

Aus der Klinik für Gynäkologie
Geschäftsführender Direktor: Universitäts Professor Dr. med. Uwe Wagner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Explorative biochemische Analyse aktueller Biomarker in humaner Follikelflüssigkeit und deren Einfluss auf das Vorhandensein einer Eizelle, den folliculären Durchmesser, das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft etc. in der assistierten Reproduktion, basierend auf dem Anti-Müller-Hormon

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lisa Witzke aus Tübingen
Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
04.05.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. (apl.) Dr. V. Ziller

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. D. Wicklein

Teile dieser Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

Witzke, L., Leser, S., Nesbigall, M., Pfefferle, P. I., Wagner, U., & Ziller, V. (2021). The role of follicular anti-Müllerian hormone in women undergoing IVF/ICSI with regard to size, oocyte presence, sociodemographic parameters, treatment variables, and other hormones and vitamins. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. doi:10.1080/09513590.2021.1967313

1 Widmung

Für meine Familie

2 Inhaltsverzeichnis

1	WIDMUNG	III
2	INHALTSVERZEICHNIS	IV
3	ABKÜRZUNGS-, TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNISSE	VI
3.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
3.2	TABELLENVERZEICHNIS	VIII
3.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
4	EINLEITUNG	10
4.1	AKTUELLER BEZUG DES THEMAS	10
4.2	DER WEIBLICHE ZYKLUS.....	12
4.3	DIE KÜNSTLICHE BEFRUCHTUNG.....	15
4.3.1	<i>Stimulationsprotokolle</i>	15
4.3.2	<i>In-vitro-Fertilisation (IVF)</i>	17
4.3.3	<i>Intrazytoplasmatische-Spermieninjektion (ICSI)</i>	20
4.3.4	<i>In-vitro-Maturation (IVM), Kryokonservierung und Natural Cycle</i>	21
4.4	DER FOLLIKEL	22
4.5	DAS ANTI-MÜLLER-HORMON.....	24
4.5.1	<i>Grundlagen über das AMH</i>	24
4.5.2	<i>AMH und die Bestimmung der ovariellen Reserve</i>	26
4.5.3	<i>Forschungsstand zum AMH in der Follikelflüssigkeit</i>	27
4.6	ZIELE DER ARBEIT.....	31
5	MATERIAL UND METHODEN	32
5.1	ALLGEMEINE INFORMATIONEN UND BIOBANKING	32
5.2	PATIENTINNENKOLLEKTIV	32
5.3	OVARIELLE STIMULATIONSPROTOKOLLE.....	33
5.4	ABLAUF DER PROBENSAMMLUNG, EIZELLENTNAHME UND GEWINNUNG DER FOLLIKELFLÜSSIGKEIT UND SERUMPROBEN.....	34
5.5	QUANTITATIVE ANALYSE DES AMH.....	35
5.5.1	<i>Elektrochemilumineszenz-Immunoassay</i>	35
5.6	STATISTISCHE ANALYSE.....	36
6	ERGEBNISSE	38
6.1	DESKRIPTIVE DATENANALYSE.....	38
6.1.1	<i>Charakteristika der Patientinnen und Behandlungsprotokolle</i>	38
6.1.2	<i>AMH in der Follikelflüssigkeit und im Serum</i>	39
6.1.3	<i>Behandlungs- und Kulturvariablen</i>	39

6.2	STATISTISCHE DATENANALYSE	40
6.2.1	<i>AMH in Bezug auf Durchmesser und Eizellen</i>	40
6.2.2	<i>AMH in Bezug auf soziodemografische Faktoren</i>	41
6.2.3	<i>AMH in Bezug auf andere Hormone</i>	41
6.2.4	<i>AMH in Bezug auf Behandlungsvariablen, Kulturvariablen, IVF, und andere Parameter.....</i>	42
6.2.5	<i>AMH in Bezug auf andere Hormone in FF und Serum</i>	43
7	DISKUSSION	45
8	ZUSAMMENFASSUNG	56
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	LIX
10	ANHANG.....	LXIX

3 Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnisse

3.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Microgramm
AMH	Anti-Müller-Hormon
ART	Assistierte Reproduktionstechnologie
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
COC	Cumulus-Eizell-Komplex
D-I-R	Deutsches IVF-Register
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
etc.	etcetera
fAMH	Follikelflüssigkeit Anti-Müller-Hormon
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Erdbeschleunigung
GH	Growth Hormone
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
h	Stunde
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HMG	Humanes Menopausengonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische-Spermieninjektion
i.m.	intramuskulär
IU	International unit
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter

LH	Luteinisierendes Hormon
m ²	Quadratmeter
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PCO	Polyzystisches Ovarialsyndrom
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
sAMH	Serum Anti-Müller-Hormon
TGF- α	Transforming Growth factor α
TGF- β	Transforming Growth factor β
TPA	Tripopylamin
TSH	Thyreoidea-stimulierendes-Hormon
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
s.c.	Subcutan
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

3.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE REAGENZIEN FÜR DEN ECLIA, QUELLE: MODIFIZIERT NACH ELECSYS AMH PLUS.....	35
TABELLE 2: URSACHEN FÜR DIE FERTILITÄTSBEHANDLUNG DER PATIENTINNEN BZW. DEREN PARTNER	38
TABELLE 3: MITTELWERT, STANDARDABWEICHUNG (SD), MEDIAN, INTERQUARTILSABSTAND (IQR), MINIMUM (MIN.) UND MAXIMUM (MAX.) VON FAMH UND S AMH IN NG/ML (WITZKE ET AL. 2021).	39
TABELLE 4: MITTELWERT, STANDARDABWEICHUNG (SD), MEDIAN, INTERQUARTILSABSTAND (IQR), MINIMUM (MIN.) UND MAXIMUM (MAX.) VON MEDITEX KULTURVARIABLEN.	40
TABELLE 5: VERGLEICH DER MITTELWERTKONZENTRATION VON FAMH ZWISCHEN FOLLIKELN MIT KLEINEM UND GROSSEM DURCHMESSER, SOWIE OHNE UND MIT EIZELLE (WITZKE ET AL. 2021) ...	40
TABELLE 6: MITTELWERTKONZENTRATION VON AMH, VITAMIN D, LH, ETC. IN FOLLIKELFLÜSSIGKEIT MIT EINEM CI VON 95% UND DEM KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN (R) ZWISCHEN AMH IN NG/ML UND VITAMIN D IN NG/ML, FSH IN MIU/ML, LH IN MIU/ML, TSH IN μ LU/ML, TESTOSTERON IN NG/ML, ESTRADIOL IN PG/ML, PROGESTERON IN NG/ML (WITZKE ET AL. 2021)	42
TABELLE 7: MITTELWERTKONZENTRATIONEN VON AMH IN NG/ML, VITAMIN D IN NG/ML, AKTIVES VITAMIN D IN NG/ML, FSH IN MIU/ML, LH IN MIU/ML, TSH IN μ LU/ML, HCG IN MIU/ML, TESTOSTERON IN NG/ML, ESTRADIOL IN PG/ML, PROGESTERON IN NG/ML UND VEGF IN NG/ML IN FOLLIKELFLÜSSIGKEIT UND SERUM MIT EINEM CI VON 95% UND DEM KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN (R) ZWISCHEN SERUM UND FOLLIKELKONZENTRATION.....	44

3.3 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ANZAHL DER FOLLIKELPUNKTIONEN 1982-2018, D·I·R 2019.....	10
ABBILDUNG 2: SCHWANGERSCHAFTSRATEN UND SCHWANGERSCHAFTSVERLÄUFE IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER DER FRAU 2019, D·I·R 2021	11
ABBILDUNG 3: MENSTRUATIONSZYKLUS DER FRAU, QUELLE: KURTZ ET AL. 2018	13
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHER ABLAUF DES IVF-STIMULATIONSPROTOKOLLS MIT GNRH- ANTAGONISTEN, QUELLE: MODIFIZIERT NACH WOLFF/ STUTE 2013	16
ABBILDUNG 5: MENSCHLICHE OOZYTE IM VORKERNSTADIUM, ETWA 18 STUNDEN NACH IVF, QUELLE: BEYER ET AL.2011.....	18
ABBILDUNG 6: EXPANDIERTE BLASTOZYTE (TAG 5 NACH ICSI MIT DEUTLICH SICHTBARER INNERER ZELLMASSE). QUELLE: AL-HASANI/ DIEDRICH 2019.....	19
ABBILDUNG 7: INTRAZYTOPLASMATISCHE SPERMIENINJEKTION MIT DEUTLICH SICHTBAREM EINSTICHTRICHTER. DAS IMMOBILISIERTE SPERMIMUM BEFINDET SICH NOCH IN DER ICSI-PIPETTE. QUELLE: EBNER/ DIEDRICH 2018.	20
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES ANTRALEN FOLLIKELS, MODIFIZIERT NACH HENNET/ COMBELLES 2012	22
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ENTWICKLUNG VON WOLFF- UND MÜLLERGÄNGEN, MODIFIZIERT NACH KIRSCH ET AL. 2017	25
ABBILDUNG 11: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN FAMH IN NG/ML MIT DEN SOZIOÖKONOMISCHEN PARAMETERN ALTER UND BMI, QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG	41
ABBILDUNG 12: SCATTERPLOTMATRIX MIT DEN KONZENTRATIONEN VON AMH UND ANDEREN HORMONEN IM SERUM UND FOLLIKELFLÜSSIGKEIT.	44

4 Einleitung

4.1 Aktueller Bezug des Themas

Ein unerfüllter Kinderwunsch wird oft zu einer sehr belastenden Situation für ein Paar (Holthausen-Markou/ Schippert 2016). Immer mehr Paare fanden sich in Deutschland in den letzten Jahren ungewollt in dieser Lage wieder. So wird angenommen, dass in Deutschland in rund 12-15 % der Ehen, eine ungewollte Kinderlosigkeit vorliegt (Valet/ Ziller 2021). Dementsprechend gewannen die Assistierte Reproduktionstechnologien (ART) in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung. Die Zahlen des Deutschen IVF-Register beweisen dies eindrücklich. So wurden in den Jahren 2019 und 2020 in Deutschland 340.053 Kinder nach einem In-vitro-Fertilisationszyklus geboren (D-I-R 2021). Für das Jahr 2017 kann beispielsweise davon ausgegangen werden, dass durchschnittlich in jeder deutschen Schulklasse ein Kind saß, dessen Eltern eine künstliche Befruchtung in Anspruch genommen haben (D-I-R 2019).

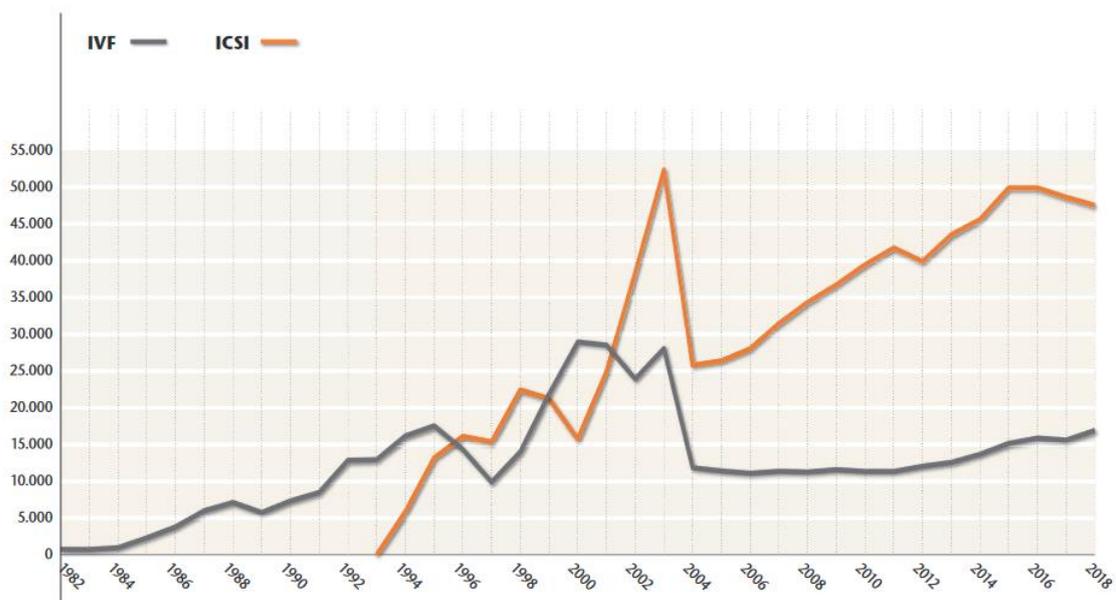


Abbildung 1: Anzahl der Follikelpunktionen 1982-2018, D-I-R 2019

Abbildung 1 zeigt, dass die Zahl der Follikelpunktionen, sei es für In-vitro-Fertilisation (IVF) oder Intrazytoplasmatische-Spermieninjektion (ICSI), in den letzten Jahrzehnten in Deutschland stark gestiegen ist. Auffallend ist jedoch ein sprunghafter Rückgang der Punktionen zwischen den Jahren 2003 und 2004 um rund 47 % von 80.434 auf 37.633 Punktionen (D-I-R 2005). Dieser Abfall fällt zeitlich mit dem Gesundheitsmodernisie-

rungs-Gesetz zusammen. Durch Inkrafttreten des Gesetzes mussten Paare unter anderem die Hälfte der IVF-Behandlungskosten selbst übernehmen, was als möglichen Grund für den Rückgang betrachtet wird (Ärzte Zeitung 2006).

Die Frage nach den Gründen für eine ungewollte Kinderlosigkeit stellt sich vielfältig dar. So verschob sich das Alter der Frauen, indem sie Kinder zur Welt bringen, in den letzten Jahrzehnten immer weiter nach hinten. Dies ist unter anderem durch längere Ausbildungszeiten, aber auch vermehrte Berufstätigkeit der Frauen zu erklären (Weyerstahl/ Stauber 2013). Während das Durchschnittsalter der Mutter bei der Geburt ihres ersten Kindes im Jahr 2010 noch bei 29,0 Jahren lag, stieg es im Jahr 2020 auf 30,2 Jahre an (Statistisches Bundesamt 2022). Außerdem ist auch das mittlere Alter der Frauen, die eine künstliche Befruchtung durchführen lassen, in den letzten Jahren stetig gestiegen und liegt aktuell bei 35,6 Jahren. Zudem nimmt der Anteil an Patientinnen mit über 40 Jahren immer weiter zu (D-I-R 2021).

Problematischerweise stellt das Alter sowohl für das Eintreten einer natürlichen Gravidität als auch für die künstliche Befruchtung einen sehr ungünstigen Faktor dar. In der nachfolgenden Abbildung wird deutlich, dass mit steigendem Alter die Wahrscheinlichkeit einer klinischen Schwangerschaft und einer Geburt bezogen auf die Anzahl der Transfers abfällt, unterdessen die Wahrscheinlichkeit für einen Abort in Bezug auf die klinische Schwangerschaft ansteigt (D-I-R 2021).

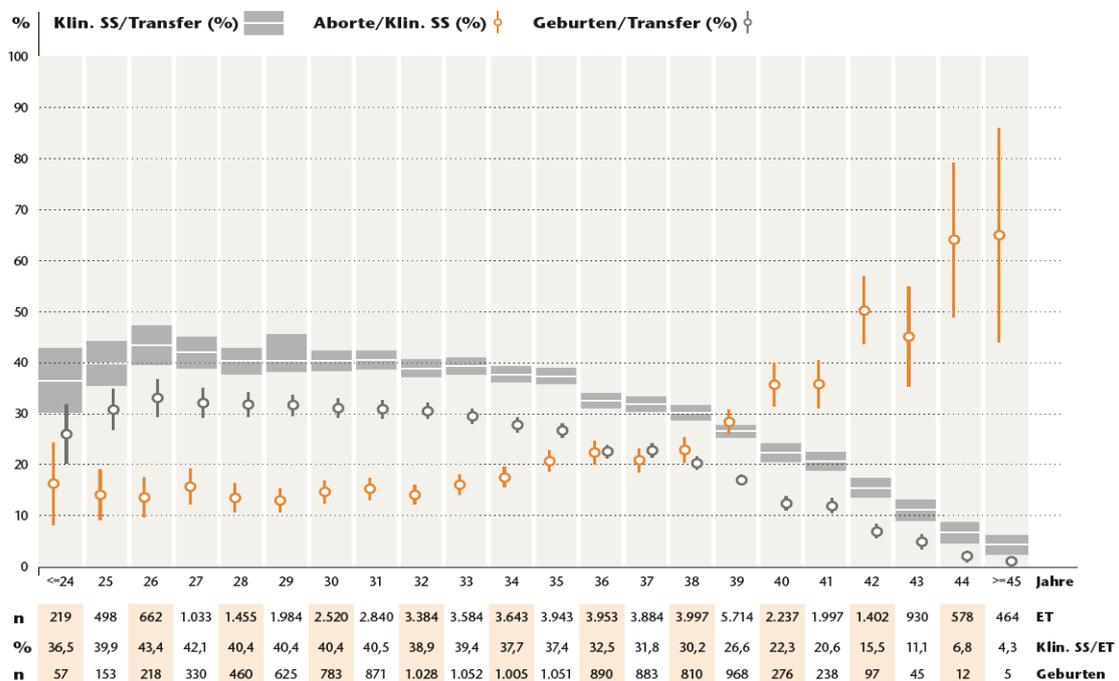


Abbildung 2: Schwangerschaftsraten und Schwangerschaftsverläufe in Abhängigkeit vom Alter der Frau 2019, D-I-R 2021

Für das weitere Verständnis ist auch die Unterscheidung zwischen Schwangerschaftsrate und Geburtenrate wichtig. Während die reine Schwangerschaftsrate pro Embryo-

nenstransfer nach Frischzyklen (im Anschluss an die Follikelpunktion ohne Kryokonservierung) bei 31,9 % liegt, ist die Geburtenrate nach Frischtransfers mit 23,3 % niedriger. In den letzten Jahren war zudem ein immer stärker werdender Trend zum „single embryo transfer“ zu beobachten. Da der Anteil an Frühgeburten unter Mehrlingsschwangerschaften erhöht ist, soll durch den Transfer von nur einem Embryo die Risiken und Belastungen, die eine Frühgeburt für Mutter und Kind mit sich bringen verringert, werden. Allerdings muss auch festgehalten werden, dass die Schwangerschaftsrate bei Transfer am Tag 5/6 dadurch von 48% (nach 2 Embryonen) auf 39% sinkt. Durch den „single embryo transfer“ gelang es allerdings, die Rate an Mehrlingsgeburten nach Frischzyklus von 19,6 % (2018) auf 18,3 % (2019) zu senken (D·I·R 2021).

Die jüngste und bedeutsame statistische Entwicklung stellt die seit 2018 mögliche kumulative Darstellung der Behandlungsergebnisse dar. Demnach liegt die Wahrscheinlichkeit, schwanger zu werden nach insgesamt 4 Zyklen mit Transfer, für eine Frau bei 70 % (D·I·R 2021).

All diese aktuellen Zahlen und Fakten über das Thema künstliche Befruchtung zeigen die Wichtigkeit des Themas in unserer Gesellschaft. Dementsprechend ist es wesentlich, auch in Zukunft weiter wissenschaftliche Forschung in diesem Gebiet zu betreiben, um möglichst vielen, ungewollt kinderlosen Paaren auch in Zukunft helfen zu können.

4.2 Der weibliche Zyklus

Der weibliche Zyklus zählt zu einem der komplexesten Vorgänge im menschlichen Körper. Er unterliegt einem streng geregelten hormonellen Kreislauf, der die Voraussetzung für die Bildung einer befruchtungsfähigen Eizelle, der Vorbereitung des Uterus für die Implantation der befruchteten Eizelle und damit dem Entstehen der Schwangerschaft bildet (Kurtz et al. 2018). Sein Verständnis ist essenziell, um auch die Vorgänge der künstlichen Befruchtung nachvollziehen zu können.

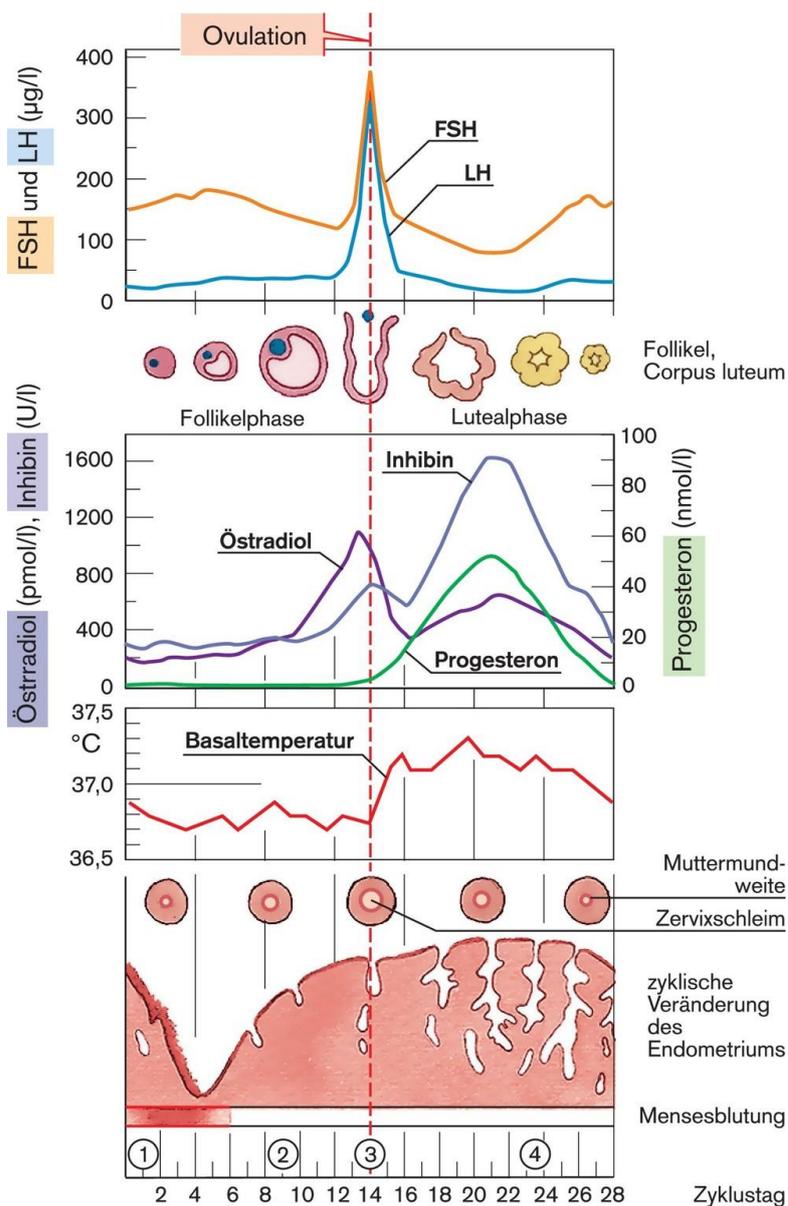


Abbildung 3: Menstruationszyklus der Frau, Quelle: Kurtz et al. 2018

Die obige Abbildung 3 stellt die Zusammenhänge zwischen den für den Menstruationszyklus relevanten Hormonen, dem Zeitpunkt der Blutung, der Temperatur und der Zervix- und Endometriumentwicklung dar.

