



Mögliche negative Einflüsse der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion auf die weitere Entwicklung der Oozyte

Thomas EBNER, Marianne MOSER, Michael SOMMERGRUBER, Gernot TEWS

Landes-Frauen- und Kinderklinik, IVF Abteilung, Linz, Österreich

Abstract

Possible Negative Effects of ICSI on Further Development of Oocytes

Intracytoplasmic injection is a rather invasive method and the question rises whether this manipulation has a significant influence on further fate of the oocyte or embryo. Two possible problems may occur, i. mechanical stress which, if the oocyte does not degenerate at all, may cause irreversible harm of the cytoskeleton and metaphase II spindle and ii. usage of an affected sperm (defective centriole, strand breaks, aneuploidy). A possible correlation between ICSI and an increase in malformation rate is discussed controversially.

Keywords: aneuploidy, blastocyst formation rate, ICSI, oocyte quality, metaphase II spindle

Zusammenfassung

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion ist eine invasive Technik und es stellt sich die Frage, inwieweit dieser Eingriff das weitere Schicksal der Eizelle oder des Embryos beeinflusst. Im Wesentlichen sind es zwei Probleme die entstehen können: Einerseits eine mechanische Beanspruchung mit, wenn die Oozyte das Anstechen überlebt, direkter Auswirkung auf die Funktion des Cytoskeletts und der Teilungsspindel und, andererseits das eventuelle Einbringen eines geschädigten Spermiums (Centrioldefekt, Strangbrüche, Aneuploidien). Ob letzteres eine Erhöhung der Missbildungsrate bedingt, ist noch umstritten.

Schlüsselwörter: Aneuploidie, Blastulationsrate, ICSI, Oozytenqualität, Teilungsspindel,

Einleitung

Ursprünglich konnte nur Paaren bei ihrem Kinderwunsch geholfen werden (67), bei denen der Partner eine ausreichende Zahl an motilen und morphologisch normalen Spermatozoen aufwies. Waren diese Samenparameter stark beeinträchtigt, war eine mögliche Befruchtung aussichtslos, weshalb verschiedene Mikromanipulationstechniken entwickelt wurden, um das Spermium näher zum eigentlichen Ort der Bestimmung, dem Ooplasma, zu bringen.

Ein erster Schritt war die Perforierung der Zona pellucida, um so den Spermien den Zugang zum perivitellinen Spalt zu ermöglichen (30). So konnten zwar Schwangerschaften erzielt werden (14), doch waren die Ergebnisse nach wie vor alles andere als zufriedenstellend. Was lag also näher, als die Spermien direkt in den perivitellinen Spalt zu injizieren (49), was tatsächlich zu besseren Befruchtungsraten führte (50). Durch die Präsenz mehrerer Spermien in unmittelbarer Nähe des Oolemmas kam es jedoch

vermehrt zu polyspermen Befruchtungen (15). Dieses Problem lösten Palermo et al (51) indem sie auch die letzte Membran mechanisch passierten und ein einzelnes unbewegliches Spermatozoon direkt in das Zytoplasma der Eizelle deponierten. Mittels dieser intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) gelang es auch in der Patientengruppe mit stark beeinträchtigter männlicher Fertilität ansprechende Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten zu erzielen (72).

In letzter Zeit wurden jedoch einige Studien publiziert, die im Vergleich zur herkömmlichen IVF bei ICSI eine geringere Rate an Blastozysten beschrieben (18, 42, 64). Eine entsprechend schlechtere Überlebens- (61) und Entwicklungsrate (4, 40) fand sich auch nach dem Auftauen kryokonservierter ICSI Embryonen. Diese schlechtere Entwicklung bei ICSI Embryonen könnte sowohl durch mechanische Verletzung diverser Zellstrukturen (19, 26) als auch durch das Einbringen von subfertilen Spermien bedingt werden, wobei gerade im letzteren Fall letztendlich nicht auszuschließen ist, dass man auch abnormales genetisches Material in die Eizelle einschleusen könnte (58), was theoretisch zu einer erhöhten Rate an Missbildungen führen könnte (11).

