

**Diplomarbeit**

**Anti-Müller-Hormon in der Follikelflüssigkeit und der  
Zusammenhang mit dem Follikelvolumen  
Eine retrospektive Datenanalyse**

eingereicht von

**Elisabeth Teresa Feldmeier**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Das Kinderwunsch Institut Schenk GmbH  
Am Sendergrund 11  
A-8143 Dobl**

unter der Anleitung von

**ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek  
Dr. med. univ. Michael Schenk, MAS**

Graz, 23.01.2017

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 23.01.2017*

*Elisabeth Teresa Feldmeier eh*

## **Vorwort**

Die folgende Arbeit wurde im Rahmen des Humanmedizinstudiums an der Medizinischen Universität Graz als Diplomarbeit erstellt. Zur Zitation; falls am Ende des Absatzes eine Quelle angegeben wurde bezieht diese sich auf den gesamten vorangegangenen Absatz.

## **Danksagungen**

Ich möchte mich beim Kinderwunsch Institut Schenk für das Zurverfügungstellen der Daten bedanken, insbesondere bei Dr. Schenk, Dr. Weiss und dem Team der Embryologie sowie bei Prof. Petek für die Betreuung. Vielen Dank für die Hilfe, emotionale Unterstützung und die Versorgung mit Schokolade in schwierigen Zeiten.

Auch möchte ich mich bei Thomas und Stefan für die statistischen Ratschläge und bei meinen Eltern und bei David für die Unterstützung bedanken.

# Zusammenfassung

## Einleitung

Die Ermittlung der Eizellqualität stellt eine große Herausforderung in der Kinderwunschbehandlung dar, da sie ausschlaggebend für den Befruchtungserfolg ist. Der Follikelflüssigkeit (FF), welche die Eizelle umgibt, wird dabei eine wichtige Rolle zugeschrieben. Die FF beinhaltet eine große Anzahl unterschiedlicher Biomarker, deren Einfluss auf die IVF (*in-vitro* Fertilisation) - Behandlung Gegenstand intensiver Forschung ist. Das Anti-Müller-Hormon (AMH) ist klinisch etabliert in seiner Rolle zur Abschätzung der verbleibenden Fertilität bei Patientinnen. Der Zusammenhang zwischen Volumen eines Follikels und dem entsprechenden AMH Gehalt soll in der vorliegenden Studie ermittelt werden. Eine Korrelation der beiden Parameter würde den Prozess der IVF-Behandlung erleichtern und aufwändige Schritte im Embryologie-Labor erübrigen.

## Material und Methoden

Es wurden AMH-Konzentrationen und Volumina von 24 Follikeln von 3 Patientinnen retrospektiv analysiert. Diese wurden im Rahmen einer IVF-Behandlung am Kinderwunschinstitut Schenk GmbH (Dobl, Österreich) erfasst.

## Ergebnisse

Eine Testung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungs-Test ergab eine Normalverteilung der Volumina (1,462 ,  $p = 0,028$ ) jedoch nicht der AMH-Werte (0,968 ,  $p = 0,306$ ). Eine anschließende Rangkorrelation nach Spearman zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Follikelvolumen und der jeweiligen AMH Konzentration im Follikel ( $-0,057$  ,  $p = 0,791$ ).

## Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen Follikelvolumen und AMH-Gehalt gefunden werden. Der Grund für die unterschiedlichen AMH Konzentrationen in den einzelnen Follikeln könnte in den Stoffwechselaktivitäten der Granulosazellen oder einem aktiven Transport von AMH aus dem Follikel liegen. Der Fokus weiterer Studien sollte auf die separate Aspiration einzelner Follikel und deren Follikelflüssigkeiten gelegt und mit einer größeren Stichprobenanzahl durchgeführt werden um die vorliegenden Resultate zu bestätigen.

# Abstract

## Introduction

The evaluation of oocyte quality is crucial for a successful fertilization in infertility treatment. The follicular fluid (ff), which is surrounding the oocyte, is ascribed an important part in predicting the oocyte quality. The ff contains a considerable number of diverse biomarkers whose influences on IVF (*in-vitro* fertilisation) are part of intense research. The Anti-Mullerian hormone (AMH) is established as the most potent marker for ovarian reserve testing, because it declines as female age increases. This study will look at the close coherence of follicular volume and the correlating AMH concentration. The correlation of both parameters could facilitate IVF process and replace complex tasks in the embryology laboratory.

## Material and methods

The AMH concentrations and volumes of 24 follicles from 3 patients undergoing IVF treatment at the Kinderwunsch Institut Schenk GmbH (Dobl, Austria) were retrospectively analysed.

## Results

Testing for normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test) revealed a normal distribution for all volumes analysed (1,462 ,  $p = 0,028$ ), but not for AMH-concentrations (0,968 ,  $p = 0,306$ ). Subsequent Spearman rank correlation found no significant relationship for follicular volume and the corresponding AMH concentration (-0,057 ,  $p = 0,791$ ).

## Discussion

In conclusion, the present study showed no significant correlation between follicular volume and AMH concentration. Reasons for the differences in AMH concentrations in individual follicles may be based on differences in metabolic activity of the granulosa cells surrounding the oocyte, or the active transport of AMH through the follicular wall. Future studies should focus on the separate aspiration of individual follicles and the analysis of the respective ff with higher sample size to confirm the present results.

# Inhaltsverzeichnis

<b>VORWORT</b> .....	<b>II</b>
<b>DANKSAGUNGEN</b> .....	<b>III</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 PHYSIOLOGIE DER FOLLIKELREIFUNG, DER SELEKTION DES DOMINANTEN FOLLIKELS UND DES EISPRUNGS</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 EMBRYONALE ENTWICKLUNG DES OVARS .....	1
1.1.2 FOLLIKULOGENESE UND SELEKTION.....	1
1.1.3 OVULATION (UND LUTEALPHASE).....	2
<b>1.2 DIE FOLLIKELFLÜSSIGKEIT</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 ANATOMISCH-HISTOLOGISCHER AUFBAU EINES FOLLIKELS .....	3
1.2.2 ENTSTEHUNG.....	4
1.2.3 DAS ANTRUM FOLLICULI.....	6
1.2.4 DIE BFB, BLOOD FOLLICLE BARRIER .....	7
1.2.5 ZUSAMMENSETZUNG .....	8
<b>1.3 ROLLE DES AMH IN DER MENSCHLICHEN ENTWICKLUNG</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 GESCHICHTLICHER HINTERGRUND.....	14
1.3.2 AMH UND SEINE ROLLE IN DER PHYSIOLOGIE DER EMBRYONALGENESE .....	14
<b>1.4 KLINISCHE BEDEUTUNG DES AMH</b> .....	<b>16</b>
1.4.1 DIE ROLLE IN DER REPRODUKTIONSMEDIZIN .....	16
1.4.2 AMH ALS MARKER IN DER PCO-DIAGNOSTIK.....	19
1.4.3 AMH UND SEINE ROLLE IN DER PÄDIATRIE BEI STÖRUNGEN DER SEXUALDIFFERENZIERUNG.....	20
1.4.4 AMH ALS MARKER BEI GRANULOSA-ZELL-TUMOR .....	21
<b>1.5 FOLLIKELDURCHMESSER UND BEFRUCHTUNGSERFOLG</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6 FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>23</b>
1.6.1 HYPOTHESE 1.....	23
1.6.2 HYPOTHESE 2.....	23
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 DATENGEWINNUNG</b> .....	<b>24</b>
2.1.1 ALLGEMEIN .....	24
<b>2.2 STIMULATION UND GEWINNUNG DER FF</b> .....	<b>26</b>
2.2.1 STIMULATION UND INSTRUKTIONEN .....	26
2.2.2 OPU, OVARIAN PICK-UP.....	26
2.2.3 SEPARATE GEWINNUNG DER FF .....	26
2.2.4 ANALYSE DER FOLLIKELFLÜSSIGKEIT .....	28

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>29</b>
3.1	ALLGEMEINE DATEN ZU DEN PATIENTINNEN/ ALLGEMEIN.....	29
3.2	MESSERGEBNISSE IN GRAFIKEN .....	32
3.2.1	DATEN GESAMT .....	32
3.2.2	DATEN DER PATIENTINNEN EINZELN DARGESTELLT .....	33
3.3	STATISTISCHE ERGEBNISSE .....	35
3.3.1	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	35
3.3.2	ALLGEMEIN .....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
3.3.3	TEST AUF NORMALVERTEILUNG MITTELS KOLMOGOROV-SMIRNOV-ANPASSUNGSTEST.....	36
3.3.4	NICHTPARAMETRISCHE AUSWERTUNG - RANGKORRELATION NACH SPEARMAN.....	37
3.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	38
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>45</b>
	<b>ANHANG - EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG BIOBANK SEITE 1 VON 4</b> .....	<b>56</b>
	<b>ANHANG - EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG BIOBANK SEITE 2 VON 4</b> .....	<b>57</b>
	<b>ANHANG - EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG BIOBANK SEITE 3 VON 4</b> .....	<b>58</b>
	<b>ANHANG - EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG BIOBANK SEITE 4 VON 4</b> .....	<b>59</b>

## **Glossar und Abkürzungen**

AFC antral follicle count

AMH Anti-Müller-Hormon

BFB blood follicle barrier

BMP-15 bone morphogenetic protein-15

COC cumulus-oocyte complex

DHEA-S Dehydroepiandrosteron-Sulfat

DNA Deoxyribonucleic acid

FF Follikelflüssigkeit

FSH follikelstimulierendes Hormon

GC Granulosazelle(n)

GCT granulosa cell tumor

hCG humanes Choriongonadotropin

IGF insulin-like growth factor

IGF-2 insulin-like-growth-factor-2

IL Interleukine

IVF in vitro fertilisation

LH luteinisierendes/luteotropes Hormon

MII Metaphase II

MIS mullerian inhibiting substance

NGF non-growing follicles

OPU ovum-pick-up

PCO polycystisches Ovar-Syndrom

PCOM polycystic ovarian morphology

PMDS persistent Müllerian Duct Syndrome

RNA Ribonucleic acid

ROS reactive oxygen species

TDF testisdeterminierender Faktor

TGF- $\beta$  transforming growth factor  $\beta$

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Follikelentwicklung am Ovar .....	3
Abbildung 2 Der antrale Follikel und seine Inhalte.....	4
Abbildung 3: Weg der Follikelflüssigkeit.....	5
Abbildung 4 Die blood follicle barrie .....	7
Abbildung 5 Fußpedal und Pumpensystem mit Dreiwegehahn .....	28
Abbildung 6 Daten gesamt dargestellt in einem Punktdiagramm .....	32
Abbildung 7 Daten gesamt ohne Ausreißer .....	32
Abbildung 8 Daten von Patientin A.....	33
Abbildung 9 Daten von Patientin B.....	33
Abbildung 10 Daten von Patientin C .....	34

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Serumwertangaben für AMH.....	16
Tabelle 2 Revidierte Kriterien 2003 für Diagnose des PCOS.....	20
Tabelle 3 Allgemeine Daten der Patientinnen.....	29
Tabelle 4 Daten gesamt.....	30
Tabelle 5 Mittelwerte der erhobenen Messwerte.....	31
Tabelle 6 Ergebnisse Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest.....	36
Tabelle 7 Ergebnisse Rangkorrelation nach Spearman.....	37

# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologie am Ovar, Follikelreifung und Ovulation

### 1.1.1 Embryonale Entwicklung des Ovars

Sobald die Primordialzellen in der 7. Embryonalwoche in die Genitalleiste eingewandert sind bezeichnet man sie als Oogonien. Die Anlage des Ovars besteht aus Mesenchym, proliferierendem Keimepithel und Oogonien, den späteren Eizellen. Die Oogonien teilen sich circa bis zur 33. Schwangerschaftswoche, vor und nach diesem Zeitpunkt finden atretische Vorgänge statt, sodass zum Zeitpunkt der Geburt des weiblichen Neugeborenen noch ein bis zwei Millionen Präordialfollikel übrig sind und zum Zeitpunkt des Eintritts in die Pubertät noch etwa 300.000-500.000 Stück. Je nach Anzahl der fruchtbaren Jahre einer Frau und der Schwangerschaften inklusive Stillperioden treten bei einer Frau bis zu 500 Eisprünge auf. Die Teilungsaktivitäten der Eizellen sind bis zur Menarche pausiert, sie verweilen im Diktyotän. Erst mit der Ovulation erfolgt die erneute Aktivierung und das Wachstum wird wieder aufgenommen (1,2).

Im Unterschied zu den weiblichen Eizellen werden die männlichen Spermien im reproduktiven Alter stetig neu gebildet, während bei Frauen der Grundstock bereits in ihrer eigenen Embryonalperiode gebildet wird und sich ab diesem Zeitpunkt verringert. Hierin begründet sich die starke Abnahme der Fertilität von Frauen mit zunehmendem Alter (1).

### 1.1.2 Follikulogenese und Selektion

Die Follikelreifung gliedert sich in die Follikelphase, die Ovulation und die Lutealphase (3).

Vor der Ovulation kommt es zu einer Rekrutierung von multiplen Follikeln in unterschiedlichen Reifungsstadien. Die zyklische Follikelreifung nimmt in etwa 85 Tagen in Anspruch und findet parallel in unterschiedlichen Stadien statt, d.h. im reproduktiven Alter liegen zu jedem Zeitpunkt verschiedene Reifungsstufen am Ovar vor. Sie gliedern sich in folgende Stadien: Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel und den Tertiärfollikel, welcher als großer Graafscher Follikel sprungreif wird und die Eizelle zur Befruchtung freigibt.

Die Anzahl der rekrutierten Follikel nimmt mit dem Alter kontinuierlich ab, d.h. je jünger die Frau, desto mehr Follikel werden pro Zyklus bei ihr aktiviert.

Die Vorgänge der Follikelreifung am Ovar nennen sich „ovarieller Zyklus“ mit Einschluss der weiteren hormonellen physiologischen Veränderungen am weiblichen Körper lautet die Bezeichnung „Menstruationszyklus“, wobei ein durchschnittlicher Zyklus circa  $28 \pm 3$  Tage

dauert. Die Phasen des weiblichen Zyklus gliedern sich auch hormonell in die Follikelphase, die Ovulation und die Lutealphase. Am Endometrium unterscheiden sich die Proliferationsphase (von Tag 1-15) und die Sekretionsphase (von Tag 16-28) (2,4,5).

Gesteuert wird das Follikelwachstum durch Granulosazellen (GC) die auf follikelstimulierendes-Hormon (FSH) ansprechen, Theka- bzw. Interstitialzellen welche auf luteinisierendes Hormon (LH) reagieren und weitere Zellen wie immunkompetente Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten. Die Granulosazellen bilden eine innere Wand des Follikels und die Thekazellen eine äußere. Die Thekazellen produzieren Androgene, welche durch die Granulosazellen zu Estradiol aromatisiert werden. Histologisch unterteilt man Thekazellen in Thekainterstitialzellen, welche den Follikel umgeben, Hilusinterstitialzellen, ähnlich den Leydig-Zellen des Hodens, primäre Interstitialzellen, ähnlich den fetalen Leydig-Zellen, und sekundäre Interstitialzellen, Reste von atretischen Follikeln. Granulosazellen hingegen lassen sich histologisch anhand ihrer Lage in basale, antrale und kumulusnahe unterscheiden. Aufgrund der Rekrutierung multipler Follikel findet ein Selektionsprozess statt, bei dem ein dominanter Leitfollikel entsteht, welcher zu späterem Zeitpunkt derjenige sein wird, der „springt“ (Graaf-Follikel). Dieser Selektionsprozess begründet sich in dem Zusammenspiel zwischen reifenden Follikeln und deren Hormonproduktion sowie hypophysär freigesetzten Hormonen. Der Follikel mit der höchsten Östrogenproduktion wird zum dominanten Follikel (2,4,6,7).

### **1.1.3 Ovulation**

Das Ende der Follikulogenese stellt die Ovulation dar. Der Begriff beschreibt die „hormonell induzierte Ruptur des Follikels mit Freigabe der Oozyte in die Tube ca. 40 Stunden nach Beginn des LH-Anstiegs oder 35-40 Stunden nach einer medikamentösen Ovulationsinduktion“ (8).

Hierbei vergrößert sich der Follikel deutlich, löst sich auf und der *cumulus-oocyte complex*, COC gelangt in die freie Bauchhöhle wo er vom Fimbrientrichter aufgenommen und weitertransportiert wird (2,3).

## 1.2 Die Follikelflüssigkeit

### 1.2.1 Anatomisch-histologischer Aufbau eines Follikels

Zu jedem Zeitpunkt liegen im Ovar Follikel in verschiedenen Reifungsstadien vor, siehe Abbildung 1. Vom Primordialfollikel entwickelt sich der Follikel über Primär- und Sekundär- zum Graafschen Follikel an dem die Ovulation stattfindet und die Oozyte freigegeben wird. Anschließend entsteht aus dem Follikelrest der Corpus luteum und wird im Zyklusverlauf zum Corpus albicans (3).

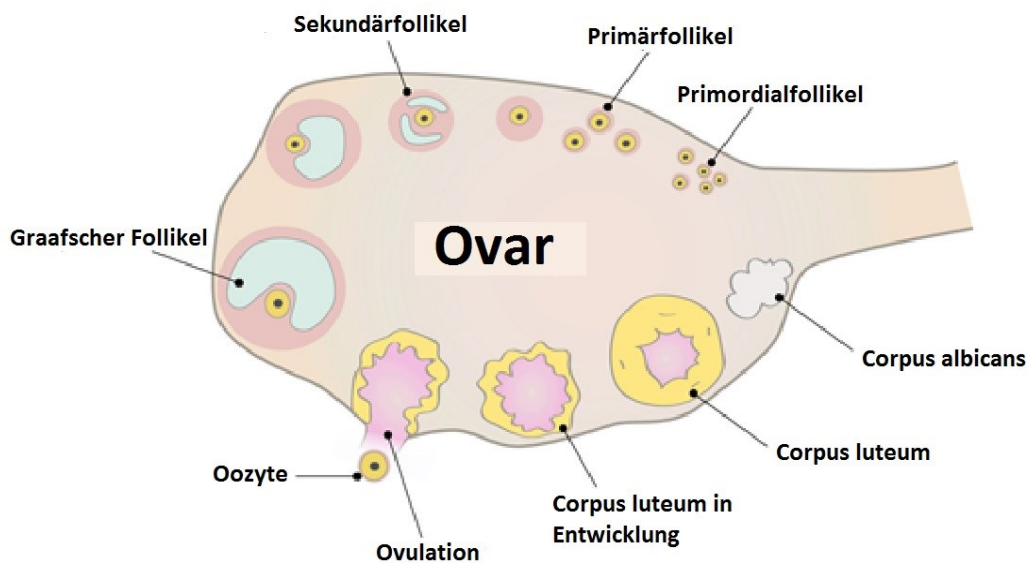


Abbildung 1: Die Follikelentwicklung am Ovar (adaptiert von <http://fblt.cz/en/skripta/viii-rozmnozovaci-soustavy/1-zenske-pohlavni-organy-tehotenstvi-a-porod/> Zugriff am 11.11.2016)

Die Eizelle ist umgeben von den Cumuluszellen und diese wiederum von der Follikelflüssigkeit. Umhüllt wird der Komplex von der Basallamina und den Thekazellen, dargestellt in Abbildung 2.