Wichtig ist hierbei zu beachten, dass der Menstruationszyklus in zwei Phasen unterteilt werden kann. Zuerst erfolgt die Follikelphase, die durch die Reifung der Follikel geprägt ist. Dann die Lutealphase, die entweder in eine Schwangerschaft oder andernfalls in die Abbruchblutung mündet.

Als Beginn des Menstruationszyklus, an dem auch die Follikelphase beginnt, wird der erste Tag der Regelblutung definiert. Während dieses Vorganges, der circa ein bis vier Tage dauert, kommt es zur Abstoßung der Funktionalis des Endometriums. Auf hormoneller Ebene ist dabei vor allem die pulsatile Freisetzung von Gonadotropin releasing

hormone (GnRH) aus dem Hypothalamus wichtig. Dieses wiederum bedingt die Freisetzung der Gonadotropine (Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH)) aus der Hypophyse. Vor allem das Hormon FSH fördert die Follikelreifung. Zu Beginn der frühen Follikelphase findet so die Selektion eines dominanten Follikels (dem sogenannten Graaf-Follikel) und die Rückbildung der anderen Follikel statt. Die heranreifenden Follikel produzieren im Verlauf sowohl das Hormon Östradiol als auch Inhibin. Hiermit wird wiederum durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die FSH-Ausschüttung gehemmt. Der Graaf-Follikel produziert währenddessen immer mehr Östradiol, welches für den Aufbau der Funktionalis des Endometriums verantwortlich ist. Deshalb wird dieser Abschnitt in Bezug auf das Endometrium auch Proliferationsphase genannt (Weyerstahl/ Stauber 2013).

Etwa 24 Stunden vor der Ovulation führen die sehr hohen Östradiolspiegel zu einem kurzzeitigen Umschlagen der negativen in eine positive Rückkopplung. Das bedeutet, dass es kurzfristig zu einer hohen Ausschüttung an LH kommt, was verantwortlich für das Auslösen des Eisprungs ist. Dieser Vorgang findet ungefähr am 14. Zyklustag statt und markiert den Beginn der zweiten Phase des Zyklus, der Lutealphase (Kurtz et al. 2018). Circa 48 Stunden nach der Ovulation steigt durch das Progesteron auch die Basaltemperatur der Frau um circa 0,2-0,5 °C an. Dieser Anstieg wird auch für die natürliche Kontrazeption verwendet (Lasch/ Fillenberg 2017).

Durch den Östrogeneinfluss weitet sich der Zervikalkanal und bildet mehr Schleim der seine Konfiguration ändert um für Spermien passierbar zu werden. Das Endometrium geht in die Sekretionsphase über, bei der die Durchblutung zunimmt und die Drüsen weiter einen glycogenhaltigen Schleim sezernieren (Kurtz et al. 2018).

Postovulatorisch kommt es durch nochmals steigende Östrogen- und Inhibin-Werte zum Abfall von LH und FSH (negative Rückkopplung). Der Follikel wandelt sich derweil in den sogenannten Gelbkörper um, der für die Produktion von Progesteron verantwortlich ist. Seinen Namen, der namensgebend für die Lutealphase ist, trägt er aufgrund von großen Lutealzellen mit hohem Lipoidgehalt, was ihn makroskopisch gelb erscheinen lässt (Kurtz et al. 2018).

Alles ist nun bereit für die erfolgreiche Einnistung (Implantation), der befruchteten Eizelle und dem Beginn der Schwangerschaft. Ist dies nicht der Fall, bildet sich der Gelbkörper langsam zum Corpus albicans zurück und es kommt zu einem Progesteronentzug. Dadurch verändert sich die Schleimhaut des Endometriums (z. B. Verschluss der Spiralarterien und Ischämie), was wiederum die Abbruchblutung einleitet. Die Follikelphase beginnt und der circa 28-tägige Zyklus kann erneut begonnen werden (Weyerstahl/ Stauber 2013).

4.3 Die künstliche Befruchtung

Bevor bei einem Paar mit Kinderwunsch invasive Maßnahmen ergriffen werden, gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, die - je nach Diagnose - eventuell zuerst ausgeschöpft werden können.

Am Anfang jeder Diagnostik steht immer eine ausführliche Anamnese. Hier müssen beispielsweise Fragen nach der Dauer des unerfüllten Kinderwunsches, zur Sozial-, Sexual- und Familienanamnese gestellt werden, um die Spontankonzeptionschancen des Paares einschätzen zu können. Daraufhin folgt die weitere Diagnostik sowohl bei der Frau (beispielsweise körperliche Untersuchung, Vaginalzytologie, Sonografie und eventuell inklusive Bestimmung des basalen Hormonstatus im Rahmen eines Zyklusmonitorings) als auch beim Mann (körperliche Untersuchung, endokrinologische Hormonbestimmung, Spermogramm etc.) (Kaufmann et al. 2013).

Einige Ursachen für einen unerfüllten Kinderwunsch können oft wenig invasiv therapiert werden. So kann beispielsweise eine ausbleibende Ovulation medikamentös mit ovarialer Stimulation und Ovulationsinduktion behandelt werden (Kaufmann et al. 2013). Wenn z. B. eine geringgradige andrologische Subfertilität vorliegt, kann eine Intrauterine Insemination (IUI) eine mögliche Therapie darstellen. Hierbei wird das meist präparierte (seminalplasmafreie) Ejakulat direkt in die Gebärmutter eingebracht. Doch die Erfolgsrate der IUI liegt im Durchschnitt bei nur 10 %. (Nawroth/ Römer 2015).

4.3.1 **Stimulationsprotokolle**

Fällt nach abgeschlossener Diagnostik die Wahl auf eine invasive Fertilitätsbehandlung wie IVF oder ICSI, steht zu Beginn meist die ovarielle Stimulation.

Während im normalen weiblichen Zyklus unter endogenem Hormoneinfluss ein dominanter Follikel heranreift, sollen bei der Stimulation für die künstliche Befruchtung mehrere Follikel heranreifen, um mehrere befruchtungsfähige Eizellen zu gewinnen (Griesinger et al. 2019).

Dafür existieren unterschiedliche Protokolle, die verschiedene Vorgehensweisen bedeuten. Allerdings zeigte sich in verschiedenen Studien, dass sich diese in Bezug auf die Schwangerschaftsrate nur wenig unterscheiden (Griesinger et al. 2019).

Grundsätzlich soll bei der ovariellen Stimulation die vorzeitige Ovulation verhindert werden, indem die LH-Freisetzung inhibiert wird. Klassischerweise wird dies mittels GnRH-Antagonisten erreicht. Diese blockieren die Hypophyse und machen diese damit unempfindlich gegenüber dem endogenen GnRH. Man kann hierfür sowohl Agonisten als auch Antagonisten verwenden (Weyerstahl/ Stauber 2013). Die Agonisten bringen jedoch einen kurzfristigen sogenannten „flair up“ mit sich, das heißt, dass sie zuerst die Hormon-

produktion der Hypophyse stimulieren und nach fünf bis sieben Tagen zu einer Hypogonadotropie führt. Die GnRH-Antagonisten hingegen haben den Vorteil, dass sie schneller wirken und schon nach circa sechs Stunden zu einer Blockade der Hypophyse führen. Die verschiedenen Protokolle unterscheiden sich daher z. B. in ihrer Dauer, Flexibilität und ihrem Nebenwirkungsprofil (Wolff/ Stute 2013).

Durch diese Blockade kann gewährleistet werden, dass während des Zyklus nicht nur einer, sondern mehrere Follikel synchron heranreifen können (Weyerstahl/ Stauber 2013). Dies geschieht allerdings nur unter der zusätzlichen Gonadotropinstimulation. Dafür können FSH mit oder ohne LH und Humanes Menopausengonadotropin (HMG) verwendet werden. In ihrer Effektivität unterscheiden sich die einzelnen Präparate nur gering. Nichtsdestotrotz muss auf manche Einzelheiten, wie z. B. die lokale Verfügbarkeit, Preis oder das Ansprechen auf die Stimulation in vorherigen Zyklen geachtet werden (Wolff/ Stute 2013).

Während der hormonellen Stimulation ist es außerdem wichtig, gleichzeitig das Zyklusmonitoring durchzuführen. Das bedeutet, dass der Zyklus in regelmäßigen Abständen sowohl transvaginalsonografisch als auch laborchemisch (u.a. Serumöstradiol) überwacht wird. Dadurch kann einerseits der richtige Zeitpunkt für das Auslösen des Eisprungs ermittelt werden (über die Größe der Follikel) und andererseits das endokrine Ansprechen auf die Therapie kontrolliert werden (Griesinger 2019).

Beendet wird der Stimulationsvorgang durch das Auslösen des Eisprungs, sobald der Leitfollikel eine ungefähre Größe von 20 mm erreicht. Hierfür wird meist urinäres und rekombinantes hCG (Humanes Choriongonadotropin) s.c. verwendet. Es sollte 35-36 Stunden vor der geplanten Follikelpunktion verabreicht werden (Wolff/ Stute 2013). Es kann davon ausgegangen werden, dass bei Einhaltung dieses üblichen Zeitfensters die Anzahl an gewonnenen Eizellen besonders gut ausfällt. (Griesinger 2019).

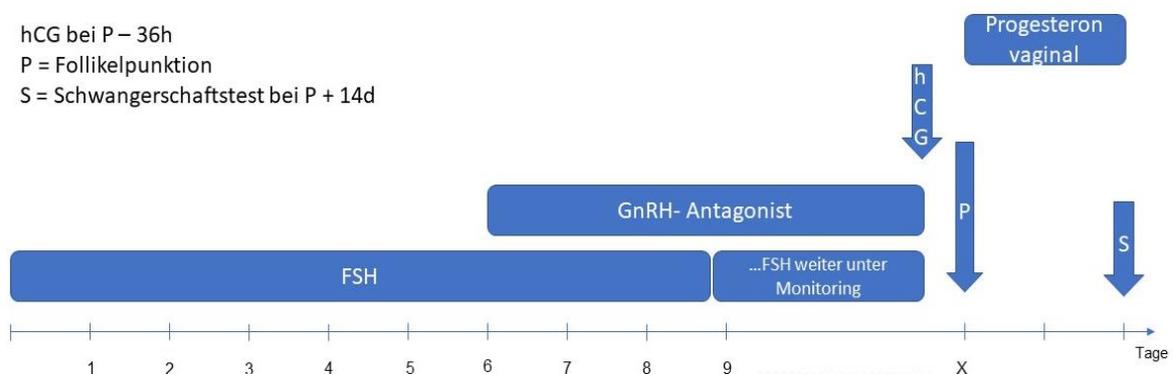


Abbildung 4: Schematischer Ablauf des IVF-Stimulationsprotokolls mit GnRH-Antagonisten, Quelle: Modifiziert nach Wolff/ Stute 2013

In Abbildung 4 ist eine schematische Darstellung des IVF-Stimulationsprotokolls dargestellt. Beispielhaft wurde ein Protokoll mit GnRH-Antagonisten abgebildet. Der Beginn der Gonadotropingabe erfolgt ungefähr am zweiten bis dritten Zyklustag. Während des gesamten Stimulationvorganges werden regelmäßig sowohl vaginalsonografische als auch laborchemische Kontrollen (Monitoring) durchgeführt. Die vaginale Progesterongabe wird als Lutealphasenunterstützung bezeichnet und sollte supportiv nach der Follikelpunktion verabreicht werden. Hierdurch soll das Eintreten einer Corpus-Luteum-Insuffizienz vermieden werden. Diese würde durch die LH-Suppression bedingt und hätte negative Folgen auf die Implantationsrate (Wolff/ Stute 2013).

4.3.2 In-vitro-Fertilisation (IVF)

Klassische Indikationen für eine IVF-Behandlung stellen unter anderem eine tubare Sterilität (beispielsweise nach einer Chlamydieninfektion) oder Endometriose dar (Nawroth/ Römer 2015).

Nachdem ein Stimulationsprotokoll wie oben beschrieben erfolgreich durchgeführt wurde, sollte 35-36 Stunden nach der Ovulationsinduktion die transvaginale Punktion der Follikel stattfinden. Diese erfolgt unter Ultraschallkontrolle und unterschiedlichen Narkoseverfahren, meist mit einer 18-Gauge-Nadel (Wolff/ Stute 2013). Wichtig ist hierbei, die Temperatur der Follikelflüssigkeit und damit der Eizellen möglichst nicht absinken zu lassen, da diese sehr temperaturempfindlich reagieren. Als nächstes wird der Cumulus-Eizell-Komplex (COC) beurteilt (Ebner/ Diedrich 2018). Dabei kommt es darauf an, eine reife (sich in der Metaphase II befindende) von einer unreifen Eizelle zu unterscheiden. Dies geschieht einerseits anhand von Beurteilung des Expansionsgrades der Corona Radiata und andererseits der äußeren Cumuluszellmatrix (Veeck/ Rosenwaks 1999).

Das Ejakulat des Partners sollte im besten Falle zeitgleich abgegeben werden und wird dann aufbereitet und untersucht. Dabei werden die Spermien vom Seminalplasma getrennt und die motilen Spermatozoen konzentriert (Nawroth/ Römer 2015).

Im Falle einer IVF sollen möglichst die natürlichen Prozesse der Befruchtung in vitro nachempfunden werden. Das bedeutet, dass circa zwei bis drei Stunden nach der Punktion die ausgewählten COCs in der Kulturschale mit einer bestimmten Menge an Spermien zusammengebracht und inkubiert werden. Zur Anzahl der Spermien existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben. Als Endkonzentration wird aber ungefähr eine Konzentration von circa 50.000-150.000 Spermien pro Eizelle angestrebt (Ebner/ Diedrich 2018).

Am Tag nach der Punktion, circa 16-18 Stunden nach der Insemination, wird die Vorkernkontrolle vorgenommen, welche zeigt, ob der Befruchtungsprozess begonnen hat (Kaufmann et al. 2013).



Abbildung 5: Menschliche Oozyte im Vorkernstadium, etwa 18 Stunden nach IVF, Quelle: Beyer et al.2011

Im Vorkernstadium (Abbildung 5) kann nach dem Punktescore nach Scott und Smith (1998) eine Beurteilung erfolgen, die schon in diesem frühen Stadium darauf hinweisen kann, welche Eizelle sich zu einem qualitativ guten Embryo mit hoher Chance einer erfolgreichen Implantation entwickeln kann. Wegweisend sind hierfür beispielsweise Merkmale wie ein homogenes Zytoplasma und aneinandergelagerte Vorkerne (Kaufmann et al. 2013).

Für den Zeitpunkt des Embryonentransfers existieren verschiedene Herangehensweisen. Früher wurde der Transfer 48 Stunden nach In-vitro-Kultivierung durchgeführt (Keck et al. 1997). In jüngerer Vergangenheit wurde allerdings die Blastozystenselektion entwickelt und erlangte immer mehr an Bedeutung. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Embryonen fünf Tage kultiviert werden, bis sie sich zum Blastozystenstadium entwickelt haben. Erst dann findet der Embryonentransfer statt. Während der Kultivierung gelangen im Durchschnitt nur drei bis vier von zehn imprägnierten Eizellen in das Blastozystenstadium (s. Abbildung 6).



Abbildung 6: Expandierte Blastozyste (Tag 5 nach ICSI mit deutlich sichtbarer innerer Zellmasse). Quelle: Al-Hasani/Diedrich 2019

Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Bewertung des Zytoplasmas und das Vorhandensein von Vorkernen, welches im Vorkernstadium (2 PN) stattfindet (Al-Hasani/ Diedrich 2019). Dieses Stadium schließt sich an das Meiose I- und Meiose II- Stadium an (Sonntag 2018). Laut des deutschen Embryonenschutzgesetzes ist eine maximale Übertragung von drei Embryonen während einer ART-Behandlung erlaubt (Ziller 2017). Alle Embryonen im Vorkernstadium, die nicht verwendet werden können, werden somit entweder kryokonserviert oder verworfen (Al-Hasani/ Diedrich 2019). Sobald es dann zum Embryonentransfer kommt, werden die zu transferierenden Embryonen mit einem Katheter transvaginal und transzervikal über den inneren Muttermund hinweg in die Gebärmutter eingebracht. Dabei sollte darauf geachtet werden, mit der Spitze des Katheters nicht zu weit in Richtung der Tuben vorzudringen, um eine Extrauterin gravidität zu verhindern (Keck et al. 1997).

Als weiteren wichtigen unterstützenden Punkt in der IVF-Behandlung ist der Lutealphasensupport zu nennen. Bei einer normalen Schwangerschaft bildet sich nach dem Eisprung aus dem verbleibenden Follikel der sogenannte Gelbkörper (Corpus luteum) aus. Dieser ist für die frühe Produktion von Progesteron zuständig, welches wiederum im Endometrium für sekretorische Umbauprozesse sorgt. So werden die bestmöglichen Voraussetzungen für die Einnistung und Entwicklung des Embryos gewährleistet (Lasch/ Fillenberg 2017). Wenn allerdings die ovarielle Stimulation, wie im Falle der IVF-Behandlung, durch externe Hormongabe erfolgt, besteht eine relative Gelbkörperinsuffizienz. Dies bedeutet, dass die Unterstützung, die der Gelbkörper eigentlich leisten sollte, nach IVF/ICSI nicht gewährleistet werden kann. Folglich ist eine Unterstützung der Lutealphase von außen notwendig (Keck 2014). Von der wiederholten hCG-Gabe wird heutzutage Abstand genommen, da diese das Risiko für eine Überstimulation begünstigt. Üblicherweise wird zur Unterstützung eine intravaginale Progesterongabe (z.B. als

Gel) bis zum Vorliegen eines positiven Schwangerschaftstests empfohlen (Sonntag 2018).

4.3.3 Intrazytoplasmatische-Spermieninjektion (ICSI)

Neben der klassischen IVF-Therapie existiert noch eine weitere Behandlungsmöglichkeit, die mittlerweile einen Großteil der ART-Behandlungen ausmacht. Hierbei handelt es sich um die Intrazytoplasmatische-Spermieninjektion (ICSI). Im Jahr 2020 folgten auf 44.336 der insgesamt 111.752 plausiblen Zyklen eine ICSI-Behandlung (18.724 IVF-Behandlungen, 32.945 Kryokonservierungen) (D·I·R 2021).

Eine ICSI-Behandlung ist beispielsweise dann indiziert, wenn eine schwerer andrologischer Subfertilität vorliegt oder auch bei fehlendem Erfolg der konventionellen IVF-Behandlung (Gätje et al. 2011).

Ein Sonderfall stellt die Azoospermie dar, bei der keine Spermien im Ejakulat zu finden sind. Dann ist es möglich, Spermien entweder aus dem Nebenhoden (MESA=microsurgical sperm extraction) zu aspirieren oder direkt aus dem Hoden (TSE=testicular sperm extraction) zu extrahieren (Weyerstahl/ Stauber 2013).

Der im Kapitel „4.3.2 In-vitro-Fertilisation“ beschriebene Vorgang stellt sich bis zu dem Zeitpunkt, an dem die durch die Punktion gewonnene Eizelle und das Sperma zusammengebracht werden, identisch dar. Im Unterschied zur IVF-Behandlung wird das einzelne Spermium dann dahingegen direkt mittels einer Glasnadel in die Eizelle injiziert (Ebner/ Diedrich 2018) (s. Abbildung 7).

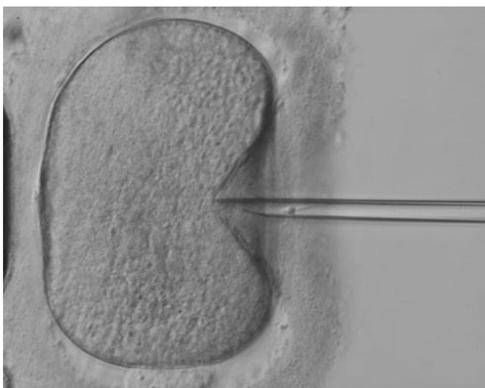


Abbildung 7: Intrazytoplasmatische Spermieninjektion mit deutlich sichtbarem Einstichtrichter. Das immobilisierte Spermium befindet sich noch in der ICSI-Pipette. Quelle: Ebner/ Diedrich 2018.

Der weitere Ablauf unterscheidet sich dann nicht mehr von einer konventionellen IVF-Behandlung. Die Entscheidung, welches Verfahren in jeweiligen Fall besser geeignet ist, kann somit erst im Labor und nach Beurteilung der Spermien getroffen werden (Ebner/ Diedrich 2018).

Im Zweifelsfall ist es auch möglich, IVF und ICSI in einem Zyklus gleichzeitig anzuwenden. Dies war beispielsweise 2020 bei 1.471 von insgesamt 111.752 plausiblen Zyklen der Fall (D·I·R 2021).

4.3.4 In-vitro-Maturation (IVM), Kryokonservierung und Natural Cycle

Im Folgenden werden drei weitere wichtige Behandlungsformen bzw. Behandlungsabläufe, die im Rahmen der ART angewandt werden können, beschrieben.

Bei der IVM wird nur eine kurze, niedrig dosierte oder gar keine ovarielle Stimulation vorgenommen. Nachdem die Eizellen im unreifen Zustand punktiert wurden, werden diese in vitro maturiert (Reifung) und dann später wieder in eine IVF- oder ICSI- Behandlung überführt (Strowitzki et al. 2018). Diese Behandlungstechnik kann bei Patientinnen angewendet werden, die durch die ovarielle Stimulation ein erhöhtes Risiko für ein Überstimulationssyndrom vorweisen. Dies können beispielsweise Patientinnen mit Z.n. einem Überstimulationssyndrom oder Polyzystisches Ovarialsyndrom (PCO)- Patientinnen sein (Strowitzki et al. 2018).

Bei der Kryokonservierung handelt es sich um eine Methode, bei der nach einer Follikelpunktion vitale Zellen und Gewebe bzw. Blastozysten bei -196°C gelagert werden können. Diese Methode kommt zum Einsatz, um überzählige Zellen im Vorkernstadium oder Blastozysten für einen erneuten Transfer bereitzustellen. In den letzten Jahren ging hierbei international der Trend hin zur „Vitrifikation“. Das bedeutet, dass die Zellen anstelle von langsamer Kryokonservierung ultraschnell eingefroren werden. Durch hohe Standards und verbesserte Techniken ist es heutzutage möglich, dadurch eine hohe Implantations- und Schwangerschaftsrate nach Kryokonservierung zu erzielen. Jedoch ist festzuhalten, dass in Deutschland auf Grund des Embryonenschutzgesetzes entstandene Zellen nur im Pronukleusstadium kryokonserviert werden dürfen (Liebermann 2018). In den letzten Jahren stieg der Anteil an Auftauzyklen im Vergleich zu Frischzyklen stetig an und lag zuletzt bei 29,5 % (D-I-R 2021).

