Korrelation von Fetuin-B mit der systemischen Immunmodulation in Kinderwunsch-Patientinnen

Von der Medizinischen Fakultät

der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Sara Gabriela Hangen Rodriguez

aus Aachen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. med. Joseph Neulen

Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Pardes Habib

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2025

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Frauenklinik für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin des Uniklinikums Aachen (UKA) im Rahmen meines Medizinstudiums an der RWTH Aachen realisiert. Im Fokus der Arbeit lag die Kinderwunschbehandlung von Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch. Die Idee zu dieser Arbeit erhielt ich durch meinen Doktorvater Professor Dr. med. Joseph Neulen und meinen Betreuer Dr. med. Benjamin Rösing. Die Datenerhebung erfolgte im IVF-Labor unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Ute Weißenborn, im Neurologie Labor unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Pardes Habib sowie im Zentrallabor des UKA.

Poster/Abstract: Einige der hier dargestellten Ergebnisse wurden 2020 in einem Posterbeitrag (P412) beim Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. (DGGG-Kongress) vorgestellt. Das Poster wurde mit dem DGGG-Posterpreis ausgezeichnet. Anschließend wurde das Abstract unter dem Titel der vorliegenden Arbeit

Hangen, R. S., Bodewig, L. M., Habib, P., Neulen, J., & Rösing, B. (2020),

Korrelation von Fetuin-B mit der systemischen Immunmodulation in Kinderwunsch-Patientinnen

im Journal Geburtshilfe und Gynäkologie Volume 80(10), P412 (2020) veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort ii

Abkürzungsverzeichnis vi

Abbildungsverzeichnis ix

Tabellenverzeichnis x

1. Einleitung 1

1.1 Kinderwunschbehandlung bei unerfülltem Kinderwunsch 1

1.2 Motivation der Arbeit 3

1.3 Anmerkung zur besseren Lesbarkeit 4

2. Zielsetzung 5

3. Kontext und Stand der Forschung 6

3.1 Der weibliche Zyklus 6

3.2 Adipositas und Stoffwechselstörungen 7

3.3 Fetuine 9

3.4 Das angeborene Immunsystem 11

3.5 Inflammasome 12

3.6 Zusammenhang metabolischer Dysbalance und systemischer Inflammation 15

3.7 Zusammenhang zwischen metabolischer Dysbalance, Inflammation und der Eizellqualität 17

3.8 Einfluss des Gewichts auf die Eizellqualität der Frau 19

4. Durchführung der Studie 21

4.1 Kollektiv 22

4.2 Ablauf der Kinderwunschbehandlung 22

4.3 Datenerhebung 23

4.4 Messung der mRNA-Expression der Inflammasome mittels rt-qPCR 24

4.4.1 Hintergrundwissen zur PCR-Methode 24

4.4.2 Vorbereitung und Durchführung der rt-qPCR 24

4.4.3 Schwellenwertzyklus 26
4.4.4 Relative Quantifizierung 27
4.4.5 Primer 28
4.5 Proteinbestimmung mittels ELISA-Verfahren 29
4.6 Messung der zellulären inflammatorischen und metabolischen Parameter und Bestimmung des Hormonstatus 32
4.7 Beurteilung der weiblichen Fertilität 33
4.8 Statistik 34
4.8.1 Statistische Methoden 34
4.8.2 Mittel der Statistik 34
4.8.3 Statistische Auswertung 34
5. Ergebnisse 36
5.1 Fetuin-B Serumkonzentration und Fertilitätsparameter 39
5.2 Fetuin-B Serumkonzentration und Anzahl entnommener Eizellen 43
5.3 Metabolisch-inflammatorischer Status im Zusammenhang mit Fertilitätsparametern 44
5.3.1 Eizellreifung und NLRC4-Genexpression 44
5.3.2 Fertilitätsparameter und metabolisch-inflammatorischer Status 47
5.4 Inflammatorischer Status und Fetuin-B 50
5.4.1 Inflammatorische Parameter auf molekularer Ebene und Fetuin-B 50
5.4.2 Inflammatorische Parameter auf zellulärer Ebene und Fetuin-B 52
5.5 Metabolischer Status und Fetuin-B 54
5.6 Fetuin-B im zeitlichen Verlauf 59
5.7 Korrelationsanalyse zwischen HOMA-Index und metabolisch-inflammatorischen Parametern 60
5.8 Korrelationsanalyse zwischen BMI und metabolisch-inflammatorischen Parametern 61
6. Diskussion 63
6.1 Zusammenhang zwischen Fetuin-B und Fertilitätsparametern 63