Die folgende Übersichtsarbeit wird sich im Wesentlichen mit diesen theoretisch denkbaren negativen Einflüssen

Corresponding Author: Univ. Doz. Mag. Dr. Thomas Ebner
Landes- Frauen- und Kinderklinik, IVF Abteilung,
Lederergasse 47, A-4010 Linz, Österreich
Phone : +43 732 7674 24605
Fax : +43 732 7674 24604
E-mail : Thomas.ebner@gespag.at

Tabelle 1. Einfluss der ICSI-Technik und der Oozytenmorphologie auf Befruchtungsrates und das Überleben der Eizelle.

	n	Befruchtung (2Pn)	Degeneration
Eizelltyp			
Keine Anomalie	810	607 (74,9)	25 (3,1) ^a
Zytoplasmatische Anomalie	632	440 (69,9)	32 (5,1)
Anomalie von Zona/PVS	241	161 (66,8)	30 (12,5) ^a
ICSI-Fehler			
Schwieriges Anstechen	136	78 (57,4)	40 (29,4) ^b
Spermium haftet an Pipette	120	87 (72,5)	11 (9,2) ^{b,c}
Ungenügende Immobilisation	63	46 (73,0)	2 (3,2)
Austreten des Spermiums in PVS	62	34 (54,8)	5 (8,1)
Mangelndes Entfernen der Cumuluszellen	110	75 (68,2)	20 (18,2) ^c

^{a,b}P<0,001
^cP<0,005
PVS=perivitelliner Spalt; 2Pn=zwei Vorkerne
Tabelle nach Ebner et al. (2001).

des ICSIs auf die anschließende Weiterentwicklung in Kultur befassen.

Mechanische Beanspruchung der Oozyte

Die ICSI unterscheidet sich von der herkömmlichen in vitro Fertilisierung (IVF) dadurch, dass dem Spermium die Passage durch den Cumuluskomplex, die Zona pellucida, den perivitellinen Spalt und die Eimembran erspart wird. Für das kontrollierte Einstechen ist es unabdingbar, dass die Eizelle von den umgebenden Zellen befreit wird, um sie dann „nackt“ besser mit einer Haltepipette manipulieren zu können. Dieser Reinigungsprozess wird in Hyaluronidase durchgeführt, die anschließend noch an der Zona haftenden Zellen werden mechanisch entfernt. Der weibliche Gamet ist also schon in der Vorbereitung zur ICSI unphysiologischen Bedingungen ausgesetzt, und es bleibt unklar, inwieweit dies die Qualität der Oozyte beeinflusst (52, 71).

Degeneration durch Anstechen

Reife Metaphase II Eizelle unterscheiden sich während des Anstechens hinsichtlich der Elastizität ihrer Membranen. Charakteristischerweise bildet sich vor dem endgültigen Durchdringen des Oolemmas eine Invagination, die bis zur Mitte der Eizelle reicht, ehe die Membran der Glaspipette nachgibt und penetriert wird. Es sind zwei Abweichungen dieses optimalen Anstechverhaltens beschrieben worden (19, 21, 47, 53), je nachdem ob die Membran bereits beim Ansetzen der Einstichpipette bricht oder erst, wenn sich die Pipette in unmittelbarer Nähe der gegenüberliegenden Membran ist. Dieser letztere Extremfall erfordert eine erhebliche Manipulation der Eizelle und oft mehrere Einstichversuche, ehe das Spermium in der Eizelle abgesetzt werden kann, sodass von diesen Eizellen ein erhöhter Prozentsatz degeneriert (20). Das selbe Phänomen ist bei der Gruppe von Oozyten beschrieben worden, die ganz plötzlich dem Druck der Pipette nachgeben. Vermutlich ist hier

aufgrund des Fehlens des Einstichtrichter, der normalerweise Schutzfunktion hat, die Überlebensrate auf 81-87% (47, 53) gesenkt.