Eine weitere reproduktionsmedizinische Methode ist zudem die Natural-Cycle-IVF oder Minimal-Stimulation-IVF Methode. Diese unterscheidet sich zur klassischen IVF/ICSI Therapie dahingehend, dass hierbei, ähnlich wie bei der IVM, eine sehr geringe Dosis oder sogar keine Gonadotropine zur Stimulation verwendet werden (Wolff/ Stute 2013). Grundsätzlich bedeutet eine Natural-Cycle-IVF, dass der natürliche Zyklus überwacht und gegebenenfalls unterstützt wird, um dann nur eine Eizelle zu gewinnen. Dadurch wird das Risiko für eine Mehrlingsschwangerschaft und auch eines Überstimulationssyndroms gesenkt (Verberg et al. 2009). Wissenschaftlich besonders interessant erscheint diese Methode, da hierdurch eine direkte Nachverfolgung des jeweiligen Follikels im Hinblick auf beispielsweise das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft möglich ist.

4.4 Der Follikel

Im nächsten Schritt soll nun der weibliche Follikel genauer beschrieben werden. Die Follikel, sind als Teil des Ovars an der Bereitstellung der Eizellen beteiligt. Daher stellen sie einen sehr wichtigen Faktor im Ablauf der Reproduktion dar.

Schon in der Embryonalentwicklung erfolgt die Anlage der Ovarien und damit der Follikel mit den darin enthaltenen Eizellen. Bis zur 20. Gestationswoche sind sechs bis sieben Millionen Keimzellen entstanden. Allerdings finden in den Ovarien ständig sowohl Atresie als auch Apoptose statt, was die Zahl der Follikel schon bis zur Geburt auf durchschnittlich ein bis zwei Millionen Primordialfollikel begrenzt. Bis zum Eintritt in die Pubertät hat sich die Anzahl dann auf circa 300.000 reduziert (Kaufmann et al. 2013). Die geschlechtsreife Phase der Frau dauert ungefähr 35 Jahre an. In diesem Zeitraum gelangen nur 300-500 Eizellen zur Ovulation. Der Rest unterliegt den ständigen Vorgängen der Atresie, wodurch die ovarielle Reserve zum Zeitpunkt der Menopause gänzlich erschöpft ist (Kurtz et al. 2018).

Der Aufbau des Follikels ist in der nachfolgenden Abbildung 8 schematisch dargestellt. Aus histologischer Sicht sind die Follikel in der Rinde des Ovars in ein zellreiches spinozelluläres Bindegewebe eingebettet. Jeder Follikel wird vom Follikel epithel bestehend aus Granulosazellen (somatische Begleitzellen) umgeben und beinhaltet eine Keimzelle (Oozyte). Die äußerste Schicht wird von den Theca Zellen gebildet, in denen unter anderem die Umwandlung von Progesteron in Androstendion stattfindet. Die Basallamina dient als Grenze zu den Granulosazellen. Ausgefüllt wird der Follikel von der Follikelflüssigkeit. Dieses umschließt auch den Cumulus-Eizell-Komplex in dessen Innern sich die Keimzelle (Oozyte) befindet (Lüllmann-Rauch/ Asan 2019).

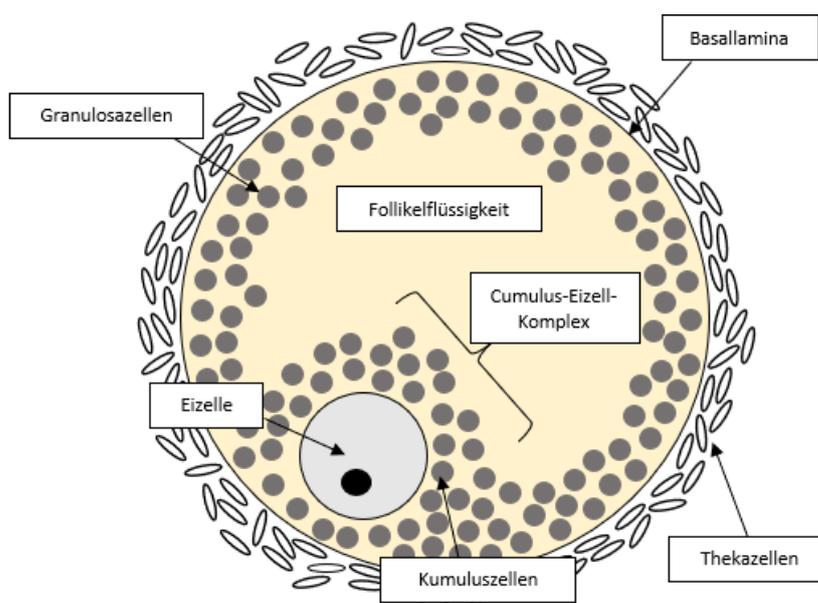


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines antralen Follikels, modifiziert nach Hennet/ Combelles 2012

Es existieren hauptsächlich drei Gruppen von Follikeln in unterschiedlichen Stadien. Die sogenannten Primordialfollikel stellen den ruhenden Vorrat der ovariellen Reserve dar. Aus ihnen werden zyklusabhängig neue Follikel rekrutiert. Hierfür sind komplexe hormonelle Vorgänge verantwortlich. Unter anderem spielt hier auch das Anti-Müller-Hormon (AMH), welches durch die Granulosazellen der Ovarien produziert wird, eine wichtige Rolle (Lüllmann-Rauch/ Asan 2019).

Die zweite Gruppe bilden die gonadotropinunabhängigen Follikel. Diese Follikel stellen den heranwachsenen Vorrat dar und befinden sich in unterschiedlichen Stadien (Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel) (Lüllmann-Rauch/ Asan 2019).

Als dritte Gruppe wird der Teil der Kohorte bezeichnet, der sich gonadotropinabhängig weiterentwickelt. Hierfür ist vor allem FSH verantwortlich. Durch Selektionsvorgänge wird am Ende aus der Gruppe der früh-antralen Follikel ein dominanter Follikel ausgewählt, der dann sprungreif wird und die Eizelle zur Verfügung stellt (Lüllmann-Rauch/ Asan 2019).

Neben der Bereitstellung der Eizellen übernehmen die Follikel die äußerst wichtige Funktion der Hormonproduktion (Androgene, Östrogene und AMH) (Cordes 2019). Besonders bedeutsam für den Follikel ist die Produktion von Östrogen (aus der Gruppe der Steroidhormone), darunter deren Hauptvertreter Estradiol. Gebildet werden sie vor allem vom dominanten Follikel des jeweiligen Zyklus. Dabei kommt es zu einem Zusammenwirken zwischen Theca interna und Granulosazellen. Während die Theca interna für die Produktion der Androgene aus Cholesterin zuständig ist, werden diese in den Granulosazellen umgesetzt. Diese Umsetzung wird vom Enzymkomplex der Aromatase ermöglicht, wessen Expression wiederum vor allem vom Vorhandensein von FSH abhängig ist. Die Wirkung der gebildeten Östrogene ist dann vielfältig und reicht unter anderem von der Proliferation der Uterusschleimhaut bis hin zur Entwicklung der weiblichen Brustdrüse (Lüllmann-Rauch/ Asan 2019).

Doch in den Follikeln werden noch eine Vielzahl anderer Stoffe produziert, die z. B. für die Reifung und Ernährung der Eizelle von großer Bedeutung sind. Zwischen den einzelnen Zellen, die den COC bilden, befinden sich sogenannte Gap junctions, die erlauben, dass Substrate wie Ionen, Glucose, Aminosäuren und Signalbotenstoffe zur Eizelle gelangen. Hierdurch wird die Entwicklung der Eizelle sowohl begünstigt als auch beeinflusst (Hennet/ Combelles 2012).

Die Follikelflüssigkeit wird grundsätzlich aus zwei verschiedenen Ursprüngen zusammengesetzt. Einerseits gelangen Kompartimente des Blutes über die Kapillaren an den Theca Zellen in das Innere des Follikels (Plasmafiltrat). Andererseits sezernieren die Zellen im Follikel auch Stoffe direkt in die Follikelflüssigkeit. Hierbei sind vor allem die

Granulosazellen wichtig, die beispielsweise auch das AMH produzieren (Rodgers/ Irving-Rodgers 2010).

Betrachtet man die Follikelflüssigkeit genauer, so stellt man fest, dass sie sehr viele verschiedene Stoffe beinhaltet. Hierzu gehören beispielsweise Aminosäuren, Fette, Elektrolyte, Steroidhormone (FSH, LH, hCG, GH, Progesteron und Estradiol), Cytokine, Enzyme, Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), Antioxidantien (wie Vitamin E), Katalase, Melatonin, Antikoagulantien sowie Wachstumsfaktoren (Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), EGF-like growth factor und Transformierender Wachstumsfaktor α (TGF- α)) (Basuino/ Silveira 2016).

Jedoch ist zum heutigen Zeitpunkt noch vieles über die Zusammensetzung und Funktion der Follikelflüssigkeit und damit über den Follikel im Allgemeinen unklar. Dementsprechend muss dies auch für die Zukunft Ansatz für weitere Forschungsarbeiten sein.

4.5 Das Anti-Müller-Hormon

4.5.1 Grundlagen über das AMH

Das Kapitel zum theoretischen Hintergrund dieser Arbeit schließt mit einer genauen Betrachtung des Anti-Müller-Hormons (AMH). Erstmals erwähnt wurde das Anti-Müller-Hormon in den 1940er Jahren von dem französischen Wissenschaftler Alfred Jost (Jost 1966). Er beobachtete, dass in frühen Entwicklungsphasen der Säugetiere, bei beiden Geschlechtern sowohl die sogenannten Wolff- als auch die Müller- Gänge existieren. Der Einfluss von Testosteron auf die Embryonalentwicklung war zur damaligen Zeit schon bekannt. Jost stellte zusätzlich fest, dass der männliche Hoden ein weiteres Hormon produziert, welches beim männlichen Fötus für die Rückbildung der Müller-Gänge verantwortlich ist. Dieses nannte er zu Beginn „hormone inhibitrice“ bzw. „Müllerian inhibitor“ (Rey et al. 2003).

Der Müller-Gang (Ductus paramesonephricus) und der Wolff-Gang (Urnierengang, Ductus mesonephricus) münden beide in den Sinus urogenitalis (Kirsch et al. 2017). Die folgende Abbildung verdeutlicht, welche Strukturen aus welchem der Gänge hervorgehen und welche Rolle das AMH darauf hat.



¹ Ductus epididymidis und Ductus deferens

² bis auf einige Rudimente (Epoophoron und Paroophoron)

³ bis auf ein kleines Rudiment (Appendix Testis)

⁴ kranialer und kaudaler Teil

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Entwicklung von Wolff- und Müllergängen, modifiziert nach Kirsch et al. 2017

Auf die Entwicklung des Wolff-Gang hat das AMH weder beim Mann noch bei der Frau eine Auswirkung. Jedoch bewirkt es beim Mann, dass sich der Müller-Gang zurückentwickelt und es nicht zur Ausbildung von Eileiter und Uterovaginalkanal kommt (Kirsch et al. 2017).

Nach Josts Entdeckung dauerte es jedoch noch einige Jahre, bis der endgültige Nachweis der Existenz und auch der weiteren Funktionen des AMHs erfolgen konnte.

Im Jahr 1986 gelang es schließlich, die Gene, die für das AMH kodieren, zu isolieren und zu sequenzieren (Cate et al. 1986). Die für die Bildung des AMHs zuständigen Gene liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 (Cohen-Haguenauer et al. 1987).

Einzuordnen ist das AMH in die große Gruppe der TGF- β Familie (Wilson et al. 1993). Charakteristisch für diese Gruppe ist die Beteiligung an der Regulation von Gewebewachstum und -differenzierung (Di Clemente et al. 2010).

Betrachtet man den molekularen Aufbau, handelt es sich beim AMH um ein durch Disulfidbrücken vernetztes homodimeres Glykoprotein, welches eine atomare Masseneinheit von 140 kDa aufweist. Eine C-terminale Domäne dient zur Verstärkung der Bioaktivität (Wilson et al. 1993).

Im weiblichen Körper stellen die Granulosa-Zellen der Follikel den Produktionsort des AMHs dar. Es ist unter anderem an der zyklischen Steuerung des Wachstums der Primordialfollikel beteiligt. Dabei hat es vor allem eine inhibitorische Rolle inne. Durch den hemmenden Einfluss von AMH auf den Übergang der Primordial- ins Reifungsstadium spielt es eine wichtige Rolle im Regulationsvorgang, welche Follikel aus dem Pool für den Zyklus rekrutiert werden (Lüllmann-Rauch/ Asan 2019).

Außerdem kommt es zum Zusammenspiel mit dem Hormon FSH. AMH wirkt hemmend auf die Follikelsensitivität, die die Follikel gegenüber FSH besitzen. Zudem kommt, dass die AMH-Expression während der Follikelrekrutierung nicht immer gleich hoch ist. Zu Beginn steigt die AMH-Expression an und erreicht ihr Maximum in den Granulosazellen der Präantral- und kleinen Antralfollikel. Sobald das Wachstum der Follikel allerdings nicht mehr von FSH abhängig ist, wird auch das AMH rückläufig, bis es in den Granulosazellen nicht mehr nachweisbar ist (Visser et al. 2006).

Doch nicht alle Granulosazellen produzieren gleich viel AMH. Bei großen Follikeln sind diejenigen, die nahe an der Oozyte zu finden sind, vermehrt für die Expression zuständig. Betrachtet man kleine Follikel und Primärfollikel, kann eine homogene AMH-Expression festgestellt werden. Wohingegen in atretischen und in Theka-Zellen kein AMH gefunden werden kann (Rey et al. 2003).

Auf die im praktischen Alltag wohl wichtigste Eigenschaft des AMHs als Marker für die ovarielle Reserve wird im Abschnitt 4.5.2 näher eingegangen. Allerdings beschäftigte sich die Forschung der letzten Jahre eingehend auch mit anderen Aspekten des AMHs, die für den klinischen Alltag relevant sein können.

Beispielsweise kann das AMH im Bereich der künstlichen Befruchtung eingesetzt werden, um die Vorhersage der ovariellen Stimulation zu verbessern und somit indirekt dabei behilflich sein, das Risiko eines ovariellen Hyperstimulationssyndrom zu senken (De-wailly et al. 2014).

Weitere Ansätze nutzen die Messung von AMH zur Überwachung von Granulosazelltumoren (La Marca/ Volpe 2007) oder zur Diagnose des polyzystischen Ovarialsyndroms (Iliodromiti et al. 2013). Aber auch im späteren Verlauf des Lebens kann es nützlich sein, um beispielsweise den Zeitpunkt der Menopause vorherzusagen (Tehrani et al. 2013).

4.5.2 AMH und die Bestimmung der ovariellen Reserve

Das wohl wichtigste Anwendungsgebiet des AMHs im klinischen und praktischen Alltag stellt die Bestimmung der ovariellen Reserve dar.

Definitionsgemäß wird unter der ovariellen Reserve der Anteil der noch übrig geblieben Primordialfollikel im Ovar verstanden (Maltaris et al. 2010). Die Frage nach der ovariellen Reserve einer Frau und damit der Möglichkeit schwanger zu werden, wird oft von Frauen mit Kinderwunsch gestellt. Diese zu beantworten ist allerdings nicht immer ganz ohne Einschränkungen möglich. So hängt sie nicht nur von einem Faktor, wie dem Alter ab, sondern kann individuell sehr unterschiedlich sein. Folglich kann es auch zu Unterschieden zwischen dem chronologischen und biologischen Alter einer Patientin kommen (Keck 2014). Betrachtet man die Höhe des AMHs in Bezug auf das Alter der Frauen ist bekannt, dass das AMH bei der Geburt nahezu bei null liegt. Später werden stabile Werte

erreicht. Diese beginnen mit der Pubertät und halten sich bis circa zum dreißigsten Lebensjahr (Buhling et al. 2013).

Neben dem natürlichen Alterungsprozess können auch andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählen beispielsweise Krankheitsbilder wie das der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz (POF), eine Chemo- oder Strahlentherapie (z. B. zur Behandlung von Karzinomen) oder Umwelteinflüsse (Maltaris et al. 2010). Die abnehmende Eizellqualität beruht grundsätzlich vor allem auf zwei Faktoren. Erstens nimmt mit steigendem Alter die Eizellqualität per se immer weiter ab. Zweitens sinkt auch die Anzahl der Follikel (Maltaris et al. 2010).

Um die ovarielle Reserve möglichst genau abzuschätzen, wird im praktischen Alltag sehr häufig der AMH-Wert im Serum (sAMH) gemessen, da es sich hierbei um eine einfach durchzuführende Methode handelt (Lüllmann-Rauch/ Asan 2019).

Es wurde festgestellt, dass das sAMH sowohl mit dem Antral Follicle Count als auch mit der Anzahl der gewonnenen Eizellen in Verbindung gebracht werden kann und insofern als Marker des Alterungsprozesses der Ovarien dient (van Rooij et al. 2002). Dasselbe gilt auch für die Schwangerschaftsraten. Diese sind bei Patientinnen mit höheren sAMH-Werten höher als mit Niedrigen (Chen et al. 2014).

Im Laufe des Lebens einer Frau verändern sich die AMH-Werte im Serum deutlich. Während bei der Geburt die AMH-Werte gegen Null gehen, erreichen sie um die Pubertät ihr Maximum und fallen dann bis zur Menopause sukzessive ab (Kelsey et al. 2012). Danach werden meist nur noch Werte von $<0,4 \mu\text{g/l}$ ermittelt (Maltaris et al. 2010).

Jedoch können noch weitere Punkte, neben dem Alter, die AMH-Serumkonzentration beeinflussen. Bei der Einnahme von kombinierten Kontrazeptiva beispielsweise sinkt der Wert signifikant ab (Kallio et al. 2013). Über die Frage, ob allgemein zyklische Schwankungen existieren, ist die Datenlage nicht einheitlich. In einer Arbeit aus dem Jahr 2007 wurde festgestellt, dass sich die Werte ohne hormonellen Einfluss während des Menstruationszyklus stabil verhalten (Tsepelidis et al. 2007). Dies könne den Wert für die Messung der ovariellen Reserve interessant machen, da er zu jedem Zeitpunkt bestimmt werden könne (Tsepelidis et al. 2007). Allerdings gibt es auch andere Meinungen, die besagen, dass durchaus intrazyklische Schwankungen existieren (Overbeek et al. 2012).

Dementsprechend sollte bei der klinischen Interpretation eines individuellen sAMH-Werts immer mit gewisser Vorsicht vorgegangen werden.

4.5.3 Forschungsstand zum AMH in der Follikelflüssigkeit

Die Messung des AMHs im Serum einer Patientin als prognostischer Marker gilt, wie im letzten Abschnitt beschrieben, schon seit Längerem als ein zuverlässiger und wichtiger Faktor in der Reproduktionsmedizin (Müller et al. 2009).

Während sich die Forschung sehr lange eher auf die Diskussion der sAMH bezog, wurde in den letzten Jahren die Frage nach der Bedeutung von AMH in der Follikelflüssigkeit (fAMH), welche bezogen auf die Follikel- und Eizellgenese den eigentlichen Wirkungsort darstellt, immer wichtiger (z.B. Fanchin et al. 2005, Capkin et al. 2012). Es stellte sich heraus, dass die Aufgaben und Wirkungsweisen des AMHs vielschichtig und komplex sind.

Jedoch existieren unterschiedliche wissenschaftliche Meinungen bezüglich dieses Themas. Schon allein die Betrachtung der Studien, die sich nur mit gesunden Patientinnen, also ohne beispielsweise PCO oder Endometriose als Erkrankung, auseinandersetzen, ergibt ein inhomogenes Bild.

Grundsätzlich wurden oft gepoolte Werte betrachtet (z. B. Bolat et al. 2016, Wunder et al. 2008). Gepoolt heißt in diesem Zusammenhang, dass die Follikelflüssigkeit aller Follikel „vermischt“ wurde und dann ein Wert bestimmt wurde. Rückschlüsse auf den einzelnen Follikel können dementsprechend nicht gezogen werden.

Mit dieser Methodik wurde einerseits festgestellt, dass zwischen dem AMH-Level in der Follikelflüssigkeit und dem Ergebnis der IVF-Behandlung (Eizellzahl, Befruchtungsrate und klinische Schwangerschaft) keine signifikante Korrelation besteht. Andererseits wurde dem sAMH-Wert eine positive Korrelation mit der Rate an klinischen Schwangerschaften zugeschrieben und somit festgestellt, dass das sAMH einen zuverlässiger Wert für die Feststellung der klinischen Schwangerschaftsrate darstellt (Bolat et al. 2016).

Zudem wurde auch eine Studie veröffentlicht, bei der signifikant höhere fAMH-Werte (gepoolt) bei Patientinnen gemessen wurden, die durch ART schwanger wurden, als bei denen, die nicht schwanger wurden (Wunder et al. 2008).

Eine der ersten Studien, die sich mit der Auswertung des einzelnen Follikels beschäftigten fand, im Jahr 2005 heraus, dass kleine Follikel circa dreimal höhere AMH-Werte aufweisen als große. Hierbei wurden jedoch jeweils nur zwei Follikel in die Untersuchung eingeschlossen (Fanchin et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse lieferten Daten, bei denen das fAMH über eine IVM (Kedem et al. 2013) bzw. kryokonservierte Follikel gewonnen wurde (Kristensen et al. 2019).

Zudem konnte sowohl sAMH als auch fAMH positiv mit der Implantations- und Schwangerschaftsrate korreliert werden (Capkin et al. 2012). Im Gegensatz dazu wurde allerdings keine Korrelation zur Befruchtungsrate festgestellt. Hierbei wurde jeweils nur der fAMH-Wert aus dem ersten Follikel bestimmt (Capkin et al. 2012).

Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch von Kim et al. 2014 ableiten. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass fAMH-Werte positiv mit der Embryonenqualität korreliert werden können und bei Patientinnen mit niedrigen fAMH-Werten auch die Befruchtungsrate geringer ausfällt. Somit könnte fAMH als Prädiktor für Eizell- und Embryonenqualität dienen.

Auch hier wurde jeweils der erste dominante Follikel der Patientin punktiert (Kim et al. 2014). Außerdem konnte festgestellt werden, dass fAMH-Werte in Follikeln, deren Eizelle später befruchtet werden, um ein Mehrfaches höher sind, als wenn keine Befruchtung eintritt (Takahashi et al. 2008).

Weiterführend von der Befruchtungsrate können auch Aussagen über das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft gemacht werden. Die Aussagen hierzu sind allerdings wiederum nicht eindeutig. So ist es laut Bastu et al. 2015 nicht möglich, eine signifikante Korrelation zwischen der Schwangerschaftsrate und AMH herzustellen (Bastu et al. 2015). Demgegenüber wurde auch festgestellt, dass sowohl erhöhte sAMH als auch fAMH-Werte als Prädiktor für das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft dienen könnten (Hattori et al. 2013). Auch im Rahmen anderer Studien, die sich mit der Auswertung von dominanten Follikeln oder Natural-Cycle-IVFs beschäftigen, konnten hohe fAMH-Werte mit einer höheren Rate an klinischen Schwangerschaftsraten in Verbindung gebracht werden (Sacha et al. 2020/ Wolff et al. 2021).