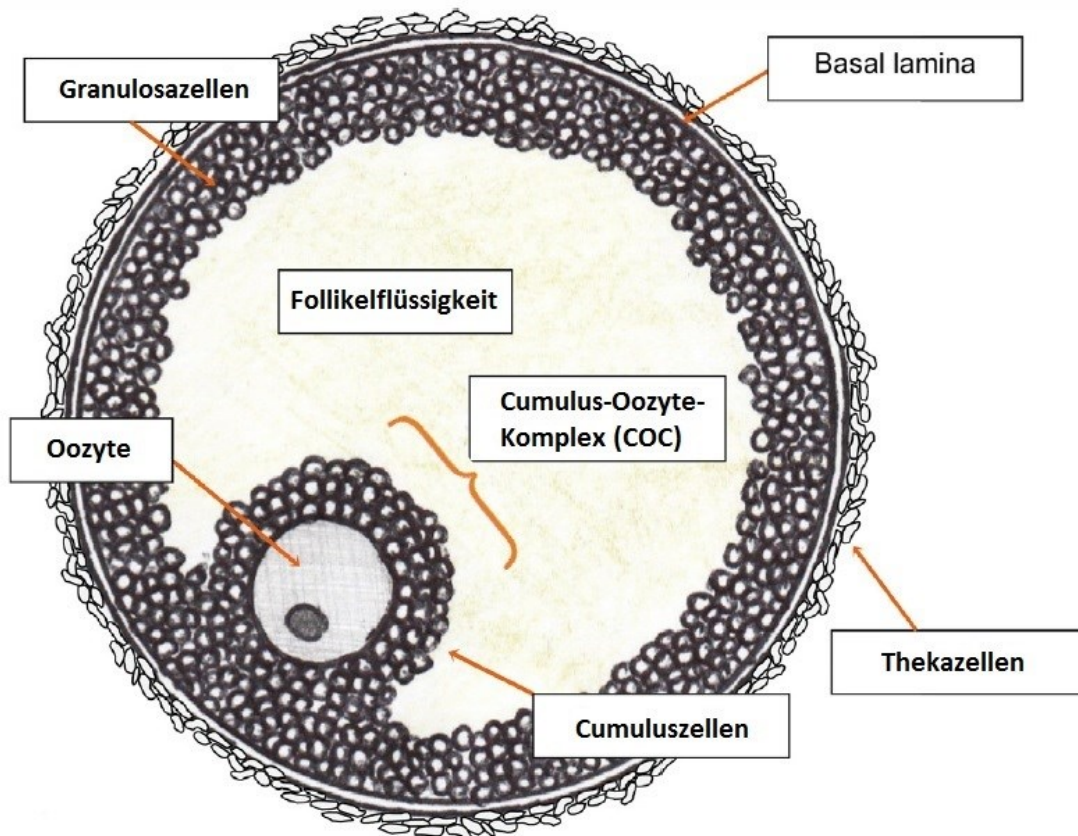


Abbildung 2 Der antrale Follikel und seine Inhalte (adaptiert von Hennet et al. 2012 (9))

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Granulosazellen. Die muralen Granulosazellen kleiden den Follikel aus und die Cumuluszellen welche die Eizelle umgeben und mit ihr den COC, bilden. Zugleich wird jeder Follikel umhüllt von einer Basallamina, eine extrazelluläre Matrix, die den inneren Teil des Follikels von den Thekazellen mit ihren Blutgefäßen trennt. Diese Basallamina ist Teil der *blood-follicle barrier*, BFB(9,10).

### 1.2.2 Entstehung

Die Follikelflüssigkeit (FF oder *liquor folliculi*), entsteht im Rahmen des Follikelwachstums. Beim Sekundärfollikel bildet sich zwischen den Granulosazellen im interzellulären Spalt das abgeschlossene *antrum folliculi* welches die FF beherbergt. Sie setzt sich zusammen aus den Sezernierungsprodukten von Granulosa- und Thekazellen sowie Serumbestandteilen. Durch einen osmotischen Gradienten, hervorgerufen durch die Sezernierung von Hyaluron, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Glykosaminoglykane, durch die Theka- und Granulosazellen, entsteht ein Druck, welcher Serum aus den thekalen Blutgefäßen bewegt (11). Versican, ein Chondroitinsulfat Proteoglycan Hyalectan, bewirkt eine Verklumpung von Hyaluron und anderen osmotisch wirksamen Stoffen zu größeren

Aggregaten und verhindert somit, dass diese aus der FF austreten kann (12). Gleichzeitig wird der kolloidosmotische Druck erhöht. Eine geringere Rolle, bei der Erhöhung des onkotischen Drucks spielt freie DNA in der FF. Es gibt Hinweise beim Rind, dass Granulosazellen nicht an klassischer Apoptose zugrunde gehen, sondern über einen Verhornungsprozess. Deshalb liegen in der FF größere DNA-Stücke vor, welche ebenfalls onkotisch wirksam sind (13). Somit sammelt sich zunehmend Flüssigkeit an. Mit dem Follikelwachstum wachsen und dehnen sich die Blutgefäße um den Follikel aus. Es wird allgemein angenommen, dass die Gefäße hier keinen limitierenden Faktor für das Follikelwachstum darstellen. Jedoch gibt es Hinweise, dass der Blutfluss einen Einfluss auf die Follikelselektion hat (14,15). Im Vergleich zur Blutmenge, welche durch die thekalen Gefäße fließt, ist die Menge an FF sehr gering und es wird nicht davon ausgegangen, dass der Blutfluss die Menge an FF beeinflusst, jedoch könnte der Druck im Gefäß bei manchen Ereignissen, z.B. dem Eisprung, einen Einfluss haben (16).

Aus den thekalen Kapillaren überwindet die FF auf dem Weg zum Antrum das Endothel der Kapillare, die subendotheliale Basallamina, das Interstitium, die folliculäre Basallamina und die *membrana granulosa* des Follikels, dargestellt in Abbildung 3.

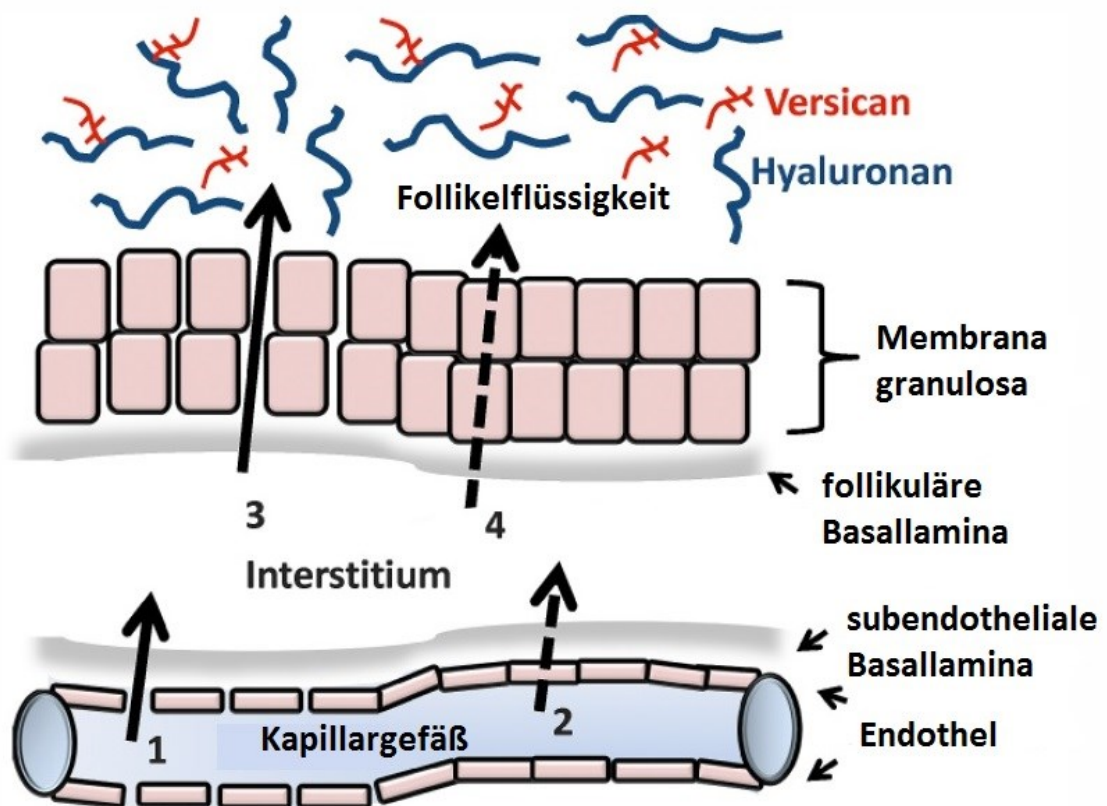


Abbildung 3: Weg der Follikelflüssigkeit, Route 1 und 2, dargestellt durch durchgehende Pfeile, zeigen den Weg der Flüssigkeit zwischen den Zellen an. Die Routen 3 und 4, die gestrichelten Pfeile, zeigen den Weg durch die Zellen an, also transzelluläre Wege, vermittelt durch Aquaporine oder Transzytose (adaptiert von Rodgers et al. 2010 (16))

Das aus der Kapillare austretende Serum, mit seinen Bestandteilen, muss die subendotheliale Basallamina, das Interstitium, die folliculäre Basallamina und schließlich noch die *membrana granulosa*, überwinden, um sich im Antrum anzusammeln. Es kommt zu einem interstitiellen Ödem durch veränderte Durchlässigkeit der thekalen Gefäße, doch sind weitere Mechanismen für den Transport nötig. Diskutiert wurden hierfür eine Natriumpumpe und Glycosaminoglycan-Spaltungen welche beide für eine Erhöhung des kolloidosmotischen Drucks im Follikel verantwortlich sind (16,17).

Da sich auch relativ große Serumproteine in der FF befinden geht man davon aus, dass die *membrana granulosa* keine dichte Barriere darstellt. Es finden sich jedoch größere Plasmaproteine, über 100 kDA, in deutlich geringerer Konzentration in der Follikelflüssigkeit als im Plasma. Dies deutet auf eine selektive Barriere zwischen Blut und Follikel hin (16).

In der folliculären Wand befinden sich Aquaporine, welche möglicherweise an einem aktiven Transport von Wasser in den Follikel beteiligt sind. Bei Ratten und Schweinen wurden die Aquaporine 1,5,7,8 und 9 in den Granulosazellen nachgewiesen, und sind dort am aktiven Wassertransport in den Follikel beteiligt (18,19).

Die Granulosazellen proliferieren weiterhin und formieren sich während des Wachstumsprozesses neu. Die genauen Umstände wie die Reorganisation der Granulosazellen und die Veränderungen der *tight junctions* zwischen ihnen vor sich gehen, sind noch ungeklärt. Die Geschwindigkeit mit der es zur Antrumbildung und Follikelexpansion kommt, hängt vor allem davon ab, ob es sich um einen dominanten oder untergeordneten Follikel handelt. (16,20,21)

### **1.2.3 Das antrum folliculi**

Das *antrum folliculi* ist der flüssigkeitsgefüllte Hohlraum in dem die Oozyte heranreift (9). Sobald ein Antrum gefüllt mit FF deutlich erkennbar wird spricht man von einem Tertiärfollikel.

Da im Follikel vor Bildung einer Höhle multiple Zellverbindungen zwischen allen benachbarten Zellen bestehen, bilden sich zunächst verschiedene kleine Ansammlungen von Flüssigkeit. Diese wachsen und verschmelzen dann an Stellen wo die Zellverbindungen, *tight junctions*, spärlicher sind oder Zellen absterben und sich Freiräume bilden, Auch bei gesunden Follikeln werden abgestorbene Granulosazellen beobachtet. Dies ist eine mögliche Erklärung für den DNA-Gehalt in der FF (16).

Teil dieses Ausdehnungsprozesses ist auch ein Umbau von Theca interna und externa, dem ovariellen Stroma, *Tunica albuginea* und dem Oberflächenepithel. Ebenso wie die Annäherung des Follikels an die Oberfläche des Eierstocks (16).

Generell beeinflusst vor allem FSH das Follikelwachstum. Die Größe des Antrums wird vermutlich von multiplen endokrinen und autokrinen Prozessen reguliert, welche noch nicht vollständig untersucht sind. Zum genauen Zusammenhang zwischen Granulosazellproliferation, Antrumbildung und allgemeinem Follikelwachstum gibt es mehrere Theorien, von denen sich noch keine definitiv bestätigen lies (16).

#### 1.2.4 Die BFB, *blood follicle barrier*

Die BFB stellt eine funktionelle Begrenzung des Follikels mit seiner FF dar. Sie besteht bereits in frühen Stadien der Follikulogenese und setzt sich funktionell aus mehreren Teilen zusammen. Dem Gefäßendothel schließt sich die subendotheliale Basismembran an mit dem thekalen Interstitium und vor der *membrana granulosa* liegt die folliculäre Basismembran (Abbildung 4). Sie trennt die einzelnen Follikel voneinander, grenzt sie gegen die Blutgefäße in der vaskularisierten *theca interna* ab und schützt die sich entwickelnden Follikel vor fremden oder schädlichen Stoffen z.B. Toxine, Medikamente. Innerhalb der BFB gibt es keine Gefäßversorgung. Erstmals beschrieben wurde die BFB im Jahr 1973 durch Shalgi et al., welche Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen Serum und FF feststellten (10,22).

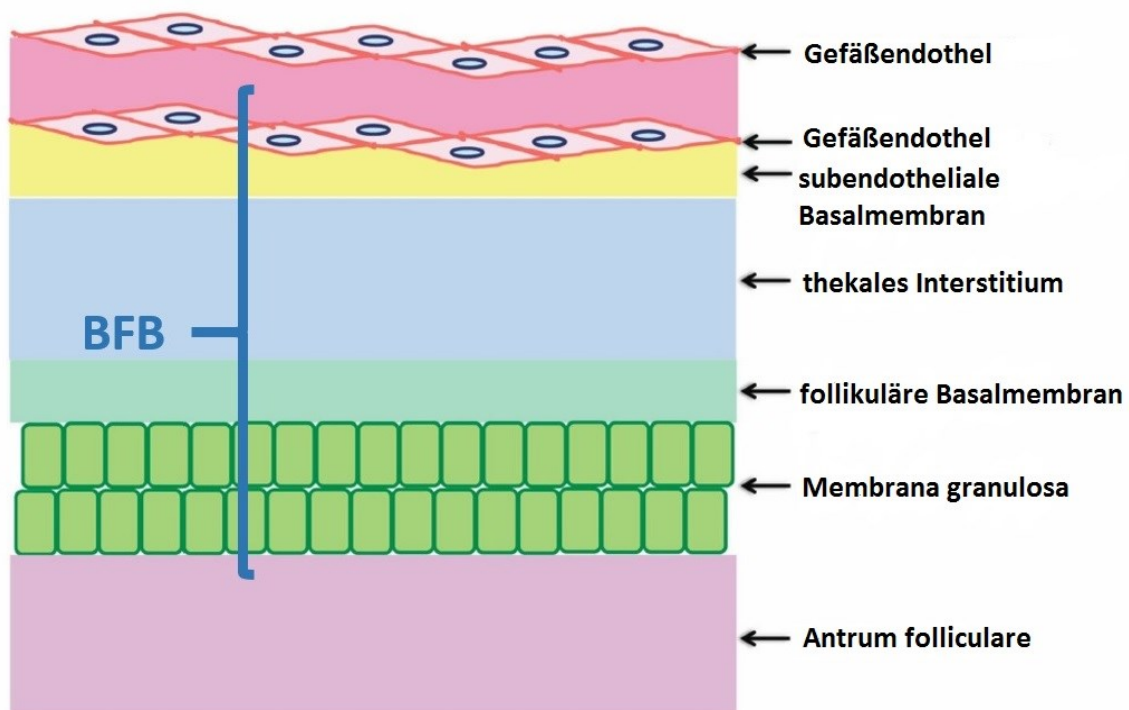


Abbildung 4 Die blood follicle barrie, (adaptiert von Siu et al. 2012 (10))

Die BFB stellt ein „molekulares Sieb“ dar und filtert auf Höhe der folliculären Basalmembran Moleküle von mittlerem Molekulargewicht. So werden beispielsweise IgG1 (ca. 150 kDa), Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor (220 kDa) und Fibrinogen (340 kDa) in viel geringerer Konzentration im Follikel gemessen. Sie können zwar bis zum Interstitium vordringen werden jedoch von der folliculären Basalmembran daran gehindert in die Follikelflüssigkeit überzutreten. Diese ist somit selektiv permeabel für schwerere Moleküle (10,23). Während der Follikulogenese verändert sich die folliculäre Basismembran dynamisch in ihrer Zusammensetzung und möglicherweise ändert sich ebenfalls die Durchlässigkeit der Moleküle während dieses Umbaus (24).

Noch größere Moleküle wie beispielsweise IgM (ca. 900 kDa) werden bereits vom Gefäßendothelium und seiner subendothelialen Basismembran zurückgehalten (23). Das Gefäßendothel kontrolliert den Austritt von Molekülen in das umgebende Gewebe durch seine *tight junctions*, *adherens junctions* und Desmosomen welche die endothelialen Zellen miteinander verbinden (25,26).

Die BFB operiert in beide Richtungen und verhindert das Ausströmen von großen Molekülen, sezerniert durch die Eizelle oder den Granulosazellen und erhält somit den kolloidosmotischen Druck aufrecht (16).