Im Normalfall jedoch, und das trifft auf knapp drei Viertel aller Patienten zu (53), wird sich ein klar differenzierter Einstichtrichter zeigen. Trotzdem erleiden 5-10% der MII-Oozyten einen unprogrammierten Zelltod (20), die Gründe hierfür sind sowohl in der Eizellqualität als auch in der Injektionstechnik zu suchen (Tabelle 1).

In einer früheren Studie konnten wir zeigen (20), dass eine beeinträchtigte Eizellqualität das Überleben der Oozyte negativ beeinflussen kann. Hier sind es nicht zytoplasmatische Faktoren –obwohl ein Zusammenhang zwischen der Viskosität des Plasmas und dem Überleben der Eizelle vermutet wird (22)– die die Nekrose der Oozyte bedingen, vielmehr sind es Anomalien der äußeren „Hüllen“, wie Zona pellucida oder perivitellinem Spalt.

Die Technik annähernd jedes fünften ICSIs weicht von der Norm ab. Neben dem erschwerten Anstechen der Eizelle (Abbildung 1) ist es das mangelhafte Reinigen der Oozyte vor dem Anstechen (Abbildung 2), welches eng mit einer erhöhten Degenerationsrate korreliert. Spermienbezogene Fehler, wie das ungenügende Immobilisieren derselben, das Haftenbleiben an der Einstichpipette oder das Austreten des Spermiums in den perivitellinen Spalt, zeigten keinen Zusammenhang mit dem Überleben.

Beiden oben genannten Problemen kann relativ leicht Abhilfe geschafft werden. Gelingt es trotz Wechsel der ICSI-Pipette nicht, die Eizelle ohne allzugroße Deformation anzustechen, empfiehlt es sich, eine Modifikation der ICSI-Technik dahingehend durchzuführen, dass man eine Druck- und eine Saugphase kombiniert, um die gegenüberliegende Membran nicht zu verletzen. Sollte dies alles keine Besserung bringen,

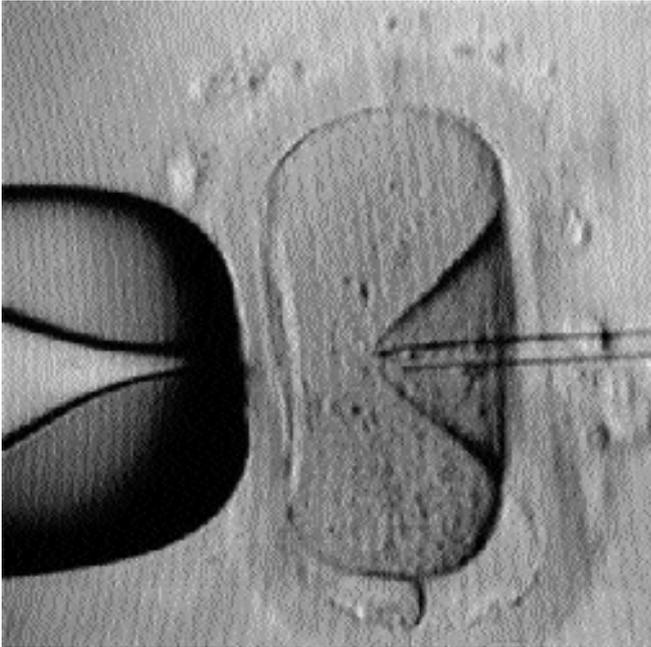


Abbildung 1. Erschwertes Anstechen der sich bereits deutlich komprimierten Oozyte.

kann man immer noch die Zona pellucida mittels Laser vorbehandeln um das Eindringen der Pipette deutlich zu erleichtern und die Überlebensrate der Eizellen signifikant zu erhöhen (1, 46, 48, 55).