Auch über die Frage, ob fAMH überhaupt ein besserer Prädiktor in der Reproduktionsmedizin darstellt als sAMH, herrscht Uneinigkeit. Schenk et al. (2017) stellten beispielweise in ihrer Studie fest, dass zwischen sAMH und fAMH-Werten keine Unterschiede bestehen. Des Weiteren konnte in dieser Studie eine positive Korrelation zwischen sAMH und fAMH ermittelt werden.

Grundsätzlich kann natürlich auch die Frage gestellt werden, ob das jeweils angewendete Stimulationsprotokoll einen Einfluss auf die gemessenen AMH-Werte hat. Bisher ist bekannt, dass bei der Bestimmung von fAMH kein Unterschied zwischen GnRH Agonisten- und GnRH Antagonistenprotokollen besteht und dementsprechend die Art der ovariellen Hyperstimulation keinen Einfluss auf die Produktion von AMH hat (Lee et al. 2008, Kaya et al. 2012). In Bezug auf die verwendeten Dosen an Gonadotropinen konnte bisher gezeigt werden, dass es auch bei niedrigeren Dosen nicht zu einer niedrigen Schwangerschaftsrate kommt (Hohmann et al. 2003).

Das AMH wurde auch immer wieder mit anderen Parametern in Verbindung gebracht. Für Sexualhormone, wie Testosteron und Estradiol, herrscht ein uneinheitliches Bild. Zwischen Testosteron und fAMH wurde einerseits keine Korrelation (Kristensen et al. 2019), andererseits eine positive Korrelation festgestellt (Wolff et al. 2017). Für den Zusammenhang zwischen Estradiol und fAMH gibt es sowohl Hinweise auf eine negative Korrelation (Fanchin et al. 2007/ Kristensen et al. 2019), als auch darauf, dass keine Korrelation existiert (Wolff et al. 2017). Im Falle von LH geht man bisher von einer posi-

tiven Verbindung zu fAMH aus (Wolff et al. 2017). Auch für Vitamin D existieren wissenschaftliche Arbeiten, die sowohl negative (Merhi et al. 2014/ Bednarska et al. 2019), als auch positive Korrelationen feststellen konnten (Skowrońska et al. 2021).

Nur wenige Studien betrachteten bisher auch den Durchmesser oder das Volumen der punktierten Follikel im Vergleich zu den fAMH-Werten. In ersten Ansätzen, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigten, konnte bei der Untersuchung von kryokonservierten Ovarien (zum Fertilitätserhalt bei gonadotoxischer Therapie) beobachtet werden, dass fAMH-Werte mit steigendem Follikeldurchmesser progressiv niedriger werden (Yding Andersen et al. 2008).

Auch die Unterscheidung von je einem kleinen und einem großen Follikel im Vergleich PCO und gesunder Kontrollgruppe wurde untersucht. Sowohl die kleinen als auch die großen Follikel der PCO-Patientinnen enthielten signifikant höhere AMH-Werte. Außerdem wurde festgestellt, dass die durchschnittlichen fAMH-Werte in kleinen Follikeln signifikant höher waren, als in großen Follikeln. Dies gilt sowohl für PCO- Patientinnen, als auch für die Kontrollgruppe (Desforgues-Bullet et al. 2010).

In einer weiteren Studie wurden verschiedene Gruppen mit verschiedenen Follikelgrößen verglichen. Demnach werden die AMH-Level geringer, wenn die Follikeldurchmesser größer werden (Bøtkjær et al. 2015).

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse, bei denen AMH-Isoformen verglichen wurden, gehen davon aus, dass eine negative Korrelation zwischen dem Follikeldurchmesser und den Isoformen vorliegt (Mamsen et al. 2021).

Besonderes Augenmerk wurde in den vergangenen Jahren auch auf den Zusammenhang zwischen AMH und dem Vorhandensein einer Eizelle bzw. der insgesamten Eizellzahl gelegt. Bisher konnte gezeigt werden, dass zwischen sAMH und der Eizellzahl ein Zusammenhang besteht (Wunder et al. 2008, Arabzadeh et al. 2010, Li et al. 2015, Melado et al. 2017, Walters et al. 2019). In Bezug auf fAMH ist bekannt, dass Follikel, die eine Eizelle enthalten, höhere fAMH-Werte aufweisen. Hierfür wurden entweder gepoolte Werte verwendet (Wunder et al. 2008) oder nur einzelne Follikel untersucht (Walters et al. 2019). Allerdings existiert auch eine Studie, die das Gegenteil beschreibt (Skowrońska et al. 2021).

Die hier beschriebene, zum Teil widersprüchliche und mangelhafte Datenlage legt weitere Untersuchungen zum Thema AMH im Kontext der künstlichen Befruchtung unbedingt nahe.

4.6 Ziele der Arbeit

Das AMH wird immer wieder als Marker für verschiedenste Aspekte in der Reproduktionsmedizin diskutiert. Vor allem vor dem Hintergrund, dass die Patientinnen, die eine künstliche Befruchtung über IVF oder ICSI in Anspruch nehmen, immer älter werden, erscheint es wichtig, neue Erkenntnisse auf diesem Bereich zu gewinnen.

Allerdings bezogen sich die bisher durchgeführten Studien oft auf die Serum AMH-Werte. Wenn der AMH-Wert der Follikelflüssigkeit untersucht wurde, wurde meist eine gepoolte Methodik angewandt (z. B. Bolat et al. 2016, Wunder et al. 2008). In nur wenigen Studien wurden einzelne Follikel punktiert. Dabei wurde dann oft nur die Untersuchung des dominanten Follikels durchgeführt (z. B. Kim et al. 2014, Takahashi et al. 2008, Walters et al. 2019, Sacha et al. 2020, Lv et al. 2020). Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob zwischen den AMH-Werten, die in der Follikelflüssigkeit gemessen werden, ein Unterschied zu den Werten im Serum existiert. Das heißt, inwiefern das von den Granulosazellen produzierte und in die Follikelflüssigkeit abgegebene AMH ins Serum übertritt. Zudem ist nicht klar, in welchem Umfang die Größe der Follikel einen Einfluss auf die AMH-Produktion oder das Vorhandensein einer Eizelle hat. Die Datenlage hierzu ist dementsprechend noch nicht sehr aussagekräftig und viele Fragen bezüglich des AMH im Kontext des Follikels und seiner Wirkung bleiben unbeantwortet.

Hauptziele dieser Arbeit sind es, den Zusammenhang zwischen fAMH und dem Follikeldurchmesser bzw. das Vorhandensein einer Eizelle durch eine umfassende und große Fallzahl zu erfassen. Außerdem soll weiter die Verbringung von AMH zu anderen Hormonen und Vitaminen sowie Behandlungsvariablen beleuchtet werden. Des Weiteren stehen wichtige sozioökonomische Faktoren wie Alter und Body-Mass-Index (BMI) sowie das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft im Vordergrund.

Somit ist es auch Ziel dieser Arbeit, mögliche Korrelationen zwischen der Konzentration von fAMH und anderen Parametern herzustellen. Außerdem sollen in einem weiteren Schritt mögliche Zusammenhänge zwischen fAMH und verschiedenen Anamnesevariablen sowie klinische Ergebnisse der künstlichen Befruchtung dargestellt werden.

Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen werden, sollen zum besseren Verständnis der follikulären Prozesse beitragen. Außerdem soll ein Beitrag zum besseren Verständnis des Hormons und langfristig auch dessen Nutzen als prognostischer Marker und Auswirkungen auf die ART geleistet werden.

5 Material und Methoden

5.1 Allgemeine Informationen und Biobanking

Alle Proben, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, konnten im Zeitraum von Januar 2018 bis Dezember 2018 im REPKO (Reproduktionsmedizinisches Kompetenzzentrum) der Universitätsklinik Gießen und Marburg (Standort Marburg) gesammelt werden.

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist es, Follikelflüssigkeit, die im Rahmen der Follikelpunktionen gewonnen wurde, explorativ zu untersuchen.

Dabei ist es wichtig eine möglichst aussagekräftige Fallzahl zu erreichen. Dies zu erreichen setzt voraus, Proben über einen längeren Zeitraum aufzubewahren. Hierfür bietet die Comprehensive Biobank Marburg die nötigen Voraussetzungen. Ziel des Biobankings allgemein ist es, Daten und Materialien langfristig aufzubewahren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder zur Verfügung zu stellen.

Für diese Arbeit wurden aus jeder bei den jeweiligen Follikelpunktionen gewonnener Probe je drei Aliquote á 1,2 mL generiert. Da es in einigen Fällen vorkam, dass weniger als 3 mL Material zur Verfügung stand, entstand in diesen Fällen weniger Aliquote. Im nächsten Schritt wurden die Aliquote codiert und bei -80°C eingefroren. Auch die kurz vor der Follikelpunktion entnommenen Blutproben wurden erst in der Biobank zentrifugiert, codiert und dann bei -80°C eingefroren.

Alle Proben konnten dann zu einem späteren Zeitpunkt angefordert, aufgetaut und die entsprechenden Messungen durchgeführt werden.

5.2 Patientinnenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Gesamtzahl von 376 Follikeln von 61 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Dabei wurde allen Patientinnen die im Erhebungszeitraum eine ART erhielten, die Teilnahme an der Studie angeboten.

Im nächsten Schritt wurde eine engere Auswahl an Patientinnen getroffen. Hierbei wurden nur „gesunde“ Patientinnen in das Patientenkollektiv aufgenommen. Ausnahmen bildeten dabei Diagnosen wie eingeschränkte Eileiterdurchgängigkeit, Tubenpathologien allgemein, Zustand nach Chlamydieninfektion, uteriner oder zervikaler Faktor oder Schilddrüsenerkrankungen, da diese entweder ausschlaggebend für die Sterilität sein können oder hierfür nicht als relevant erachtet wurden. Auf das Ausschlusskriterium Alter wurde zunächst bewusst verzichtet und Frauen jeden Alters eingeschlossen, um auch diesen Aspekt in Bezug auf das AMH untersuchen zu können. Gleiches galt für Patientinnen mit der Diagnose Präadipositas, Adipositas Grad 1,2 oder 3 (Einteilung

nach Herold et al. 2018). Nicht eingeschlossen wurden Patientinnen mit den Diagnosen Endometriose, PCO, Zustand nach Malignom, Prolaktinom, Mukoviszidose und Hepatitis, da diese Erkrankungen potentiell einen Einfluss auf die Fertilität und auch das AMH haben können.

Bei den Partnern der Patientinnen wurden nur Erkrankungen ausgeschlossen, die zu einer außergewöhnlichen Befruchtungsrate führen. Hierdurch soll gewährleistet werden, dass die Ergebnisse nicht von äußeren Faktoren beeinflusst werden.

5.3 Ovarielle Stimulationsprotokolle

Alle in die Studie eingeschlossenen Patientinnen unterzogen sich vor der Behandlung individuell angepassten ovariellen Stimulationsprotokollen.

Das Ziel der ovariellen Stimulation der Patientinnen war es, ungefähr acht bis zwölf befruchtungsfähige Eizellen für die künstliche Befruchtung bereitzustellen.

Genaue Erklärungen zum allgemeinen Ablauf der ovariellen Stimulation sind im Kapitel „4.3.1. Stimulationsprotokolle“ nachzulesen.

Für die vorliegende Studie wurden entweder Kurz(short)- oder Lang(long)- Protokolle verwendet. Diese unterscheiden sich insoweit, dass im Langprotokoll die hypophysären Gonadotropine zuerst mit einem GnRH-Analagon supprimiert werden. Daraufhin erfolgt die Stimulation mittels FSH und dann die Ovulationsinduktion mittels hCG. Das Kurzprotokoll dahingegen beginnt mit der Stimulation mittels FSH gefolgt mit der Verwendung eines GnRH-Antagonisten zur Unterdrückung der Hypophysenaktivität. Für die Follikelstimulation und Ovulationsinduktion wird dann analog zum Langprotokoll weiter FSH und dann hCG verwendet.

Für die Follikelstimulation mit FSH wurden folgende Präparate (gegebenenfalls auch in Kombination) verwendet. Urinäres humanes Menopausales Gonadotropin (hMG; enthält LH und FSH), rekombinantes FSH (rFSH, FSH- CPT) oder rekombinantes LH (rLH). In den meisten Fällen wurden rekombinante Produkte verwendet. Die verwendeten Dosierungsformen sind entweder konstant bleibend, abfallend („step down“) oder individuell ansteigend („step up“).

Als Applikationsformen kamen intranasale Einzelapplikation oder i.m.- bzw. s.c.-Applikation eines Depotpräparates in Frage. Die Dosierung erfolgte entweder als Standarddosierung oder individuell angepasst (nach Alter, Gewicht, Hormonstatus etc.).

Als nächstes wurde dann an Tag fünf bis sieben der Stimulation ein transvaginaler Ultraschall zur Kontrolle des Follikelwachstums durchgeführt. Gleichzeitig wurde über eine Blutentnahme Estradiol, LH und gegebenenfalls Progesteron bestimmt. Je nach Ergebnissen der sonografischen und laborchemischen Kontrollen wurden weitere Dosierungen festgelegt und die Kontrolle bis zum Entschluss zur Eizellentnahme wiederholt.

Von dem Zeitpunkt an, an dem in der sonografischen Kontrolle festgestellt wurde, dass drei dominante Follikel von mindestens 18-20 mm beim Langprotokoll oder 17-18 mm beim Kurzprotokoll (Mittelwert von zwei maximalen Durchmessern) vorhanden sind, wurde der Termin für die Follikelpunktion festgelegt. Die endgültige Eizellreifung und Ovulation wurde circa 36 Stunden vor dem Termin der Follikelpunktion mittels hCG s.c. (5000 IU/Applikation (rekombinant 250 µg/ Applikation) ausgelöst.

5.4 Ablauf der Probensammlung, Eizellentnahme und Gewinnung der Follikelflüssigkeit und Serumproben

Die ambulant durchgeführte Follikelpunktion geschah circa 36 Stunden nach der hCG-Gabe in Kurznarkose. Dabei wurden die Follikel mit einer 17 Gauge Nadel (Follicle-Puncture-System; Reproline) transvaginal und ultraschallgesteuert punktiert und die Follikelflüssigkeit, mit den Eizellen, mittels einer Vakuumpumpe in entsprechende 14ml Rundbodenröhrchen (Rundbodenröhrchen; Falcon) abgesaugt.

Jeder Follikel wurde einzeln punktiert und die Follikelflüssigkeit komplett entleert. Die Flüssigkeit, die sich danach noch im Schlauch befand, wurde ganz in das Röhrchen abgegeben. Wenn die einzelne Punktion z. B. auf Grund der Größe des Follikels nicht möglich war, wurden mehrere Follikel in ein Röhrchen punktiert und dieses dann als Mischpunktat dokumentiert. Wenn möglich wurden große Follikel zuerst punktiert. Wenn nötig wurde zwischen den einzelnen Follikeln mit Flushingmedium (Flushing Medium; Origio MediCult) gespült und dies dann auch dokumentiert. Während der Punktion wurde der Durchmesser des jeweils punktierten Follikels mit Hilfe des Ultraschalles erfasst und dokumentiert. Das bedeutet, dass der routinemäßige Ablauf der Follikelpunktion an dieser Stelle minimal verändert wurde, da normalerweise nicht jeder Follikel einzeln punktiert wird.

Direkt im Anschluss wurde die Follikelflüssigkeit unter einem Stereomikroskop (SMZ1500 Plan apo; Nikon) auf einer Wärmeplatte nach dem Vorhandensein von Eizellen untersucht. Diese wurden dann in Flushing Medium bei 37°C überführt. So konnte gewährleistet werden, dass die Temperatur des Punktats bis zur Entnahme der Eizellen nicht absinken konnte. Anschließend wurden die Eizellen gemäß dem routinemäßigen Ablauf der ART entweder mittels IVF oder ICSI mit den Spermien zusammengeführt.

Die übriggebliebene Follikelflüssigkeit wurde anschließend wieder in vorbeschriftete Röhrchen gegeben, sodass im Nachhinein eine Zuordnung zu den einzelnen Follikeln möglich war. Im gleichen Zug wurde das Volumen der Follikelflüssigkeit in mL abgelesen und dokumentiert.

Im Anschluss an die Follikelpunktion wurden die Proben elf Minuten bei 3000g zentrifugiert, der Überstand verworfen, und dann bei -80°C in der Comprehensive Biobank Marburg bis zur Messung der Konzentrationen gelagert.

Die Serumproben wurden am Tag der Follikelpunktionen vor dem Eingriff über eine venöse Blutentnahme gewonnen (S- Monovette 4.9mL Z-Gel; Sarstedt).

Die Serumprobe wurde im Anschluss (innerhalb von 1,5 Stunden) bei 2500g für zehn Minuten zentrifugiert und der Serumüberstand in tiefkältebeständige Kryoröhrchen der Firma FluidX gefüllt. Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

5.5 Quantitative Analyse des AMH

Für die quantitative Analyse wurden nur Proben verwendet, die nicht blutig und ohne Flushingmedium waren. Dadurch kann gewährleistet werden, dass die Follikelflüssigkeit nicht verunreinigt wurde und die gemessenen Werte den Werten in der Follikelflüssigkeit entsprechen.

Die immunhistologische Bestimmung des AMH im Serum und Follikelflüssigkeit konnte mit Hilfe eines Elektrochemilumineszenz Immunoassay (ECLIA) durchgeführt (Cobas-e601 analyzer, Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt werden. Dabei handelte es sich um eine vollautomatische Analyse. Die angewendete Methode wurde durch interne und externe Qualitätsprogramme kontrolliert. Als Grenzbereiche der Messung wurden 0.01-23 ng/mL definiert. Die verwendeten Reagenzien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien für den ECLIA, Quelle: modifiziert nach Elecsys AMH Plus.

Reagenz	Zusammensetzung und Konzentration
Anti-AMH-Ak~Ru(bpy)₃²⁺	Monoklonaler Anti-AMH-Antikörper (Maus), markiert mit Ruthenium-Komplex, 1.0 mg/L; Phosphatpuffer, 50 mmol/L, pH 7.5; Konservierungsmittel
Anti-AMH-Ak~Biotin	Biotinylierter monoklonales Anti-AMH-Antikörper (Maus), 1.0 mg/L; Phosphatpuffer, 50 mmol/L, pH 7.5; Konservierungsmittel
Streptavidin-beschichtete Mikropartikel	Streptavidin-beschichtete Mikropartikel, 0.72 mg/mL; Konservierungsmittel

5.5.1 Elektrochemilumineszenz-Immunoassay

Bei dem für die Messung des AMH angewandten Verfahren handelt es sich um einen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA). Dies ist eine Sonderform des Immunoassays. Der Vorteil dieser Analysemethode liegt vor allem darin, dass es die zwei sehr

wichtigen analytischen Prinzipien Elektrochemie und Spektrometrie miteinander kombiniert. Grundsätzlich werden für diesen Assay neben dem zu bestimmenden Antigen zwei verschiedene Antikörper benötigt. Erstens ein biotinylierter und zweitens ein Ruthenium (II)-tris(bipyridyl) $2+$ -konjugierter Antikörper ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$). Diese Komponenten bilden einen Komplex. Nach Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ werden zur Probe Streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugegeben. Sie binden an den biotinylierten Antikörper. Da die Partikel paramagnetisch sind, werden sie von einem an der Anode gelegenen positiven Magneten angezogen. So kann das Reaktionsgemisch von den überflüssigen Bestandteilen (nicht an Antigen fixierte $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ -markierte AK) getrennt werden. Im nächsten Schritt wird das Oxidationsmittel Tripropylamin (TPA) hinzugegeben. Durch eine angelegte Spannung an der Anode kommt es sowohl zur Abgabe eines Elektrons als auch eines Protons des TPA. Es bildet sich ein TPA-Radikal. Gleichzeitig wird der Ruthenium (II)-tris(bipyridyl) $2+$ -konjugierter Antikörper von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ zu $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ oxidiert. Durch die darauffolgende Reaktion wird der Antikörper in einen angeregten Zustand überführt. Dies geschieht durch Reduktion auf $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, genauer gesagt durch die Übernahme eines freien Elektrons des TPA-Radikals. Da dieser Zustand nicht stabil ist, kehrt er wieder in seine Ausgangsform zurück. Entscheidend dabei ist, dass ein Photon der Wellenlänge 620nm abgegeben wird. Am Ende wird die Chemilumineszenzemission bei 620nm gemessen und über die Intensität dann die Konzentration des zu bestimmenden Antigens bestimmt (Renz 2009).

5.6 Statistische Analyse

Die für die statistische Analyse relevanten Daten wurden entweder während der Follikelpunktion erhoben (Follikelvolumen, Follikeldurchmesser, etc.), im Nachhinein bestimmt (AMH-Werte, etc.) oder aus der intern geführten Datenbank MedITEX IVF abgerufen (BMI der Patientinnen, Diagnosen, Befruchtungsraten, etc.). Da von einer Patientin mehrere Follikel für die Messung der Sexualsteroidkonzentrationen ausgewertet wurden, wurden marginale Modelle für die statistische Auswertung verwendet (Pinheiro 2006). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass eine direkte Intra-Patienten-Korrelation innerhalb wiederholter Messungen der gleichen Variablen sowie zwischen den einzelnen Variablenpaaren (z. B. fAMH und sAMH) hergestellt werden konnte (Witzke et al. 2021). Im Mittelpunkt der Auswertungen standen neben soziodemografischen Parametern andere Hormone und Vitamine, vor allem der Größendurchmesser der Follikel. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Follikel herzustellen, erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen. Follikel mit einem Durchmesser von $<16\text{mm}$ wurden als klein, solche mit einem Durchmesser $\geq 16\text{ mm}$ als groß definiert. Ein p-Wert von $<.05$ wurde als signifikant angesehen.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm R durchgeführt. Für Gruppenvergleiche zum Vergleich der Steroidkonzentrationen wurden verallgemeinerte Kleinste-Quadrate-Schätzungen durchgeführt. Dabei wurden die Korrelationen zwischen wiederholten Messungen von verschiedenen Follikelproben derselben Patientin verwendet. Für jedes berechnete Variablenpaar wurde die Maximum-Likelihood-Methode angewandt, um Schätzungen der mittleren Konzentrationen, der Varianzen, Korrelationen sowie der 95%-Konfidenzintervalle (CIs) zu ermitteln (R Core Team 2014).

6 Ergebnisse

6.1 Deskriptive Datenanalyse

6.1.1 Charakteristika der Patientinnen und Behandlungsprotokolle

Das durchschnittliche Alter der 61 an der Studie teilnehmenden Patientinnen betrug 34,3 Jahre (95% CI, 33.57-34.99). Betrachtet man weitere soziodemografische Parameter, zeigt sich ein durchschnittlicher BMI von 23,72 kg/m² (95% CI, 22,97-24,46). Genauer unterteilt entsprachen 76,9% der Patientinnen nicht der Definition von Übergewicht. 11,5% wurden zur Gruppe mit Präadipositas, 3,85% Adipositas Grad 1, 1,92% Adipositas Grad 2 und 5,77% Adipositas Grad 3 zugeordnet.