Die BFB hat einen wichtigen Stellenwert in der Follikulogenese da sie den Follikel schützt und ebenso wichtig ist ihre regulatorische Funktion mit der sie Einfluss auf die Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit und somit auf das direkte Umfeld der heranwachsenden Oozyte nimmt. Trotz ihrer wichtigen Rolle sind noch etliche wissenschaftliche Fragen offen und genauere Untersuchungen von Nöten (10).

### **1.2.5 Zusammensetzung**

Die FF setzt sich, zusammen aus Serumbestandteilen und den Sezernierungsprodukten von Theka- und Granulosazellen. Multiple Bestandteilgruppen sind bereits bekannt, werden im Folgenden, in ihrer Funktion für den Follikel und allgemeinen klinischen Bedeutung, kurz erläutert.

#### **1.2.5.1 Hormone**

##### ***1.2.5.1.1 Gonadotropine***

Gonadotropine sind im Hypophysenvorderlappen gebildete Proteohormone, welche Wachstum und Stoffwechsel an den Keimdrüsen steuern (27).

Hohe Konzentrationen, beeinflusst von der zirkulierenden Serumkonzentration, an FSH, LH und hCG weisen auf eine verbesserte Eizellreifung und eine erhöhte

Befruchtungswahrscheinlichkeit hin. Für LH sind diese Ergebnisse am deutlichsten. Auch gibt es Hinweise, dass die Gonadotropine einen Einfluss auf die Sekretion der Granulosazellen von Hyaluronsäuren nehmen (20,28).

#### ***1.2.5.1.2 Somatotropin***

Somatotropin ist ebenfalls ein Hormon des Hypophysenvorderlappens und reguliert über verschiedene Stoffwechselfvorgänge das Wachstum, es ist auch als „Wachstumshormon“ bekannt. Ferner erhöht Somatotropin die Östradiol-Ausschüttung der Granulosazellen, sowie die Bildung von FSH- und LH-Rezeptoren. Ein Zusammenhang zwischen Somatotropingehalt und Befruchtungserfolg ist ungeklärt (20,29–31).

#### ***1.2.5.1.3 Prolaktin***

Prolaktin ist ein Produkt der laktotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens und ein Polypeptid aus 198 Aminosäuren, sein physiologischer Spiegel ist am höchsten während Stillperioden, daher die Namensgebung (3).

Prolaktin stellt keinen geeigneten Marker für die Qualität der Eizelle dar, in vereinzelt Studien wurde eine Aussagekraft bestätigt, diese konnte in anderen Studien jedoch nicht nachgewiesen werden (20).

#### ***1.2.5.1.4 Steroidhormone und Corticosteroide***

Beide Gruppen werden aus Cholesterol gebildet und besitzen eine Struktur aus Kohlenstoffringen. Am Ovar werden die Steroidhormonengruppen Östrogene, Progesterone und Androgene gebildet. In der Nebennierenrinde die Corticosteroide mit ihren drei Gruppen; Glukokortikoide, Mineralkortikoide und Sexualhormone (3,32).

Estradiol eignet sich gut als Marker für die Follikelselektion innerhalb einer Patientin im Rahmen einer IVF Behandlung. Ebenso DHEA-S, Dehydroepiandrosteron-Sulfat, als Marker um den hochwertigsten Follikel innerhalb einer Patientengruppe auszuwählen. Vor allem das Verhältnis Östradiol/Progesteron hat hohe Vorhersagekraft hinsichtlich Implantation und Schwangerschaft. Hingegen eignen sich Progesteron und Testosteron nur bedingt als Marker, da sie sich in ihrer Variabilität kaum unterscheiden, nur ein niedriges Verhältnis Östradiol/Androgene deutet auf frühzeitige atretische Vorgänge am Follikel hin (20,33).

Der positive Einfluss von Corticosteroiden in der FF auf den IVF-Erfolg ist umstritten. Möglicherweise hat das Verhältnis Cortisol/Cortison einen positiven Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft (20,34,35).

#### ***1.2.5.1.5 Anti-Müller-Hormon, AMH***

Der folliculäre Gehalt des Peptidhormons AMH eignet sich als Prädiktor für die Qualität von Oozyte und Embryo (36,37). Die Bedeutung des AMH in Serum und Follikelflüssigkeit soll im Kapitel 1.4 genauer erläutert werden.

### **1.2.5.2 Wachstumsfaktoren**

#### ***1.2.5.2.1 Inhibin A und Inhibin B***

Inhibin ist ein Proteohormon, welches die FSH-Ausschüttung reguliert und wird in den Granulosazellen, bzw. beim Mann in den Sertolizellen gebildet. Es spielt eine Rolle im hypothalamohypophysären Regelkreis. Man unterscheidet aufgrund der Zusammensetzung der Proteinketten Inhibin A und Inhibin B (3,38).

Während der folliculären Entwicklung erhöht sich der Anteil an Inhibin A, hingegen verringert sich der Anteil an Inhibin B. Inhibin B in der Follikelflüssigkeit kann als Marker für die ovarielle Antwort gesehen werden, da es mit der Anzahl der gewonnenen Eizellen stark korreliert (39,40).

#### ***1.2.5.2.2 BMP-15***

*Bone morphogenetic protein-15* ist ein Wachstumsfaktor aus der TGF-beta-Familie und ein potenzieller Faktor um die Eizellqualität widerzuspiegeln. Es korreliert mit dem Estradiolgehalt der Follikelflüssigkeit (41,42).

#### ***1.2.5.2.3 IGF***

Insulin-like growth factors stimulieren die Zellproliferation- und differenzierung in vielen Geweben. Ihre Wirkung und der Einfluss ihrer Bindungsproteine auf die Eizellentwicklung sind umstritten (20,43).

#### ***1.2.5.2.4 Interleukine***

Interleukine (IL), sind Zytokine und werden unter anderem während der Follikelreifung und Ovulation vom Ovar sezerniert und gelangen über die BFB in die Follikelflüssigkeit. IL-1beta, IL-2, IL-8 und IL-12 sind mögliche Marker zur Vorhersage des IVF-Erfolgs, ihre genaue Stellung ist jedoch kontrovers diskutiert und muss noch genauer abgeklärt werden (20,44–46).

### **1.2.5.3 Reaktive Sauerstoff Spezies**

#### ***1.2.5.3.1 ROS und antioxidative Faktoren***

Reaktive Sauerstoff Spezies, fallen im Rahmen des aeroben Metabolismus an, und stellen als oxidativer Stress einen negativen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Eizelle dar. Durch verschiedene protektive Faktoren wird die Eizelle vor diesem negativen Einfluss geschützt. Der genaue Einfluss von ROS und antioxidativen Vorgängen auf die Oozyte ist umstritten und genauere Validierung ist notwendig (47).

#### ***1.2.5.3.2 Stickoxide***

Granulosazellen beinhalten Stickoxid-Synthase (eNOS) und produzieren Nitrite und Nitrate aus Stickoxiden. Der Gehalt an Nitriten und Nitraten ist signifikant kleiner in Follikeln mit reifen Eizellen als in befruchteten Embryonen. Es besteht also die Möglichkeit, dass eine zu hohe Konzentration an Stickoxide um die Eizelle apoptotische Vorgänge im Follikel auslösen und somit ihre Entwicklung einschränken kann. Die Schwierigkeit der Messung von Stickoxiden limitiert jedoch die Möglichkeit sie als Qualitäts-Marker zu verwenden (20,48,49).

#### ***1.2.5.3.3 VEGF***

VEGF, *vascular endothelial growth factor*, stimulieren die Angiogenese im menschlichen Körper indem es die Endothelbildung vermittelt. Ob VEGF einen positiven oder negativen Einfluss auf die Eizelle hat, ist kontrovers diskutiert. Als sicher bestätigt hat sich, dass VEGF den Grad an perifollikulärer Gefäßversorgung angibt, also die Dichte an Gefäßen in der unmittelbaren Umgebung des Follikels und ihren Durchblutungsgrad. Es könnte eine ungenügende Sauerstoffversorgung des Follikels anzeigen. Derzeit stellt es einen zu aufwändigen und kostenintensiven Marker dar um praktische Anwendung zu finden (20,50,51).

### **1.2.5.4 Anti-Apoptose Faktoren**

Hohe Zellapoptose-Anteile im Follikel zeigen eine schlechte Qualität der Eizelle und ihres Umfeldes an. Oozyten mit hoher Qualität weisen niedrige Apoptoseraten auf. Jedoch stellen keine Apoptose-Faktoren (z.B. soluble Fas) einen geeigneten Prädiktor für den IVF-Erfolg dar (20,52,53).

## **1.2.5.5 Proteine, Peptide und Aminosäuren**

### **1.2.5.5.1 Proteomik**

Proteomik, englisch *proteomics*, bezeichnet, die multiple gleichzeitige biochemische Analyse von allen Proteinstrukturen in einem Medium zu einem definierten Zeitpunkt. Als problematische Faktoren ergeben sich unter anderem das dynamische Verhalten der Proteine und ihre zum Teil komplizierte Zusammensetzung (20,54).

Trotz großer Studien zur Proteinzusammensetzung der FF konnten noch keine Schlüsselproteine, als deutliche Prädiktoren, gefunden werden. Dies stellt eine große Herausforderung und ein vielversprechendes Feld für die zukünftige IVF-Forschung dar (55,56).

### **1.2.5.5.2 PAPP-A**

Pregnancy-associated plasma protein A, nimmt eine Schlüsselposition in der Steroidgenese im Follikel ein und korreliert positiv mit Estradiol und Progesteron, negativ mit AMH, Testosteron und Androstendion. Inwiefern es ein Marker hinsichtlich Eizellqualität ist, bleibt ungeklärt (57).

## **1.2.5.6 Zuckermoleküle**

Hyaluron, ein Disaccharid aus D-Glucuronsäure und D-N-Acetylglykosamin nimmt eine wichtige Rolle bei der Bindung des Cumulus-Eizell-Complexes und der Bildung eines kolloidosmotischen Gradienten ein. Bis dato wurde kein Einfluss seiner Konzentration in der FF auf die Reifheit und die Fruchtbarkeit von Eizellen gefunden (20,58).

## **1.2.5.7 Prostanoid**

Dazu zählt Prostaglandin F<sub>2α</sub>, welches unter Gonadotropinstimulation von den GC sezerniert wird. Die Einflüsse sind umstritten da die sehr kurze Halbwertszeit der Prostanoid ihre Messung erschwert und sich als technisch schwierig gestaltet. Deshalb eignen sie sich derzeit schlecht als Marker für die IVF Behandlung (20).

## **1.2.5.8 Physikalisch-chemische Faktoren**

Die Viskosität der FF oder ihr Brechungskoeffizient zeigen keinen Zusammenhang mit dem Eizellreifungsgrad oder dem Befruchtungserfolg (59,60).

## **1.2.5.9 Fettsäuren**

Die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Follikelflüssigkeit ist unter anderem abhängig von den Ernährungsgewohnheiten der Patientin vor und während der IVF-Behandlung und ihrem allgemeinen Metabolismus. Bei Milchkühen konnte nachgewiesen werden, dass die

Zusammensetzung der Fettsäuren einen Einfluss auf die Eizelle und ihre Differenzierungsfähigkeiten hat. Es gibt Hinweise, dass ein Vorherrschen von mehrfach ungesättigten- gegenüber gesättigten Fettsäuren die Reifheit der Eizelle, sowie die Stabilität ihrer Zellmembran verbessert. Somit nimmt die Zusammensetzung der Fettsäuren der Follikelflüssigkeit einen Einfluss auf die Qualität der Eizelle (56,61).

#### **1.2.5.10 Zellfreie DNA und RNA**

Ebenso in der Follikelflüssigkeit findet sich zellfreie DNA. Ihre Konzentration ist invers korreliert mit dem Follikeldurchmesser und der Embryoqualität und somit mit den Stoffwechselprozessen die innerhalb des Follikels stattfinden. Dies bedeutet, je höher der Gehalt an cfDNA desto höher ist die Apoptoserate von Granulosazellen. Ihr Anteil könnte die Gesundheit und Reifheit des Follikels widerspiegeln. Noch unklar ist, ob der Gehalt an cfDNA in der FF ein Auslöser für oder eine Konsequenz von niedriger Embryoqualität ist. (62).

Die Zusammensetzungen von microRNA in der FF zwischen Patientinnen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Alters und den Reifungsstufen der Eizellen (63).

## **1.3 Rolle des AMH in der menschlichen Entwicklung**

### **1.3.1 Geschichtlicher Hintergrund**

Das Anti-Müller-Hormon (AMH), im englischen Sprachraum auch bekannt als *mullerian inhibiting substance* (MIS), ist ein 140 kDA schweres Peptidhormon aus der TGF- $\beta$ -Familie. Es wird beim weiblichen Geschlecht, von den Granulosazellen wachsender Follikel sezerniert und beim männlichen während der Embryonalgenese von testikulärem Gewebe (3,64). Zytokin aus der TGF- $\beta$ -Gruppe spielen eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung- und proliferation in der Embryonalgenese und der Homöostase des Gewebes im adulten Organismus (65), z.B. bei Mutationen von Tumorsuppressorgenen (66). Das AMH-Gen liegt auf Chromosom 19 p13.3, enthält 5 *exons* und bindet an den spezifischen AMH type II receptor, welcher von einem Gen auf Chromosom 12 p13 kodiert wird (64,67,68).

Beschrieben und benannt wurde AMH erstmals 1830 durch den Physiologen und Anatom Johannes Peter Müller, der sein Rolle bei der Geschlechtsdifferenzierung und Embryonalentwicklung untersuchte (69). Ebenso hervorzuheben sind die Experimente von Alfred Jost um das Jahr 1940. Er konnte durch Tierversuche die Rolle von AMH in der Geschlechtsentwicklung genauer darstellen, indem er bei männlichen Hasenfeten die Hoden entfernte und diese sich daraufhin weiblich entwickelten (70).

### **1.3.2 AMH und seine Rolle in der Physiologie der Embryonalgenese**

Die Anlage des menschlichen Fötus ist anatomisch immer weiblich und wird erst durch das Einwirken verschiedener Faktoren männlich. Somit unterscheiden sich vor der siebten Woche der Embryonalentwicklung männliche und weibliche Feten nur genetisch, nicht histologisch, diese Phase wird als sexuell indifferentes Stadium bezeichnet mit indifferenter Gonadenleiste. In diese wandern die Urkeimzellen ein und es entwickelt sich je nach Chromosomenvorliegen Ovarien oder Hoden. Der vom Y-Chromosom induzierte testisdeterminierende Faktor (TDF) veranlasst die Bildung der Hoden. Wenn dieser nicht vorhanden ist, bilden sich Ovarien aus. Die indifferent angelegten paarigen Gang-Systeme werden Wolff- und Müller-Gänge genannt. Aus ihnen entwickeln sich im Weiteren die Geschlechtsorgane (6).

Beim männlichen Embryo bilden sich die Wolff-Gänge durch Testosteroneinfluss zurück. Zusätzlich wird AMH von den Sertoli-Zellen des fetalen Hodens gebildet und reguliert gemeinsam mit Testosteron, produziert von den Leydig-Zellen des Hodens, die

Rückbildung der Müller-Gänge (*Ductus paramesonephrici*). Somit wird die Ausbildung von *Uterus* und *Tuba uterina* verhindert. Infolgedessen bilden sich weitere orchale Strukturen aus (71,72).

Beim weiblichen Fötus kommt es durch die Abwesenheit von TDF, zur Ausbildung von weiblichen Geschlechtsorganen (73), hier fördern die Hormone des Ovars die Ausbildung der Müller-Gänge. In der folgenden Embryogenese verschmelzen die paarigen Müller-Gänge und bilden das obere Drittel der Vagina, Eileiter und den Uterus. Der untere Teil der Vagina bildet sich aus dem *Sinus urogenitalis* (6,74). Wie bei allen embryonalen Vorgängen kann es zu Fehlentwicklungen kommen und hier spielt AMH als Marker im Serumblut eine wichtige Rolle.

## 1.4 Klinische Bedeutung des AMH

### 1.4.1 Die Rolle in der Reproduktionsmedizin

Die Konzentration an Anti-Müller-Hormon im Blutserum wird in der Reproduktionsmedizin primär für die Vorhersage des „reproduktionsmedizinischen Alters“ von Frauen mit Kinderwunsch verwendet, da es das Alter in Hinblick auf das Klimakterium einschätzen kann. Es erlaubt Rückschlüsse auf die Anzahl der antralen und präantralen Follikel, kann zu einem gewissen Grad Vorhersage leisten wie die ovarielle Antwort auf eine IVF-Stimulation (*in vitro fertilisation*) sein wird und kann eventuelle iatrogene Schäden der IVF möglicherweise vorhersagen z.B. OHSS. Bei der Diagnose von polyzystischem Ovar-Syndrom (PCO) kann es den antralen Follikel-Count ersetzen (8,75). Der große Vorteil des AMH im Vergleich zu anderen Markern ist, dass es den aktuellen Zustand der verbleibenden Fertilität widerspiegelt und relativ leicht und durchführerunabhängig erhoben werden kann (76).

Die Normwerte für AMH im Serum werden derzeit für Frauen zwischen 25 und 40 Jahre folgendermaßen angegeben, siehe Tabelle 1:

Tabelle 1 Serumwertangaben für AMH adaptiert nach Alipour et al. (77)

	AMH im Serum [ng/ml]	AMH im Serum [pmol/l] <sup>1</sup>
„high“ (oft PCOS)	>3.0 ng/ml	>21,4 pmol/l
„normal“	1,0-3,0 ng/ml	7,2-21,4 pmol/l
„low normal“	0,7-0,9 ng/ml	5,0-6,4 pmol/l
„low“	0,3-0,6 ng/ml	2,1-4,3 pmol/l
„very low“	<0,3 ng/ml	<2,1 pmol/l

#### 1.4.1.1 Vorhersage der ovariellen Reserve

Die Vorhersage der ovariellen Reserve ist ein wichtiger Bestandteil jeder IVF-Behandlung, da sie nicht nur über den Erfolg einer anstehenden Therapie Auskunft gibt, sondern ebenso über möglichen Zeitdruck für das Paar mit Kinderwunsch informieren kann.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden entwickelt und verwendet.