6.2 Niedrige NLRC4-Genexpression bei hoher Eizellreifung 64

6.3 Trends von Fertilisationsrate mit HOMA-Index und Monozytenzahl 65

6.4 Positiver Zusammenhang von NLRP3 und Fetuin-B 67

6.5 Erhöhte Fetuin-B Konzentrationen bei metabolisch-inflammatorisch suboptimalem Status 67

6.6 Beurteilung der Studie 69

6.7 Klinische Relevanz der Arbeit 71

7. Zusammenfassung 73

Literaturverzeichnis 74

Danksagung 87

Erklärung zur Datenaufbewahrung 88

Eidesstattliche Erklärung über den Eigenanteil 89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs	absolut
AIM2	Absent In Melanoma 2
AN	Anorexia nervosa
ART	assisted reproductive techniques
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintriphosphat
ß2M	ß2-Mikroglobulin
BMI	Body Mass Index
COS	controlled ovarian stimulation
CRP	C-reaktives Protein
CV	coefficient of variation
DAMP	damage-associated molecular pattern
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.
DNA	desoxyribonucleic acid
D	Domäne
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
ELISA	Enyzme-linked Immunosorbent Assay
EPEC	pathogenic Escherichia coli
EZ	Eizelle
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone

hCG	humanes Choriongonadotropin
HEK	Human Embryonic Kidney Cells
hHPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HOMA-Index	Homeostasis Model Assessment
HRP	horseradish peroxidase
ICSI	intracytoplasmatic sperm injection
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVF	in-vitro-Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktorprotein-1
$\overline{\mathbf{mean}}$	arithmetisches Mittel
MII	Metaphase-II
MII-EZ	Eizelle in der Metaphase II
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLRP2	NLR Family Pyrin Domain Containing 2
NLRP3	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
NLRC4	NLR Family CARD Domain Containing 4
OI	Ovulationsinduktion
p	p-Wert
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom

PCR	polymerase chain reaction
PN-Stadium	Pronukleusstadium, Vorkernstadium
PN-EZ	Eizelle im Pronukleusstadium
PRR	pattern recognition receptor
qPCR	quantitative PCR
r	Rangkorrelationskoeffizient Spearman’s Rho
r^2	Bestimmtheitsmaß
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomale RNA
rt-qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription-PCR
S	Svedberg Einheit
SD	standard deviation
t	Messzeitpunkt
T2DM	type 2 diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor – alfa
U	Unit
UKA	Universitätsklinikum Aachen
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
X	unabhängige Variable
Y	abhängige Variable
y	years
ZP	Zona Pellucida

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Graphische Darstellung der Blutentnahmezeitpunkte. 23
Abb. 2: Darstellung der 96-Wells-Mikrotiterplatte des ELISA-Kit inklusive Probenauftragung. 30
Abb. 3: Standardkurve des Fetuin-B ELISA. 31
Abb. 4: Quartilsvergleich der Eizellreifung und der Fetuin-B Serumkonzentration an t1. 40
Abb. 5: Quartilsvergleich der Fertilisationsrate und der Fetuin-B Serumkonzentration an t1. 40
Abb. 6: Korrelation zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration an t2 und der Anzahl entnommener Eizellen. 43
Abb. 7: Verteilung von gereiften Eizellen und Inflammasom: Vergleich der Quartile Q1 und Q4 im Säulendiagramm. 46
Abb. 8: Quartilsvergleich der Fertilisationsrate und des HOMA Index an t1. 48
Abb. 9: Quartilsvergleich der Fertilisationsrate und der Monozytenzahl an t2. 49
Abb. 10: Quartilsvergleich der Inflammasom-Genexpression (NLRP2, NLRP3, NLRC4, AIM2) und der Fetuin-B Serumkonzentration an t1. 51
Abb. 11: Korrelation zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Leukozytenzahl an t1. 52
Abb. 12: Korrelation zwischen der Fetuin-B und der CRP Serumkonzentration an t1. 53
Abb. 13: Quartilsvergleich der Fetuin-B Serumkonzentration und des HOMA Index an t1. 55
Abb. 14: Quartilsvergleich der Fetuin-B Serumkonzentration und des BMI an t1. 56
Abb. 15: Fetuin-B und Insulin Serumkonzentration im korrelativen Zusammenhang (links) und im Quartilsvergleich (rechts) an t1. 57
Abb. 16: Fetuin-B und Triglyzerid Serumkonzentration im korrelativen Zusammenhang (links) und im Quartilsvergleich (rechts) an t1. 58
Abb. 17: Vergleich der Fetuin-B Serumkonzentrationen an t1 und t2. 59
Abb. 18: Korrelation zwischen dem BMI und der CRP Serumkonzentration an t1. 61
Abb. 19: Korrelation zwischen dem BMI und der Leukozytenzahl an t1. 62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung von Synonymen regelmäßig verwendeter Begriffe.....4
Tab. 2: Auflistung verwendeter Primer mit zugehöriger Annealing Temperatur. 28
Tab. 3: Übersicht klinischer und metabolischer Merkmale im Studienkollektiv. 36
Tab. 4: Korrelation zwischen Fetuin-B und Fertilitätsparametern.....39
Tab. 5: Charakteristika der Studienteilnehmerinnen entsprechend der Fetuin-B Serumkonzentration im Quartilsvergleich zum Messzeitpunkt t1. 42
Tab. 6: Korrelation zwischen der Eizellreifung und der Inflammasomexpression. 44
Tab. 7: Korrelation zwischen der Fertilisationsrate und dem HOMA-Index und der Monozytenzahl. 47
Tab. 8: Korrelation zwischen der Fetuin-B und der Inflammasomexpression. ..50
Tab. 9: Korrelation zwischen Fetuin-B und dem HOMA-Index und dem BMI. ..54
Tab. 10: Korrelationstabelle zwischen HOMA-Index und metabolisch-inflammatorischen Parametern. 60