Außerdem wurden über die intern geführte Datenbank MedITEX IVF Daten zur Ursache für die Behandlung erhoben. Sowohl die erfassten weiblichen, als auch die männlichen Ursachen werden in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt. Dabei ist es möglich, dass eine Frau bzw. ein Mann mehrere der genannten Merkmale aufweist (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Ursachen für die Fertilitätsbehandlung der Patientinnen bzw. deren Partner

Diagnose Patientin	Anteil
Idiopathisch	48,1%
Tubenpathologie	26,9%
Nachgewiesene Chlamydieninfektion	9,62%
Schilddrüsenerkrankung	3,85%
Uteriner und/ oder zervikaler Faktor	1,92%
Uterus bicornis	1,92%
Diagnose Partner der Patientin	
Eingeschränktes Spermogramm	46,2%
Idiopathisch	42,3%
Azoospermie	7,69%

Es zeigt sich, dass die Hauptursache für die Fertilitätsbehandlung auf Seite der Patientin idiopathisch und an zweiter Stelle eine Tubenpathologie war. In Bezug auf die Partner der Patientinnen wiesen fast die Hälfte ein eingeschränktes Spermogramm als Ursache für die Behandlung auf. Bei fast ebenso vielen Partnern konnte keine bekannte Ursache evaluiert werden.

In Bezug auf die angewandte Technik wurden bei 90,2% der Patientinnen eine ICSI-Behandlung durchgeführt. Bei 6,56% Patientinnen war es eine IVF und bei 3,28% eine Kombination aus beidem. Bei den Behandlungsprotokollen handelte es sich bei 52,5%

um ein Short-Protokoll, bei 28,8% um ein Long-Protokoll und bei 18,6% um andere Protokolle.

Eine klinisch nachgewiesene Schwangerschaft trat bei 54,1% der Patientinnen ein. Davon waren 72,7% Einlings- und 27,3% Zwillingschwangerschaften. Von den schwangeren Frauen brachten 48,5% ein oder mehrere Kinder zur Welt. Das bedeutet insgesamt eine Geburtenrate von 26,23%.

6.1.2 AMH in der Follikelflüssigkeit und im Serum

Die 376 gesammelten Follikelproben, sowie die 53 Serumproben wurden primär auf das AMH untersucht. Die Werte sowie die Standardabweichung, Median etc. sind in der folgenden Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQR), Minimum (Min.) und Maximum (Max.) von fAMH und s AMH in ng/ml (Witzke et al. 2021).

	Flüssigkeit	n	Mittelwert	SD	Median	IQR	Min.	Max.
AMH	Follikel	376	3,0	3,1	2,0	2,0	0,0	20,7
	Serum	53	2,81	1,8	2,12	2,56	0,57	7,36

6.1.3 Behandlungs- und Kulturvariablen

Da viele Informationen über den Ablauf der Behandlung und den späteren Verlauf in der Eizellkultur über die Meditex- Datenbank gesammelt wurden, konnte auch ein Überblick der Daten über den Verlauf der Stimulationen bereitgestellt werden.

Einen Überblick über die Werte bietet Tabelle 4. Bei 61 betrachteten Stimulationsprotokollen wurden die Patientinnen im Durchschnitt 10,5 Tage stimuliert (Sd 1,3), bis die Eizellentnahme erfolgte. Der kürzeste Zeitraum war 8, der längste 14 Tage. Im Durchschnitt wurde jeweils 9,4 Eizellen je Punktion gewonnen (Sd 5,6, minimal eine, maximal 21). Es wurden im Durchschnitt 7,4 Eizellen inseminiert (Sd 5,0, minimal null, maximal 21). Wohingegen im Durchschnitt nur 5,3 Eizellen befruchtet werden (Sd 3,7, minimal 0, maximal 16). 1,6 Eizellen wurden im Durchschnitt kryokonserviert (Sd 3,4, minimal 0, maximal 15).

Auch Hormonspiegel wurden im Zuge der Stimulationsprotokolle im Serum erhoben. Dabei lagen die letzten gemessenen AMH-Werte bei 3,0 ng/ml im Durchschnitt (Sd 2,2, minimal 0,6, maximal 9,1, n = 48). Für Estradiol wurden 1409,4 pg/ml (Sd 1134,0, minimal 52,0, maximal 5530,0, n = 58), für LH 3,0 mIU/ml (Sd 2,9, minimal 0,2, maximal 18,0, n = 58) und für Progesteron 0,6 ng/ml (Sd 0,4, minimal 0,1, maximal 1,6, n = 57) Durchschnittswerte erhoben.

In den einzelnen Stimulationszyklen wurden unterschiedliche Dosen zur ovariellen Stimulation verwendet. Im Durchschnitt waren dies für FSH 1928,7 mIU/ml (Sd 885,7, minimal 0,0, maximal 3900,0) und für hMG 259,4 IU (Sd 821,3, minimal 0,0, maximal 3300,0). Außerdem wurden mehrere Variablen der Eizellkulturen aus der Meditex- Datei erhoben. „2 PN“ wird hierbei als Vorkernstadium definiert. „EC“ bedeutet in diesem Zusammenhang Eizelle. Die Abkürzungen MI und MII beziehen sich auf die Metaphase I bzw. II des Zellzyklus.

Tabelle 4: Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Interquartilsabstand (IQR), Minimum (Min.) und Maximum (Max.) von Meditex Kulturvariablen.

	n	Mittelwert	SD	Median	IQR	Min.	Max.
2 PNs ICSI	61	4,5	3,7	4,0	4,0	0,0	16,0
2PNs IVF	61	0,4	1,5	0,0	0,0	0,0	9,0
EC MI- Phase	61	0,5	0,8	0,0	1,0	0,0	3,0
EC MII-Phase	61	5,3	4,5	4,0	6,0	0,0	18,0

6.2 Statistische Datenanalyse

6.2.1 AMH in Bezug auf Durchmesser und Eizellen

Aus den erhobenen Daten konnten insbesondere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen dem AMH und Parametern wie dem Follikeldurchmesser und das Vorhandensein einer Eizelle im jeweiligen Follikel gewonnen werden. Follikel mit einem großen Durchmesser beinhalteten eine signifikant niedrigere Konzentration von fAMH mit einem mittleren Unterschied von 1 ng/ml weniger ($p = 0,001$). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Follikel, die eine Eizelle beinhalten, signifikant höhere fAMH aufweisen als diejenigen ohne eine Eizelle ($p < 0,001$). Hierbei betrug der mittlere Durchschnitt 2,1 ng/ml beim Vorhandensein einer Eizelle. Die genauen Zusammenhänge sind in der folgenden Tabelle 5 aufgeführt (Witzke et al. 2021).

Tabelle 5: Vergleich der Mittelwertkonzentration von fAMH zwischen Follikeln mit kleinem und großem Durchmesser, sowie ohne und mit Eizelle (Witzke et al. 2021)

Variable	Gruppe	Mittelwert (95% CI)	p
Durchmesser	Klein	3,6 (2,8; 4,4)	0,001
	Groß	2,6 (2,0; 3,2)	
	Groß – klein	-1,0 (-1,7; -0,3)	
Eizelle	Nein	2,7 (1,9; 3,4)	<0,001
	Ja	4,8 (3,6; 5,9)	
	Ja -Nein	2,1 (1,1; 3,2)	

6.2.2 AMH in Bezug auf soziodemografische Faktoren

Als soziodemografische Faktoren wurde das fAMH hinsichtlich des Zusammenhangs mit dem Alter und dem BMI der Patientinnen untersucht. Dabei zeigte sich, dass der BMI minimal signifikant positiv mit den fAMH-Werten korreliert ($r = 0,03$, $p < 0,006$). Außerdem wurde ein durchschnittlicher Wert von $23,72 \text{ kg/m}^2$ (95% 22,97, 24,46) ermittelt. Bezüglich des Alters zeigte sich, dass ältere Patientinnen niedrigere fAMH-Werte aufwiesen als jüngere Patientinnen ($r = -0,11$, $p < 0,001$). Das Durchschnittliche Alter betrug 34,28 Jahre (95% CI 33,57, 34,99) (Witzke et al. 2021).

Die genauen Werte sind in der folgenden Abbildung 10 grafisch dargestellt.

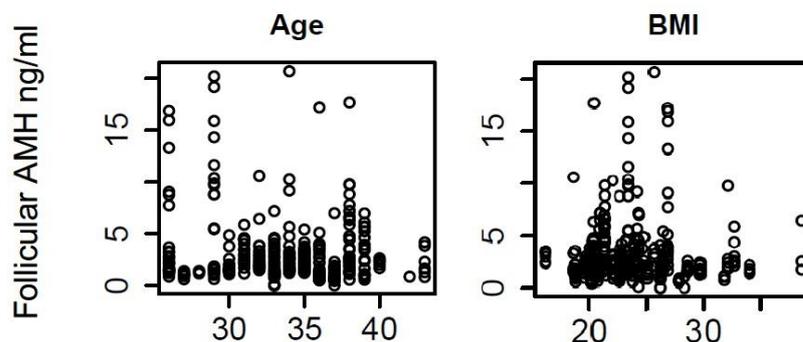


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen fAMH in ng/ml mit den sozioökonomischen Parametern Alter und BMI, Quelle: Eigene Darstellung

6.2.3 AMH in Bezug auf andere Hormone

In der Follikelflüssigkeit können neben dem AMH noch eine Vielzahl anderer Hormone nachgewiesen werden. Die in Tabelle 6 aufgeführten Hormone wurden in der vorliegenden Datenbasis untersucht und in Korrelation zum AMH gesetzt. Besonders auffallend ist hierbei, dass eine negative Korrelation zu Vitamin D, FSH, TSH, Estradiol und Progesteron besteht, während im Zusammenhang mit LH das Gegenteil festzustellen ist. Das bedeutet, dass bei höheren LH-Werten auch höhere AMH-Werte in den Follikeln enthalten sind. Zwischen TSH und AMH konnte eine negative Korrelation gefunden werden (Witzke et al. 2021). Hinsichtlich der Effektstärke ist festzustellen, dass die Korrelation zwischen AMH und FSH sowie AMH und Progesteron besonders bedeutsam ist.

Tabelle 6: Mittelwertkonzentration von AMH, Vitamin D, LH, etc. in Follikelflüssigkeit mit einem CI von 95% und dem Korrelationskoeffizienten (r) zwischen AMH in ng/ml und Vitamin D in ng/ml, FSH in mIU/ml, LH in mIU/ml, TSH in μ IU/ml, Testosteron in ng/ml, Estradiol in pg/ml, Progesteron in ng/ml (Witzke et al. 2021)

Hormon	Mittelwert AMH	Mittelwert des Hormons	r	p
Vitamin D	2,86 (2,48; 3,25)	29,53 (27,80; 31,26)	-0,13 (-0,14; -0,11)	< 0,001
FSH	2,86 (2,47; 3,24)	8,00 (7,18; 8,81)	-0,11(-0,12; -0,09)	< 0,001
LH	2,85 (2,47; 3,24)	1,34 (1,10; 1,59)	0,35 (0,34; 0,37)	< 0,001
TSH	2,86 (2,47; 3,24)	2,14 (1,98; 2,31)	-0,13 (-0,14; -0,11)	< 0,001
Testosteron	2,85 (2,47; 3,24)	6,53 (5,69; 7,37)	-0,07 (-0,09; -0,06)	< 0,001
Estradiol	2,90 (2,52; 3,27)	485675,41 (485675,41; 485675,41)	-0,15 (-0,17; -0,13)	< 0,001
Progesteron	2,92 (2,56; 3,27)	11660,53 (11660,53, 11660,53)	-0,21 (-0,23; -0,20)	< 0,001

6.2.4 AMH in Bezug auf Behandlungsvariablen, Kulturvariablen, IVF, und andere Parameter

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen dem AMH mit verschiedenen Behandlungs-, sowie Kulturvariablen und anderen Parametern untersucht.

In Bezug auf die angewandten Behandlungsprotokolle konnte beispielsweise festgestellt werden, dass der erste gemessene hCG-Wert in mIU/ml (dementsprechend der laborchemische Test um die Schwangerschaft festzustellen) positiv mit dem fAMH-Wert korreliert ($r = 0,17$ (Sd 0,15; 0,20), $p < 0,001$). Ein besonders starker positiver Zusammenhang besteht außerdem zwischen dem letzten gemessenen AMH-Wert vor der Punktion im Serum und fAMH ($r = 0,36$ (Sd 0,34; 0,38), $p < 0,001$) (Witzke et al. 2021). Mit jeweils $r = -0,06$ für Estradiol (Sd -0,08; -0,04, $p < 0,001$) und LH (Sd -0,09; -0,04, $p < 0,001$), welches zum gleichen Zeitpunkt wie das letzte sAMH gemessen wurde, zeigte sich hingegen ein lediglich schwacher signifikanter Zusammenhang. Für den zuletzt gemessenen Progesteronspiegel im Serum konnte auf einem Signifikanzniveau von 5 % kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($r = 0,00$; Sd -0,02; 0,02, $p = 0,988$).

In einem nächsten Schritt wurde analysiert, wie sich der Zusammenhang von fAMH und den verwendeten Stimulationsdosen zeigt. Hierbei konnte ein signifikanter negativer Zusammenhang sowohl für das insgesamt verwendete FSH ($r = -0,11$ (Sd -0,12; -0,09), $p < 0,001$), als auch für hMG ($r = -0,14$ (Sd -0,16; -0,13), $p < 0,001$) festgestellt werden. Das bedeutet, dass je geringer die verwendeten Dosen in der Stimulation waren, desto höher waren die endgültigen fAMH-Werte. Dasselbe gilt auch für die Anzahl der Tage, die insgesamt für die Stimulation benötigt wurden ($r = -0,18$ (Sd -0,20; -0,16), $p < 0,001$). Umgekehrt verhält sich der Zusammenhang zwischen fAMH und der totalen Anzahl an gewonnen Eizellen je Punktion. Die beiden Parameter korrelieren signifikant schwach positiv miteinander ($r = 0,12$ (Sd 0,10; 0,13), $p < 0,001$) (Witzke et al. 2021).

In Bezug auf die durchschnittlich inseminierten und dann tatsächlich befruchteten Eizellen konnte ein signifikant schwach positiver Zusammenhang festgestellt werden ($r = 0,10$ (Sd 0,08; 0,11), $p < 0,001$ und $r = 0,18$ (Sd 0,16; 0,20), $p < 0,001$).

Daraufhin wurden die verschiedenen Kulturvariablen analysiert. In Bezug auf 2PNs bei einer ICSI-Therapie konnte eine signifikant positive Korrelation mit AMH festgestellt werden ($r = 0,18$ (Sd 0,16; 0,20), $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu wurde für die 2PNs nach einer IVF-Behandlung ein signifikant schwach negativer Zusammenhang festgestellt ($r = -0,06$ (Sd -0,08; -0,04), $p < 0,001$). Für Metaphase I bzw. II Stadien konnten folgende Korrelationen mit fAMH erhoben werden: M I $r = -0,04$ (-0,06; -0,02) $p < 0,001$ und M II $r = 0,21$ (0,19; 0,23) $p < 0,001$. Das bedeutet, dass jeweils eine signifikant negative Korrelation zwischen fAMH und M I bzw. M II beschrieben werden kann.

In Bezug auf weitere Faktoren, die über die Meditex- Datenbank erhoben wurden, wie beispielsweise das Vorkommen eines Überstimulationssyndroms, welche Art von Stimulationsprotokoll angewendet wurde oder ob eine IVF oder ICSI durchgeführt wurde, konnte auf einem Signifikanzniveau von 5% leider kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

6.2.5 AMH in Bezug auf andere Hormone in FF und Serum

Des Weiteren wurde die Verbindung zwischen fAMH und sAMH untersucht. Wir beschränkten uns hierbei nicht nur auf das AMH, sondern untersuchten auch weitere Hormone wie beispielsweise Vitamin D, LH, FSH und Testosteron. Auch diese Hormone spielen im Kontext des Zyklus und der ART eine wichtige Rolle. Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Hormonen eine signifikante positive Korrelation. Dies bedeutet, dass höhere Werte in der Follikelflüssigkeit auch mit höheren Werten im Serum einhergehen. Neben dieser schon in der Literatur beschriebenen Aussage in Bezug auf AMH (Schenk et al. 2017), fallen besonders starke positive Korrelationen bei Vitamin D, FSH, LH, TSH und hCG auf.

Die genaue Auflistung der Werte ist in der folgenden Tabelle 7 veranschaulicht. Des Weiteren ist in Abbildung 11 eine Scatterplotmatrix zur besseren grafischen Darstellung dieser Werte abgebildet.

Tabelle 7: Mittelwertkonzentrationen von AMH in ng/ml, Vitamin D in ng/ml, aktives Vitamin D in ng/ml, FSH in mIU/ml, LH in mIU/ml, TSH in μ IU/ml, hCG in mIU/ml, Testosteron in ng/ml, Estradiol in pg/ml, Progesteron in ng/ml und VEGF in ng/ml in Follikelflüssigkeit und Serum mit einem CI von 95% und dem Korrelationskoeffizienten (r) zwischen Serum und Follikelkonzentration.

Hormon	Mittelwert FF	Mittelwert Serum	r	p
AMH	2,84 (2,45; 3,23)	0,79 (0,69; 0,89)	0,42 (0,40; 0,44)	< 0,001
Vitamin D	29,62 (27,90; 31,33)	31,00 (29,15; 32,86)	0,82 (0,81; 0,83)	< 0,001
Aktives Vitamin D	45,51 (42,42; 48,61)	53,53 (50,13; 56,94)	0,44 (0,41; 0,47)	< 0,001
FSH	8,03 (7,22; 8,84)	12,62 (11,44; 13,80)	0,91 (0,91; 0,91)	< 0,001
LH	1,34 (1,10; 1,59)	1,52 (1,26; 1,79)	0,69 (0,68; 0,71)	< 0,001
TSH	2,14 (1,98; 2,31)	2,43 (2,19; 2,68)	0,75 (0,74; 0,76)	< 0,001
hCG	44,26 (39,21; 49,30)	99,30 (90,42; 108,18)	0,75 (0,74; 0,76)	< 0,001
Testosteron	6,52 (5,68; 7,36)	0,57 (0,50; 0,63)	0,38 (0,36; 0,40)	< 0,001
Estradiol	485675,42 (485675,42; 485675,42)	1381,90 (1381,90; 1381,90)	0,24 (0,20; 0,27)	< 0,001
Progesteron	11660,90 (11660,90; 11660,90)	10,86 (8,86; 12,86)	0,34 (0,31; 0,37)	< 0,001
VEGF	4,56 (4,19; 4,92)	0,54 (0,44; 0,64)	0,40 (0,38; 0,43)	< 0,001

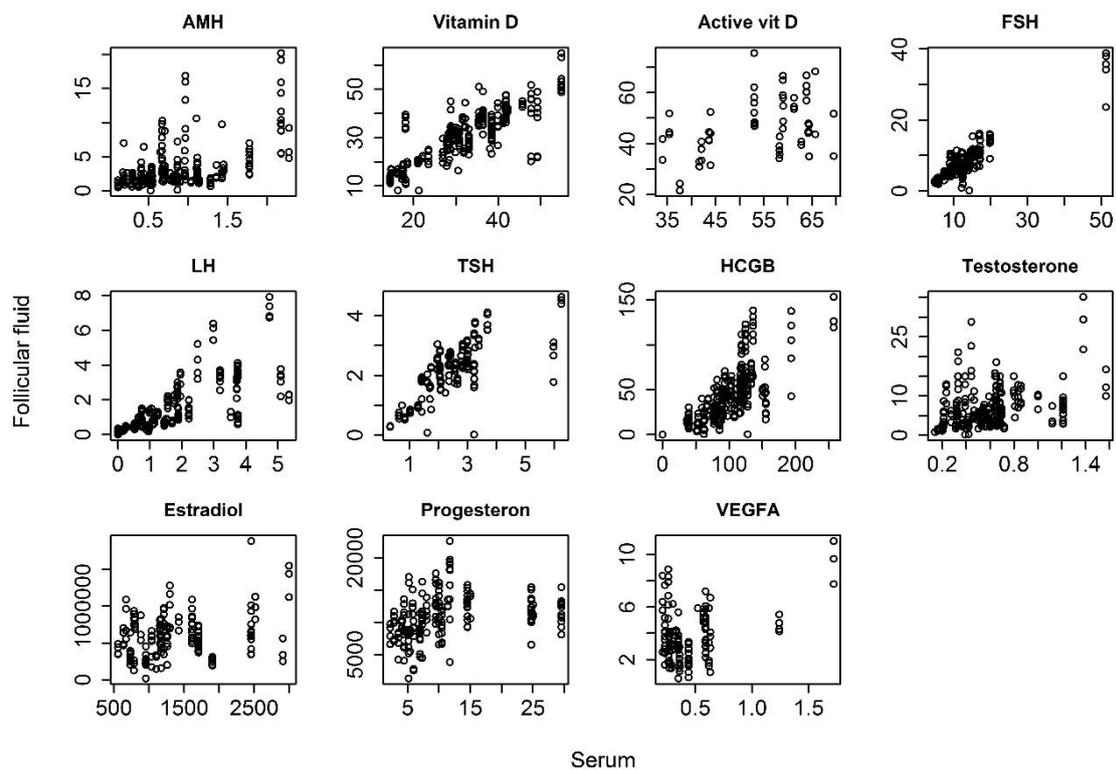


Abbildung 11: Scatterplotmatrix mit den Konzentrationen von AMH und anderen Hormonen im Serum und Follikelflüssigkeit.

7 Diskussion

Betrachtet man zuallererst das Kollektiv der Patientinnen, so konnten wir mit unseren 61 Patientinnen mit einem durchschnittlichen Alter von 34,3 Jahren ein gutes Vergleichskollektiv der Patientinnen in Deutschland abbilden. Das Durchschnittsalter der behandelten Frauen betrug laut Deutschem IVF Register im Jahr 2019 35,6 Jahre (D-I-R 2021). Auch die Indikationen, die in unserem Patientenkollektiv zur ART führten, ähneln den Hauptindikationen in ganz Deutschland. Das Deutsche IVF Register gibt als Indikationen für IVF und ICSI Tubenpathologie, Endometriose, Hyperandrogenämie/PCO, Pathologischer Zyklus, Psychische Faktoren, Alter, sonstige (inklusive uteriner oder zervikaler Faktor), keine Angaben und normal an (D-I-R 2021). Diese entsprechen in großen Teilen den Indikationen unseres Kollektivs (s. Ergebnisteil). Auf Patientinnen mit der Diagnose Endometriose und PCO-Syndrom wurde bei der Auswahl aktiv verzichtet, um sicherzustellen, dass diese Krankheitsbilder die AMH-Werte nicht beeinflussen.