<sup>1</sup> Adaptiert nach (77), mit: ng/ml x 7,14 = pmol/l

#### **1.4.1.1.1 Bestimmung der ovariellen Reserve über den AMH-Wert**

AMH und AFC, *antral follicle count*, korrelieren signifikant mit der Anzahl an gewonnenen Eizellen beim OPU (78). Somit erlaubt der Serumwert des AMH einen direkten Rückschluss auf die Anzahl der verbleibenden antralen Follikel. Der Serumwert weist eine gewisse intraindividuelle Schwankungsbreite im Menstruationszyklus auf (11% der Variabilität). Diese ist jedoch relativ gering im Vergleich zur interindividuellen Schwankung welche 89 % der Variabilität erklärt (79,80). Auch schwanken die Werte im Verlauf des Lebens: es kommt zu einem Gipfel kurz nach der Geburt, vor der Pubertät und am höchsten sind die Werte nach der Pubertät im durchschnittlich 25. Lebensjahr, also dem Zeitpunkt der höchsten Fruchtbarkeit. Mit diesen Werten korreliert die Anzahl der *non-growing follicles* (NGF) ab dem Alter von 25 direkt (81,82).

Somit ist ein großer Vorteil von AMH seine relative Stabilität über den ganzen Zyklus, es kann zu jedem Zeitpunkt abgenommen und aus dem Serum bestimmt werden und ist zeitlich unabhängig, dies erhöht die Flexibilität der Behandlung (76).

In mehreren Studien wurde darauf hingewiesen, dass AMH der geeignetste Marker ist um die ovarielle Reserve wiederzugeben (8,76,78). Der größte Nachteil aller anderen Marker, besteht darin, dass sie erst auffällig werden, sobald die ovarielle Reserve bereits niedrig ist und die Erfolgchancen von künstlicher Befruchtung bereits gesunken sind.

Zu erwähnen ist, dass es ethnische Unterschiede hinsichtlich der ovariellen Reserve und somit der Höhe des AMH-Gehalts im Serum gibt. Genetische Unterschiede führen dazu, dass bei dunkelhäutigen und hispanoamerikanischen Frauen, die AMH-Werte um circa 25% niedriger liegen als bei kaukasischen (83). Mit zunehmender Globalisierung gilt dies zu berücksichtigen, damit für jede Frau eine optimale Planung ihrer Fruchtbarkeitsbehandlung stattfinden kann.

#### **1.4.1.1.2 Alter**

Den größten Einfluss auf die verbleibende ovarielle Reserve hat das Alter der Patientin. Mit zunehmendem Alter minimiert sich die Anzahl der verbleibenden antralen Follikel unter anderem durch Ovulationen und atretische Vorgänge. Je jünger die Patientin desto größer ist in der Regel ihre verbleibende ovarielle Reserve (1).

#### **1.4.1.1.3 Antrale Follikelzählung**

Der *antrale follicle count* (AFC) und der Serumwert des AMH korrelieren mit der Anzahl an Primordialfollikeln am Ovar, auch bei Berücksichtigung des Alters. Dies erlaubt ohne invasive Methode, mit histologischer Biopsie, die ovarielle Reserve der verbleibenden Follikel bei einer Frau abzuschätzen (84). Ein vaginaler Ultraschall mit AFC weist jedoch

hohe Messunterschiede auf, zurückzuführen auf den jeweiligen durchführenden Arzt und eignet sich schlecht bei Frauen mit vorausgegangenem Operationen oder Zysten an den Ovarien. Ein anderer Nachteil ist, dass beim Ultraschall kein Unterschied zwischen atretischen und gesunden Follikeln getroffen werden kann, was das Ergebnis verfälschen kann (85,86). Trotzdem besteht eine sehr hohe Übereinkunft der Messergebnisse zwischen AFC und AMH im Serum hinsichtlich fertilen und nichtfertilen Patienten (87) und der AFC eignet sich gut als kontrollierender Marker für AMH.

#### **1.4.1.1.4 FSH**

Follikel-stimulierendes Hormon ist einer der ältesten und bewährtesten Marker in der Reproduktionsmedizin. Es wird aufgrund zyklischer Werte am dritten Menstruationstag abgenommen und ist somit zeitlich unflexibel. Mit zunehmendem Alter steigen die Serumwerte an, da das Ovar in seiner Reaktionsfreudigkeit abnimmt. In vielen Szenarien kann der Wert verfälscht sein, beispielsweise durch hormonelle Substitution, PCO-Syndrom oder Tumore der Hypophyse (88,89).

#### **1.4.1.1.5 LH**

Luteinisierendes Hormon ist wie FSH ein Hormon sezerniert vom Hypophysenvorderlappen. Es liefert im direkten Vergleich zu AMH keine so klaren Aussagen über die verbleibende Fruchtbarkeit, jedoch gibt es Hinweise dass bei PCO das Verhältnis von LH zu FSH mehr Aussagekraft hat als die reine Messung des AMH (8,90).

#### **1.4.1.1.6 Estradiol**

Estradiol, ein steroidales Geschlechtshormon, wird sezerniert von Fett-, Brust- und Nervengewebe, sowie von Leber, Nebennieren und ovariellen Follikeln. Diese vielen Entstehungsorte erschweren sein Potential als Marker zur Messung der ovariellen Reserve. Bei Amenorrhoe oder unregelmäßiger Menstruation kann es Hinweis auf Hypoöstrogenismus oder die Menopause geben, insgesamt eignet es sich jedoch nicht sehr gut als Prädiktor für die Vorhersage der Anzahl der verbleibenden Eizellen (76,91,92).

#### **1.4.1.1.7 Inhibin B**

Inhibin B ist ein heterodimeres Glycoprotein und wird wie AMH von den Follikeln in ihren unterschiedlichen Stadien sezerniert. Es reduziert die FSH-Ausschüttung der Hypophyse. Als Marker zur Vorhersage der Menopause, von OHSS und der Toxizität von Chemotherapie eignet es sich schlechter als AMH (76,93–96).

### **1.4.1.2 Risikoeinschätzung OHSS**

Das ovarielle Hyperstimulationssyndrom, OHSS, stellt eine schwere Komplikation der Kinderwunschbehandlung dar. Es kann zu verschiedenen Zeitpunkten während der hormonellen Stimulation und in verschiedenen Schweregraden auftreten. Es geht einher mit einer Verschiebung von Flüssigkeit in den interstitiellen Raum, multizystische Adnexe und multiple Ödeme ausgelöst durch die hormonelle Stimulation mit Gonadotropinen und die daraus folgenden Komplikationen u.a. Elektrolytstörungen, gestörte Hämokonzentration, Gewichtszunahme, Dyspnoe und abdominelle Schmerzen, bis hin zum Nierenversagen. Da es im schlimmsten Falle lebensbedrohlich sein kann, stellt die Risikoeinschätzung für jede Patientin ein OHSS zu erleiden für den Kliniker eine wichtige Herausforderung dar (3).

AMH-Serumwerte haben sich hier als Marker bewährt um das Risiko für ein OHSS individuell für jede Patientin zu bewerten und bei erhöhtem Risiko die hormonelle Dosis anzupassen und eine genaue Überwachung der Stimulation voranzuplanen (97,98).

Diese individuelle Anpassung der Behandlung aufgrund des AMH-Wertes erhöht den positiven klinischen Outcome, verringert Komplikationen und daraus folgende finanzielle Kosten (99).

## **1.4.2 AMH als Marker in der PCO-Diagnostik**

### **1.4.2.1 Definition Polyzystisches-Ovar-Syndrom**

Das polyzystische-Ovar-Syndrom, PCO-Syndrom, auch bekannt als Stein-Leventhal-Syndrom, nach seinen Erstbeschreibern, ist die häufigste hyperandrogenämische Störung bei Frauen und betrifft 5-10% von ihnen. Die genauen pathophysiologischen Vorgänge sind unklar, es handelt sich um eine Störung mit heterogenem Bild und setzt sich aus veränderten Ovarien und einer gestörten Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse zusammen. Auf den veränderten Ovarien befinden sich viele kleine Zysten, mindestens 10 Stück mit einem Durchmesser unter 10mm: „polyzystisches Ovar“. Diese werden je nach Definition begleitet von einer Insulinresistenz, welche eine Hyperinsulinämie nach sich zieht, das Risiko für Diabetes mellitus II erhöht und eine Hyperandrogenämie, beide mit ihren jeweiligen klinischen Folgeerscheinungen u.a. kommt es zur Adipositas, Hirsutismus und Oligo- oder Amenorrhoe (100,101).

### **1.4.2.2 Diagnostik des PCO**

In den Rotterdam-Kriterien von 2003, erstellt im Rahmen eines Workshops von ESHRE und ASRM, müssen zwei von drei Kriterien erfüllt sein für eine PCO-Syndrom-Diagnose, siehe Tabelle 2 (102).

Revidierte Kriterien 2003, 2 von 3 müssen erfüllt sein für die Diagnose PCO-Syndrom	
1.	Oligo- oder Anovulation
2.	Klinische und/oder biochemische Zeichen für Hyperandrogenämie
3.	Polyzystische Ovarien, <i>polycystic ovarian morphology</i> (PCOM), unter Ausschluss anderer Ätiologie (kongenitale adrenale Hyperplasie, Androgenproduzierende Tumore, Cushing-Syndrom)

Im Serum finden sich bei PCO höhere AMH-Werte als bei gesunden Patientinnen. Diese erhöhten Werte rühren von einem Reifungsdefekt, einer Reifungsstörung der Granulosazellen oder von der vorliegenden Hyperandrogenämie (103).

Aufgrund dieser erhöhten Serumwerte kann AMH als diagnostischer Faktor für die PCO-Diagnose verwendet werden, da es die Ausprägung des PCO-Syndroms widerspiegelt (104).

#### **1.4.3 AMH und seine Rolle in der Pädiatrie bei Störungen der Sexualdifferenzierung**

Sexuelle Entwicklungsstörungen bei Kindern können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Um diese genauer zu eruieren und Therapiefortschritte zu überwachen hat sich die Messung von AMH im Serumblut als nützlicher Wert erwiesen. Zum Beispiel um die Anwesenheit von testikulärem Gewebe oder beidseits abwesende Hoden zu beweisen, oder um bei schweren Störungen der sexuellen Entwicklung Aufschluss zu geben. Auch bei weiblichen Patientinnen mit Turner Syndrom kann es zu einem vorzeitigen Verlust der ovariellen Reserve kommen, dies kann mittels AMH als Marker gemessen und überwacht werden (105,106).

So haben männliche Neugeborene hohe AMH-Werte im Serum, bei weiblichen hingegen ist das Hormon nicht nachweisbar. Bis zum Alter von drei Monaten erhöhen sich bei beiden Geschlechtern die Werte, jedoch sind sie bei Jungen noch deutlich höher. Bei Eintritt in die Pubertät verringern sich die Serumwerte bei jungen männlichen Heranwachsenden und erhöhen sich bei weiblichen, um sich am Ende der Pubertät stabil einzupendeln und erst nach dem circa 30. Lebensjahr, bei beiden Geschlechtern, wieder abzusinken. Diese Normwerte sind von großer Wichtigkeit, da sie bei verschiedenen Erkrankungen Aufschluss über den Schweregrad und die Entwicklung geben können (106).

Wenn bei der Geburt das Geschlecht des Kindes aufgrund zweideutiger Genitalien unklar ist kann mittels Serum-AMH die Anwesenheit von testikulärem Gewebe bewiesen werden und Aufschluss über das Geschlecht geben (107–109).

Bei Hodendystopie gibt es Hinweise, dass AMH in den meisten Fällen die hCG-stimulierte Testosteronmessung ersetzen könnte, da es einen ebenso guten Vorhersagewert liefert und eine unkompliziertere Messung ermöglicht (107,110).

Bei persistierenden Müller-Gängen, auch genannt PMDS *persistent müllerian duct syndrome*, kommt es aufgrund anormaler AMH-Sekretion zu einer gestörten Rückbildung der Müller-Gänge bei betroffenen männlichen Individuen. Grund hierfür kann eine Mutation im AMH-Gen, im AMH-Rezeptor-Gen oder eine Hodendysgenese sein. Man unterscheidet Patienten mit PMDS nach ihrem AMH-Status, positiv oder negativ bzw. Vorliegen von genetischen Mutationen. Bei AMH-positiven Patienten geht man von einer Mutation im AMH-Rezeptor-Gen aus. Es gibt jedoch auch Patienten ohne eine genetische Diagnose (111,112).

Bei Mädchen und Frauen mit Virilisierungserscheinungen kann die AMH-Konzentration im Serum einen Aufschluss über die Anwesenheit von testikulärem Gewebe, einen Granulosazelltumor oder übermäßige adrenale Testosteronproduktion geben (113,114).

#### **1.4.4 AMH als Marker bei Granulosazelltumor**

Granulosazelltumore (GCT *granulosa cell tumor*) machen circa acht Prozent aller malignen Ovarialkarzinome aus. Man unterscheidet eine adulte und eine juvenile Form, welche deutlich seltener auftritt. Da AMH von den Granulosazellen und somit auch dem GCT sezerniert wird, kann man bei 76-93% der Patientinnen erhöhte Serumwerte messen und somit über diesen Wert auf die Tumoraktivität rückschließen. Ebenso erhöhen sich die AMH-Werte bereits bis zu 16 Monaten vor klinischer Symptomatik des Tumors. Somit eignet sich hier AMH sowohl als früher diagnostischer Marker, wie auch als Kontrollmarker für ein Wiederauftreten des Tumors (115–117).

## **1.5 Follikeldurchmesser und Befruchtungserfolg**

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben wächst der Follikel in seiner Entwicklung kontinuierlich. Bei hormonellen Stimulationen im Rahmen von IVF-Behandlungen wird beobachtet, dass es trotzdem Follikel unterschiedlicher Größe in einem Zyklus gibt. Da mit zunehmender Reife sich auch das Volumen des Follikels erhöht, geht man davon aus darin eine reife Eizelle zu finden. Somit wird beim OPU versucht vor allem die größten Follikel am Ovar zu punktieren, da in ihnen am wahrscheinlichsten eine reife Oozyte gefunden werden kann. Es werden in der Regel alle punktierbaren Follikel punktiert, diese sind meist jene mit einem Durchmesser größer 10 mm. Die Follikelgröße gilt als ausschlaggebender Faktor vor dem OPU in konventionellen Stimulationszyklen (118–120).

Am vielversprechendsten, um eine Schwangerschaft zu erreichen, haben sich Eizellen erwiesen, die bei der Punktion bereits das Metaphase II (MII) Stadium erreicht haben. Auch in kleineren Follikeln finden sich Eizellen im MII Stadium oder Eizellen die dieses in den Stunden nach dem OPU erreichen, jedoch bei Follikeln ab 18 mm Durchmesser sind 99% der Oozyten im MII-Stadium. Auch werden mehr Eizellen gewonnen, je größer die Follikel sind. Für den klinischen Alltag bedeutet dies, dass ab einer Follikelgröße von 15 mm Durchmesser die Ovulation ausgelöst wird um eine möglichst große Anzahl an reifen Eizellen zu gewinnen und den Befruchtungserfolg zu maximieren (118).

## **1.6 Fragestellung und Hypothesen**

Aus den geschilderten Erkenntnissen ergibt sich die Fragestellung ob zwischen der Follikelgröße und dem AMH-Gehalt im Follikel ein Zusammenhang besteht.

Auf den Follikeldurchmesser kann durch das gewonnene Volumen der folliculären Flüssigkeit rückgeschlossen werden, da sich je nach Masse der FF unmittelbar die Größe des Follikels vergrößert.

Die Hypothesen lauten folgendermaßen:

### **Hypothese 1 (H1)**

Die Konzentration von AMH ist direkt proportional zum Follikelvolumen.

### **Hypothese 2 (H2)**

Die Konzentration von AMH ist indirekt proportional zum Follikelvolumen.

### **Nullhypothese (H0)**

Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Konzentration von AMH und dem Follikelvolumen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Datengewinnung**

Die Patientinnen wurden zufällig ausgewählt. Es handelte sich um Frauen, die sich im Rahmen einer In-vitro-Fertilisation, einer Behandlung am Kinderwunsch-Institut Dobl unterzogen und bereits Teil der Biobank-Studie waren. Die Frauen willigten mittels Einverständniserklärung dazu ein, überschüssige Körperflüssigkeits- und Gewebeproben für Studienzwecke in der Biobank der Medizinischen Universität Graz einzulagern (sogenannte Biobank-Studie) und für wissenschaftliche Zwecke zu untersuchen. Die Biobank-Studie ist eine Kooperation zwischen dem Kinderwunsch Institut Dobl GmbH und der Medizinischen Universität Graz und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz positiv beurteilt mit der Ethikkommissionsnummer (20-492 ex 08/09).

#### **2.1.1 Allgemein**

##### **2.1.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

Eingeschlossen wurden Frauen, die aufgrund von Kinderwunsch eine hormonelle Stimulation und damit einhergehende Eizellentnahme (*ovum-pick-up*) erhielten.

Es wurden nur Patientinnen die bereits Teil einer Biobankstudie sind, und eingewilligt hatten ihre Daten anonymisiert für die Forschung weiterzugeben, in die Studie inkludiert. Siehe im Anhang: Einverständniserklärung Biobank.

Ausschlusskriterien waren Patientinnen jünger als 20 Jahre und älter als 40 Jahre, zum Stimulationszeitpunkt.

##### **2.1.1.2 Datenschutz und ethische Bedenken**

Die patientenbezogenen Daten wurden aus dem institutsinternen Patientenverwaltungsprogramm gewonnen, durch einen Code anonymisiert und mit größter Sorgfalt behandelt. Nur autorisierten Personen, welche eine Verschwiegenheitserklärung unterzeichnet haben, wurde Dateneinsicht gewährt.

Die Patientinnen wurden ärztlich aufgeklärt und um Einwilligung gebeten, spätestens 24 Stunden vor der Eizellentnahme. Die beteiligten Frauen unterzeichneten eine Einverständniserklärung (siehe Anhang: Einverständniserklärung Biobank) und wurden über die anonyme Verwendung von klinischen Daten und überschüssigen Proben

körperbezogener Flüssigkeiten (Follikelflüssigkeit, Supernatant, Serumüberstände) aufgeklärt.

Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein körperliches Risiko für die Patientinnen. Es entstanden keine direkten Vorteile für die Teilnehmerinnen. Die Daten zur IVF-Behandlung wurden anonymisiert behandelt und die Datenverarbeitung erfolgte indirekt personenbezogen codiert über ein institutsinternes Codierungssystem beziehungsweise für die Berechnungen über ein Buchstabencodierungssystem über welches nur autorisierte Personen auf die Daten der Patientinnen rückvollziehen können.