1. Einleitung

1.1 Kinderwunschbehandlung bei unerfülltem Kinderwunsch

Ein unerfüllter Kinderwunsch, auch Sterilität genannt, liegt laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) vor, wenn über einen Zeitraum von einem Jahr bei regelmäßigem ungeschütztem Geschlechtsverkehr keine Schwangerschaft eintritt (Zegers-Hochschild et al. 2017). Da bis zu diesem Zeitpunkt 85 % aller Paare einen Empfängnisversuch erfolgreich abgeschlossen haben, ist bei erfolglosen Paaren eine klinische Untersuchung indiziert (Committee 2000). Die Ursachen für den unerfüllten Kinderwunsch eines Paares sind vielfältig (Smith et al. 2003). Sie liegen zu 40 % beim männlichen Partner, 40 % bei der weiblichen Partnerin und zu 20 % bei beiden Partnern (Eunpu 1995). In einer zuvor publizierten Studie war die häufigste Ursache der weiblichen Unfruchtbarkeit anatomisch bedingt: 27,4 % der Frauen wiesen eine Störung der Eileiterfunktion auf. Bei 20 % der Frauen waren Menstruationsstörungen die Ursache. In 24,5 % der Fälle konnte keine Ursache gefunden werden (Zoe 2009). Weiter kann die Fertilität einer Frau durch gynäkologische Vorerkrankungen wie der Endometriose oder dem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) vermindert sein (Xu et al. 2006; Marquard et al. 2011). Der psychische Zustand der Frau kann laut Cousineau & Domar (2007) ebenso Einfluss auf ihre Fertilität haben. Aufgrund der verschiedenen möglichen Ursachen ist das diagnostische Spektrum sehr breit (Smith et al. 2003). Im Rahmen der Kinderwunschbehandlung gibt es verschiedene Therapieansätze, welche als Ziel das Herbeiführen einer Schwangerschaft mithilfe medizinischer Maßnahmen haben (Farquhar & Marjoribanks 2018). Diese richten sich stets nach der Sterilitätsursache. Anatomische Sterilitätsursachen der Frau können beispielsweise mittels chirurgischen Eingriffen behandelt werden (Pandian et al. 2008). Es gibt jedoch auch Sterilitätsursachen, die sich nicht durch Medikamente oder operative Eingriffe beheben lassen (Strowitzki 2000). Die künstliche Befruchtung oder assistierte Reproduktion (assisted reproductive techniques, ART) ist eine Methode, die verschiedene in-vitro-Verfahren einschließt, bei denen die Befruchtung (Fertilisation) der Eizelle mit einem Spermium außerhalb des Eileiters (Tube) erfolgt (Herrler & Beier 1998). Abhängig von den

Samenparametern des männlichen Partners kann eine in-vitro-Fertilisation (IVF) oder zusätzlich eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (intracytoplasmatic sperm injection, ICSI) erforderlich sein (Herrler & Beier 1998). Der Ablauf der Kinderwunschbehandlung im Rahmen einer ART wird in sechs Schritte eingeteilt. Der erste Schritt ist eine kontrollierte Stimulation des Eierstocks (Ovar). Zur Kontrolle der endogenen Gonadotropinfreisetzung und um einen vorzeitigen Eisprung (Ovulation) während der kontrollierten ovariellen Stimulation (controlled ovarial stimaulation, COS) zu verhindern, werden Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) -Rezeptoren an der Hypophyse downreguliert (Agonistenprotokoll) oder blockiert (Antagonistenprotokoll) (Depalo et al. 2012; Die ESHRE Leitliniengruppe zur ovariellen Stimulation 2020). Daraufhin erhalten die Patientinnen Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) subkutan zur supraphysiologischen Stimulation mit dem Ziel mehrere ovarielle Follikel zu rekrutieren und im Wachstum zu stimulieren (Smacklon & Fauser 2000). Bei ausreichendem Wachstum unter hormoneller und sonographischer Kontrolle wird im zweiten Schritt die Ovulation ausgelöst (Castillo et al. 2014). Dazu werden sogenannte LH-Analoga wie hCG (Agonisten- und Antagonistenprotokoll) oder GnRH-Agonisten (Antagonistenprotokoll) appliziert. Die Induktion der Ovulation erfolgt entweder durch die Gabe von hCG als LH-Äquivalent oder durch die Gabe von GnRH-Agonisten, die zur endogenen LH-Ausschüttung führt. (Gonen et al. 1990). Die herangereiften Eizellen (Oozyten) werden im dritten Schritt transvaginal und ultraschallgesteuert punktiert. Die entnommenen Eizellen werden aufgearbeitet und können im nächsten Schritt in-vitro inseminiert werden oder über eine Spermieninjektion befruchtet werden (Die ESHRE-Arbeitsgruppe für Ultraschall in der ART 2019). Die Beurteilung der Eizellentwicklung erfolgt in der Praxis hauptsächlich durch eine mikroskopische Begutachtung der Morphologie der Eizellen (Die ESHRE-Leitliniengruppe für gute Praxis in IVF-Laboren et al. 2016). Die Eizellreifung gibt hierbei die relative Anzahl korrekt ausgereifter Eizellen in der Metaphase-II (MII) an und ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Spermienbefruchtung (Humeidan & Jank 2012). Eizellen, welche das Vorkernstadium (Pronukleusstadium, PN-Stadium) erreichen, dokumentieren eine erfolgreiche Fertilisation (Greuner & Montag 2014). Im fünften Schritt werden die aus befruchteten Eizellen entstandenen Embryonen zwei bis fünf Tage kultiviert. Schließlich erfolgt der Embryotransfer in die Gebärmutter (Uterus) der Frau.