Die Mehrheit der Patientinnen unseres Patientenkollektivs erhielten eine ICSI-Behandlung. Dies ist auch im deutschlandweiten Vergleich der Fall. Hierbei waren es 2020 39,7% ICSI und 16,8% IVF. Dies ist zwar in Bezug auf die ICSI-Behandlung mehr als in unserem Kollektiv, allerdings ist zu berücksichtigen, dass in die deutschlandweite Statistik auch kryokonservierte Eizellen einbezogen wurden (29,5%) (D-I-R 2021).

Für das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft konnten wir mit 54,1% einen höheren Wert als im gesamtdeutschen Durchschnitt erzielen (31,9%). Mit 26,23% Geburtenrate in unserer Studie liegt der Durchschnitt leicht über dem gesamtdeutschen Durchschnitt, der bei 23,3% liegt (D-I-R 2021). Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass unser Kollektiv, wie oben beschreiben, Patientinnen mit Erkrankungen wie beispielsweise PCO und Endometriose nicht berücksichtigt. Dies könnte auch die höhere Rate an klinischen Schwangerschaften und Geburtenrate erklären.

Betrachtet man die Methodik der bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten, die das Anti-Müller-Hormon und dessen Auswirkung auf die ART behandeln, lag der Fokus oft auf den Serumwerten (Melado et al. 20017, van Rooij et al. 2002). Allerdings spiegeln die Follikel als Entstehungsort des AMH die tatsächlichen Werte deutlich besser wider als die im Serum gemessenen Werte. Selbst wenn das fAMH untersucht wurde, wurden in der Mehrzahl der Arbeiten nur gepoolte Werte untersucht (Wunder et al. 2008, Mehta et al. 2013, Bolat et al. 2016). Diese Technik ist zwar leichter und schneller durchzuführen, ergibt aber ein Mischergebnis aus den einzelnen Werten und erlaubt es daher nicht, Rückschlüsse auf den einzelnen Follikel zu ziehen. Daher kann es als Vorteil bewertet werden, dass für die Ergebnisse dieser Arbeit jeder Follikel einzeln punktiert wurde.

Zudem gab es bisher in nur wenigen Arbeiten den Ansatz, einzelne Follikel zu punktieren. Dies wurde allerdings dann mit der Einschränkung durchgeführt, nur den ersten bzw. die ersten beiden dominanten Follikel zu punktieren (Fanchin et al. 2007, Arabzadeh et al. 2010, Walters et al. 2019). Auf diese Weise konnten zwar Rückschlüsse auf den einen einzelnen Follikel gezogen werden, jedoch nur in einer sehr geringen Anzahl und auch nicht annähernd vollständig für die jeweilige Patientin. Somit geht ein Teil der Informationen über die Follikel verloren.

Die Mehrzahl der bisher zu diesem Thema vorgestellten Studien konnten auch nur kleinere Fallzahlen vorweisen (Tramišak et al. 2015, Schenk et al. 2017, Skowrońska et al. 2021). Mit einer Patientinnenzahl von $n = 61$ und daraus resultierend 376 einzelnen Follikeln konnten wir eine stabile Datenbasis generieren (Witzke et al. 2021).

Eines der Hauptziele dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen dem fAMH und dem Durchmesser der einzelnen Follikel (und damit indirekt auf das Volumen) sowie das Vorhandensein einer Eizelle herauszuarbeiten. Darauf basierend soll der Ablauf der ART besser evaluiert werden können und insgesamt eine wissenschaftliche Basis geschaffen werden, um ein besseres Outcome hinsichtlich erfolgreicher künstlicher Befruchtungen zu erzielen.

Durch die vorliegenden Daten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es eine signifikant negative Korrelation zwischen dem Durchmesser der Follikel und dem darin beinhalteten fAMH gibt. Das bedeutet, dass Follikel, die einen größeren Durchmesser haben, nicht automatisch auch mehr fAMH beinhalten, sondern eine niedrigere Konzentration aufweisen. Dieses Ergebnis könnte auf einen Verdünnungseffekt hinweisen. Das bedeutet, dass große und kleine Follikel zwar die gleiche Menge an fAMH produzieren, dann aber die Konzentration in großen Follikeln insgesamt auf Grund des größeren Volumens sinkt (Witzke et al. 2021).

Die Empfehlungen zum Ablauf der ultraschallgesteuerten Eizellentnahme der European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) raten dazu, möglichst alle Follikel zu punktieren und mit dem am nächsten liegenden Ovar und Follikel unabhängig von der Größe zu beginnen (D'Angelo et al. 2019). Auf Grundlage dieser Arbeit kann allerdings die Überlegung angestellt werden, dass auf Grund des Verdünnungseffekts große (und dadurch gut erreichbare) Follikel zuerst punktiert werden können.

Betrachtet man die vorliegende Literatur gibt es nur wenige Studien, die Bezug auf den Follikeldurchmesser und das fAMH nehmen. Frühere Forschungsarbeiten untersuchten nicht stimulierte Follikel von kryokonservierten Ovarien. Dabei wurden bei größerem Durchmesser niedrigere fAMH-Werte gemessen (Yding Andersen et al. 2008). Eine weitere Arbeit von Desforges-Bullet et al. (2010) verglich je einen kleinen mit einem großen

Follikel einer Patientin und kam zu dem Ergebnis, dass kleinere Follikel höhere fAMH-Werte enthielten als große Follikel. Jedoch sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt zu bewerten, da die Follikel im ersten Fall nicht stimuliert waren, also nicht dem Zustand während einer ART entsprechen, und bei der zweiten Studie nur zwei Follikel verglichen wurden. Dies spiegelt beide Male den tatsächlichen Ist-Zustand unter der ART nicht wider.

Etwas später wurde festgestellt, dass wenn man Follikel unterschiedlicher Größe von unterschiedlichen Patientinnen vergleicht, die AMH-Werte bei steigendem Follikeldurchmesser sinken (Bøtkjær et al. 2015). Diese Ergebnisse ähneln zwar den Ergebnissen, die in dieser Arbeit präsentiert werden, allerdings wurden bei Bøtkjær et al. (2015) teilweise kryokonservierte Follikel verwendet und diese direkt mit Follikeln anderer Patientinnen verglichen. Des Weiteren konnte mit n=80 untersuchten Follikeln eher eine kleine Datenbasis generiert werden.

Andere Ergebnisse weisen im Gegensatz zu unseren Ergebnissen auf eine negative Korrelation hin. Allerdings wurde der Follikeldurchmesser hier einerseits mit AMH-Isoformen verglichen und andererseits hatten große Follikel nur einen Durchmesser von 12mm (Mamsen et al. 2021). Diese Einteilung entspricht jedoch nicht dem durchschnittlichen sonografischen Befund bei der Follikelpunktion, da Follikelgrößen von mehr als 12 mm durchaus vorliegen können. Andere Studien gehen eher von einer positiven Korrelation aus (Kedem et al. 2013). Allerdings muss beachtet werden, dass beispielsweise in der Studie von Kedem et al. (2013) eine andere Herangehensweise durchgeführt wurde. Zwar wurden große Follikel über eine IVF-Behandlung gewonnen, kleine und mittlere allerdings über eine IVM-Behandlung. Das bedeutet, dass dabei zwei unterschiedliche Verfahren verwendet wurden, um die jeweiligen fAMH-Werte zu erheben. Diese Diskrepanz macht einen direkten Vergleich der Werte schwierig.

Ein weiteres Verfahren, das bisher verwendet wurde um Follikelflüssigkeit auf AMH zu untersuchen, ist die Verwendung von kryokonservierten Follikeln. Diese stammen aus Ovarien die vorher laparoskopisch entnommen wurden (Kristensen et al. 2019). Auch hier gilt, dass durch die Kryokonservierung möglicherweise keine vergleichbaren Ergebnisse erhoben werden können.

Auch in einer Arbeit von Fanchin et al. (2005) konnte der oben beschriebene Zusammenhang zwischen der Follikelgröße und dem fAMH bestätigt werden. Allerdings gilt auch hier wieder die Einschränkung, dass pro Patientin nur vier Follikel eingeschlossen wurden. Dabei wurden nur zwei große und zwei kleine Follikel miteinander verglichen. In der vorliegenden Arbeit konnten hingegen alle erhobenen Werte durch ein einheitliches Verfahren (IVF oder ICSI) generiert werden. Hierdurch sind die Daten sowohl besser vergleichbar, als auch dem normalen Ablauf der ART entsprechend. Ausgehend von

den bisherigen Überlegungen, dass eine Vergrößerung des folliculären Durchmessers nicht zu einer Erhöhung der fAMH-Produktion führt, können die Daten dies nicht nur mit großer Fallzahl bestätigen, sondern durch eine behandlungsnaher Methodik noch weiter stärken. Das bedeutet einen erstmaligen Zusammenhang der Follikelgröße zum tatsächlichen Ablauf der ART (Witzke et al. 2021).

Eine weitere wichtige Fragestellung dieser Arbeit bezieht sich auf das Vorhandensein einer Eizelle in einem Follikel und dem Zusammenhang mit dem jeweiligen fAMH. Es konnte gezeigt werden, dass Follikel, die eine Eizelle enthalten eine signifikant höhere fAMH-Konzentration aufweisen, als diejenigen ohne Eizelle. Die Mehrzahl der wissenschaftlichen Arbeiten, die bisher zu dieser Frage veröffentlicht wurden, gehen von diesem Zusammenhang aus und können somit durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestärkt werden. Allerdings wurde in den bestehenden Studien entweder der Vergleich zu sAMH und fAMH gezogen (Melado et al. 2017), gepoolte Werte verwendet (Wunder et al. 2008) oder nur einzelne große Follikel ausgewertet (Walters et al. 2019). Es existiert allerdings auch eine Studie, die davon ausgeht, dass die fAMH-Konzentration nicht mit der Entwicklung einer Eizelle korreliert werden kann (Skowrońska et al. 2021). Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch die Anzahl der insgesamt pro Patientin gewonnenen Eizellen vom fAMH abhängig ist. Das bedeutet, dass je höher die fAMH-Werte waren, desto mehr Eizellen wurden insgesamt gewonnen. Der Zusammenhang zwischen einer Eizelle in einem individuellen Follikel mit fAMH geht allerdings noch einen Schritt über die insgesamt Eizellzahl hinaus. Kombiniert man diese Information mit den Ergebnissen bezüglich des Durchmessers, könnte man davon ausgehen, dass große Follikel, die keine höheren fAMH-Werte aufweisen als kleinere Follikel, nicht zwangsläufig auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine Eizelle beinhalten. Daher kann die Überlegung angestellt werden, dass die Reihenfolge, in der die Follikel punktiert werden, in Bezug auf das Vorhandensein einer Eizelle keinen ausschlaggebenden Einfluss hat. Das bedeutet, dass die Chancen, eine Eizelle zu erhalten, unabhängig von der Follikelgröße sein könnten und man hinsichtlich des Ablaufs der ART auf diesen Faktor keine Rücksicht nehmen müsste (Witzke et al. 2021).

Weitere Parameter, die routinemäßig im Rahmen der ART erhoben werden, sind sozioökonomische Faktoren, wie beispielsweise das Alter der Patientinnen und deren BMI. Da diese Parameter nichtinvasiv und ohne Aufwand in jedem Behandlungszyklus erhoben werden können, eignen sie sich sehr gut zur Auswertung (Witzke et al. 2021). Somit ergibt sich, im Vergleich zu z. B. aufwendigeren Hormonbestimmungen im Labor, ein einfacher Zugang zu den Auswertungsmöglichkeiten der ART. Außerdem wurden in

diese Studie nur "gesunde" Patientinnen aufgenommen, um den Einfluss von Krankheiten wie PCO oder Endometriose auf das Ergebnis zu minimieren.

In Bezug auf das Alter der Patientinnen konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Alter die fAMH-Werte sinken. Diese Erkenntnis unterstützt bereits vorliegenden Ergebnissen die Aussagen, dass nicht nur sAMH mit höherem Alter sinkt, sondern auch fAMH (Schenk et al. 2017, Kedem et al. 2014).

Ein weiterer soziodemografischer Faktor ist der BMI. Da sich der BMI aus Gewicht und Größe zusammensetzt, können indirekt auch Rückschlüsse über das Gewicht der Patientin gezogen werden. Über den Zusammenhang zwischen dem BMI und fAMH ist in der bestehenden Literatur wenig bekannt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde der Zusammenhang zwischen dem BMI und sAMH untersucht. Doch die Ergebnisse waren nicht eindeutig. In der linearen Regression wurde kein Zusammenhang der beiden Parameter festgestellt, in der Quantilsregression jedoch ein negativer Zusammenhang (Lim et al. 2021). Wir konnten mit einer großen Fallzahl zeigen, dass lediglich eine schwach signifikant positive Korrelation nachzuweisen ist. Dies ist eine interessante Feststellung, wenn man bedenkt, dass ein erhöhter BMI als limitierender Faktor für Fertilität gilt (Leidenberger et al. 2014). Die Tatsache, dass der BMI keinen Einfluss auf das fAMH hat, könnte darauf hinweisen, dass das Gewicht die Fertilität nicht direkt über den Follikel, sondern über andere Prozesse beeinflussen könnte. Weitere Studien (z.B. über den Zusammenhang anderer Hormone mit dem BMI) werden notwendig sein, um den Zusammenhang zu klären (Witzke et al. 2021).

Da im folliculären Milieu neben AMH eine Vielzahl an weiteren Hormonen zu finden ist, erscheint es sehr sinnvoll und interessant, diese auch im Kontext mit AMH zu untersuchen. Bisher sind die Zusammenhänge in der Follikelflüssigkeit nicht gänzlich untersucht und verstanden worden. In dieser Arbeit konnten negative Korrelationen zwischen AMH und Vitamin D, FSH, TSH, Estradiol und Progesteron sowie eine positive Korrelation zu LH festgestellt werden.

Bisher existieren in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Es wird einerseits davon ausgegangen, dass es keinen (Kristensen et al. 2019), aber auch andererseits einen positiven (Wolff et al. 2017) Zusammenhang zwischen Testosteron und eine negative (Fanchin et al. 2007/ Kristensen et al. 2019), bzw. keine Korrelation zu Estradiol existiert (Wolff et al. 2017). Das bedeutet, dass die hier vorliegenden Ergebnisse dies unterstützen, wenn auch einschränkend angemerkt werden muss, dass es sich jeweils um eine schwache Korrelation handelt. Andererseits existieren auch Arbeiten, die davon ausgehen, dass es eine positive Korrelation zwischen AMH und Testosteron, sowie keine Kor-

relation mit Estradiol besteht. Hierbei wurden die Follikel allerdings nicht im Zusammenhang einer typischen ART-Behandlung, sondern im Zusammenhang eines „Natural Cycles“ und somit mit nur einem Follikel der jeweiligen Patientin untersucht (Wolff et al. 2017).

Einen besonders signifikant starken positiven Zusammenhang konnte zwischen AMH und LH festgestellt werden. Umgekehrt existiert eine negative Korrelation zwischen AMH und Vitamin D, wenn auch diese in diesem Zusammenhang eher schwach ausfällt. In beiden Fällen konnte damit die bisher in der Literatur vorhandene spärliche Datengrundlage gefestigt und bestätigt werden (Merhi et al. 2014, Wolff et al. 2017, Bednarska et al. 2019, Skowrońska et al. 2021).

Obwohl diese Arbeit die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Hormonen und AMH weiter beleuchten konnte, sollte darüber hinaus weitergehende Forschung betrieben werden. So sollte beispielsweise der Einfluss der Hormone in der Follikelflüssigkeit auf verschiedene Ergebnisse der ART, wie z. B. die Embryoqualität oder die Schwangerschaftsrate, in ergänzenden Studien untersucht werden.

Im nächsten Schritt soll der Zusammenhang zwischen AMH und Behandlungsprotokollen, Behandlungsvariablen, Kulturvariablen, IVF, etc. diskutiert werden.

Ein sehr entscheidender Wert im Rahmen der ART stellt das zuerst gemessene hCG dar. Darüber kann laborchemisch ein erfolgreicher Embryonentransfer festgestellt werden. In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass zwischen diesem Wert und fAMH eine positive Korrelation besteht. Die bisherige Studienlage zu diesem Wert liefert unterschiedliche Ergebnisse. Follikuläres AMH wurde bereits als Prädiktor für das Auftreten einer klinischen Schwangerschaft und die Anzahl der Lebendgeburtenrate nach einem Single Embryotransfer beschrieben (Capkın et al. 2012/ Ciepiela et al. 2019). Außerdem kann auf Basis von Untersuchungen an Natural Cycle IVF-Behandlungen davon ausgegangen werden, dass höhere fAMH-Konzentrationen mit einer höheren klinischen Schwangerschaftsrate assoziiert sind (Wolff et al. 2021). Andererseits konnte in anderen Studien keine Korrelation zwischen fAMH und der Schwangerschaftsrate bzw. klinischer Schwangerschaft festgestellt werden (Bastu et al. 2015/ Li et al. 2015).

Da unsere Ergebnisse eher darauf hindeuten, dass fAMH auf das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft hinweisen kann, bestätigt sich erneut, die Relevanz dieses Markers für die klinische Praxis der ART. In weiteren Studien muss untersucht werden, ob dementsprechend eine Präferenz der einzelnen Follikel anhand des fAMH möglich und sinnvoll ist. Somit können die Ergebnisse indirekt die These unterstützen, dass fAMH als Marker für das Ergebnis der ART dienen kann (Witzke et al. 2021).

Durch die Meditex- Datenbank wurden auch Parameter wie beispielsweise die verwendeten Stimulationsdosen oder die Anzahl der Tage, die für die Stimulation benötigt wurden, erfasst. Eine bisher vorliegende Studie zeigte, dass dies bei einer insgesamt geringeren Dosis an verwendeten Gonadotropinen, die zur Stimulation verwendet wurden, sowie einem kürzeren Stimulationsintervall nicht zu einer niedrigeren Schwangerschaftsrate führt (Hohmann et al. 2003). Außerdem ist bekannt, dass im folliculären Milieu die gesamte antioxidative Kapazität in der Follikelflüssigkeit geringer ist, wenn eine geringe Dosis an Gonadotropinen zur Stimulation verwendet wurde (Aydogan et al. 2018).

Für die Parameter verwendete Stimulationsdosen und die Anzahl der Tage, die für die Stimulation benötigt wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine negative Korrelation zu fAMH festgestellt werden. Diese Erkenntnis könnte natürlich auch mit der Überlegung zusammenhängen, dass hohe fAMH-Werte in der Follikelflüssigkeit das Vorhandensein vieler Follikel gleichzeitig bedeutet und damit voraussetzt, dass dadurch niedrigere FSH- und hMG-Dosen für die Stimulation verwendet werden müssen. Kombiniert man diese Erkenntnisse mit den bisher Vorhandenen, kann diskutiert werden, inwiefern fAMH auch als Marker für die Schwangerschaftsrate dienen kann. Wenn man davon ausgeht, dass hohe fAMH-Werte in der Follikelflüssigkeit bei niedrigen Stimulationsdosen mit FSH und hMG vorkommen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass eine Schwangerschaftsrate dadurch nicht eingeschränkt ist. Da in dieser Arbeit der direkte Zusammenhang zur Schwangerschaftsrate nicht abgebildet werden konnte, wird es notwendig sein, durch weitere Studien diesen Zusammenhang sicher zu klären (Witzke et al. 2021).

Ein weiterer Aspekt, der untersucht wurde, sind Kulturvariablen, wie das Vorkommen von 2 PNs (Vorkernstadium) jeweils für die IVF bzw. ICSI-Therapie, als unterschiedliche Behandlungsformen. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen fAMH und ICSI, jedoch eine negative Korrelation zu IVF. Der Unterschied könnte hierbei in dem unterschiedlichen technischen Vorgehen der beiden Therapieformen begründet sein. Bei einer ICSI-Behandlung wird das Spermium direkt in die Eizelle injiziert, während bei einer IVF-Behandlung die beiden Elemente nur zusammengebracht werden. Allerdings muss beachtet werden, dass die Korrelation für IVF zwar statistisch signifikant, aber mit $r = -0,06$ eher schwach ist. Des Weiteren kommt hinzu, dass in der vorliegenden Arbeit die Fallzahl von IVF-Behandlungen deutlich geringer war als von ICSI-Behandlungen. Daher sollte, um diese Zusammenhänge sicher zu klären, eine erneute Durchführung der Messungen mit einer ausgewogenen Fallzahl hinsichtlich beider Verfahren erfolgen.

Leider waren die Ergebnisse, die den Zusammenhang zwischen fAMH und dem Vorkommen eines Überstimulationssyndroms bzw. dem angewendeten Stimulationsprotokoll, auf einem Signifikanzniveau von 5% nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich zur Auswertung der Informationen aus der Meditex-Datenbank sagen, dass diese einfach und ohne Aufwand über die Meditex-Datenbank erhoben werden können. Dies macht sie für eine Auswertung sehr interessant. Über diese Parameter eine valide Aussage zu treffen, wäre sehr wichtig, da dies eine direkte Relevanz für die tägliche Praxis bedeuten könnte. Im Vergleich zu anderen Studien, die zu dem Thema Follikelflüssigkeit und AMH schon vorliegen, weist die hier vorliegende Arbeit zwar eine verhältnismäßig große Fallzahl auf, für die Zukunft wäre es aber wichtig, gegebenenfalls mit noch breiterer Datenbasis Aussagen über die oben genannten Parameter zu treffen.

Besonders interessant ist auch die Frage, ob zwischen fAMH und der insgesamten Anzahl an Eizellen eine Verbindung besteht. Die Auswirkung auf den aktuellen bzw. ersten Zyklus der künstlichen Befruchtung erscheint zwar eher gering, allerdings kann nach einer erfolglosen Behandlung gegebenenfalls auf kryokonservierte Eizellen aus der Follikelpunktion zurückgegriffen werden. Dies ist allerdings nur möglich, wenn eine ausreichende Anzahl an Eizellen gewonnen und kryokonserviert werden konnte. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass je höher das gemessene fAMH ist, auch die Anzahl an gewonnenen Eizellen steigt (Witzke et al. 2021). Diese Ergebnisse können den bisherigen Stand der Wissenschaft komplementieren. Der Zusammenhang wurde bisher schon zwischen fAMH und sAMH (Walters et. al 2019/ Bolat et. al 2016) sowie zwischen fAMH von PCO-Patientinnen festgestellt (Yilmaz et. al 2012). Dasselbe gilt auch für eine Studie von Wunder et al. (2008). Hierbei wurden allerdings gepoolte Werte für die Follikelflüssigkeit verwendet.