### **2.1.1.3 Votum der Ethikkommission**

Für die Durchführung der Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz vor. Es wurde vor der Datenbearbeitung eingeholt. Die Ethikkommissionsnummer lautet 29-065 ex 16/17 und es besteht Gültigkeit vom 18.11.2016 bis zum 18.11.2017 unter der Voraussetzung, dass etwaige Änderungen im eingereichten Protokoll gemeldet werden.

## **2.2 Stimulation und Gewinnung der FF**

### **2.2.1 Stimulation und Instruktionen**

Die hormonelle Stimulation der Patientinnen erfolgte nach Standardprotokollen, bei zwei wurde das Antagonistenprotokoll und bei einer Patientin das so genannte *long protocol* angewandt. Alle drei erhielten rekombinante FSH-Präparate, Puregon® Merck & Co. Inc., Kenilworth, USA oder Gonal-f® Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland. Die Patientinnen wurden vom Patientenmanagement genauestens unterwiesen, wie sie die hormonelle Stimulation zuhause selbst durchführen sollten. Für Fragen zu jeder Tages- und Nachtzeit erhielten sie die Nummer eines Notfalltelefons, besetzt vom jeweiligen diensthabenden Arzt oder der jeweiligen diensthabenden Ärztin.

Die Patientinnen erhielten die Anweisung vor dem Eingriff nüchtern zu bleiben, also bis zwei Stunden vor dem Eingriff nur klare Flüssigkeiten ohne Milch und Zucker zu sich zu nehmen und bis sechs Stunden vor dem Eingriff nichts zu essen.

Während des Stimulationsprozesses fanden zu gegebenen Zeitpunkten Ultraschallkontrollen mit Voluson™ E8 RSA GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien, statt um das Follikelwachstum zu kontrollieren und gegebenenfalls die Menge der Hormone zu verändern.

### **2.2.2 Die Eizellentnahme (ovum-pick-up)**

Der OPU fand am Kinderwunschinstitut statt und wurde durch einen Facharzt oder eine Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe durchgeführt. Unter intravenöser Vollnarkose, eingeleitet und überwacht durch einen Facharzt für Anästhesiologie, wurden den Patientinnen über ultraschallkontrollierte transvaginale Punktion des Ovarparenchyms alle punktierbaren Follikel entnommen und die Follikelflüssigkeit unter den erforderlichen Lagerungsbedingungen der Embryologie übergeben. Bei allen Patientinnen lief die Punktion laut Protokoll komplikationslos.

### **2.2.3 Separate Gewinnung der FF**

In der Vergangenheit stellte die separate Sammlung der einzelnen Follikelflüssigkeiten beim OPU einen komplizierten Vorgang dar und ging mit stärkeren Belastungen für die Patientinnen einher. So wurde nach jeder Punktion die Nadel per Hand mit einer Spülflüssigkeit (*flushing*-Medium) durchspült und die vaginale Wand wurde mehrfach durchstoßen, es entstand somit ein erhöhtes postoperatives Blutungsrisiko und größere postoperative Schmerzen bei der Patientin. Auch konnten FF und *flushing*-Medium nicht

separat gesammelt werden und es musste immer die gleiche Menge an *flushing* verwendet werden um auf die Konzentrationen der FF korrekt rückschließen zu können. All dies bedeutet einen erheblichen Mehraufwand für Operateur und das Team der Embryologie sowie nicht zuletzt eine erhöhte Unbequemlichkeit und ein erhöhtes Risiko für die Patientin.

Im Jahre 2016 wurde eine neue Methode der separaten Punktion entwickelt und diese soll genauer beschrieben werden.

### **2.2.3.1 Steiner-Nadel**

Um das *flushing*-Medium einzuspülen ohne die Nadel zu bewegen ist eine Zwei-Kanal-System notwendig, bei der im Kanal 1 die Follikelflüssigkeit abpunktiert werden kann und im Kanal 2 das *flushing* eingespült wird. Somit entfällt die Notwendigkeit die Vaginalwand erneut zu durchstechen. Diese Kriterien erfüllt die verwendete Nadel, Steiner-Tan Needle 17 gauge, (IVFETFLEX.com Handelsgmbh & Co KG, Graz, Österreich) bei der über einen Drei-Wege-Hahn zwischen Punktion, also Absaugen, und *flushing* hin- und hergeschaltet werden kann. Außerdem verfügt diese Nadel über ein kleineres Restvolumen welches in der Nadel verbleibt um möglichst wenig Flüssigkeit zu verlieren. Somit wird gewährt das keine Vermischung der Follikelflüssigkeiten vorkommt, also kein *Pooling*. Auf dieser Technik beruht der Hauptaugenmerk der Datenanalyse, da sie einen direkten Datenvergleich innerhalb einer Patientin und innerhalb eines Stimulationszyklus erlaubt (121,122).

Die genaue Technik beschrieben als *standard operating procedure* wurde 2016 von Schenk et al. publiziert (122)

### **2.2.3.2 *flushing*-Methode**

Es gibt widersprüchliche Hinweise ob mittels der *flushing*-Methode mehr Eizellen gewonnen werden. Mehr Eizellen stellen ein Ziel des IVF-Prozesses dar, da man bei mehr Oozyten folglich mehr Embryonen erhält und sich die Befruchtungschancen erhöhen. Jedoch wird kritisiert, dass bei dieser Technik eine größere Menge an Narkosemittel verwendet werden muss, das Gewebe stärker manipuliert wird und sich die Prozedur verlängert (123).

In einem Review aus dem Jahre 2011 der Cochrane Library konnte, bei Verwendung der *flushing*-Technik, keine Erhöhung der gewonnen Eizellanzahl festgestellt werden (124).

Die Methode ermöglicht jedoch die separate Gewinnung der Follikelflüssigkeit und aus diesem Grund wurde sie für die vorliegende Studie verwendet. Als *flushing*-Medium

wurde verwendet „flushing medium GM501 Flush“ (Gynemed Medizinprodukte GmbH & Co.KG, Lensahn, Deutschland). Die gewonnene Follikelflüssigkeit und das rückabsorbierte *flushing* wurden in entsprechend markierten Tubes beim OPU getrennt gelagert (122).



Abbildung 5 Fußpedal und Pumpensystem mit Dreivegehahn (125)

#### 2.2.4 Analyse der Follikelflüssigkeit

Die Analyse der folliculären Flüssigkeit erfolgte mit dem Gerät cobas<sup>®</sup> e 411 analyzer der Firma Roche Diagnostics GmbH, Wien, Österreich mittels Elecsys<sup>®</sup> AMH, einem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay. Der *analyzer* wurde von geschulten Mitarbeitern bedient. Über ein Sandwich-Prinzip bei dem sich zwei Antikörper an das Antigen der Probe anlegen und anschließender Zugabe von Streptavidin-beschichteten-Mikropartikeln kann am Reagenzgemisch der AMH-Gehalt gemessen werden. Die Testdauer beträgt 18 Minuten und das benötigte Probenvolumen ist 50µl. Bei einem Messbereich von 0,071-164,2 pmol/l beträgt die Gesamtpräzision 2,9-4,4% für den cobas<sup>®</sup> e 411 analyzer (126).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeine Datenerhebung

Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug zum Zeitpunkt der Punktion 32 Jahre, mit einer Standardabweichung von 4,3 Jahren und der durchschnittliche BMI betrug 25,3 kg/m<sup>2</sup> mit einer Standardabweichung von 5,8, siehe Tabelle 3. Die Anzahl der entnommenen Follikel und die entsprechenden AMH Konzentrationen finden sich in Tabelle 4.

*Tabelle 3 Allgemeine Daten der Patientinnen*

Patientin	Alter [Jahre]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
A	28	170	72	24,9
B	38	160	47	18,4
C	30	158	81	32,5
$\bar{x}$	32	163	66,7	25,3

*Tabelle 4 Daten gesamt*

<b>Patientin</b>	<b>Follikelnummer</b>	<b>Volumen in [ml]</b>	<b>AMH in [pmol/l]</b>
<b>A</b>	1	1,0	6,62
	2	3,5	4,82
	3	1,8	4,60
	4	4,0	4,95
	5	4,0	48,17
	6	3,4	12,46
	7	2,0	4,00
	8	2,6	2,95
	9	2,5	6,27
	10	2,0	20,70
	11	0,8	11,59
<b>B</b>	1	1,8	4,70
	2	2,8	10,76
	3	2,5	2,63
	4	2,4	7,02
	5	2,5	0,51
<b>C</b>	1	1,2	5,40
	2	8,5	6,89
	3	1,0	6,98
	4	1,8	6,79
	5	2,3	3,82
	6	2,2	12,37
	7	1,8	7,45
	8	3,0	3,90

*Tabelle 5 Mittelwerte der erhobenen Messwerte, jeweils einzeln für die Patientinnen sowohl die Mittelwerte der Gesamtdaten.*

<b>Mittelwerte</b>	<b>Anzahl der Follikel</b>	<b>Volumen [ml]</b>	<b>AMH [pmol/l]</b>
<b>Patientin A</b>	11	2,5	11,56
<b>Patientin B</b>	5	2,4	5,12
<b>Patientin C</b>	8	2,7	6,70
<b>Gesamt</b>	24	2,6	8,60

## 3.2 Messergebnisse in Grafiken

### 3.2.1 Daten gesamt

Die gemessenen AMH Werte weisen keine signifikante Korrelation zu den entsprechenden Follikelvolumina auf, siehe Abbildung 6.

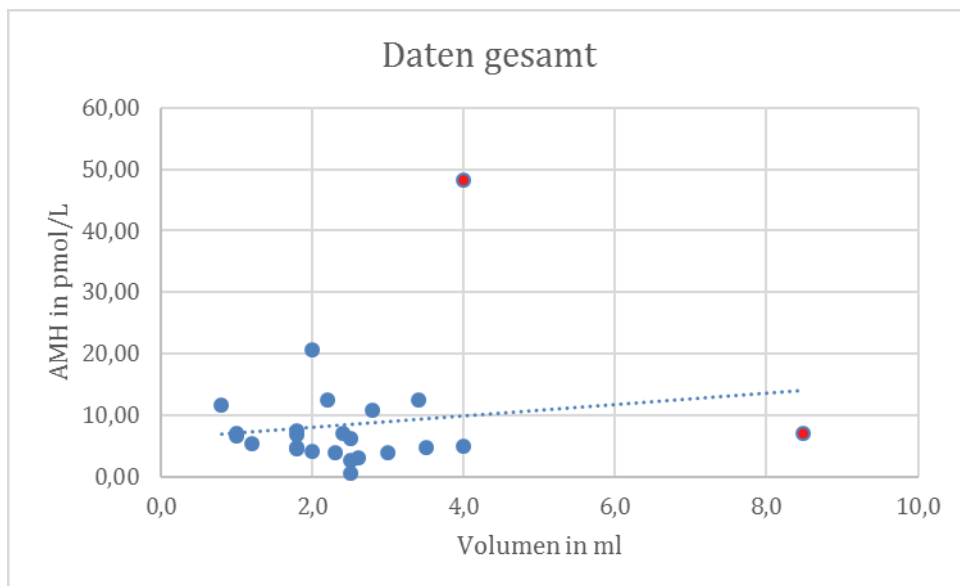


Abbildung 6 Daten gesamt dargestellt in einem Punktdiagramm; die gestrichelte Linie stellt eine lineare Trendlinie dar sie soll die nicht vorhandene Korrelation verdeutlichen. Die beiden Rot dargestellten Werte werden aufgrund ihrer räumlichen Distanz zu dem Feld der anderen Werte als Ausreißer definiert.

In Abbildung 7 sind die Gesamtdaten grafisch dargestellt, ohne die beiden Ausreißer.

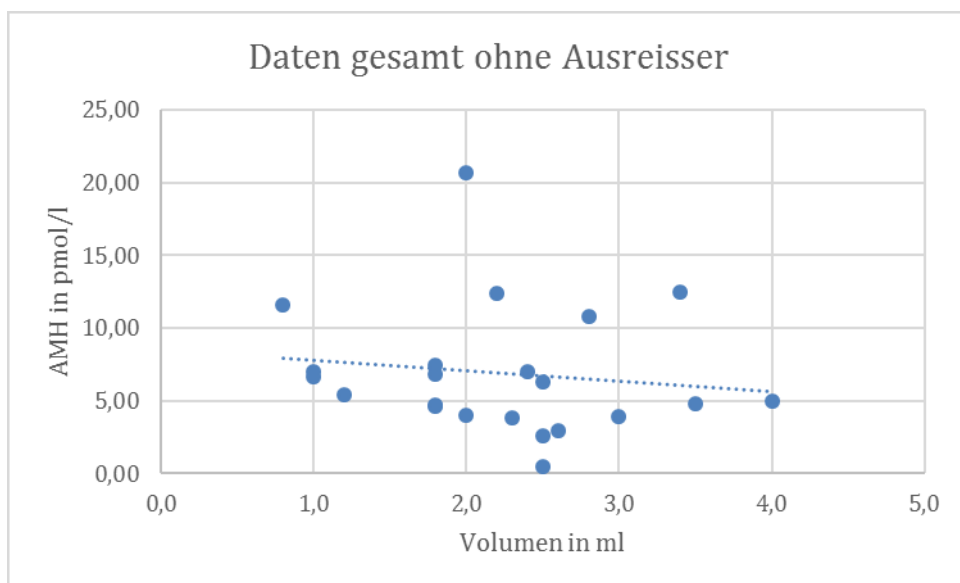


Abbildung 7 Daten gesamt ohne Ausreißer, die gestrichelte Linie stellt eine lineare Trendlinie dar. Es ergibt sich auch hier keine Korrelation zwischen den Parametern.

### 3.2.2 Daten der Patientinnen einzeln dargestellt

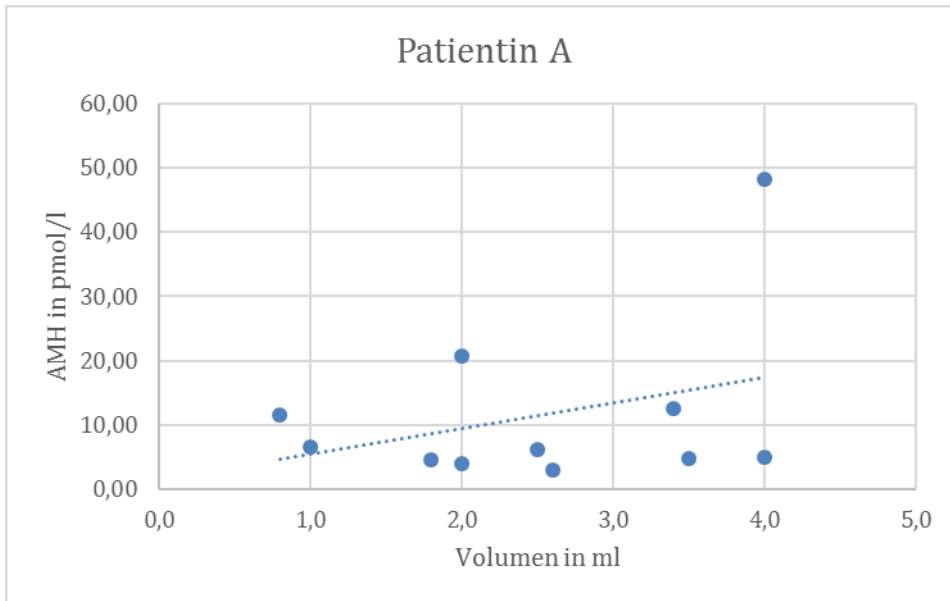


Abbildung 8 Daten von Patientin A, die gestrichelte Linie stellt eine lineare Trendlinie dar und soll die nicht vorhandene Korrelation verdeutlichen.

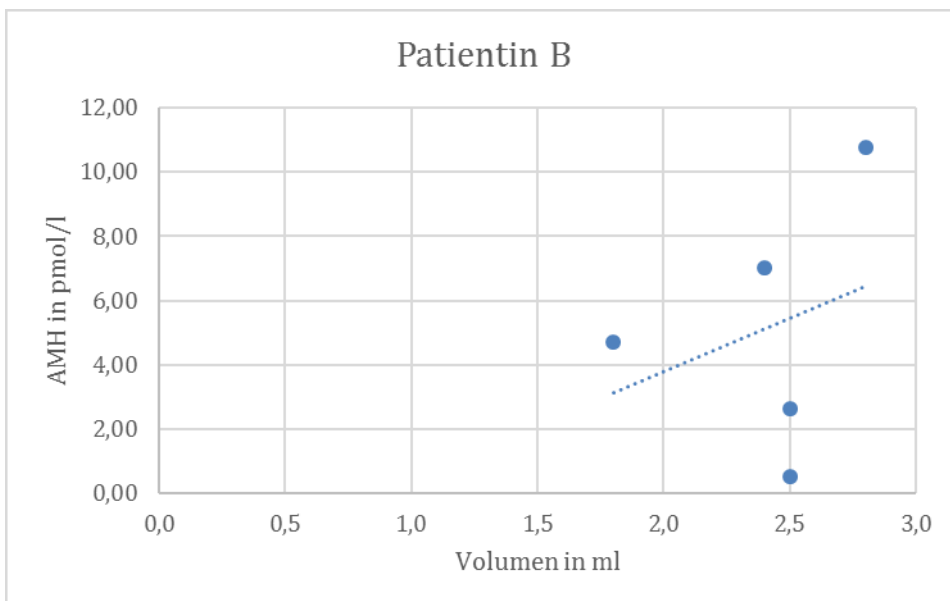


Abbildung 9 Daten von Patientin B, die gestrichelte Linie stellt eine lineare Trendlinie dar und soll die nicht vorhandene Korrelation verdeutlichen.