Das Problem der hinderlichen Cumuluszellen entsteht meist durch einen zu vorsichtigen Säuberungsprozess mit Hyaluronidase, oder ist Ausdruck einer suboptimalen Reifung der Eizelle (41). Das Vorhandensein zu vieler Cumuluszellen kann das Begutachten der Eizelle erschweren und die Haltepipette verstopfen (53), viel eher aber verhindert es die optimale Manipulation mittels Haltepipette. Dem kann Abhilfe geschaffen werden, indem man die Eizelle so lange dreht bis man eine cumuluszellfreie Ansaug- und Einstichstelle gefunden hat.

Verletzung des Zytoskeletts und des Spindelapparates

Die Lage des ersten Polkörperchens ist hier sekundär, sind doch adequate Befruchtungsraten für fast alle Positionen der Oozyte beschrieben worden (6). Es zeigte sich, dass die Befruchtungsergebnisse bzw. die Embryoqualität deutlich besser waren, wenn der erste Polkörper in der 7 Uhr-Position fixiert wurde, besser sogar noch als bei den eigentlich empfohlenen 6 und 12 Uhr-Positionen. Lediglich wenn der Polkörper auf der 9 Uhr Position war, gab es Befruchtungsraten von unter 60%. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass die Metaphase II-Spindel verletzt wurde, die ja in unmittelbarer Nähe des ersten Polkörperchens angenommen wird.

Hardarson et al. (32) konnten jedoch zeigen, dass diese Annahme bei weitem nicht immer zutrifft, denn sie beschrieben eine

mittlere Abweichung zwischen MII-Spindel und ersten Polkörper von 41,7 Grad. Da dieser Wert signifikant größer war, als der Abweichungswinkel von Prophase I Eizellen, die in vitro nachreifen, kann die beschriebene Dislokation nur bedingt auf die Manipulation während der Entfernung des Cumuluskomplexes zurückzuführen sein. Jedenfalls fanden sich 92,6% aller Spindeln zumindest in der Hemisphäre des ersten Polkörperchens, 68,5% sogar im selben Drittel.

Der Prozentsatz an Oozyten ohne nachweisbarem Spindelapparat bewegt sich zwischen 8 und 18% (16, 44, 56, 73). Solchermaßen beeinträchtigte Eizellen lassen sich schwerer befruchten (56, 73), die sich daraus entwickelnden Embryonen zeigen eine schlechte Morphologie (44) und erreichen seltener das Blastozystenstadium am Tag 5 (73).

Mit zunehmender Abweichung der meiotischen Spindel von der Position des ersten Polkörperchens erhöht sich natürlich das Risiko die MII-Spindel irreversibel zu beschädigen. Da die Mikrotubuli der humanen MII-Spindel von Haus aus nicht so stabil sind und ausserdem einen regen Turnover aufweisen, sind menschliche Spindelapparate besonders anfällig für widrige Kulturbedingungen, wie Temperaturschwankungen (2, 75) und Sauerstoffmangel (33). Folglich kann schon jede kleinste Spindelverletzung, die durch die ICSI entsteht, zu einer morphologischen Veränderung der Spindel und in weiterer Folge zu einem meiotischen Arrest (65) oder einem Fehler bei der Aufteilung der Chromosomen führen (25, 35, 57).

Aber auch für den Fall, dass sich Spindel und Polkörperchen in unmittelbarer Nähe befinden, kann diese (und/oder das Zytoskelett) durch die Aspiration des Zytoplasmas beeinträchtigt werden, welche vorgenommen werden sollte, um die Eimembran sicher zu brechen (10, 70). Es hat sich bewährt, nur wenig Ooplasma zu aspirieren (47), denn im Falle eines zu starken Aufsaugens (>6 pl) ist eine eingeschränkte Blastozystenbildungsrate beobachtet worden (19). Allerdings fand sich keine dadurch verursachte Erhöhung an chromosomalen (X, Y, 18) Anomalien (19).