Nach zwei Wochen kann bei eingetretener Schwangerschaft hCG im Serum nachgewiesen werden (Schwangerschaftstest) (Rebar 2019).

1.2 Motivation der Arbeit

In Deutschland bleibt fast jedes zehnte Paar mit Kinderwunsch zwischen 25 und 45 Jahren kinderlos (Zimmermann & Biakowski 2020). Gleichzeitig ist die Zahl an Kinderwunschbehandlungen bei unerfülltem Kinderwunsch seit Jahren steigend (Deutsches IVF-Register 2021). Die Geburtenrate pro Embryotransfer lag 2020 bei 23,3 %, somit können bis zu einer erfolgreichen Schwangerschaft durchaus mehrere Behandlungszyklen nötig sein (Deutsches IVF-Register 2021). Dabei belasten Kinderwunschbehandlungen die Paare psychisch, physisch und finanziell (Hölzle 1989). Seit dem Jahr 2004 werden Kinderwunschbehandlungen nur noch teilweise und unter bestimmten Bedingungen von der gesetzlichen Krankenkasse übernommen. Ein IVF-Zyklus kostet beispielsweise bis zu 4.000 Euro inklusive der benötigten Medikamente (Deutsches IVF-Register 2021). Die Ursachen für einen unerfüllten Kinderwunsch sind vielfältig (Smith et al. 2003). Dementsprechend ist bislang nicht genau definiert, wie Erfolgsprognosen für Frauen, die eine ART in Anspruch nehmen, erstellt werden (Kissin et al. 2014). Dabei ist eine möglichst genaue Prognose seit langem ein Ziel (van Loendersloot et al. 2014). Es existieren Modelle, die den Erfolg einer ART-Behandlung vorhersagen sollen, jedoch sind diese meist unzureichend optimiert und schätzen die Ergebnisse entweder zu hoch oder zu niedrig ein (Templeton et al. 1996; Nelson & Lawlor 2011; te Velde et al. 2014).

Zunehmend gibt es Hinweise, dass Stoffwechselerkrankungen eine mögliche Ursache der weiblichen Sterilität darstellen (Chieri et al. 1969; Iborra et al. 2005). Diese resultiert aus Störungen von Stoffwechselsignalen und der Ausschüttung proinflammatorischer Botenstoffe, welche die Eizellreifung beeinflussen können (Castellano et al. 2009; Boots & Jungheim 2015). Zugleich ist eine ordnungsgemäße Eizellreifung mit einer hohen Eizellqualität und Fertilisationsrate assoziiert und die Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft (Navot et al. 1991; Hourvitz et al. 2009; Fang et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Studie konzipiert, um mögliche Zusammenhänge zwischen Stoffwechselerkrankungen, niedrigschwelligen (low-grade) Inflammationen und der Eizellqualität systematisch zu untersuchen.

1.3 Anmerkung zur besseren Lesbarkeit

In der Medizin werden oftmals verschiedene Synonyme für einen medizinischen Begriff oder eine Erkrankung verwendet. In der unten aufgeführten Tabelle 1 werden Synonyme regelmäßig verwendeter Begriffe dieser Arbeit aufgeführt. Zur besseren Lesbarkeit werden in dieser Arbeit die Begriffe der linken Spalte genutzt.

Tab. 1: Auflistung von Synonymen regelmäßig verwendeter Begriffe

Verwendeter Begriff	Synonyme
Assistierte Reproduktive Technologien (ART) als spezifischer Begriff	künstliche Befruchtung, In-Vitro-Fertilisation
Ovar	Eierstock
Eizelle	Oozyte
Eizellqualität	Eine hohe Eizellqualität gilt in dieser Arbeit als Überbegriff für eine hohe Eizellreifung und Fertilisationsrate
Fertilität	Fruchtbarkeit, Fortpflanzungsfähigkeit, im Rahmen der Arbeit wurde das Ausmaß der weiblichen Fertilität anhand der Eizellqualität bewertet
Kinderwunschbehandlung als allgemeiner Begriff	Medizinische Maßnahmen zur Herbeiführung einer Schwangerschaft inklusive Hormonbehandlungen
metabolisch	stoffwechselbedingt
Metabolische Dysbalancen	Stoffwechselerkrankung, metabolische Erkrankung
Unerfüllter Kinderwunsch	Sterilität, Unfruchtbarkeit

2. Zielsetzung

Die Gründe für einen unerfüllten Kinderwunsch sind vielfältig (Smith et al. 2003). Gleichzeitig ist die Zahl an Kinderwunschbehandlungen bei unerfülltem Kinderwunsch seit Jahren steigend (Deutsches IVF-Register 2021). Zunehmend gibt es Hinweise, dass metabolische Dysbalancen und damit assoziierte inflammatorische Zustände eine mögliche Ursache der weiblichen Sterilität darstellen, jedoch ist die Studienlage unzureichend (Chieri et al. 1969; Iborra et al. 2005; Castellano et al. 2009).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Zusammenhang zwischen metabolischen Dysbalancen, systemischen Inflammationen und der Eizellqualität im ART-Setting systematisch zu untersuchen. Dabei lautet die Fragestellung, inwiefern metabolisch-inflammatorische Marker und Fetuin-B, als Prognoseparameter für eine erfolgreiche Kinderwunschbehandlung der Frau verwendet werden können. Zudem erfolgt erstmals eine Zusammenhangsbetrachtung der Inflammasom-Genexpression und der Eizellreifung und Fetuin-B.

Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen der Eizellqualität und einem metabolisch-inflammatorischen Profil wurden n = 56 Patientinnen im Zeitraum von 01.07.2019 bis 01.04.2020 zur Untersuchung eingeschlossen. Die Patientinnen kamen zur Kinderwunschbehandlung bei unerfülltem Kinderwunsch in die Frauenklinik für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin des UKA. Das Alter der Patientinnen betrug im Mittel 33 Jahre (25 - 40 Jahre). Von allen Frauen liegt eine schriftliche Einwilligung in die Studie vor. Der Aufbau der Studie ist in Kapitel 4 dargestellt.

Das Studienziel ist systemische Parameter der behandelten Patientin zu identifizieren, die im Zusammenhang mit der Eizellqualität stehen und die idealerweise vor der Kinderwunschbehandlung optimiert werden können, um eine höhere Schwangerschafts- und Geburtenrate zu erlangen. Die Hypothese lautet, dass unter aktivierter pro-inflammatorischer Konstellation und suboptimalem metabolischem Status die Qualität der Eizellen sinkt.

3. Kontext und Stand der Forschung

3.1 Der weibliche Zyklus

Der weibliche Zyklus oder Menstruationszyklus dauert durchschnittlich 25-35 Tage und findet bei Frauen im gebärfähigen Alter von circa zwölf bis 51 Jahren statt (Fillenberg 2017). Der weibliche Zyklus ist komplex und abhängig von einer gut koordinierten Zusammenarbeit von Hypothalamus, Hypophyse und den Ovarien (Ferin et al. 1993). Er wird hormonell unter anderem durch das Luteinisierende Hormon (LH) und das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) gesteuert. LH und FSH gehören zu den sogenannten Gonadotropinen und werden in der Hypophyse ausgeschüttet. Das Signal dafür kommt aus dem Hypothalamus und heißt Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH). Die GnRH Sekretion erfolgt pulsatil, das heißt der zeitliche Abstand der GnRH-Sekretion bestimmt, ob LH oder FSH sezerniert wird (Jarry & Hinney 1998). Die erste Zyklushälfte wird Follikelphase genannt und beginnt mit dem ersten Tag der Menstruationsblutung. Im Ovar kommt es durch das FSH zum Wachstum eines dominanten Follikels, welcher eine Eizelle enthält. Das Hormon Östradiol führt zudem zum Aufbau der Gebärmutterschleimhaut (Endometrium). Die erste Zyklushälfte kann in ihrer Länge zwischen 14 und 21 Tagen variieren (Fillenberg 2017). Die fruchtbare Phase umfasst sechs Tage, diese sind fünf Tage vor und am Tag der Ovulation. In dieser Phase besteht die höchste Wahrscheinlichkeit der Empfängnis (Wilcox et al. 1995). Die zweite Zyklushälfte wird Lutealphase genannt und beginnt mit der Ovulation, welche durch einen LH-Anstieg induziert wird. Die Follikelwand rupturiert und die herangereifte Eizelle gelangt in den Eileiter. Aus dem Follikel bildet sich der Gelbkörper (Corpus luteum), welcher die Hormone Progesteron und Östradiol produziert (Cordes 2020). Das Endometrium wird durch den Hormoneinfluss umgebaut und es werden ideale Einnistungsbedingungen für eine befruchtete Eizelle geschaffen. Progesteron hilft dabei, eine mögliche Schwangerschaft aufrecht zu erhalten. Wird die Eizelle nicht befruchtet, bildet sich das Corpus luteum zurück und das aufgebaute Endometrium wird bei der nächsten Menstruation abgestoßen. Die zweite Zyklushälfte dauert 14 Tage (Fillenberg 2017; Cordes 2020). U.a. moduliert ovarielles Östradiol die Aktivität der hypophysären Gonadotropinausschüttung. Es kann sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die GnRH Sekretion im Hypothalamus haben (Wintermantel et al. 2006).

Hohe Östrogenkonzentrationen stimulieren die Gonadotropinsekretion, niedrige Östrogenkonzentrationen wiederum hemmen die Gonadotropinsekretion (Müller-Esterl 2018).