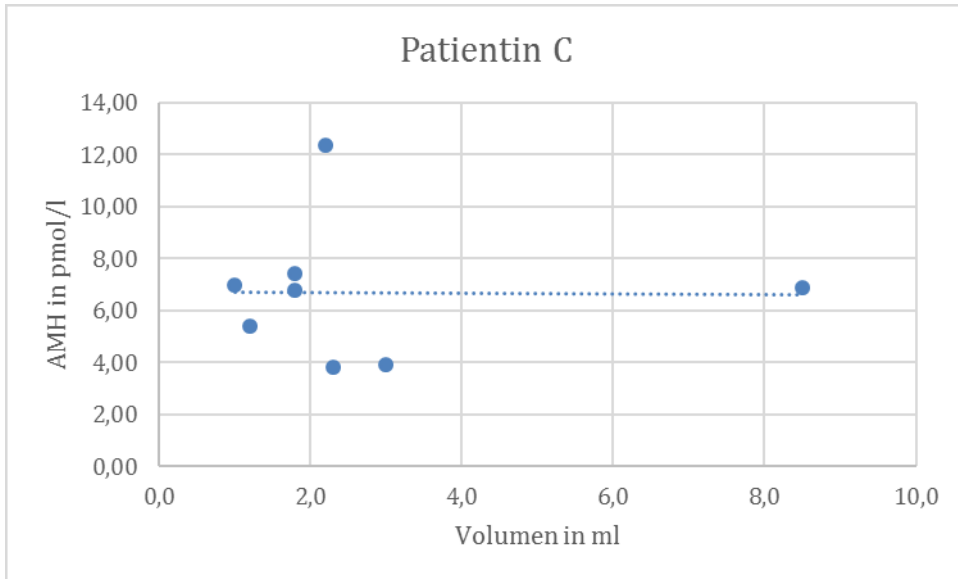


Abbildung 10 Daten von Patientin C, die gestrichelte Linie stellt eine lineare Trendlinie dar und soll die nicht vorhandene Korrelation verdeutlichen.

### **3.3 Statistische Ergebnisse**

#### **3.3.1 Statistische Auswertung**

Die Ermittlung der Fallzahl orientiert sich an einer Berechnung für eine frühere Studie . Bei dieser ergab sich mittels einer One Correlation Power Analysis eine geeignete Power für Datensample der Größe  $N=24$ , für die Fragestellung ob sich ein statistischer Zusammenhang zwischen dem follikulären AMH-Gehalt und dem Serum-AMH-Gehalt feststellen lässt. Aufgrund der thematischen Ähnlichkeit wurde dieses  $N$  übernommen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM® SPSS® Statistics Version 23 für Windows. Es wurden die Daten mittels des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung geprüft und anschließend eine Rangkorrelation nach Spearman (Spearman's Rho) berechnet. Die Datendarstellungen in Grafiken wurde mit Microsoft® Excel® 2016 für Windows erstellt.

### 3.3.2 Test auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests. Aufgrund der Signifikanz bei den AMH-Werten zeigt sich, dass diese nicht normalverteilt sind.

*Tabelle 6 Ergebnisse Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest*

		<b>Volumen [ml]</b>	<b>AMH [pmol/l]</b>
<b>N</b>		24	24
<b>Parameter der Normalverteilung</b>	Mittelwert	2,5583	8,5979
	Standardabweichung	1,53592	9,42955
<b>Extremste Differenzen</b>	Absolut	,198	,298
	Positiv	,198	,298
	Negativ	-,144	-,222
<b>Kolmogorov-Smirnov-Z</b>		,968	1,462
<b>Asymptotische Signifikanz (2-seitig)</b>		,306	,028*
<i>*signifikant</i>			

### 3.3.3 Nichtparametrische Auswertung - Rangkorrelation nach Spearman

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman, Spearmans Rho, dargestellt. Es ergibt sich keine Signifikanz für den Korrelationskoeffizienten.

*Tabelle 7 Ergebnisse Rangkorrelation nach Spearman*

			<b>Volumen</b>	<b>AMH</b>
<b>Spearman-Rho</b>	Volumen	Korrelationskoeffizient	1,000	-0,57
		Signifikanz (2-seitig)		,791
		N	24	24
	AMH	Korrelationskoeffizient	-,057	1,000
		Signifikanz (2-seitig)	,791	
		N	24	24

### **3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Es ergibt sich aus den statistischen Berechnungen kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Volumen der FF und dem AMH-Gehalt. Bei  $n=24$  beträgt der Korrelationskoeffizient  $-0,57$ . Dies ist kongruent mit den grafischen Darstellungen der Daten in Punktdiagrammen, bei denen die eingefügte lineare Trendlinie keinen zu erwartenden Zusammenhang der Parameter zeigt. Die Volumen-Werte weisen Normalverteilung auf, die AMH-Werte nicht.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Volumen der FF und ihrem Gehalt an AMH gefunden werden, dies bedeutet, dass aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht vom Follikelvolumen auf den AMH-Gehalt rückgeschlossen werden kann.

In der Follikelflüssigkeit wächst die Eizelle heran. Diese schützt sie vor schädlichen Einflüssen, beeinflusst ihr Wachstum, reguliert die Nährstoffzufuhr sowie die Reifung der Oozyte. Sie ist somit ein Schlüsselement der Reproduktion, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Eizelle hat (127). Die Follikelflüssigkeit bietet eine optimale Quelle um Biomarker nicht invasiv zu analysieren und die Qualität der Eizelle zu beurteilen. Sie spiegelt das Milieu in dem die Oozyte heranwächst wider und gibt direkte Hinweise auf den Metabolismus in Theka- und Granulosazellen. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit der routinemäßigen Gewinnung sowie in der separaten Aspiration einzelner Follikelflüssigkeiten, welche für die weitere IVF-Behandlung nicht benötigt werden. In der Praxis hat sich diese Methode jedoch noch nicht durchgesetzt, mangels unzureichendem Wissen über die Verfügbarkeit und das Potential von Biomarkern wie beispielsweise AMH, welches im Serum schon seit Jahren ein bewährter Marker für die Einschätzung des reproduktiven Potentials weiblicher Patienten ist.

Der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Studien fällt schwer, da keine gefunden werden konnten, bei denen die Follikelflüssigkeiten nicht gepooled, bzw. nicht nur der größte, also Dominant- oder Leitfollikel analysiert wurde (Stand Oktober 2016). Dennoch soll auf einige Publikationen eingegangen werden die AMH in der FF und seine Rolle analysiert haben. Die meisten Fragestellungen versuchen einen Zusammenhang zwischen FF-AMH und der Eizellqualität direkt herzustellen.

Im Jahr 2014 publizierten Tramišak Milaković et al. eine Studie, in der sie den AMH-Gehalt in der FF mit dem Reifestadium der Eizellen, der Morphologie der Metaphase II (MII) Eizellen und ihrer Befruchtungskapazität verglichen. Es wurden die dominanten Follikel von 92 Frauen untersucht, n=37 in der Gruppe <35 Jahre und n=44 in der Gruppe  $\geq 35$  Jahre, und hinsichtlich der Fragestellung untersucht. Daraus ergaben sich keine Zusammenhänge zwischen AMH und MII Eizellen, unreifen Eizellen, sowie atretischen Eizellen. Für die jüngere Gruppe ergaben sich signifikant niedrigere AMH-Werte in den Follikelflüssigkeiten der befruchteten MII-Eizellen als in den nicht-befruchteten MII-

Eizellen. Für die ältere Gruppe galt dies nicht. Ein wie erwarteter negativer Zusammenhang zwischen Serum-AMH und Alter der Patientin konnte bestätigt werden. Aus diesen Ergebnissen schließen die Autoren, dass follikuläre AMH-Level einen möglichen Prädiktor für die Befruchtungskapazität von MII Eizellen jüngerer Patientinnen darstellen (128).

In einer Untersuchung von Kim et al. veröffentlicht im Jahr 2014 wurden die AMH-Werte in 65 Proben FF untersucht. Auch hier wurde der jeweils größte Follikel untersucht, mit der Bedingung, dass dessen Durchmesser mehr als 20mm beträgt. Die Proben wurden anhand des AMH-Gehalts in drei Perzentilen aufgeteilt und als Endpunkt wurde die Befruchtungsrate und der *embryo score*, berechnet aus Blastomerenanzahl multipliziert mit einer Kennzahl zur Darstellung der Fragmentierung, herangezogen. Es stellte sich heraus, dass die AMH-Konzentrationen signifikant und positiv mit dem *embryo score* an Tag 3 korrelieren. Des Weiteren ergaben sich signifikant niedrigere Befruchtungsraten in der Gruppe mit den niedrigsten AMH-Werten. Die Autoren schließen aus den Ergebnissen, dass der AMH-Gehalt in der Follikelflüssigkeit einen Marker zur Ermittlung der Eizell- bzw. Embryoqualität darstellt (36).

Aflatoonian et al. untersuchten 2010 ob ein Zusammenhang zwischen dem follikulären AMH und Befruchtung oder Embryoqualität besteht. Sie untersuchten dazu 62 einzelne Follikel von ebenso vielen Patientinnen. Sie teilten die FF in die Gruppen „befruchtet“ und „nicht-befruchtet“ ein und fanden in letztgenannter Gruppe niedrigere AMH-Level. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen FF-AMH und *embryo score* wurde festgestellt. Daraus schließen die Autoren, dass die follikulären AMH-Werte mit der Befruchtungsfähigkeit und Embryoqualität zusammenhängen (129).

Die türkische Gruppe um Çapkin et al. fand im Jahr 2012 bei einer Studiengruppe von 43 Frauen signifikant höhere follikuläre AMH-Werte, beim jeweils ersten punktierten Follikel, dem am besten zugänglichen, am Tag des OPU bei denjenigen Frauen welche später eine klinische Schwangerschaft erreichten. Jedoch blieben diese Ergebnisse nicht stabil nach einer Korrektur auf Alter und AFC. AMH stellte also keinen unabhängigen Faktor zur Vorhersage einer Schwangerschaft dar. Auch fanden sie keinen Zusammenhang zwischen Serum und follikulärem AMH wobei FF-AMH signifikant und positiv mit AFC und Implantationsrate und negativ mit basalem FSH korrelierte (130).

Fanchin et al. veröffentlichten 2007 eine Studie in der sie bei 118 Patientinnen das FF-AMH im präovulatorischen Follikel untersuchten. Sie fanden heraus, dass follikuläres

AMH, im Gegensatz zum Serum-AMH, positiv mit dem Implantationsvermögen des jeweiligen Embryos korrelierten (131).

Das japanische Team um Hattori et al. verglichen im Jahr 2012 den Zusammenhang von follikulärem und Serum-AMH als Prädiktoren für den reproduktiven Outcome und fanden widersprüchliche Ergebnisse (132).

Ein anderes japanisches Team um Takahashi et al. fand bereits 2008 heraus, dass Eizellen mit der Fähigkeit größere Mengen an AMH zu produzieren mit höherer Wahrscheinlichkeit befruchtet werden konnten. Es handelte sich um eine retrospektive Studie der Daten von 31 Patientinnen. Kein Zusammenhang wurde zwischen Befruchtungserfolg und Serum-AMH oder dem Gehalt an Inhibin B gefunden (37).

Im Jahr 2015 untersuchten Bastu et al. den Zusammenhang zwischen AMH, Cathepsin B und Relaxin in der FF und fanden davon nur für Cathepsin B eine statistisch relevanten Bezug zu den Schwangerschaftsraten von 79 untersuchten Paaren (133).

Ein Forscherteam um Cupisti et al. untersuchte 2007 den Zusammenhang zwischen AMH, Inhibin B und Activin A in der Follikelflüssigkeit, um daraus Rückschlüsse auf das Reifungs- und Entwicklungspotential der Eizelle zu ziehen. Dazu *poolten* sie die Follikelflüssigkeiten von 27 IVF Patientinnen und fanden einen invers korrelierten Zusammenhang zwischen dem AMH-Gehalt und Reifung bzw. Entwicklungspotential der gewonnenen Eizellen. Das *pooling* der Follikelflüssigkeiten lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die einzelne Eizelle bzw. den IVF Outcome zu (134).

Die Konzentration an AMH in der FF begründet sich in der Sezernierungsaktivität der Granulosazellen und der Durchlässigkeit der Follikelmembran bzw. der BFB. Sie hängt davon ab, wieviel AMH produziert wird und wieviel davon ins Serum gelangt. Wie von Rodgers und Irving-Rodgers beschrieben, kann davon ausgegangen werden, dass Moleküle mit einem größeren Gewicht als 100 kDa nicht passiv durch die BFB diffundieren können (16). Das molekulare Gewicht von AMH beträgt 140 kDa (97). Dies könnte mitunter die Ursache für die beobachteten Konzentrationsunterschiede sein. Wie der genaue Transport von AMH in die Blutbahn stattfindet ist noch unzureichend geklärt. Ein aktiver Transportmechanismus, durch verstärkte Signaltransduktion ausgelöst, könnte erklären weshalb die AMH-Werte zwischen den einzelnen Follikeln einer Patientin innerhalb eines Zyklus deutliche Unterschiede aufweisen.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass sich Gehalt von AMH in Serum und Follikel gegenseitig beeinflussen. Sofern der Transport durch die BFB passiv erfolgt und AMH frei

hin und her diffundieren kann, wären geringere Schwankungen der Anteile zu erwarten. Durch die erhebliche Variation an ermittelten AMH Konzentrationen innerhalb eines Zyklus, kann diese Theorie jedoch nicht unterstützt werden.

Die Annahme eines Zusammenhangs zwischen follikulärem AMH und dem Follikelvolumen begründet sich in der je nach Wachstumsstadium unterschiedlichen AMH-Sezernierungsaktivität der GC. Diese verändert sich größenabhängig und zeigt ihr Maximum bei einem Durchmesser von circa 5-8 mm. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen genetischer Expression des AMH durch die GC und AMH-Gehalt im Follikel. Ab 8 mm Durchmesser des Follikels kommt es zu einer Abnahme der Sezernierungsaktivität, somit einer verminderten Expression von AMH. Die genauen Gründe hierfür sind noch unzureichend geklärt, vermutet wird ein Zusammenhang mit der Östrogenproduktion (135). Davon ausgehend müsste sich der AMH-Gehalt mit steigendem Volumen ebenso ändern, was in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine positive Korrelation zwischen Follikelvolumen und AMH-Gehalt würde sich durch eine mit zunehmendem Reifestadium steigende Stoffwechselaktivität des Follikels oder durch eine höhere Anzahl an GC erklären lassen.

Hierbei spielt die AMH-Produktion der GC eine entscheidende Rolle. Sie verändert sich größenabhängig mit einem Maximum bei ca. 5 mm Durchmesser (97). Dies bedeutet, dass ab einer bestimmten Follikelgröße ein hormoneller Regulationsmechanismus aktiviert wird, welcher die AMH-Produktion, bzw. die Aktivität der GC ändert. Diese Ergebnisse wurden in mehreren Studien bestätigt (76,97,136).

Eine Erhöhung der GC-Zellzahl würde sich im erhöhten AMH-Anteil widerspiegeln. Für den Fall, dass bei einem höheren Volumen die Anzahl der GC jedoch gleichbliebe, hieße dies ein, durch einen Verdünnungseffekt hervorgerufenen, vergleichsweise niedrigeres AMH. Beides konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass kleinere Follikel aufgrund räumlicher Gegebenheiten eine vergleichsweise geringere Anzahl an GC-Zellen aufweisen und somit die AMH-Produktion entsprechend niedrig ist bzw., dass die GC kleinerer Follikel in der Regel ein wenig fortgeschrittenes Reifungsstadium aufweisen. Deren GC noch keine oder nur wenig sekretorische Aktivität zeigen.

Ein negativer Zusammenhang zwischen Follikelvolumen und AMH-Gehalt ließe sich dadurch erklären, dass Follikel mit einem langsameren Stoffwechsel nicht die nötigen Produkte in ausreichend kurzer Zeit herstellen können um den kolloidosmotischen Druck

für eine Größenzunahme aufrechtzuerhalten. Somit mangelt es an Raum für eine physiologische Proliferation der GC und sie können ihre sezernierende Aktivität nicht aufnehmen. Eine weitere Theorie ist, dass bei weniger Volumen des Follikels vergleichsweise mehr GC vorhanden sind und sich dadurch der Anteil des AMH erhöht, was einen konzentrierenden Effekt hervorrufen könnte.

Die Datenanalyse hat mehrere Limitationen. Zum einen die geringe Anzahl an Daten, da mit einer größeren Fallzahl und weiteren Parametern zu den Patienten und zur Follikelflüssigkeit, beispielsweise anderen Hormonen, möglicherweise statistische Zusammenhänge zum Follikelvolumen dargestellt werden könnten. In weiterführenden Studien sollte mit einer größeren Probenanzahl gearbeitet werden. Auch schränkt der retrospektive Charakter der Untersuchung die untersuchbaren Variablen stark ein. Eine weitere Einschränkung stellt die Beschränkung der Analyse auf ein einziges Institut dar. Hiermit kann weder Behandler- noch Institutsunabhängigkeit gewährleistet werden.

Hervorzuheben ist die Technik der separaten Punktion der einzelnen Follikel und der Analyse der verschiedenen Follikelflüssigkeiten innerhalb einer Patientin und innerhalb desselben Zyklus ohne Vermischung (*pooling*). Somit entsteht eine direkte Vergleichbarkeit des, die Eizelle umgebenden, Follikelstoffwechsels und seiner Produkte. Hier sollte die zukünftige Suche nach einem geeigneten Biomarker zur Beurteilung der Eizellqualität ansetzen. Da sie unter vergleichbaren hormonellen Reifungsbedingungen im selben Organismus reifen würden Unterschiede besser erkennbar. Indem keine Vermischung der gewonnenen Flüssigkeiten erfolgt, erlaubt die Technik der separaten Punktion eine direkte Rückverfolgbarkeit der Follikelflüssigkeit zur entsprechenden Eizelle und ihrem Outcome. Es kann direkt von verschiedenen Ausgangspunkten wie erfolgreiche Befruchtung, biochemische Schwangerschaft oder *baby-take-home-rate* auf das Milieu in dem die Eizelle gereift ist rückgeschlossen werden (122).

Ebenso ein Vorteil ist die Suche nach einer ressourcenschonenden Ermittlung der bestmöglichen Eizellqualität. Im Falle eines Zusammenhangs zwischen dem Volumen der FF und dem Gehalt an AMH, für den Fall, dass AMH tatsächlich einen qualitativen Vorhersagewert der Eizellqualität darstellt, lässt sich diese am Volumen der FF ablesen. Die beste Lösung wäre hier das Abwiegen der Falcontubes nach der Punktion. Hiermit würde man einen gut nachvollziehbaren, weitgehend durchführerunabhängigen und numerischen Wert erhalten. Es würde sich hiermit die personal-, zeit- und

kostenaufwändige Analyse der Follikelflüssigkeit erübrigen. Der ermittelte Wert könnte unmittelbar in die klinische Entscheidungsfindung, welcher Embryo übertragen werden soll, einfließen.