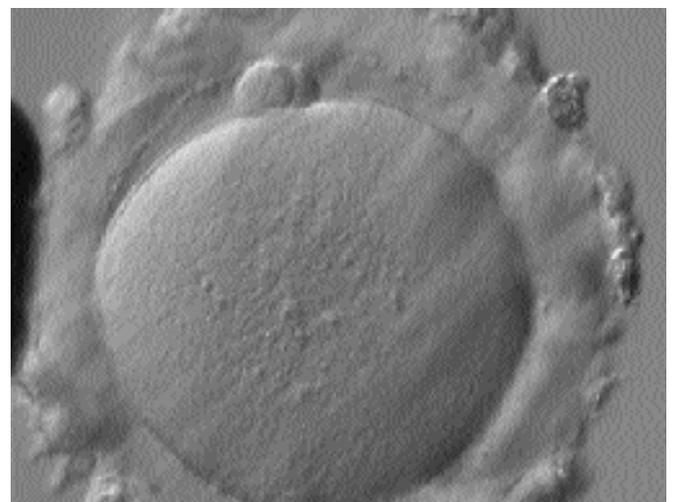


Abbildung 2. MII-Oozyte die nur unzureichend von Cumuluszellen befreit ist.

Neben all diesen Problemen rund um die meiotische Spindel ist es nahezu unvermeidbar, während des Deponierens des immobilisierten Spermatozoons kleinere Mengen an Medium oder PVP in die Zelle zu transferieren. Ein relativ großes Volumen an zellfremden Substanzen kann zu Vakuolisierung der Zygote führen (eigene Beobachtungen), was wiederum eine verringerte Zahl an Blastozysten (max. 34%) mit sich bringen kann (23, 76).

Injektion abnormer Spermien

Neben den oben angeführten Problemen, die ausschließlich von der invasiven Natur der Methode per se herrühren, existiert eine weitere, nicht zu unterschätzende Problematik, welche auf das schlechtere Patientenkollektiv zurückzuführen ist. Da die ICSI auch eine Therapie bei ausgeprägter männlicher Subfertilität ermöglicht, können theoretisch auch morphologisch unauffällige Spermatozoen für eine Injektion herangezogen werden, die kleinere molekulare und zelluläre Defekte aufweisen, die die Spermatozoenfunktion nachhaltig beeinträchtigen.

So können Spermien einen Defekt des Centriols aufweisen, und da das männliche Centromer das aktive bei der ersten Zellteilung ist, sind in solchen Fällen vorzeitige Wachstumsstops die Regel (69). Genauer gesagt kommt es zwar zur Dekondensation des Spermiumkopfes bzw. zur Aktivierung der Eizelle, jedoch lagern sich die beiden Pronuklei aufgrund des Defekts des Spermiumcentrosoms nicht aneinander, da die Zahl und Anordnung der Mikrotubuli pathologisch ist. Folglich kann es nicht zur Syngamie kommen. Morphologisch kann man manchmal solche Anomalien der Centriolen an Deformationen des Kragenbereiches der Spermien voraussehen (12, 13, 54). Man muss sich vor Augen halten, dass im Extremfall sehrwohl Befruchtungen und Embryonen guter Qualität erzielen lassen, nichtsdestotrotz endeten alle bisher erzielten Schwangerschaften in einem Frühabort (45, 54).

Neben solchen morphologischen Spezialfällen findet man natürlich auch verschiedenste Fälle von DNS-Anomalien der Spermatozoen, die mittels ICSI in die Eizelle eingeschleust werden können und auch weitervererbt werden, man denke nur an die Deletionen des Y-Chromosoms.

Evenson et al. (29) z.B. nahmen die Empfindlichkeit des Spermchromatins gegenüber Säureeinwirkung als Maß für die Fertilität. Sie konnten in einer Normalpopulation (ohne IVF/ICSI) zeigen, dass die Aussicht auf eine Schwangerschaft ab einem Schwellenwert von 30% betroffener Spermien äußerst schlecht ist (37, 66), zudem konnten anhand dieses Richtwertes 39% der Fehlgeburten vorhergesagt werden (29).