3.2 Adipositas und Stoffwechselstörungen

Die steigende Prävalenz von Übergewicht und Adipositas ist ein weltweites Gesundheitsproblem. 47 % der Frauen und 62 % der Männer in Deutschland waren im Jahr 2017 von Übergewicht, einschließlich Adipositas, betroffen (Schienkiewitz et al. 2017). Übergewicht beschreibt eine Vermehrung des Körperfetts, die über das Normalmaß hinausgeht, und wird ab einem Body-Mass-Index (BMI) von 25 kg/m^2 diagnostiziert (Hauner et al. 2013). Der Begriff BMI existiert seit 1951 und dient der Einschätzung des Körpergewichts (Brozek & Keys). Adipositas bezeichnet ein starkes Übergewicht (BMI > 30 kg/m^2) und wird von der WHO als eigenständige Krankheit eingestuft (Weltgesundheitsorganisation 2000). Übergewichtige Menschen haben ein erhöhtes Risiko für metabolische Erkrankungen (Simon-Vermot & Keller 2000). Grund dafür ist die Zunahme von viszeralem Fett. Viszerales Fettgewebe befindet sich in der freien Bauchhöhle und ist stoffwechselaktiv, indem es eine Reihe an Botenstoffen, unter anderem Adipokine und Zytokine, sezerniert (Nishimura et al. 2009). Es ist bekannt, dass einige dieser Zytokine die Insulinwirkung reduzieren und somit zur Entwicklung einer Insulinresistenz beitragen können (Li et al. 2015). Auch wenn Übergewicht mit metabolischen Dysbalancen assoziiert wird, bleibt ein bestimmter Anteil der übergewichtigen Menschen metabolisch gesund. In einer vorherigen Studie wiesen 30 % der Adipösen keine metabolischen Erkrankungen auf (Wildman et al. 2008).

Unter dem Begriff metabolische Dysbalancen werden Stoffwechselerkrankungen wie Glukose- oder Fettstoffwechselstörungen zusammengefasst. Diese resultieren in der Regel aus Überernährung oder genetischer Prädisposition (Rich 1990; Leong & Wilding 1999).

Die Insulinresistenz bezeichnet eine verminderte Wirkung von Insulin auf den Stoffwechsel (Müller et al. 2007). Sie wird diagnostiziert, wenn eine bestimmte Menge an endogenem oder exogenem Insulin nicht zu einem Anstieg der Glukoseaufnahme führt (Lebovitz 2001). Zur Diagnostik einer Insulinresistenz gibt es verschiedene Methoden:

Die quantitative Bestimmung von humanem Insulin im Serum erfolgt über Radio-Immunoassays (Quabbe 1969). Die Glukoseaufnahme kann über sogenannte patch-clamp Verfahren gemessen werden (Matsuda & DeFronzo 1999). Desweiteren kann die Wahrscheinlichkeit für eine Insulinresistenz über die Berechnung des Homeostasis Model Assessment (HOMA)-Index bestimmt werden (Antuna-Puente et al. 2011).

Ursachen für eine Insulinresistenz können Übergewicht, genetische Prädisposition oder Stress sein (Müller et al. 2007). Die Insulinresistenz ist Teil des metabolischen Syndroms. Das metabolische Syndrom ist eine häufige Stoffwechselstörung und besteht aus verschiedenen Symptomen wie der Glukoseintoleranz, Insulinresistenz, Adipositas, Dyslipidämie und Bluthochdruck (Eckel et al. 2005). Die Dyslipidämie ist durch eine erhöhte Konzentration an LDL-Cholesterinen und Triglyzeriden gekennzeichnet, welche zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko bei Betroffenen führt (Rost 1992; Parhofer & Wu 2019). Das metabolische Syndrom ist primär durch das Zusammenwirken verschiedener Gene determiniert, wird aber signifikant durch exogene sekundäre Faktoren wie körperlicher Aktivität und Ernährung beeinflusst (Joost et al. 2000).

Kompensatorisch kommt es bei einer Insulinresistenz zum Anstieg der Insulinkonzentration im Blut (Hyperinsulinämie) (Erdmann et al. 2008). Mit der Zeit kann die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) die Insulinresistenz nicht kompensieren und es entsteht eine relative Pankreasinsuffizienz (Pereira & Alvarez-Leite 2014). Dies führt zu einer unzureichenden hepatischen und peripheren Glukoseverwertung und in der Folge zu höheren Glukosespiegeln. Dieser Zustand wird als gestörte Glukosetoleranz bezeichnet und löst die Entwicklung eines Diabetes Typ II (type 2 diabetes mellitus, T2DM) aus (Reaven 2005). Somit stellt die Insulinresistenz einen Risikofaktor des T2DM dar. Beim T2DM handelt es sich um eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, bei der es zu einer Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglykämie) kommt. Ursache ist meist eine gestörte Insulinsekretion oder eine gestörte Insulinwirkung (Nauck et al. 2017).

Das Polyzystische Ovarialsyndrom (PCO-Syndrom, PCOS) ist die häufigste ovarielle Funktionsstörung bei prämenopausalen Frauen (Marquard et al. 2011). Frauen, die vom PCOS betroffen sind, weisen eine erhöhte Prävalenz für eine Insulinresistenz auf (Dunaif 1997). Die Insulinresistenz bei PCOS-Patientinnen

basiert auf einem genetischen Defekt in der Insulinwirkung und tritt bereits im jungen Alter und unabhängig vom BMI auf (Dunaif et al. 1992). Das PCOS wird anhand der Rotterdam Kriterien diagnostiziert (ESHRE/ASRM 2004). Hierbei müssen zur Diagnosesicherung zwei der drei folgenden Kriterien vorliegen: chronische Anovulation, Hyperandrogenämie, polyzystische Ovarmorphologie (ESHRE/ASRM 2004). Das PCOS wird mit einem erhöhten Risiko für Stoffwechselanomalien wie erhöhten Insulinwerten und der Hyperlipidämie in Verbindung gebracht. Diese Zusammenhänge bestehen unabhängig vom BMI der Patientinnen und gehen mit einem erhöhten Risiko einher, an T2DM zu erkranken (Tsilchorozidou et al. 2004; Ghaffarzad et al. 2016).