Abschließend soll es zu einer Betrachtung und Diskussion von AMH und anderen Hormonen in der Follikelflüssigkeit und im Serum kommen. Ein besonders starker positiver Zusammenhang kann durch diese Arbeit zwischen dem letzten gemessenen AMH-Wert vor der Punktion im Serum und fAMH festgestellt werden. Dieser Zusammenhang war in der bisher vorliegenden Literatur schon beschrieben worden (Schenk et al. 2017). Allerdings gilt auch hier, dass dieser Zusammenhang bisher nur mit geringen Fallzahlen festgestellt werden konnte. Daher können die hier vorliegenden Ergebnisse den bisherigen Stand der Wissenschaft stützen und ergänzen. Für diese Arbeit wurden im Gegensatz dazu alle auswertbaren aspirierten Follikel einer Patientin verwendet und somit eine insgesamt große Fallzahl generiert. Dadurch ist es möglich, eine Aussage über den gesamten Follikelpool der Patientinnen machen zu können (Witzke et al. 2021). Des Weiteren erscheint die Tatsache, dass der durchschnittliche AMH-Wert im Serum niedriger ist als in der Follikelflüssigkeit, plausibel. Dies könnte darin begründet sein, dass die

Follikel auch der Produktionsort von AMH sind und erst von dort aus nach peripher gelangen, wo es dann im Serum in niedriger Konzentration gemessen werden kann.

Abschließend können noch die weiteren Korrelationen zwischen fAMH und anderen Hormonen im Serum betrachtet werden. Hierbei fällt auf, dass diese für jedes Hormon positiv sind. Dementsprechend gehen also höhere fAMH-Werte auch mit höheren Werten aller untersuchten Hormone im Serum einher. Besonders bemerkenswert sind hierbei die Korrelationen zu Vitamin D und FSH, da diese besonders stark sind. Dieser Zusammenhang könnte darauf zurückzuführen sein, dass die untersuchten Hormone jeweils eine Rolle im Rahmen der Befruchtung spielen und sich daher gegebenenfalls auch gegenseitig beeinflussen könnten.

Für den Vergleich Vitamin D und FSH im Serum mit der Follikelflüssigkeit gilt, gegensätzlich zu sAMH, dass die Werte jeweils im Serum höher sind als in der Follikelflüssigkeit. Dies könnte im Umkehrschluss damit begründet sein, dass die genannten Hormone nicht im Follikel, sondern an anderen Orten im Körper synthetisiert werden und daher im Serum durchschnittlich höher gemessen werden können (Kirsch et al. 2017/ Pape et al. 2019).

Die hier vorgelegten wissenschaftlichen Daten über die Follikelflüssigkeit wurden im Vergleich zu anderen Studien mit einer großen Fallzahl generiert. Außerdem konnte jeder Follikel einzeln untersucht und somit ein direkter Rückschluss auf den Durchmesser und das Vorhandensein einer Eizelle gezogen werden und eine Verwendung von gepoolten Werten vermieden werden.

Jedoch gibt es Einschränkungen, die abschließend diskutiert werden müssen. Basierend auf den vorliegenden Daten ist es beispielsweise nicht möglich, einen direkten Zusammenhang von den jeweiligen Follikeln auf eine mögliche befruchtete Eizelle bzw., ob es überhaupt zu einer Schwangerschaft oder Lebendgeburt durch diese Eizelle gekommen ist, zu ziehen. Solche Rückschlüsse mit einer statistischen Genauigkeit zu ermitteln würde allerdings bedeuten, dass der Ablauf der ART nach der Follikelpunktion stark verändert werden müsste. So werden normalerweise mehrere der per IVF oder ICSI befruchteten Eizellen gesammelt inkubiert und somit ist eine nachträgliche Unterscheidung bzw. Zuordnung nicht möglich. Das bedeutet, dass in diesem Fall die Daten nur auf „Populations Ebene“ vorhanden sind. In anderen Fällen, z. B. zwischen zwei Follikelparametern oder beim Vergleich zwischen Follikelflüssigkeit und Serum, können die Werte „eins-zu-eins“ abgeglichen werden.

Eine direkte Zuordnung in allen Fällen wäre nur durch einen extrem hohen organisatorischen Aufwand zu bewältigen, der insgesamt eine Verlängerung des Prozesses bedingen würde. Um allerdings zu gewährleisten, dass es auf keinen Fall zu Verzögerungen

und somit zu einem potentiell schlechteren Outcome für die Patientinnen kommt, kann diese Verlängerung des Ablaufs aus ethischen Gründen nicht toleriert werden. Die Erkenntnis über die Schwangerschaftsrate in Zuordnung mit dem jeweiligen Follikel wäre im Hinblick auf die Verbesserung des ART-Ablaufes jedoch sehr interessant und wichtig und sollte in weiteren wissenschaftlichen Studien untersucht werden. Eine Möglichkeit sich dieser Fragestellung zu nähern, könnte die Untersuchung von Single Embryotransfers oder Natural Cycle IVF sein.

Als weitere Limitation der Studie muss genannt werden, dass gegebenenfalls eine Ungenauigkeit bei der Größenmessung der Follikel entstehen kann. Um den Durchmesser der Follikel zu bestimmen, wurden die Werte während der Follikelpunktion gemessen. Hierfür wurden die Durchmesser vom Untersucher sonographisch geschätzt und nicht millimetergenau in mehreren Ebenen gemessen. Um diese Ungenauigkeit zu reduzieren erfolgte eine Unterteilung der Follikel in zwei Gruppen (große und kleine Follikel). Außerdem wurde die Menge an Follikelflüssigkeit je Follikel nach der Eizellentnahme in Millilitern erfasst.

Durch die für diese Arbeit verwendete Methodik konnte gewährleistet werden, dass der normale Ablauf der ART unbeeinflusst blieb und somit auch die AMH-Werte nicht verfälscht wurden. Außerdem muss auch in diesem Punkt berücksichtigt werden, dass eine noch genauere Bestimmung der Follikeldurchmesser gegebenenfalls eine verlängerte Punktionszeit bedingt und damit eine vermehrte Belastung für die Patientin auftreten könnte. Des Weiteren sollte laut den aktuellen ESHRE Empfehlungen Mehrfachpunktionen und Seitwärtsbewegungen mit der Nadel im Ovar vermieden werden, um das Komplikationsrisiko für beispielsweise Blutungen zu senken (D'Angelo et al. 2019).

Auch ist anzusprechen, dass es technisch nicht möglich ist, eine Vermischung der einzelnen Follikelflüssigkeiten zu 100% zu vermeiden. Die Follikelflüssigkeit wurde, nachdem ein Follikel punktiert war vollständig aus dem Schlauchsystem abgelassen und auch nach jeder Follikelpunktion vollständig entleert. Damit kann eine Vermischung zwar minimiert werden, um allerdings eine 100%ige Trennung zu ermöglichen, würde der Ablauf der ART wieder verlängert werden müssen. (Witzke et al. 2021)

Abschließend kann insgesamt jedoch festgehalten werden, dass die „Standard Operating Procedures“ (SOP) der ART zur Erhebung der Werte nicht verändert wurden. Dementsprechend bieten die Daten dieser Studie einen neuen Blickwinkel, vor allem auf den Zusammenhang zwischen dem fAMH und dem Follikeldurchmesser bzw. das Vorhandensein einer Eizelle. Dementsprechend kann der aktuelle Stand der Wissenschaft durch diese Arbeit gefestigt und erweitert werden. Hierdurch soll langfristig die ART ver-

bessert werden. Dennoch ist es zukünftig wichtig, Fragestellungen zum direkten Zusammenhang zwischen einzelnen Follikeln und dem Eintreten einer Schwangerschaft zu klären. Nur so wird es möglich sein, den Ablauf der ART weiter zu verbessern und somit den Paaren, die eine künstliche Befruchtung in Anspruch nehmen müssen, noch bessere Chancen auf die Erfüllung des Kinderwunsches zu ermöglichen.

8 Zusammenfassung

Die Hauptfragen, die diese Arbeit beantworten sollte, bezogen sich auf den Zusammenhang des follikulären Anti-Müller-Hormon (AMH) mit dem Follikeldurchmesser, das Vorhandensein einer Eizelle und anderen Hormonen und Vitaminen. Dadurch soll es langfristig möglich sein, neue Erkenntnisse zu gewinnen, die zum besseren Verständnis der Eizellreifung etc. beitragen können.

Die bisherige Forschung zum follikulärem AMH (fAMH) konnte bereits Hinweise darauf liefern, dass es einen Zusammenhang zwischen dem fAMH und dem Follikeldurchmesser bzw. dem Vorhandensein einer Eizelle gibt (beispielsweise Desforgues-Bullet et al. 2010, Kedem et al. 2013, Mamsen et al. 2021). Die entsprechende Forschung bezog sich dabei jedoch auf geringe Fallzahlen, auf die Untersuchung von kryokonservierten oder durch In-vitro-Maturation (IVM) gewonnene Follikel oder auf den Vergleich mit einem dominanten Follikel.

In dieser Arbeit konnte basierend auf einem großen Datensatz die Follikelflüssigkeit einer Mehrzahl von Follikeln der jeweiligen Patientin untersucht werden, ohne den normalen Ablauf der ART zu verändern.

Zusammenfassend lässt sich dabei festhalten, dass bezüglich des Follikeldurchmessers und fAMH eine signifikant negative Korrelation besteht (1 ng/ml weniger je größer der Durchmesser, $p < 0,001$). Daraus kann abgeleitet werden, dass die Granulosazellen der großen Follikel nicht unbedingt mehr AMH produzieren als kleine Follikel. Dementsprechend beinhalten kleine Follikel eine signifikant höhere Konzentration von AMH als große Follikel.

Im Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer Eizelle konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein einer Eizelle signifikant mit dem AMH-Spiegel verbunden ist (mittlerer Durchschnitt 2,1 ng/ml, $p < 0,001$). Hohe follikuläre AMH-Werte können demnach eher in Follikeln gemessen werden, die eine Eizelle aufweisen.

Des Weiteren konnten neue Erkenntnisse gewonnen und bisher bestehende Kenntnisse zwischen fAMH, Steroidhormonen, Vitamin D, sozioökonomischen Parametern und verschiedenen Behandlungsvariablen gefestigt werden.

Es zeigte sich, dass zwischen dem fAMH und dem Alter der Patientinnen eine schwache, aber signifikant negative Verbindung besteht ($r = -0,11$, $p < 0,001$). Das bedeutet, dass die Follikel von älteren Patientinnen niedrigere fAMH-Werte aufweisen als bei jüngeren Patientinnen.

Zwischen fAMH und dem Body-Mass-Index (BMI) der Patientinnen wurde lediglich eine leicht signifikant positive Korrelation hergestellt ($r = 0,03$, $p < 0,006$). Zwischen fAMH und Vitamin D ($r = -0,13$, $p < 0,001$). bzw. Progesteron ($r = -0,21$, $p < 0,001$) konnte eine

negative Korrelation festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass zwischen fAMH und dem luteinisierenden Hormon (LH) eine signifikant positive Korrelation besteht ($r = 0,35$, $p < 0,001$).

Durch diese Arbeit konnte ein ganzheitliches Bild der Follikel wiedergegeben werden, da fast alle Follikel der jeweiligen Patientin in die Auswertung aufgenommen wurden. Daher konnte erstmals jeder Follikel einzeln und vergleichbar auf die oben genannten Parameter untersucht werden. Denn bisher spiegelten die vorhandenen Ergebnisse immer nur Teilaspekte der ART wider (Kryokonservierung, IVM, einzelne Follikel, dominanter Follikel etc.). Die grundsätzlich geltenden „Standard Operating Procedures“ (SOPs) wurden dementsprechend für diese Arbeit nicht verändert. Die dadurch gewonnen Erkenntnisse liefern grundlegende Informationen über die Rolle des AMH in der ART, besonders in Bezug auf die Follikelflüssigkeit. Der aktuelle Stand der Wissenschaft zu diesem Thema wird demnach ergänzt. Das neugewonnene Wissen unterstützt folglich die zukünftige Weiterentwicklung und Verbesserung der Reproduktionsmedizin.

Weitere Forschungen, z. B. zur Wirkung von AMH auf die Befruchtungsrates und Eizellentwicklung, sind notwendig, um die assistierte Reproduktionstechnologie in Zukunft weiter zu verbessern.

Summary

The main questions to be answered by this work were related to the relationship of follicular anti-Müllerian hormone (AMH) with follicular diameter, the presence of an oocyte and other hormones and vitamins. In the long term, this should make it possible to gain new insights that can contribute to a better understanding of oocyte maturation, etc.

Previous research on follicular AMH (fAMH) has already provided evidence that there is a relationship between fAMH and follicular diameter or the presence of an oocyte (see, for example, Desforges-Bullet et al. 2010, Kedem et al. 2013, Mamsen et al. 2021). However, this has only ever been done on the basis of small numbers of cases, by studying cryopreserved follicles or follicles obtained by in vitro maturation (IVM), or by comparison with a dominant follicle.

In this work, based on a large data set, it was possible to examine the follicular fluid of a majority of follicles of the respective patients without changing the normal course of ART. In conclusion, there is a significant negative correlation between follicular diameter and fAMH (1 ng/ml less the larger the diameter, $p < 0.001$). It can be inferred that granulosa cells of large follicles do not necessarily produce more AMH than small follicles. Accordingly, small follicles contain a significantly higher concentration of AMH than large follicles.

In relation to the presence of an oocyte, the presence of an oocyte was shown to be significantly associated with AMH levels (mean average 2.1 ng/ml, $p < 0.001$). High follicular AMH levels may be more likely to be measured in follicles that have an oocyte. Furthermore, new insights were gained and previously existing knowledge between fAMH, steroid hormones, vitamin D, socioeconomic parameters and various treatment variables was consolidated.

It was found that there was a weak but significant negative association between fAMH and patient age ($r = -0.11$, $p < 0.001$). This means that the follicles of older patients have lower fAMH levels than those of younger patients.

Only a minimally significant positive correlation was established between fAMH and patient body mass index (BMI) ($r = 0.03$, $p < 0.006$). A negative correlation was found between fAMH and vitamin D ($r = -0.13$, $p < 0.001$). or progesterone ($r = -0.21$, $p < 0.001$). In contrast, fAMH and luteinizing hormone (LH) were shown to have a significant positive correlation ($r = 0.35$, $p < 0.001$).

This work made it possible to reflect a holistic picture of the follicles, since almost all follicles of each patient were included in the evaluation. Therefore, for the first time, each follicle could be examined individually and comparably for the above-mentioned parameters. Until now, the available results only reflected partial aspects of ART (cryopreservation, IVM, single follicle, dominant follicle, etc.). Accordingly, the basically applicable "Standard Operating Procedures" (SOPs) were not changed for this work. The findings thus gained provides basic information on the role of AMH in ART, especially in relation to follicular fluid. This can add to the current state of science on this topic. Thus, this knowledge may be useful for future development and improvement of reproductive medicine.

Further research, e.g. on the effect of AMH on fertilization rate and oocyte development, is necessary to further improve assisted reproductive technology in the future.

9 Literaturverzeichnis

- Al-Hasani, S., & Diedrich, K. (2019). *Bewertung der Qualität menschlicher Oozyten und Embryonen*. In: *Diedrich K., Ludwig M., Griesinger G. (eds) Reproduktionsmedizin*. Berlin, Heidelberg. : Springer Reference Medizin. . doi:10.1007/978-3-662-55601-6_23-1
- Arabzadeh, S., Hossein, G., Rashidi, B. H., Hosseini, M. A., & Zeraati, H. (2010). Comparing serum basal and follicular fluid levels of anti-Müllerian hormone as a predictor of in vitro fertilization outcomes in patients with and without polycystic ovary syndrome. *Annals of Saudi medicine*, 30(6), S. 442–447. doi:10.4103/0256-4947.71063
- Aydogan Mathyk, B., Aslan Cetin, B., Vardagli, D., Zengin, E., Sofiyeva, N., Irez, T., & Ocal, P. (2018). Comparison of antagonist mild and long agonist protocols in terms of follicular fluid total antioxidant capacity. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 57(2), 194–199. doi:10.1016/j.tjog.2018.02.005
- Bastu, E., Gokulu, S. G., Dural, O., Yasa, C., Bulgurcuoglu, S., Karamustafaoglu Balci, B., . . . Buyru, F. (2015). The association between follicular fluid levels of cathepsin B, relaxin or AMH with clinical pregnancy rates in infertile patients. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 187, 30–34. doi:10.1016/j.ejogrb.2015.02.009
- Basuino, L., & Silveira, C. F. (2016). Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA assisted reproduction*, 1(20), 38–40. doi:10.5935/1518-0557.20160009
- Bednarska-Czerwińska, A., Olszak-Wąsik, K., Olejek, A., Czerwiński, M., & Tukiendorf, A. A. (2019). Vitamin D and Anti-Müllerian Hormone Levels in Infertility Treatment: The Change-Point Problem. *Nutrients*, 11(5), 1053. doi:10.3390/nu11051053
- Beyer, D. A., Griesinger, G., Diedrich, K., & Schulze-Mosgau, A. (2011). Vitrifikation von Eizellen und Eizellen im Pronukleusstadium. *Gynäkologe (Der Gynäkologe)*, 44(2), 122–127. doi:10.1007/s00129-010-2688-0
- Bolat, S. E., Ozdemirci, S., Kasapoglu, T., Duran, B., Goktas, L., & Karahanoglu, E. (2016). The effect of serum and follicular fluid anti-Mullerian hormone level on the number of oocytes retrieved and rate of fertilization and clinical pregnancy. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 90–96. doi:10.14744/nci.2016.02418
- Bøtkjær, J. A., Jeppesen, J. V., Wissing, M. L., Kløverpris, S., Oxvig, C., Mason, J. I., . . . Andersen, C. Y. (2015). Pregnancy-associated plasma protein A in human

- ovarian follicles and its association with intrafollicular hormone levels. *Fertility and sterility*, 104(5), 1294-301. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.07.1152
- Buhling, K. J., Stute, P., & Ziller, V. (2013). Anti-Mullerian Hormone: Usefulness in Clinical Practice. *International Journal of Endocrinology*. doi:10.1155/2013/791386
- Capkın, S. İ., Ozyer, S., Karayağın, R., Moraloğlu, O., Özcan, S., & Uğur, M. (2012). Serum and follicular fluid Anti-Mullerian hormone concentrations at the time of follicle puncture and reproductive outcome. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 13(1), 21–26. doi:10.5152/jtgga.2011.71
- Cate, R. L., Mattaliano, R. J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N. M., Cheung, A., . . . MacLa. (1986). Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, 45(5), 685–698. doi:10.1016/0092-8674(86)90783-X
- Chen, Y.-P., Wu, W.-H., Wu, H.-M., Chen, C.-K., Wang, H.-S., & Huang, H.-Y. (2014). Effects of anti-Müllerian hormone and follicle stimulating hormone levels on in vitro fertilization pregnancy rate. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 53(3), 313–316. doi:10.1016/j.tjog.2013.06.012
- Ciepiela, P., Dulęba, A. J., Kario, A., Chełstowski, K., Branecka-Woźniak, D., & Kurzawa, R. (2019). Oocyte matched follicular fluid anti-Müllerian hormone is an excellent predictor of live birth after fresh single embryo transfer. *Human reproduction (Oxford, England)*, 34(11), 2244–2253. doi:10.1093/humrep/dez186
- Cohen-Haguenaer, O., Picard, J. Y., Mattéi, M. G., Serero, S., Nguyen, V. C., Tand, M. F., . . . Frézal, J. (1987). Mapping of the gene for anti-müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenetics and cell genetics*, 44(1), 2–6. doi:10.1159/000132332
- Cordes, T. (2019). Endokrine Kontrolle der Ovarfunktion. In L. M. Diedrich K., *Reproduktionsmedizin* (S. 1–16). Berlin, Heidelberg. : Springer Reference Medizin. . doi:10.1007/978-3-662-55601-6_3-1
- D·I·R®, D. I.-R. (2005). D·I·R Jahrbuch 2004. (J. R. Endokrinologie, Hrsg.) 9, 32. Abgerufen am 03. 08. 2022 von <https://www.deutsches-ivf-register.de/jahrbuch-archiv.php>
- D·I·R®, D. I.-R. (2019). D·I·R Jahrbuch 2018. (J. R. Endokrinologie, Hrsg.) 16(6). Abgerufen am 03. 08. 2022 von <https://www.deutsches-ivf-register.de/jahrbuch-archiv.php>
- D·I·R®, D. I.-R. (2021). D·I·R Jahrbuch 2020. (J. R. Endokrinologie, Hrsg.) 18(5). Abgerufen am 03. 08. 2022 von <https://www.deutsches-ivf-register.de/jahrbuch-archiv.php>

- D'Angelo, A., Panayotidis, C., Amso, N., Marci, R., Matorras, R., Onofriescu, M., . . . Vlaisavljevic, V. (2019). Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up†. *Human reproduction open*, 2019(4). doi:10.1093/hropen/hoz025
- Desforgues-Bullet, V., Gallo, C., Lefebvre, C., Pigny, P., Dewailly, D., & Catteau-Jonard, S. (2010). Increased anti-Müllerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 94(1), 198–204. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.03.004
- Dewailly, D., Andersen, C. Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., . . . Anderso. (2014). The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Human reproduction update*, 20(3), 370–385. doi:10.1093/humupd/dmt062
- Di Clemente, N., Jamin, S. P., Lugovskoy, A., Carmillo, P., Ehrenfels, C., Picard, J.-Y., . . . Cate, R. L. (2010). Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(11), 2193–2206. doi:10.1210/me.2010-0273
- Diedrich, K., Ludwig, M., & Griesinger, G. (2013). *Reproduktionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-30181-0
- Ebner, T., & Diedrich, K. (2018). *In-vitro-Fertilisation und intrazytoplasmatische Spermieninjektion*. In: *Diedrich K., Ludwig M., Griesinger G. (eds) Reproduktionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin. doi:10.1007/978-3-662-55601-6_22-1
- Elecsys AMH Plus*. (06. 11. 2022). Abgerufen am 01. 01. 2022 von <http://193.191.178.147> › AMH plus-3-e8-201803
- Fanchin, R., Louafi, N., Méndez Lozano, D. H., Frydman, N., Frydman, R., & Taieb, J. (2005). Per-follicle measurements indicate that anti-müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertility and sterility*, 84(1), 167–173. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.01.115
- Fanchin, R., Mendez Lozano, D. H., Frydman, N., Gougeon, A., Di Clemente, N., Frydman, R., & Taieb, J. (2007). Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(5), S. 1796–1802. doi:10.1210/jc.2006-1053
- Gätje, R., Eberle, C., & Scholz, C. (2011). *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Thieme.