Eine weitere Möglichkeit die Spermienintegrität zu analysieren, ist die Untersuchung von DNS-Strangbrüchen. Normalerweise sind gerade einmal 5% aller Spermien betroffen (3, 17, 68). Je höher die Rate an Strangbrüchen, desto schlechtere Befruchtungsraten sind zu erwarten. Es zeigte sich ein auffälliger Zusammenhang zwischen der Rate an DNS-Schäden

und dem Alter des Mannes, Spermienkonzentration und der Morphologie der Samen.

Letztendlich, obwohl ihre Frequenz eher gering erscheint (so ist die mittlere Häufigkeit für eine autosomale Disomie 0,25% und für eine Disomie der Geschlechtschromosomen 0,26%), stellen auch Aneuploidien der Spermien ein nicht zu unterschätzendes Problem dar (24, 63). Die häufigste Form jedoch ist die Diploidie, hervorgerufen durch meiotischen Mutationen bzw. einem pathologischen Umfeld im Hoden. Bei Verwendung solcher Spermien drohen Befruchtungsversagen, Teilungsstörungen, Schwangerschaftsabbrüche und theoretisch auch Missbildungen (60, 62). Erhöhte Aneuploidieraten finden sich in Patienten ohne normal geformte Spermien (34) und sind eng mit dem Ausgang der ICSI-Behandlung korreliert (8, 9).

Ausblick

Im Wesentlichen lassen sich also zwei Gruppen von möglichen direkten oder indirekten Einflüssen der ICSI auf die weitere Entwicklung der Eizelle in Kultur feststellen. Einerseits eine durch das invasive Einstechen bedingte mechanische Komponente und andererseits ein irrtümliches Verwenden eines geschädigten Spermiums.

Die mechanische Beanspruchung der Oozyte kann in 5-10% aller Fälle zu einer Degeneration derselben führen. Dies fällt nicht so sehr ins Gewicht, wenn die Patientin ansprechend auf die kontrollierte ovarielle Überstimulation anspricht, werden jedoch nur ein bis drei MII-Eizellen gewonnen, kann es zum Abbruch des ganzen Zyklus führen (38, 43).

Wird bei der ICSI das Cytoskelett inklusive Spindelapparat entscheidend beeinträchtigt, fällt der entstehende Embryo vermutlich morphologisch bereits auf und wird in den seltensten Fällen das Blastozystenstadium erreichen. Dies mag zum Teil die schlechteren Blastulationsraten bei ICSI erklären (19, 42, 64).

Hauptsächlich ist dieses gegenüber der herkömmlichen IVF schlechtere Outcome wohl auf die schlechte Qualität der verwendeten Spermatozoen zurückzuführen. Überhaupt meinen Sakkas et al. (59), dass die Blastozystenkultur bis zum Tag 5 oder 6 ein geeignetes Mittel wäre, um jene Embryonen herauszufiltern, bei welchen die väterlichen DNS in den Spermien Schäden aufwies. Dies wird allerdings angezweifelt (5).

Von Kritikern wird der ICSI oft vorgeworfen, dass die natürliche Selektion der Spermien wegfällt, was zu einer Erhöhung der Missbildungen führen könnte (36), eine natürliche Auslese besteht aber auch in vivo nicht (27). Die größte bis dato vorliegende Studie (7), die ICSI Kinder mit IVF Kindern verglich, brachte die Erkenntnis, dass kein erhöhtes Missbildungsrisiko in ICSI-Fällen zu erwarten ist. Die wenigen Studien, welche einen signifikanten Einfluss der ICSI auf die Rate an Missbildungen vermuten ließen (28, 31, 74) konnten bei Durchsicht des Studiendesigns bis auf eine

(31) alle entkräftet werden, da die Erhöhung wohl mit Mehrlingsschwangerschaften bzw. der Dauer des Kinderwunsches in Zusammenhang zu bringen waren. Letztendlich spielen auch womöglich bis dato unbekannte Risikofaktoren der Eltern mitherein (39).