3.3 Fetuine

Fetuin-B ist ein hepatisches Protein aus der Cystatin-Familie (Meex et al. 2015). Es ist ein natürlicher Insulin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor. Fetuine werden von der Leber sezerniert, weswegen sie auch Hepatokine heißen (Meex et al. 2015). Fetuin-A induziert eine Insulinresistenz und weist proinflammatorische Eigenschaften auf (Pedersen 1944; Hennige et al. 2008; Pal et al. 2012). Verschiedene Studien fanden erhöhte Fetuin-A Serumkonzentrationen bei metabolischen Erkrankungen wie Diabetes Mellitus oder der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (Ix et al. 2008; Ou et al. 2012). Auf struktureller Basis ist Fetuin-B eindeutig homolog zu Fetuin-A, wie durch eine gemeinsame Anordnung in drei Domänen (D1-3) gezeigt wird (Olivier et al. 2000).

Dietzel et al. (2013) zeigten erstmalig, dass Fetuin-B essenziell für eine erfolgreiche Befruchtung in Mäusen ist. Fetuin-B erwies sich im Tierexperiment als spezifischer Ovastacin-Inhibitor, einem Protein, welches die Verhärtung der Zona Pellucida nach Spermienbindung induziert. Die Zona Pellucida ist eine Hülle aus Glykoproteinen und umgibt die Eizelle. Knock out Mäuse ohne Fetuin-B waren aufgrund einer vorzeitigen Verhärtung der ZP unfruchtbar (Dietzel et al. 2013). Die Assoziation von Fetuin-B zur Eizellqualität im ART-Setting, zeigt in bisherigen Studien kontroverse Ergebnisse. Fang et al. (2019) fanden, sowohl im Serum als auch in der Follikelflüssigkeit, erniedrigte Fetuin-B Konzentrationen bei Patientinnen mit niedrigen Fertilisationsraten (< 30 %).

Eine weitere Studie stellte heraus, dass Frauen mit autoimmuner Thyreoiditis signifikant erniedrigte Fetuin-B Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit aufweisen.

Es wurde geschlussfolgert, dass die erniedrigten Fetuin-B Konzentrationen Grund für die niedrigen Fertilisationsraten seien (Zhang et al. 2022). Floehr et al. (2016) hingegen wiesen in ihrer Studie einen Anstieg der Fetuin-B Serumkonzentration bei erfolgreichen IVF-Zyklen nach. Ein IVF-Zyklus galt als erfolgreich, wenn mindestens eine Eizelle befruchtet werden konnte. Außerdem wurde eine annähernd gleiche Fetuin-B Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit gemessen. Es wurde geschlussfolgert, dass ein freier Austausch von Fetuin-B zwischen Serum und Follikelflüssigkeit stattfindet. In vorherigen Messungen zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Trend zwischen hohen Fetuin-B Serumkonzentrationen und niedrigen Fertilisationsraten im ART-Setting (Hangen et al. 2020).

In diversen kürzlich publizierten Forschungsarbeiten wurden hohe Fetuin-B Serumkonzentrationen mit metabolischen Dysbalancen assoziiert. Fetuin-B wird vermehrt bei Leberverfettung sezerniert und führt im zellbasierten in-vitro-Experiment zu einer Insulinresistenz, indem es die Insulinwirkung in Myotuben und Hepatozyten vermindert (Meex et al. 2015; Peter et al. 2018). El-Ashmawy & Ahmed (2019) zeigten in ihrer Studie, dass die Fetuin-B Serumkonzentration bei Patienten, die an T2DM und einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) erkrankt sind, höher als bei lebergesunden Patienten ist. Eine weitere Studie zeigte erhöhte Fetuin-B Serumkonzentrationen bei Frauen mit PCOS. Die Fetuin-B Serumkonzentration korrelierte hierbei signifikant mit dem HOMA-Index, welcher klinisch zur Abschätzung einer Insulinresistenz bestimmt wird. Zhu et al. (2017) fanden signifikant erhöhte Fetuin-B Serumkonzentrationen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK). KHK entsteht überwiegend durch Lipidablagerungen in der Gefäßwand, welche zu chronischen Inflammationen führen (Barton et al. 2007). Außerdem zeigte die Studie positive Korrelationen zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration zu der Cholesterin Serumkonzentration und dem Nüchternblutzucker (Zhu et al. 2017). In aktuell publizierten Studien wurden zudem mehrfach positive Korrelationen zwischen Fetuin-B und dem Akut-Phase-Protein CRP beobachtet (Meex et al. 2015; Qu et al. 2018).