Aus diesen Überlegungen und den Untersuchungsergebnissen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der AMH-Gehalt in der Follikelflüssigkeit vom jeweiligen Metabolismus der Eizelle abhängig ist. Falls das Stoffwechsellniveau der Eizellen und der zugehörigen Follikel einen qualitätsbestimmenden Einfluss aufweist, könnte man die Qualität am AMH-Niveau in der FF bestimmen. Somit kann nicht zurückgewiesen werden, dass AMH in der FF einen möglichen Qualitätsindikator der Eizelle darstellt.

Zukünftige Studien sollten eine Analyse von mehr Parametern z.B. Hormonen oder dem Proteom in Betracht ziehen. Die Eizellen sollten ihrer jeweiligen FF zugeordnet werden und ihre Entwicklung, also Befruchtungs- und Implantationserfolg, und als Endpunkt die *baby-take-home-rate*, beurteilt werden. Auf diese Weise könnten sich Parameter finden, die in der Follikelflüssigkeit vorhanden sind und Hinweise auf die Qualität der Eizelle und ihr Entwicklungspotential geben. Dies würde den IVF-Prozess um ein Vielfaches vereinfachen und verkürzen.

Sofern sich AMH als geeigneter Parameter zur Bestimmung der Eizellqualität etabliert, wären Messungen der einzelnen FF von großer Bedeutung. Die Volumetrie könnte als ergänzender Parameter herangezogen werden, stellt aber alleine keinen ausreichend informativen Faktor zur Beurteilung der Eizellqualität dar.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Feige A, Rempfen A, Würfel W, Jawny J, Rohde A. Frauenheilkunde. 3. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2006.
2. Weyerstahl T, Stauber M. Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2013.
3. Kaufmann M, Costa SD. Die Gynäkologie. 3. Auflage. Scharl A, Herausgeber. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
4. Gätje R, Eberle C, Scholz C, Lübke M, Solbach C, Muschel K, u.a. Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2015.
5. Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;234(1–2):81–6.
6. Gruber S, Blanck S. BASICS Gynäkologie und Geburtshilfe. 5. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2014.
7. von Wolff M, Stute P. Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2013.
8. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, u.a. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update.* 2014;20(3):370–85.
9. Hennet M, Combelles CMH. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-11-12):819–31.
10. Siu MKY, Cheng CY. The blood-follicle barrier (BFB) in disease and in ovarian function. *Adv Exp Med Biol.* 2012;763:186.
11. Clarke HG, Hope SA, Byers S, Rodgers RJ. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction.* 1. Juli 2006;132(1):119–31.
12. Rahmani M, Wong BW, Ang L, Cheung CC, Carthy JM, Walinski H, u.a. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Can J Physiol Pharmacol.* Jänner 2006;84(1):77–92.
13. Van Wezel IL, Dharmarajan AM, Lavranos TC, Rodgers RJ. Evidence for Alternative Pathways of Granulosa Cell Death in Healthy and Slightly Atretic Bovine Antral Follicles. *Endocrinology.* 1. Juni 1999;140(6):2602–12.
14. Acosta TJ. Studies of Follicular Vascularity Associated with Follicle Selection and Ovulation in Cattle. *J Reprod Dev.* 2007;53(1):39–44.
15. Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction.* 1. Februar 2003;125(2):211–23.

16. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biol Reprod.* 1. Juni 2010;82(6):1021–9.
17. Gosden RG, Hunter RHF, Telfer E, Torrance C, Brown N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 1. März 1988;82(2):813–25.
18. McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, Bost KL, Clemens MG, Hughes FM. Water Permeability of an Ovarian Antral Follicle Is Predominantly Transcellular and Mediated by Aquaporins. *Endocrinology.* 1. August 2002;143(8):2905–12.
19. Skowronski MT, Kwon T-H, Nielsen S. Immunolocalization of Aquaporin 1, 5, and 9 in the Female Pig Reproductive System. *J Histochem Cytochem.* 15. September 2008;57(1):61–7.
20. Revelli A, Piane LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 4. Mai 2009;7:40.
21. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular-Fluid Factors and Granulosa-Cell Gene Expression Associated with Follicle Deviation in Cattle. *Biol Reprod.* 1. Februar 2001;64(2):432–41.
22. Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M, Soferman N. Proteins of Human Follicular Fluid: The Blood-Follicle Barrier. *Fertil Steril.* 24(6):429–34.
23. Zhou H, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Fujii Y, Ohno S. Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood–follicle barrier formation of mice revealed by ‘in vivo cryotechnique’. *Reproduction.* 1. August 2007;134(2):307–17.
24. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction.* 1. Oktober 2003;126(4):415–24.
25. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Dev Cell.* Februar 2009;16(2):209–21.
26. Bazzoni G. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost.* 2006;95(1):36–42.
27. DocCheck Flexikon. Gonadotropin [Internet]. DocCheck Flexikon. [zitiert 7. November 2016]. Verfügbar unter: <http://flexikon.doccheck.com/de/Gonadotropin>
28. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, u. a. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod.* 1. April 2002;17(4):1017–22.
29. Lanzzone A, Fortini A, Fulghesu AM, Soranna L, Caruso A, Mancuso S. Growth hormone enhances estradiol production follicle-stimulating hormone-induced in the early stage of the follicular maturation. *Fertil Steril.* Dezember 1996;66(6):948–53.

30. Jia X-C, Kalmijn J, Hsueh AJW. Growth Hormone Enhances Follicle-Stimulating Hormone-Induced Differentiation of Cultured Rat Granulosa Cells. *Endocrinology*. April 1986;118(4):1401–9.
31. DocCheck Flexikon. Somatotropin [Internet]. DocCheck Flexikon. [zitiert 7. November 2016]. Verfügbar unter: <http://flexikon.doccheck.com/de/Somatotropin>
32. DocCheck Flexikon. Kortikosteroid [Internet]. DocCheck Flexikon. [zitiert 7. November 2016]. Verfügbar unter: <http://flexikon.doccheck.com/de/Kortikosteroid>
33. Carpintero N, Suárez O, Varea C, Rioja R, Mangas C. Variability between the follicular steroid hormone levels in different follicles of the same patient and between patients. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(1):37.
34. Keay SD, Harlow CR, Wood PJ, Jenkins JM, Cahill DJ. Higher cortisol:cortisone ratios in the preovulatory follicle of completely unstimulated IVF cycles indicate oocytes with increased pregnancy potential. *Hum Reprod*. 1. September 2002;17(9):2410–4.
35. Lewicka S, von Hagens C, Hettinger U, Grunwald K, Vecsei P, Runnebaum B, u. a. Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Hum Reprod*. 1. August 2003;18(8):1613–7.
36. Kim JH, Lee JR, Chang HJ, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Anti-Müllerian Hormone Levels in the Follicular Fluid of the Preovulatory Follicle: A Predictor for Oocyte Fertilization and Quality of Embryo. *J Korean Med Sci*. 2014;29(9):1266.
37. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. März 2008;89(3):586–91.
38. Inhibin. In: Wikipedia [Internet]. 2016 [zitiert 7. November 2016]. Verfügbar unter: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Inhibin&oldid=157311337>
39. Lau CP, Ledger WL, Groome NP, Barlow DH, Muttukrishna S. Dimeric inhibins and activin A in human follicular fluid and oocyte–cumulus culture medium. *Hum Reprod*. 1. Oktober 1999;14(10):2525–30.
40. Wen X, Tozer A, Butler S, Bell C, Docherty S, Iles R. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte’s ability to fertilize. *Fertil Steril*. Juni 2006;85(6):1723–9.
41. Wu Y-T, Tang L, Cai J, Lu X-E, Xu J, Zhu X-M, u.a. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod*. 21. März 2007;22(6):1526–31.
42. Bone morphogenetic protein 15. In: Wikipedia [Internet]. 2016 [zitiert 7. November 2016]. Verfügbar unter: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Bone\\_morphogenetic\\_protein\\_15&oldid=722708555](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Bone_morphogenetic_protein_15&oldid=722708555)

43. Asimakopoulos B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. Juli 2008;90(1):60–4.
44. Singh AK, Dutta M, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 1. Oktober 2016;33(10):1363–72.
45. Orvieto R, Dratviman-Storobinsky O, Cohen Y. Interleukin-2 Production by Cultured Human Granulosa Cells. *Am J Reprod Immunol*. November 2015;74(5):392–7.
46. Zollner K-P, Hofmann T, Zollner U. Good fertilization results associated with high IL-1beta concentrations in follicular fluid of IVF patients. *J Reprod Med*. 2012;58(11–12):485–490.
47. Askoxylaki M, Siristatidis C, Chrelas C, Vogiatzi P, Creatsa M, Salamalekis G, u.a. Reactive oxygen species in the follicular fluid of subfertile women undergoing in vitro fertilization: a short narrative review. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(11):1117–1120.
48. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Relationships Between Concentrations of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Nitric Oxide in Follicular Fluid and Oocyte Quality. *J Assist Reprod Genet*. 2000;17(4):222–8.
49. Barrionuevo MJ, Schwandt RA, Rao PS, Graham LB, Maisel LP, Yeko TR. Nitric Oxide (NO) and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in Follicular Fluid and Their Correlation With Fertilization and Embryo Cleavage. *Am J Reprod Immunol*. 1. Dezember 2000;44(6):359–64.
50. DocCheck Flexikon. VEGF [Internet]. DocCheck Flexikon. [zitiert 30. September 2016]. Verfügbar unter: <http://flexikon.doccheck.com/de/VEGF>
51. Monteleone P, Giovanni Artini P, Simi G, Casarosa E, Cela V, Genazzani AR. Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet*. Mai 2008;25(5):183–6.
52. Høst E, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1. November 2000;79(11):936–40.
53. Onalan G, Selam B, Onalan R, Ceyhan T, Cincik M, Pabuccu R. Serum and follicular fluid levels of soluble Fas and soluble Fas ligand in IVF cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. März 2006;125(1):85–91.
54. Proteomik. In: Wikipedia [Internet]. 2016 [zitiert 30. September 2016]. Verfügbar unter: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Proteomik&oldid=158217884>
55. Zamah AM, Hassis ME, Albertolle ME, Williams KE. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin Proteomics* [Internet]. Dezember 2015

[zitiert 12. September 2016];12(1). Verfügbar unter:  
<http://www.clinicalproteomicsjournal.com/content/12/1/5>

56. Benkhalifa M, Madkour A, Louanjli N, Bouamoud N, Saadani B, Kaarouch I, u.a. From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: contribution to embryo development and IVF outcome. *Expert Rev Proteomics*. 4. Juli 2015;12(4):407–23.
57. Bøtkjær JA, Jeppesen JV, Wissing ML, Kløverpris S, Oxvig C, Mason JI, u.a. Pregnancy-associated plasma protein A in human ovarian follicles and its association with intrafollicular hormone levels. *Fertil Steril*. November 2015;104(5):1294–1301.e1.
58. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril*. August 1994;62(2):347–52.
59. Bayer SR, Armant DR, Dlugi AM, Seibel MM. Spectrophotometric absorbance of follicular fluid: a predictor of oocyte fertilizing capability. *Fertil Steril*. März 1988;49(3):442–6.
60. Fisch B, Goldberg I, Ovadia J, Tadir Y. Physicochemical properties of follicular fluid and their relation to in vitro fertilization (IVF) outcome. *J Vitro Fertil Embryo Transf IVF*. April 1990;7(2):67–73.
61. Shaaker M, Rahimpour A, Nouri M, Khanaki K, Darabi M, Farzadi L, u.a. Fatty acid composition of human follicular fluid phospholipids and fertilization rate in assisted reproductive techniques. *Iran Biomed J*. 2012;16(3):162–8.
62. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejou E, u.a. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod*. 1. Dezember 2014;29(12):2661–9.
63. Moreno JM, Núñez MJ, Quiñonero A, Martínez S, de la Orden M, Simón C, u.a. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. *Fertil Steril*. Oktober 2015;104(4):1037–1046.e1.
64. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, u.a. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*. Juni 1986;45(5):685–98.
65. Derynck R, Miyazono K. The TGF- $\beta$  Family [Internet]. CSHL Press; 2008. 1114 S. Verfügbar unter: <https://books.google.com/books?id=QW5xq75p5gYC&pgis=1>
66. Acton QA. Issues in Cancer Epidemiology and Research: 2011 Edition [Internet]. ScholarlyEditions; 2012. 3510 S. Verfügbar unter: <https://books.google.com/books?id=Y6haWM6lFkYC&pgis=1>
67. Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi M-G, di Clemente N, Tizard R, u.a. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat Genet*. Dezember 1995;11(4):382–8.

68. Laveleye MD, Gruson D. Anti-Müllerian hormone testing: Evaluation of a novel method allowing more automation. *Scand J Clin Lab Invest.* 17. November 2015;75(8):681–5.
69. Madejsky M. Das alternative Kinderwunschbuch: Die besten Naturheilkonzepte für die Fruchtbarkeit [Internet]. Arkana; 2015. 376 S. Verfügbar unter: <https://books.google.com/books?id=zDXgBQAAQBAJ&pgis=1>
70. Matzuk M, Brown CW, Kumar TR. *Transgenics in Endocrinology.* Springer Science & Business Media; 2001. 485 S.
71. Moore KL, Persaud TVN. *Embryologie.* 5. Auflage. München: Elsevier Health Sciences Germany; 2007. 341–345 S.
72. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie.* 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2003. 489, 510 S.
73. Snustad DP, Simmons MJ. *Principles of Genetics, Binder Ready Version* [Internet]. John Wiley & Sons; 2015. 648 S. Verfügbar unter: <https://books.google.com/books?id=NBB0CgAAQBAJ&pgis=1>
74. Rey R. Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* Februar 2005;49(1):26–36.
75. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet Lond Engl.* August 2007;370(9588):685–97.
76. Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K, Malik R. Anti-Mullerian Hormone: *Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers.* *Dis Markers.* 2016;2016:1–9.
77. Alipour F, Rasekhjahromi A, Maalhigh M, Sobhanian S, Hosseinpour M. Comparison of Specificity and Sensitivity of AMH and FSH in Diagnosis of Premature Ovarian Failure. *Dis Markers.* 2015;2015:585604.
78. Kotanidis L, Nikolettos K, Petousis S, Asimakopoulos B, Chatzimitrou E, Kolios G, u.a. The use of serum anti-Mullerian hormone (AMH) levels and antral follicle count (AFC) to predict the number of oocytes collected and availability of embryos for cryopreservation in IVF. *J Endocrinol Invest.* Dezember 2016;39(12):1459–64.
79. Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod.* 2005;20(4):923–927.
80. Van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CWN, Eijkemans MJC, Fauser BC, u.a. Comparison of inter-and intra-cycle variability of anti-Müllerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod.* 2010;25(1):221–227.
81. Fleming R, Kelsey TW, Anderson RA, Wallace WH, Nelson SM. Interpreting human follicular recruitment and antimüllerian hormone concentrations throughout life. *Fertil Steril.* 2012;98(5):1097–1102.

82. Kelsey TW, Anderson RA, Wright P, Nelson SM, Wallace WHB. Data-driven assessment of the human ovarian reserve. *Mol Hum Reprod.* 2012;18(2):79–87.
83. Tal R, Seifer DB. Potential mechanisms for racial and ethnic differences in antimüllerian hormone and ovarian reserve. *Bd.* 2013. 2013.
84. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril.* 2011;95(1):170–175.
85. Nelson SM, Anderson RA, Broekmans FJ, Raine-Fenning N, Fleming R, La Marca A. Anti-Müllerian hormone: Clairvoyance or crystal clear? *Bd.* 27. 2012. 631–636 S.
86. Marca AL, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod.* 1. Dezember 2006;21(12):3103–7.
87. Bozkurt B, Erdem M, Mutlu MF, Erdem A, Guler I, Mutlu I, u.a. Comparison of age-related changes in anti-Müllerian hormone levels and other ovarian reserve tests between healthy fertile and infertile population. *Hum Fertil Camb Engl.* August 2016;1–7.
88. Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:257–275.
89. Bukman A, Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Bd.* 7. 2001. 581–590 S.
90. Chun S. Serum luteinizing hormone level and luteinizing hormone/follicle-stimulating hormone ratio but not serum anti-Müllerian hormone level is related to ovarian volume in Korean women with polycystic ovary syndrome. *Clin Exp Reprod Med.* 2014;41(2):86–91.
91. Ryan KJ. Biochemistry of Aromatase: Significance to Female Reproductive Physiology. *Cancer Res.* 1. August 1982;42(8 Supplement):3342s–3344s.
92. Frattarelli JL, Lauria-Costab DF, Miller BT, Bergh PA, Scott RT. Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* September 2000;74(3):512–7.
93. Welt CK. Regulation and Function of Inhibins in the Normal Menstrual Cycle. *Semin Reprod Med.* August 2004;22(3):187–93.
94. Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang D, u.a. Anti-Mullerian Hormone and Inhibin B in the Definition of Ovarian Aging and the Menopause Transition. *J Clin Endocrinol Metab.* September 2008;93(9):3478–83.
95. Makanji Y, Zhu J, Mishra R, Holmquist C, Wong WPS, Schwartz NB, u.a. Inhibin at 90: From Discovery to Clinical Application, a Historical Review. *Endocr Rev.* Oktober 2014;35(5):747–94.

96. Krawczuk-Rybak M, Leszczynska E, Poznanska M, Zelazowska-Rutkowska B, Wysocka J. Anti-Müllerian Hormone as a Sensitive Marker of Ovarian Function in Young Cancer Survivors. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:1–6.
97. Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update.* 1. September 2014;20(5):688–701.
98. Broer SL, Disseldorp J van, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, u.a. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update.* 1. Jänner 2013;19(1):26–36.
99. Yates AP, Rustamov O, Roberts SA, Lim HYN, Pemberton PW, Smith A, u.a. Anti-Müllerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. *Hum Reprod.* 1. September 2011;26(9):2353–62.
100. Kaufmann M, Costa SD. *Die Gynäkologie.* 3. Auflage. Scharl A, Herausgeber. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
101. Franks S. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int J Obes.* Juli 2008;32(7):1035–41.
102. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1. Jänner 2004;81(1):19–25.
103. Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, di Clemente N. Anti-Müllerian Hormone, Its Receptor, FSH Receptor, and Androgen Receptor Genes Are Overexpressed by Granulosa Cells from Stimulated Follicles in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* November 2008;93(11):4456–61.
104. Jacob SL, Field HP, Calder N, Picton HM, Balen AH, Barth JH. Anti-Müllerian Hormone reflects the severity of Polycystic Ovary Syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2. November 2016;
105. Visser JA, Hokken-Koelega ACS, Zandwijken GRJ, Limacher A, Ranke MB, Fluck CE. Anti-Müllerian hormone levels in girls and adolescents with Turner syndrome are related to karyotype, pubertal development and growth hormone treatment. *Hum Reprod.* 1. Juli 2013;28(7):1899–907.
106. Lindhardt Johansen M, Hagen CP, Johannsen TH, Main KM, Picard J-Y, Rgensen A, u.a. Anti-Müllerian Hormone and Its Clinical Use in Pediatrics with Special Emphasis on Disorders of Sex Development. *Int J Endocrinol.* 3. Dezember 2013;2013:e198698.
107. Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson ML, u.a. Measurements of Serum Müllerian Inhibiting Substance in the Evaluation of Children with Nonpalpable Gonads. *N Engl J Med.* 22. Mai 1997;336(21):1480–6.
108. Stoppa-Vaucher S, Djemli A, Van Vliet G. Undetectable AMH at 3 days of age: A clue to bilateral anorchia. *Clin Biochem.* November 2010;43(16–17):1373–4.