Literatur

1. Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V, Dias JA, Abdelmassih R, Nagy ZP. Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod* 2002;17:2694-2699.
2. Almeida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995;3:357-365.
3. Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 1997;10:231-237.
4. Archer J, Gook DA, Edgar DH. Blastocyst formation and cell numbers in human frozen-thawed embryos following extended culture. *Hum Reprod* 2003;18:1669-1673.
5. Banerjee S, Lamond S, McMahon A, Campbell S, Nargund G. Does blastocyst culture eliminate paternal chromosomal defects and select good embryos? Inheritance of an abnormal paternal genome following ICSI. *Hum Reprod* 2000;15:2455-2459.
6. Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril* 2000;73:31-37.
7. Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Human Reproduction* 2004;19:573-578.
8. Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003;18:1371-1376.
9. Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 2001;16:1433-1439.
10. Carillo AJ, Atiee SH, Lane B, Pridham DD, Risch P, Silverman IH, Cook CL. Oolemma rupture inside the intracytoplasmic sperm injection needle significantly improves the fertilization rate and reduces oocyte damage. *Fertil Steril* 1998;70:676-679.
11. Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his infertile sons. *Hum Reprod* 1999;14:2689-2694.
12. Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Osés R, Carizza C, Leisner M, Blaquier J. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod* 1998;13:2521-2526.
13. Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Olmedo S, Zanchetti F, Hermes R. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod* 1999;14:1811-1818.
14. Cohen J, Malter HE, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, Massey J. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988;2:162.
15. Cohen J, Alikani M, Malter HE, Adler A, Talansky B, Rosenwaks Z. Partial zona dissection or subzonal sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on the evaluation of sperm and embryo morphology. *Fertil Steril* 1991;56:696-706.
16. Cooke S, Tyler JPP, Driscoll GL. Meiotic spindle location and identification and its effects on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod* 2003;18:2397-2405.
17. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 1999;14:505-512.
18. Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RCM, van Wissen LCP, Geraedts JPM, Evers JLH. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional IVF or ICSI. *Hum Reprod* 2000;15:465-469.
19. Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RCM, van Wissen LCP, Geraedts JPM, Evers JLH. Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod* 2001;16:306-312.
20. 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 Genet* 2001;18:601-606.
21. Ebner T, Moser M, Yaman C, Sommergruber M, Hartl J, Jesacher K, Tews G. Prospective hatching of embryos developed from oocytes exhibiting difficult oolemma penetration during ICSI. *Hum Reprod* 2002;17:1317-1320.
22. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 2003;18:1294-1298.
23. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence of a cytoplasmic halo at zygote stage but not type and extension of the same has a significant influence on preimplantation development and implantation behavior. *Hum Reprod* 2003;18:2406-12.
24. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;6:93-105.
25. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 1995;10:2343-2349.
26. Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online* 2002;5:117-124.
27. Engel W, Murphy D, Schmid M. Are there genetic risks assisted with microassisted reproduction? *Hum Reprod* 1996;11:2359-2370.
28. Ericson A, Kallen B. Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study. *Hum Reprod* 2001;16:504-509.
29. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-1049.
30. Gordon JW, Grunfeld L, Carrisi G, Talansky BE, Richards C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 1988;50:68-73.
31. Hansen M, Kurinczuk JJ, Boer C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *New England J Med* 2002;346:725-730.
32. Hardarson T, Lundin K, Hamberger, L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum Reprod* 2000;15:1372-1376.
33. Hu Y, Betzendahl I, Cortvrint R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low Os and aging on spindles and chromosomes on mouse oocytes from preantral follicle culture. *Hum Reprod* 2001;16:737-748.
34. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K, Sozen E, Can B, Guven C, Vanderzwalmen P. Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:726-730.
35. Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod* 1998;13:2217-2222.
36. Kurinczuk JJ, Bower C. Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *Brit J Med* 1997;315:1260-1266.
37. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717-1722.
38. Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smitz J, Camus M, Devroey P, Steirteghem A. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* 1995;10:2630-2636.
39. Ludwig M, Katalinic A. Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 2002;5:171-178.
40. Macas E, Imthurn B, Borsos M, Rosselli M, Maurer-Major E, Keller PJ. Impairment of the developmental potential of frozen-thawed human zygotes obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:630-635.
41. Mandelbaum J. Oocytes. *Hum Reprod* 2000 (Suppl 4):11-18.
42. Miller JE, Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001;16:918-924.
43. Moomjy M, Scott Sills E, Rosenwaks Z, Palermo GD. Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome. *Hum Reprod*

