation 2008, Fakultät Charité, Universitätsmedizin Berlin.

11. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod 1997; 12: 1750–5.

12. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. Fertil Steril 2005; 83: 1635–40.

13. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rates and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 2000; 15: 427–30.

14. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. Hum Reprod 2002; 17: 2415–8.

15. Montag M, Baukloh V. Verbessert „Assisted Hatching" die Schwangerschaftsrate? Reproduktionsmedizin 1998; 14: 327–9.

16. Ebner T, Moser M, Tews G. Die Bedeutung der Morphologie der Oozyte hinsichtlich ihres weiteren Entwicklungspotenzials. J Reprod Endokrinol 2006; 1: 17–23.

17. Scott L, Alvero R, Leondiris M, Miler B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod 2000; 15: 2394–403.

18. Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, Osteen KG, Wentz AC. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 1989; 52: 801–6.

19. Steer C, Mills C, Tan S, Campbell S, Edwards R. 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 1992; 7: 117–9.

20. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. RBM online 2011; 22: 632–46.

21. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod 2011; 1–14.

22. Sadler T. Medizinische Embryologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1998; 12–7.

23. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Molekularbiologie der Zelle. 2. Aufl. CH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990.

24. Tan S, Royston P, Cambell S. Cumulative conception and live birth rates after in-vitro fertilization. Lancet 1992; 339: 1390–4.

25. Felberbaum R. Cetrorelix in controlled ovarian stimulation for ART. Results of phase III, multiple dose treatment. Gynecol Endocrinol 1999; 13: 14.

26. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire JC, Alvarez S, Moreau L, Nicollet B, Zorn JR, Bouchard P, Frydman R. Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetrorelix) or a depot formula of a LH-RH agonist (triptorelin). Fertil Steril 2000; 73: 314–20.

27. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 595–7.

28. Serhal P, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997; 12: 1267–70.

29. Sundström P, Nilsson BO. Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycles is asynchronous. Hum Reprod 1988; 3: 613–9.

30. Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organisation in meiotically mature human oocytes after exogeneous ovarian hyperstimulation. J Electron Microscopical Technologies 1990; 16: 324–46.

31. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Jesacher K, Tews G. A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. J Assist Reprod Genetics 2001; 18: 623–8.

32. Rosen MP, Shen S, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI. Oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection: a multivariate analysis to assess its importance as a laboratory or clinical marker. Fertil Steril 2006; 85: 1736–43.

33. Dale B, Wilding M, Coppola G, Tosti E. How do spermatozoa activate oocytes? RBM online 2010; 21: 1–3.

34. Heytens E, Parrington J, Coward K, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCz) in spermatozoa from infertile men. Hum Reprod 2009; 24: 2417–28.

35. Saunders C.M. PLC zeta: a sperm specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. Development 2002; 129: 3533–44.

36. Plachot M. Fertilization. Hum Reprod 2000; (Suppl 4): 19–30.

37. Scott L, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Hum Reprod 1998; 13: 1003–13.

38. Tesarik J, Junca A, Hazout A, Aubriot F, Nathan C, Cohen-Bacrie, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potenzial after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non invasive examination of pronuclear morphology. Hum Reprod 2000; 15: 1396–9.

39. Goessens G. Nucleolar structure. Int Rev Cytol 1984; 87: 107–58.

40. Tesarik J, Kopecny V. Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is corelated with early RNA synthetic activity. Exp Cell Res 1990; 191: 153–6.

41. Montag M, van der Ven H, on behalf of the German Pronuclear Morphology Study Group. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. Hum Reprod 2001; 11: 2384–9.

42. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. Hum Reprod. 2003; 18: 2406–12.

43. Stalf T, Herrero J, Mehnert C, Manolopoulos K, Lenhard A, Gips H. Influence of polarization effects and pronuclei on embryo quality and implantation in an IVF program. J Assist Reprod Genet 2002; 19: 355–62.

44. Nagy Z, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H, Van Sterteghem A. Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 1606–12.

45. Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. Reprod Biomed Online 2003; 6: 201–14.

46. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphologie. Hum Reprod 1999; 14: 1318–23.

47. Balaban B, Urman B, Isiklar A, et al. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. Hum Reprod 2001; 16: 2357–61.

48 Nagy Z, Dozortsev D, Diamond M, Rienz L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. Fertil Steril 2003; 80: 67–74.

49. Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari A, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16: 2177–81.

50. James A, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. Hum Reprod 2006; 21: 1599–604.

51. Weitzmann VN, Schnee-Riesz J, Benadiva C, Nulsen J, Siano L, Maier D. Predictive value of embryo grading for embryos with known outcomes. Fertil Steril 2010; 93: 658–62.

52. Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. Hum Reprod 2003; 18: 1307–12.

53. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royer D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. Hum Reprod 2007; 22: 1973–81.

54. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potenzial of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. Hum Reprod 2001; 16: 326–32.

55. Feil D, Henshaw RC, Lane M. Day 4 embryo selection is equal to day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers. Hum Reprod 2008; 7: 1505–10.

56. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In: Jansen R, Mortimer D (eds). Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999. Parthenon Publishing, London, 1999; 378–88.

57. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. Curr Opin Obstet Gynecol 1999; 11: 307–11.

58. Austin C. Anomalies of fertilization leading to triploidy. J Cell Comp Physiol 1960; 56: 1–15.

59. Rosenbusch B, Schneider M, Gläser B, Brucker C. Cytogenetic analysis of giant oocytes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. Hum Reprod 2002; 17: 2388–93.

60. Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. Hum Reprod 2004; 19: 1591–7.

61. Ebner T. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. RBM online 2008; 16: 113–8.

62. Fisch J, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The graduated embryo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. Hum Reprod 2001; 16: 1970–5.

63. De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote und embryo morphology und growth rate. Hum Reprod 2002; 17: 2402–9.

64. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implanation. Hum Reprod 2011; 10: 2658–71.

65. Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Hsieh AH, Huang HW, Tan PH, Chang SY. The predictive value of using a combined Z-score und day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. Hum Reprod 2003; 18: 1299–306.