109. Misra M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Lee MM. Measurement of Mullerian Inhibiting Substance Facilitates Management of Boys with Microphallus and Cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab.* August 2002;87(8):3598–602.
110. Grinspon RP, Rey RA. New perspectives in the diagnosis of pediatric male hypogonadism: the importance of AMH as a Sertoli cell marker. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* November 2011;55(8):512–9.
111. Josso N, Rey R, Picard J-Y. Testicular Anti-Müllerian Hormone: Clinical Applications in DSD. *Semin Reprod Med.* 8. Oktober 2012;30(5):364–73.
112. Belville C, Van Vlijmen H, Ehrenfels C, Pepinsky B, Rezaie AR, Picard J-Y, u.a. Mutations of the Anti-Müllerian Hormone Gene in Patients with Persistent Müllerian Duct Syndrome: Biosynthesis, Secretion, and Processing of the Abnormal Proteins and Analysis Using a Three-Dimensional Model. *Mol Endocrinol.* 1. März 2004;18(3):708–21.
113. Lee MM, Misra M, Donahoe PK, MacLaughlin DT. MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions. *Mol Cell Endocrinol.* Dezember 2003;211(1–2):91–8.
114. Misra M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Lee MM. The Role of Müllerian Inhibiting Substance in the Evaluation of Phenotypic Female Patients with Mild Degrees of Virilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 1. Februar 2003;88(2):787–92.
115. Chong YH, Campbell AJ, Farrand S, McLennan IS. Anti-Müllerian Hormone Level in Older Women: Detection of Granulosa Cell Tumor Recurrence. *Int J Gynecol Cancer.* Oktober 2012;1.
116. Karkanaki A, Vosnakis C, Panidis D. The clinical significance of anti-Müllerian hormone evaluation in gynecological endocrinology. *Horm Athens Greece.* Juni 2011;10(2):95–103.
117. Rey R. Anti-Müllerian hormone is a specific marker of Sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. *Hum Pathol.* Oktober 2000;31(10):1202–8.
118. Mehri S, Levi Setti PE, Greco K, Sakkas D, Martinez G, Patrizio P. Correlation between follicular diameters and flushing versus no flushing on oocyte maturity, fertilization rate and embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* Jänner 2014;31(1):73–7.
119. Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G, Herausgeber. *Reproduktionsmedizin [Internet].* 1. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; [zitiert 7. November 2016]. Verfügbar unter: <http://www.springer.com/de/book/9783642301803>
120. Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS. The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 1. Oktober 1995;64(4):787–90.
121. Rose BI, Laky D. A comparison of the Cook single lumen immature ovum IVM needle to the Steiner-Tan pseudo double lumen flushing needle for oocyte retrieval for IVM. *J Assist Reprod Genet.* Juni 2013;30(6):855.

122. Schenk M, Huppertz B, Obermayer-Pietsch B, Kastelic D, Hörmann-Kröpfl M, Weiss G. Biobanking of different body fluids within the frame of IVF—a standard operating procedure to improve reproductive biology research. *J Assist Reprod Genet.* 26. November 2016;1–8.
123. Leung ASO, Dahan MH, Tan SL. Techniques and technology for human oocyte collection. *Expert Rev Med Devices.* 2. August 2016;13(8):701–3.
124. Wongtra-Ngan S, Vutyavanich T, Brown J. Follicular flushing during oocyte retrieval in assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev.* 8. September 2010;(9):CD004634.
125. Steiner, H-P. Unser Erfindungen - Institut für In-Vitro-Fertilisierung und Endokrinologie Dr. Hans-Peter Steiner [Internet]. Institut für In-Vitro-Fertilisierung und Endokrinologie Dr. Hans-Peter Steiner. [zitiert 16. Jänner 2017]. Verfügbar unter: <http://www.ivf-steiner.at/index.php?mod=inv>
126. Roche Diagnostics. Kinderwunsch-Portfolio von Roche Diagnostics [Internet]. [zitiert 25. November 2016]. Verfügbar unter: <https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/klinische-chemie-immundiagnostik/kinderwunsch-parameter.html>
127. Basuino L, Silveira CF. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod.* 1. März 2016;20(1):38–40.
128. Tramišak Milaković T, Panić Horvat L, Čavlović K, Smiljan Severinski N, Vlašić H, Vlastelić I, u.a. Follicular fluid anti-Müllerian hormone: a predictive marker of fertilization capacity of MII oocytes. *Arch Gynecol Obstet.* März 2015;291(3):681–7.
129. Aflatoonian A, Mashayekhy M, Mohamadian F& M. The correlation between follicular fluid anti-mullerian hormone levels and fertilization and embryo quality in ART cycles. *Iran J Reprod Med.* 8(4):157–60.
130. Çapkin Sİ, Özyer Ş, Karayalçın R, Moraloğlu Ö, Özcan S, Uğur M. Serum and follicular fluid Anti-Mullerian hormone concentrations at the time of follicle puncture and reproductive outcome. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2012;13(1):21.
131. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, u.a. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 1. Mai 2007;92(5):1796–802.
132. Hattori Y, Sato T, Okada H, Saito C, Sugiura-Ogasawara M. Comparison of follicular fluid and serum anti-Mullerian hormone levels as predictors of the outcome of assisted reproductive treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Juli 2013;169(2):252–6.
133. Bastu E, Gokulu SG, Dural O, Yasa C, Bulgurcuoglu S, Karamustafaoglu Balci B, u.a. The association between follicular fluid levels of cathepsin B, relaxin or AMH with clinical pregnancy rates in infertile patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* April 2015;187:30–4.

134. Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, Strick R, Stiegler E, Binder H, u.a. Correlations between anti-müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur J Med Res.* 14. Dezember 2007;12(12):604–8.
135. Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, u.a. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Mol Hum Reprod.* 1. August 2013;19(8):519–27.
136. Weenen C, Laven JSE, Bergh ARM von, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, u.a. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod.* 1. Februar 2004;10(2):77–83.

# Anhang – Einverständniserklärung Biobank Seite 1 von 4

## **PatientInneninformation/Einverständniserklärung für das Forschungsvorhaben der Medizinischen Universität Graz in Kooperation mit dem Kinderwunschinstitut Schenk GmbH, Institut für Re- produktionsmedizin und klinische Embryologie (in der Folge KIWI):**

### **Bereitstellung von Gewebeproben, Blutproben und anderen Körperflüssigkei- ten zu Forschungszwecken und zur Entwicklung neuer Diagnoseverfahren, Vorbeugemaßnahmen und Behandlungen**

Sehr geehrte Patientin! Sehr geehrter Patient!

#### Einleitung

Die wissenschaftliche Untersuchung von Gewebeproben, Blutproben und anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung mit Krankheitssymptomen ist heute eine der wichtigsten Voraussetzungen für ein besseres Verständnis der Ursachen und des Verlaufs von Erkrankungen sowie für die darauf aufbauende Entwicklung neuer Verfahren für die Diagnose, Vorbeugung und Behandlung dieser Erkrankungen. Hierfür werden typischerweise aus medizinischen Proben Zellen oder andere Bestandteile isoliert, vermehrt und mit mikroskopischen, biochemischen, immunologischen oder molekularbiologischen Methoden untersucht. Auch genanalytische Methoden können dabei zum Einsatz kommen. (Alle diese Methoden sind wissenschaftliche Techniken, mit denen die verschiedenen chemischen und biologischen Vorgänge im menschlichen Körper bzw. in dessen Zellen erforscht und besser verstanden werden.)

Solche Untersuchungen sind nur möglich, wenn Patientinnen und Patienten sich bereit erklären, medizinische Proben hierfür zur Verfügung zu stellen.

**Wir laden Sie ein, an dem oben genannten Forschungsvorhaben teilzunehmen. Voraussetzung für die Durchführung dieser Forschung ist, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich erklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zu einem ausführlichen Gespräch mit Fachleuten sorgfältig durch und zögern Sie nicht, Fragen zu stellen.**

#### Maßnahmen im Rahmen des Forschungsprojektes:

- Sollten bei den ohnehin vorgesehenen Untersuchungen im Rahmen der Diagnose und Behandlung Ihrer Erkrankung Blutproben, andere Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben gewonnen werden, ist geplant, jene Anteile dieser medizinischen Proben, welche nicht mehr unmittelbar für Ihre medizinische Betreuung benötigt werden, ohne zeitliche Befristung in einer sogenannten Biobank zu sammeln, zu archivieren und in Verbindung mit den erhobenen Krankheitsdaten für die Forschung zu verwenden. Diese Biobank ist Eigentum der Medizinischen Universität Graz und firmenunabhängig.

Es wird bei Ihnen keinesfalls mehr oder anderes Gewebe entfernt, als für die Diagnose beziehungsweise Therapie der bei Ihnen vorliegenden Erkrankung erforderlich ist. Für etwaige zusätzliche Eingriffe im Rahmen von anderen wissenschaftlichen Projekten der Medizinischen Universität Graz werden sie gesondert darüber informiert.

Lediglich im Rahmen von routinemäßig vorgesehenen Blutabnahmen könnte Ihnen bis maximal 20 ml Blut zusätzlich entnommen werden.

## Anhang – Einverständniserklärung Biobank Seite 2 von 4

- Um Zusammenhänge zwischen den Forschungsergebnissen und Ihrer Erkrankung feststellen zu können, dürfen gegebenenfalls von der Medizinischen Universität Graz und dem KIWI Informationen über den Verlauf Ihrer Erkrankung von Ihrem Hausarzt, dem Sie betreuenden Facharzt oder anderen Krankenhäusern, an denen Sie behandelt werden, eingeholt werden.
- Die Forschungsergebnisse werden gemeinsam mit den Daten über den Verlauf Ihrer Erkrankung in kodierter Form in einer Datenbank im KIWI gespeichert. Ebenso werden die Proben kodiert in der Biobank Graz der Medizinischen Universität aufbewahrt. Unter kodiert wird verstanden, dass nach menschlichem Ermessen mit Ausnahme der Sie behandelnden Ärztinnen und Ärzte und des unmittelbar befassten Personals der Biobank keine dritte Person die medizinischen Proben, Ihre Befunde sowie die Angaben über Ihre Krankheitssymptome und Lebensumstände mit Ihnen in Verbindung bringen kann. Alle Personen, die Zugang zu diesen Proben und Daten haben, unterliegen der Schweigepflicht. Der Schutz vor dem Zugriff Unbefugter ist sichergestellt.  
Die Verantwortung für die Aufbewahrung bzw. gegebenenfalls Vernichtung der Daten und Proben trägt die Leiterin bzw. der Leiter der Biobank der Medizinischen Universität Graz.
- Die Forschung wird grundsätzlich an der Medizinischen Universität Graz in Kooperation mit dem KIWI bzw. in Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen erfolgen. Die Durchführung von Analysen an kodierten Proben oder kodierten Daten kann auch in nationaler und internationaler Zusammenarbeit mit externen Partnern (zB anderen Forschungseinrichtungen, Firmen) erfolgen.
- Ihre medizinischen Proben und Daten sollen zu wissenschaftlichen Erkenntnissen über Ursachen, Verlauf, Behandlung und Vorbeugung von Krankheiten führen und schließlich zur Entwicklung und Qualitätskontrolle von neuen Diagnosemitteln und –verfahren eingesetzt werden.  
Gegebenenfalls sollen die Forschungsergebnisse in kodierter Form in wissenschaftlichen Schriften publiziert werden, zur Ausbildung von Ärztinnen und Ärzten eingesetzt werden und durch die Medizinische Universität Graz bzw. das KIWI in Zusammenarbeit mit anderen Unternehmen und Personen weiter wissenschaftlich oder auch kommerziell, zB mittels Patentierung, verwertet werden.

Für Ihre Bereitstellung der medizinischen Proben, Befunde sowie die Angaben über Ihre Krankheitssymptome und Lebensumstände ist keine finanzielle Abgeltung oder Beteiligung an einer etwaigen kommerziellen Verwertung der Forschungsergebnisse vorgesehen.

Eine individuelle Rückmeldung von Informationen und Forschungsergebnissen, die aus Ihren medizinischen Proben gewonnen werden, ist nur für den Fall vorgesehen, dass es sich um für Sie medizinisch bedeutsame Informationen handelt. Sie können jedoch darüber entscheiden, ob Sie diese Informationen bekommen möchten oder nicht.

Das wissenschaftliche Vorhaben und diese PatientInnen-information/ Einverständniserklärung wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft und befürwortet.

## Anhang – Einverständniserklärung Biobank Seite 3 von 4

Forschungsprojekte, die in Zukunft mit den in der Biobank gespeicherten Proben und im KIWI gespeicherten Daten vorgesehen sind, werden erst nach Vorliegen einer neuerlichen, projektbezogenen befürwortenden Stellungnahme der Ethikkommission durchgeführt werden. Nur kodierte Proben und kodierte Daten werden von der Biobank an Forschungsprojekte weitergegeben.

Ihre Einwilligung dazu ist völlig freiwillig und hat keinen Einfluss auf die für Sie vorgesehene Diagnose und Behandlung Ihrer Erkrankung. Durch die Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben entstehen für Sie keine zusätzlichen Kosten. Sie können die Einwilligung ohne Angabe von Gründen ablehnen oder Ihre erteilte Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen durch schriftliche oder mündliche Erklärung widerrufen. In diesem Fall wird jegliche Verbindung zwischen den von Ihnen gewonnenen Proben sowie Daten und Ihrer Person unwiederbringlich gelöscht. Wenn Sie es wünschen, werden die Proben aus der Biobank entfernt und vernichtet. Für weitere Informationen oder den Widerruf der Einwilligung wenden Sie sich bitte an die Leitung der Biobank der Medizinischen Universität Graz, Stiftingtalstraße 3.1, A-8010 Graz (Tel. 0043 316-385-72716) bzw. an die Leitung des KIWI, Am Sendergrund 11 + 12, A-8143 Dobl (Tel. 0043 3136 55111 23).

**Bitte unterschreiben Sie die Einverständniserklärung nur:**

- wenn Sie Art und Ablauf des Forschungsvorhabens vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen, und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Teilnehmerin bzw. Teilnehmer an diesem Forschungsvorhabens im Klaren sind.

# Anhang – Einverständniserklärung Biobank Seite 4 von 4

*Patientenbarcode aufkleben  
(falls vorhanden)*

## Einverständniserklärung



Ich, ..... geboren am .....  
 habe die mir zur Kenntnis gebrachte PatientInneninformation zum Forschungsvorhaben: „Bereitstellung von Gewebeproben, Blutproben und anderen Körperflüssigkeiten zu Forschungszwecken und zur Entwicklung neuer Diagnoseverfahren, Vorbeugemaßnahmen und Behandlungen“, bestehend aus 3 Seiten, gelesen und verstanden.  
 Ich wurde im Rahmen eines diesbezüglichen Aufklärungsgespräches von Herrn/Frau (Dr. med.) ..... ausführlich und verständlich über Wesen, Bedeutung und Tragweite des Forschungsvorhabens informiert. Alle meine Fragen wurden ausreichend beantwortet und ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Zur Zeit habe ich keine weiteren Fragen mehr.  
 Mit meiner Unterschrift erkläre ich zu den angeführten Punkten Folgendes:

Ich willige ein, dass ich die <b>nicht mehr für meine medizinische Behandlung benötigten Proben</b> der Medizinischen Universität Graz für das vorliegende Forschungsvorhaben überlasse. Ich erkläre mich bereit, dass <b>im Rahmen von routinemäßig vorgesehenen Blutabnahmen maximal 20 ml Blut zusätzlich</b> abgenommen werden können.	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
---	--------------------------------	----------------------------------

Weiters erlaube ich der Medizinischen Universität Graz die Verwendung der für mich durch das KIWI erstellten Befunde und der gesammelten Angaben über meine Krankheitssymptome und Lebensumstände für das vorliegende Forschungsvorhaben. Dies inkludiert neben den Daten, die am KIWI vorhanden sind, **auch medizinische Daten weiterer Institutionen (Haus-, Facharzt und andere Krankenhäuser)**, die zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken erhoben wurden.

Ich bevollmächtige diesbezüglich die Medizinische Universität Graz, diese Daten direkt bei den genannten Institutionen anzufordern.	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
---	--------------------------------	----------------------------------

Beim Umgang mit den Proben und/oder Daten werden die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes und des Gentechnikgesetzes beachtet. Bei allfälliger Weitergabe der Proben und/oder Daten sowie bei etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieses Forschungsvorhabens werde ich nicht namentlich genannt.  
 Eine Kopie dieser PatientInneninformation und Einverständniserklärung habe ich erhalten. Eine weitere Kopie behält das KIWI, und das Original verbleibt bei der Medizinischen Universität Graz.  
 Meine Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben ist freiwillig. Ich kann meine Einwilligung jederzeit an der Medizinischen Universität Graz ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass dadurch ein Nachteil für meine medizinische Betreuung entsteht.

Ich wünsche über für mich persönlich oder meine direkten Nachkommen bedeutsame medizinische Forschungsergebnisse informiert zu werden.	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
--	--------------------------------	----------------------------------

.....  
 (Datum und Unterschrift der /des Patienten/in)

Ich habe Herrn /Frau..... vor der Unterzeichnung dieser Erklärung ausführlich beraten und bestätige, keinen Druck ausgeübt zu haben.

.....  
 (Datum, Name und Unterschrift der/des verantwortlichen Ärztin/Arztes)  
*Vielen Dank für ihre Teilnahme!*