- Griesinger, G. (2019). *Ovulationsinduktion und ovarielle Stimulation*. In: *Diedrich K., Ludwig M., Griesinger G. (eds) Reproduktionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin. Springer. doi:10.1007/978-3-662-55601-6_15-1
- Hattori, Y., Sato, T., Okada, H., Saito, C., & Sugiura-Ogasawara, M. (2013). Comparison of follicular fluid and serum anti-Müllerian hormone levels as predictors of the outcome of assisted reproductive treatment. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 169(2), 252–256. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.03.021
- Hennet, M. L., & Combelles, C. M. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International journal of developmental biology*, 56(10-12), S. 819–831. doi:10.1387/ijdb.120133cc
- Herold, G. u. (2018). *Innere Medizin 2018*. Köln: Gerd Herold.
- Hohmann, F. P., Macklon, N. S., & Fauser, B. C. (2003). A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH a. *Human Reproduction*, 88(1), 166–173. doi:10.1210/jc.2002-020788
- Holthausen-Markou, S., & Schippert, C. (2016). Unerfüllter Kinderwunsch aus gynäkologisch-psychosomatischer Perspektive. *Frauenheilkunde up2date*, 10(3), 223–238. doi:10.1055/s-0042-102318
- Iliodromiti, S., Kelsey, T. W., Anderson, R. A., & Nelson, S. M. (2013). Can anti-Müllerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(8), S. 3332–3340. doi:10.1210/jc.2013-1393
- Jost, A. (1966). Problems of fetal endocrinology: the adrenal glands. *Recent progress in hormone research*(22), 541–574. doi:10.1016/b978-1-4831-9825-5.50017-8
- Kallio, S., Puurunen, J., Ruokonen, A., Vaskivuo, T., Piltonen, T., & Tapanainen, J. S. (2013). Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertility and sterility*, 99(5), S. 1305–1310. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.034
- Kaufmann, M., Costa, S. D., & Scharl, A. (2013). *Die Gynäkologie*. Berlin: Springer Medizin.
- Kaya, A., Atabekoglu, C. S., Kahraman, K., Taskin, S., Ozmen, B., Berker, B., & Sonmezer, M. (2012). Follicular fluid concentrations of IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, VEGF, AMH, and inhibin-B in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. *European journal of*

- obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 164(2), S. 167–171.
doi:10.1016/j.ejogrb.2012.06.010
- Keck, C., & Auber, B. (2014). *Kinderwunschbehandlung in der gynäkologischen Praxis, Sinnvolle Diagnostik- und Therapiestrategien für Frauenärzte*. Stuttgart: Thieme.
- Keck, C., Neulen, C., & Breckwoldt, M. (1997). *Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie*. Stuttgart: G. Thieme.
- Kedem, A., Hourvitz, A., Yung, Y., Shalev, L., Yerushalmi, G. M., Kanety, H., . . . Maman, E. (2013). Anti-Müllerian hormone (AMH) downregulation in late antral stages is impaired in PCOS patients. A study in normo-ovulatory and PCOS patients undergoing in vitro maturation (IVM) treatments. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 29(7), 651–656. doi:10.3109/09513590.2013.798279
- Kedem, A., Yung, Y., Yerushalmi, G. M., Haas, J., Maman, E., Hanochi, M., . . . Hourvitz, A. (2014). Anti Müllerian Hormone (AMH) level and expression in mural and cumulus cells in relation to age. *Journal of ovarian research*, 7, 113. doi:10.1186/s13048-014-0113-3
- Kelsey, T. W., Anderson, R. A., Wright, P., Nelson, S. M., & Wallace, W. H. (2012). Data-driven assessment of the human ovarian reserve. *Molecular human reproduction*, 2, S. 79–87. doi:10.1093/molehr/gar059
- Kim, J. H., Lee, J. R., Chang, H. J., Jee, B. C., Suh, C. S., & Kim, S. H. (2014). Anti-Müllerian hormone levels in the follicular fluid of the preovulatory follicle: a predictor for oocyte fertilization and quality of embryo. *Journal of Korean medical science*, 29(9), 1266–1270. doi:10.3346/jkms.2014.29.9.1266
- Kirsch, J., May, C. A., Lorke, D., Winkelmann, A., Schwab, W., Herrmann, G., & Funk, R. (2017). *Taschenlehrbuch Anatomie*. Stuttgart. doi:10.1055/b-004-135641
- Kristensen, S. G., Kumar, A., Kalra, B., Pors, S. E., Bøtkjær, J. A., Mamsen, L. S., . . . Andersen, C. Y. (2019). Quantitative Differences in TGF- β Family Members Measured in Small Antral Follicle Fluids From Women With or Without PCO. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(12), 6371–6384. doi:10.1210/jc.2019-01094
- Kurtz, A., Pape, H.-C., Silbernagl, S., Bondke Persson, A., Brenner, B., Burckhardt, G., . . . K. (2018). *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. doi:10.1055/b-006-149284
- La Marca, A., & Volpe, A. (2007). The Anti-Müllerian hormone and ovarian cancer. *Human reproduction update*, 13(3), S. 265–273. doi:10.1093/humupd/dml060
- Lasch, L., & Fillenberg, S. (2017). *Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin, Heidelberg; s.l.: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-52809-9

- Lee, J. R., Kim, S. H., Kim, S. M., Jee, B. C., Ku, S.-Y., Suh, C. S., . . . Moon, S. Y. (2008). Follicular fluid anti-Müllerian hormone and inhibin B concentrations: comparison between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist cycles. *Fertility and sterility*, 4, S. 860–867. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.04.010
- Leidenberger, F. A., Strowitzki, T., & Ortmann, O. (2014). *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-38043-3
- Li, Y., Nie, M., Liu, Y., Zhang, W., & Yang, X. (2015). The dynamic changes of anti-Müllerian hormone and inhibin B during controlled ovarian hyperstimulation in decreased ovarian reserve women and the effect on clinical outcome. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 31(6), 450–453. doi:10.3109/09513590.2014.998187
- Liebermann, J. (2018). *Kryokonservierung*. In: *Diedrich K., Ludwig M., Griesinger G. (eds) Reproduktionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin. doi:10.1007/978-3-662-55601-6_24-1
- Lim, S., Kim, S., Kim, O., Kim, B., Jung, H., Ko, K.-P., & Lee, H. (2021). Correlations among anti-Müllerian hormone levels, body mass index and lipid profile in reproductive-aged women: The Korea Nurses' Health Study. 8(6), S. 2996–3005. doi:10.1002/nop2.1011
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. doi:10.1055/b-006-163361
- Lv, Y., Du, S., Huang, X., & Hao, C. (2020). Follicular fluid estradiol is an improved predictor of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer outcome. *Experimental and therapeutic medicine*, 20(6). doi:10.3892/etm.2020.9256
- Maltaris, T., Agorastos, T., Beckmann, M. W., & Dittrich, R. (2010). Ovarielle Reserve und Fertilitätserhalt. *Gynäkologische Endokrinologie*, 8(3), S. 180–185. doi:10.1007/s10304-010-0358-x
- Mamsen, L. S., Bøtkjær, J. A., Kristensen, S. G., Pors, S. E., Jeppesen, J. V., Kumar, A., . . . Andersen, C. Y. (2021). High Variability of Molecular Isoforms of AMH in Follicular Fluid and Granulosa Cells From Human Small Antral Follicles. *Frontiers in endocrinology*(12), 617523. doi:10.3389/fendo.2021.617523
- Mehta, B. N., Chimote, M. N., Chimote, N. N., Nath, N. M., & Chimote, N. M. (2013). Follicular-fluid anti-Müllerian hormone (FF AMH) is a plausible biochemical indicator of functional viability of oocyte in conventional in vitro fertilization (IVF)

- cycles. *Journal of human reproductive sciences*, 6(2), S. 99–105. doi:10.4103/0974-1208.117168
- Melado Vidales, L., Fernández-Nistal, A., Martínez Fernández, V., Verdú Merino, V., Bruna Catalán, I., & Bajo Arenas, J. M. (2017). Anti-Müllerian hormone levels to predict oocyte maturity and embryo quality during controlled ovarian hyperstimulation. *Minerva ginecologica*, 69(3), 225–232. doi:10.23736/S0026-4784.16.03958-7
- Merhi, Z., Doswell, A., Krebs, K., & Cipolla, M. (2014). Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99(6), E1137-45. doi:10.1210/jc.2013-4161
- Müller, A., Dittrich, R., Reissmann, C., Kronawitter, D., Beckmann, M., & Oppelt, P. (2009). *Rationelle Diagnostik in der gynäkologischen Endokrinologie und Reproduktionsmedizin – Teil 2: Besondere Aspekte der Sterilitätsdiagnostik* (Bd. 69). doi:10.1055/s-0029-1185816
- Nawroth, F., & Römer, T. (2015). *Diagnostik und Therapie der weiblichen Sterilität*. Stuttgart: De Gruyter.
- Overbeek, A., Broekmans, F. J., Hehenkamp, W. J., Wijdeveld, M. E., van Disseldorp, J., van Dulmen-den Broeder, E., & Lambalk, C. B. (2012). Intra-cycle fluctuations of anti-Müllerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis. *Reproductive biomedicine online*, S. 664–669. doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.023
- Pape, H.-C., Kurtz, A., & Silbernagl, S. U. (2019). *Physiologie - Sexualfunktionen, Schwangerschaft und Geburt*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. doi:10.1055/b-006-163285
- Pinheiro, J. (2006). Conditional versus marginal covariance representation. *Austrian J Stat.*, 31–44.
- Renz, H. (2009). *Praktische Labordiagnostik, Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie*. Berlin: De Gruyter.
- Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., & Bedecarrás, P. (2003). AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and cellular endocrinology*, 211(1-2), S. 21–31.
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of reproduction*, 82(6), S. 1021–1029. doi:10.1095/biolreprod.109.082941
- Sacha, C. R., Chavarro, J. E., Williams, P. L., Ford, J., Zhang, L., Donahoe, P. K., . . . Mínguez-Alarcón, L. (2020). Follicular fluid anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations and outcomes of in vitro fertilization cycles with fresh embryo

- transfer among women at a fertility center. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 11(37), 2757–2766. doi:10.1007/s10815-020-01956-7
- Schenk, M., Kröpfl, J. M., Obermayer-Pietsch, B., Feldmeier, E., & Weiss, G. (2017). Anti-Mullerian hormone concentrations in individual follicular fluids within one stimulated IVF cycle resemble blood serum values. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(9), 1115–1120. doi:10.1007/s10815-017-0908-4
- Skowrońska, P., Kunicki, M., Pastuszek, E., Konieczna, L., Bączek, T., Męczekalski, B., . . . Łukaszuk, K. (2021). Vitamin D and anti-Müllerian hormone concentration in human follicular fluid individually aspirated from all patient follicles. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*(5), 1-5. doi:10.1080/09513590.2021.1933934
- Sonntag, B. (2018). Beurteilung und Therapie der Lutealphase. In L. M. Diedrich K., *Reproduktionsmedizin* (S. 1–8). Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin. doi:10.1007/978-3-662-55601-6_8-1
- Sonntag, B. (2018). *Physiologie der Befruchtung*. In: *Diedrich K., Ludwig M., Griesinger G. (eds) Reproduktionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin. Springer. doi:10.1007/978-3-662-55601-6_9-2
- Statistisches, B. (2022). *Staat & Gesellschaft - Geburten - Bevölkerung - Geburten - Statistisches Bundesamt (Destatis)*. Abgerufen am 06. 11 .2022 von https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/Zahl-der-Woche/2022/PD22_18_p002.html
- Strowitzki, T., Diedrich, K., & Rösner, S. (2018). *In-vitro-Maturation (IVM)*. In: *Diedrich K., Ludwig M., Griesinger G. (eds) Reproduktionsmedizin*. . Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin. . doi:10.1007/978-3-662-55601-6_25-1
- Takahashi, C., Fujito, A., Kazuka, M., Sugiyama, R., Ito, H., & Isaka, K. (2008). Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 89(3), 586–591. doi:DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.080
- Team, R. C. (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*.
- Tehrani, F. R., Solaymani-Dodaran, M., Tohidi, M., Gohari, M. R., & Azizi, F. (2013). Modeling age at menopause using serum concentration of anti-mullerian hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(2), S. 729–735. doi:10.1210/jc.2012-3176
- Tramišak Milaković, T., Panić Horvat, L., Čavlović, K., Smiljan Severinski, N., Vlašić, H., Vlastelić, I., . . . Radojčić Badovinac, A. (2015). Follicular fluid anti-Müllerian

- hormone: a predictive marker of fertilization capacity of MII oocytes. *Archives of gynecology and obstetrics*, 291(3), S. 681–687. doi:10.1007/s00404-014-3460-9
- Valet, A., & Ziller, V. (2021). Sterilität. In Goerke, Steller et al. (Hg.) 2021 – *Klinikleitfaden Gynäkologie und Geburtshilfe* (S. 567–606). Urban & Fischer (Elsevier). doi:10.1016/B978-3-437-21342-7.00016-4
- van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., te Velde, E. R., Fauser, B. C., Bancsi, L. F., Jong, F. H., & Themmen, A. P. (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*, 17(12), 3065–3071. doi:10.1093/humrep/17.12.3065
- Veeck, L. L., & Rosenwaks, Z. (1999). *An atlas of human gametes and conceptuses - An illustrated reference for assisted reproductive technology* (Bd. The Encyclopedia of visual medicine series). New York; London: The Parthenon Publishing Group.
- Verberg, M. F., Macklon, N. S., Nargund, G., Frydman, R., Devroey, P., Broekmans, F. J., & Fauser, B. C. (2009). Mild ovarian stimulation for IVF. *Human reproduction update*, 15(1), S. 13–29. doi:10.1093/humupd/dmn056
- Visser, J. A., Jong, F. H., Laven, J. S., & Themmen, A. P. (2006). Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction (Cambridge, England)*, 131(1), 1–9. doi:10.1530/rep.1.00529
- Walters, K. A., Eid, S., Edwards, M. C., Thuis-Watson, R., Desai, R., Bowman, M., . . . Handelsman, D. J. (2019). Steroid profiles by liquid chromatography-mass spectrometry of matched serum and single dominant ovarian follicular fluid from women undergoing IVF. *Reproductive biomedicine online*, 38(1), 30–37. doi:10.1016/j.rbmo.2018.10.006
- Weyerstahl, T., & Stauber, M. (2013). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. doi:10.1055/b-002-94109
- Wilson, C. A., Di Clemente, N., Ehrenfels, C., Pepinsky, R. B., Josso, N., Vigier, B., & Cate, R. L. (1993). Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol*(7(2)), 247–257. doi:10.1210/mend.7.2.8469238
- Witzke, L., Leser, S., Nesbigall, M., Pfefferle, P. I., Wagner, U., & Ziller, V. (2021). The role of follicular anti-Mullerian hormone in women undergoing IVF/ICSI with regard to size, oocyte presence, sociodemographic parameters, treatment variables, and other hormones and vitamins. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. doi:10.1080/09513590.2021.1967313

- Wolff, M. v., & Stute, P. (2013). *Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Das Praxisbuch ; mit 95 Tabellen*. Stuttgart: Schattauer.
- Wolff, M. v., Mitter, V. R., Jamir, N., Stute, P., Eisenhut, M., & Bersinger, N. A. (2021). The endocrine milieu in naturally matured follicles is different in women with high serum anti-Müllerian hormone concentrations. *Reproductive biomedicine online*, 43(2), S. 329–337. doi:10.1016/j.rbmo.2021.01.021
- Wolff, M. v., Stute, P., Eisenhut, M., Marti, U., Bitterlich, N., & Bersinger, N. A. (2017). Serum and follicular fluid testosterone concentrations do not correlate, questioning the impact of androgen supplementation on the follicular endocrine milieu. *Reproductive biomedicine online*, 35(5), 616–623. doi:10.1016/j.rbmo.2017.07.012
- Wunder, D. M., Guibourdenche, J., Birkhäuser, M. H., & Bersinger, N. A. (2008). Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 90(6), 2203–2210. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.078
- Yding Andersen, C., Rosendahl, M., & Byskov, A. G. (2008). Concentration of anti-Müllerian hormone and inhibin-B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(6), 2344–2349. doi:10.1210/jc.2007-2342
- Yilmaz, N., Uygur, D., Dogan, M., Ozgu, E., Salman, B., & Mollamahmutoglu, L. (2012). The effect of follicular antimüllerian hormone levels of non-obese, non-hyperandrogenemic polycystic ovary syndrome patients on assisted reproduction outcome. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 28(3), 162–165. doi:10.3109/09513590.2011.593667
- Zeitung, Ä. (2006). Abgerufen am 06. 11 2022 von <https://www.aerztezeitung.de/medizin/fachbereiche/gynaekologie/article/431654/selbstbeteiligung-kuenstlichen-befruchtung-aerzte-sehen-hohen-kosten-paare-kritisch.html>
- Ziller, V. (2017). Auslegungssache Embryonenschutzgesetz. *Gynäkologe (Der Gynäkologe)*, 50(6), 409–413. doi:10.1007/s00129-017-4079-2

10 Anhang

a) Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden an der Philipps-Universität Marburg waren:

Dr. Jürgen Adamkiewicz, Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch, Prof. Erika Baum, Dr. med. Martin Bäumlein, Prof. Dr. med. Katja Becker, Prof. Dr. Anette Becker, Prof. Dr. Stephan Becker, Dr. rer. med. Katharina Belting, Dr. Mirjam Bertoune, Dr. med. Jens Best, Dr. Gabriel A. Bonaterra, Dr. Kathrin Bolte, Prof. apl. Stefan Bösner, Prof. Dr. Alexander Brehm, Prof. Dr. Andreas Burchert, Prof. Dr. Yalcin Cetin, Prof. Frank Czubayko, Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut, Prof. Dr. Niels Decher, Prof. Dr. Adriana del Rey, Prof. Dr. Dr. Reinhard Dettmeyer, Prof. Dr. Norbert Donner-Banzhoff, Prof. Dr. med. Carsten Eggers, Dr. Markus Eickmann, Dr. Beate Feuser, PD Dr. Barbara Fritz, Fr. Univ.-Prof. Dr. med. Susanne Fuchs-Winkelmann, Prof. Dr. med. Christian Görg, Prof. Dr. Thomas M. Gress, Dr. med. Martin Gschnell, Dr. med. Michael Haberhausen, Prof. Dr. Axel Hegele, Prof. Dr. med. Michael Hertl, Prof. Dr. Wulf Hildebrandt, Herr Priv.-Doz. Dr. Stephan Hoch, Prof. Dr. Stefan G. Hofmann, Prof. Dr. Uwe Homberg, Prof. Dr. med. Joachim Hoyer, Dr. med. Malin Jansen, Dr. med. Andreas Jerrentrup, Dr. med. Dennis Josephs, Prof. Dr. med. Matthias Kalder, Prof. Dr. med. Dr. phil. Peter Herbert Kann M.A. , Dr. med. Veit Kanngießer, PD Dr. med. Christian Keller, Prof. Dr. Tilo Kircher, Prof. Dr. Ralf Kinscherf, Prof. Dr. med. Andreas Kirsch-baum, Dr. med. Ina Kluge, Dr. med. Beate Kolb-Niemann, Martin Kollmann, Dr. med. Siegmund Köhler, Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Kruse, Prof. Dr. med. Maritta Kühnert, Dr. med. Andrea Kussin, Prof. Roland Lill, Prof. Dr. Michael Lohoff, Prof. Dr. med. Andreas H. Mahnken, Prof. Dr. Andrea Maisner, Prof. Dr. Georg Manolikas, Dr. Lisa Maurer, Priv.-Doz. Dr. med. Nikolas Mirow, Prof. Dr. med. Roland Moll, Ulrich Mueller, Prof. Dr. Rolf Müller, Prof. Dr. Reinier Mutters, Univ.-Prof. Dr. med. Igor Nenadić, Prof. Dr. Andreas Neubauer, Prof. Dr. Bernhard Neumüller, Priv.-Doz. Dr. med. Wilfried Nikolaizik, Prof. Dr. med. Christopher Nimsky, PD Dr. Andreas Nockher, Dr. Stephan Heinrich Nolte, Prof. Dr. Johannes Oberwinkler, Dr. habil. Frank Oeffner, Prof. Dr. Dominik Oliver, Prof. Dr. Sven Opitz, Prof. Dr. Axel Pagenstecher, Prof. Dr. Dr. Petra Pfefferle, Prof. Dr. med. Wolfgang Pfützner, Prof. Dr. Timothy David Plant, PD Dr. rer. nat. Regina Preisig-Müller, Prof. Dr. med. Ardawan J. Rastan, Dr. Jens-Peter Reese M.P.H, Prof. Dr. Harald Renz, Dr. med. Jorge Riera Knorrenschild, Hr. Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Ruchholtz, Prof. Dr. Irmtraut Sahmland, Prof. Dr. Joachim Schachtner, Prof. Dr. Jürgen Schäfer, Prof. Dr. med. Bernhard Schieffer, Univ.-Prof. Dr. med. Bernd

Schmeck, Prof. Dr. med. Joachim Schneider, Prof. Dr. Gerhard Schratt, Dr. med. Ulrich Schu, Prof. Dr. med. Stephan Schulze, Dr. med. Christian G. Schüttler, apl. Prof. Dr. Carola Seifart, Univ.-Prof. Dr. med. Guido Seitz, Prof. Dr. med. Walter Sekundo, Dr. med. Selim Sevinc, Prof. Birte Steiniger, Univ.-Prof. Dr. med. Boris A. Stuck, Dr. rer. nat. Elisabeth Szabo, Prof. Dr. Kati Thieme, Prof. Dr. Lars Timmermann, Prof. Dr. Claus Franz Vogelmeier, Prof. Dr. med. Uwe Wagner, Univ.-Prof. Dr. med. Stefanie Weber, Prof. Dr. Eberhard Weihe, Dipl.oec.troph. Andrea Werdecker, Dr. rer. physiol. Ronny Westerman, PD Dr. Reiner Westermann, Prof. Dr. med. Thomas Wiesmann, Prof. Dr. Beate Wilhelm, Prof. Thomas Worzfeld, Dr. Christian Wrocklage, Prof. Dr. Wulf Hildebrandt, Prof. (apl.) Dr. med. Volker Ziller

Am Klinikum Fulda:

Dr. med. Alfred Adamski, Dr. med. Michael Buhl, Dr. Gunter Isselstein, Dr. med. Simon Lang, Prof. Dr. ed. Martin Hessmann, Prof. Dr. med. Reinald Repp, Dr. med. Markus Six, Takanori Sasaki Dr. Johannes Weber

Im St. Elisabeth-Krankenhaus Köln-Hohenlind:

Dr. med. Nikolaus Ansorge, Priv.-Doz. Dr. med. Beate Appenrodt, Dr. med. Rai-Rainer Golnik, Dr. med. Michaela Jäcker, Dr. med. Albrecht Ostermann, Dr. med. Markus Pitscheider, Sylvia Münster, Dr. med. Thomas Tapaß

Im Zollernalb Klinikum Balingen:

Dr. med. Wolfgang Braun, Dr. Julia Klenske, Tomas Moser

b) Danksagung

Ein besonderer Dank gilt neben Prof. (apl.) Dr. med. Volker Ziller dem gesamten Team des Reproduktionsmedizinischen Kompetenzzentrums des Universitätsklinikums Marburg. Besonders zu erwähnen sind hierbei Dr. Moira Behn, Dr. Martha Kalff-Suske und Thomas Bauer.

Außerdem möchte ich meinen Mit- Doktorandinnen Stefanie Leser und Miriam Nesbigall für die gute Zusammenarbeit bei der gemeinsame Datenerhebung und sowie den regen und interaktiven Austausch danken.

Ein großer Dank geht auch an meine Familie für die unermüdliche Unterstützung in den vergangenen Jahren.