- 1998;13:2212-2216.
44. Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of human developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18:817-820.
 45. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002;17:990-998.
 46. Moser M, Ebner T, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Jesacher K, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. Laser-assisted zona pellucida thinning prior to routine ICSI. *Hum Reprod* 2004;19: im Druck.
 47. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, Vankelecom A, Devroey P, Van Steirteghem A. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod* 1995;10:3171-3177.
 48. Nagy ZP, Oliveira SA, Abdelmassih V, Abdelmassih R. Novel use of laser to assist ICSI for patients with fragile oocytes: a case report. *Reprod Biomed Online* 2002;4:27-31.
 49. Ng SC, Bongso TA, Ratnam SS. Microinjection of human oocytes. a technique for severe oligoasthenoteratozoospermia. *Fertil Steril* 1991;56:1117-1123.
 50. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Induction of acrosom reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. *Hum Reprod* 1992;7:248-254.
 51. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-18.
 52. Palermo G, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril* 1995;63:1231-1240.
 53. Palermo G, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, Moy F, Cohen J, Rosenwaks Z. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:172-176.
 54. Rawe VY, Terada Y, Nakamura S, Chillik CF, Olmedo SB, Chemes HE. A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Hum Reprod* 2002;17:2344-2349.
 55. Rienzi L, Greco E, Ubaldi F, Iacobelli M, Martinez F, Tesarik J. Laser-assisted intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:1045-1047.
 56. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, Tesarik J, Greco E. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18:1289-1293.
 57. Rosenbusch B, Sterzik K. Irregular chromosome segregation following ICSI? *Hum Reprod* 1996;11:2337-2338.
 58. Sakkas D, Bianchi PG, Manicardi GC. Chromatin packaging anomalies and DNA damage in human sperm: their possible implications in the treatment of male factor infertility. In: Barratt C, De Jonge C, Mortimer D, Parinaud J (eds). *Genetics of human male infertility*. Editions EDK, Paris, UK, 1997:205-221.
 59. Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod* 1999;14:4-5.
 60. Sakkas D, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG. Possible consequences of performing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with sperm possessing nuclear DNA damage. *Hum Fertil* 2000;3:26-30.
 61. Schnorr J, Brown S, Oeninger S, Mayer J, Muasher S, Lanzendorf S. Impact of intracytoplasmic sperm injection on embryo cryopreservation and clinical outcome. *Fertil Steril* 2001;75:636-637.
 62. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000;28:529-536.
 63. Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet* 2000;90:219-226.
 64. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence. *Hum Reprod* 1998;13:1632-1637.
 65. Soewarto D, Schmiady H, Eichenlaub-Ritter U. Consequences of non-extrusion of the first polar body and control of the sequential segregation of homologues and chromatides in mammalian oocytes. *Hum Reprod* 1995;10:2350-2360.
 66. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73:43-50.
 67. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2:366.
 68. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602-607.
 69. Van Blerkom J. Sperm centrosome dysfunction: a possible new class of male factor infertility in the human. *Mol Hum Reprod* 1996;2:349-354.
 70. Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R. Two essential steps for a successful intracytoplasmic injection: Injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolemma. *Hum Reprod* 1996;11:540-547.
 71. Van de Velde H, Nagy ZP, Joris H, De Vos, A, Van Steirteghem AC. Effects of different hyaluronidase concentrations and mechanical procedures for cumulus cell removal on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:2246-2250.
 72. Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-1066.
 73. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod* 2001;16:1464-1468.
 74. Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wikland M, Källén B. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod* 2000;15:944-948.
 75. Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 769-777.
 76. Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002;17:1327-33.