3.4 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem dient sowohl der Abwehr von Krankheitserregern mit denen der Organismus in Berührung kommt als auch dem Erkennen eigener geschädigter Zellen und der Geweberegeneration (Bröker et al. 2019b). Es reagiert mit einer angeborenen und einer erworbenen oder adaptiven Immunantwort. Die Moleküle und die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort sind von Geburt an vorhanden. Dieses System ist schnell verfügbar und im Vergleich zur adaptiven Immunantwort unabhängig von einer sich verändernden Umgebung (Koenderman et al. 2014). Die Immunantwort des adaptiven Immunsystems hingegen folgt mit einer Latenzzeit von ein paar Tagen und reagiert auf Pathogene und andere Erkennungsproteine mit der Bildung spezifischer Antikörper (Rensing & Rippe 2013; Bröker et al. 2019a).

Auf zellulärer Ebene besteht das angeborene Immunsystem hauptsächlich aus den sogenannten Leukozyten. Zu dieser Gruppe gehören phagozytierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten und zytotoxische Zellen wie natürliche Killerzellen (Yakut 2013). Neutrophile Granulozyten werden vermehrt im Knochenmark bei Infektionen gebildet und in großer Zahl an den Infektionsherd rekrutiert (Bröker et al. 2019b). Natürliche Killerzellen sind hauptsächlich für die Erkennung und Beseitigung virusinfizierter Zellen und Tumorzellen verantwortlich (Bröker et al. 2019b). Monozyten sind die Vorläuferzellen von Makrophagen. Sie werden im Knochenmark gebildet und gelangen dann in den Blutkreislauf. Von da aus erreichen sie die Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren und ihre Funktionen erfüllen (Van Furth 1982). Makrophagen räumen avitale Zellen ab und erkennen eingedrungene Infektionserreger meist als eine der ersten Immunzellen (Bröker et al. 2019b). Makrophagen erkennen verschiedene Strukturen über keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptor, PRR). Diese befinden sich in der Regel außen an der Zellmembran oder im Zellplasma (Agostini et al. 2004). PRRs erkennen zwei verschiedene Muster: Schaden-assoziierte molekulare Muster (damage-associated molecular pattern, DAMP) und Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern, PAMP). DAMPs werden durch endogenen Stress induziert und entstehen bei einer sterilen Inflammation. PAMPs stammen von eindringenden Pathogene (Kumar et al. 2011).

Die Erkennung von PAMPs oder DAMPs durch PRRs führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, was zur Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokine führt, die für Immunreaktionen wichtig sind (Chen & Nunez 2010). Einer dieser Signalwege ist die Aktivierung des Inflammasoms.

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems und wichtig für die Immunreaktion. Zu den bekanntesten Zytokingruppen gehören Interleukine (IL), Interferone (IFN) Chemokine und der Tumornekrosefaktor (TNF) (Dinarello 2000). Das proinflammatorische Zytokin IL-6 induziert unter anderem die Genexpression des Akute-Phase-Proteins CRP (Szalai et al. 1998). CRP wird hauptsächlich in der Leber als Reaktion auf inflammatorische Prozesse oder Infekte produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr (Marnell et al. 2005).

Es ist bekannt, dass diverse Organe und Gewebe, wie zum Beispiel die Leber oder die Muskulatur, spezifische Zytokine sezernieren und so mit anderen Organen kommunizieren (Raschke et al. 2013; Meex et al. 2015).

Zytokine sind unter anderem auch im abnormalem Glukose- und Lipidmetabolismus involviert und können den metabolischen Haushalt beeinflussen (Minokoshi et al. 2002; Shi et al. 2019).

3.5 Inflammasome

Inflammasome sind intrazelluläre Proteinkomplexe, die zum angeborenen Immunsystem gehören und wichtige Signalfaktoren darstellen (Martinon et al. 2002). Sie bestehen aus einem PRR, einem Adapterprotein (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD, ASC) und einer Caspase 1 (Dinarello, 2009). Inflammasome vermitteln in ihrer aktivierten Form die Ausschüttung der Zytokine IL-1ß und IL-18 (Ganz 2015). Dabei führt die Inflammasomaktivierung zunächst zur Aktivierung der Caspase 1. Diese spaltet die biologisch inaktive Form der Interleukine (IL) pro-IL-1ß und pro-IL-18 proteolytisch in ihre biologisch aktive Form IL-1ß und IL-18. IL-1ß und IL-18 rekrutieren weitere Immunzellen, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten und verursachen einen inflammatorischen Zelltod (Pyroptose) (Latz et al. 2013). Fehlregulationen und Mutationen in Inflammasomen sind mit Autoimmunerkrankungen assoziiert (Agostini et al. 2004; Duncan & Canna 2018).

Inflammasome spielen eine wichtige Rolle in der Induktion steriler Inflammationen (Iyer et al. 2009). Metabolische DAMPs, wie Fettsäuren, aktivieren PRRs und führen zu einer länger andauernden systemischen Inflammation mit niedriger Intensität (Kopp et al. 2009). Sterile Inflammationen werden durch das Vorhandensein mäßig erhöhter Entzündungsparametern auch low-grade Inflammation genannt (Friedrichsen 2018).

Inflammasomkomplexe werden jeweils nach ihrem spezifischen Sensormolekül (PRR) benannt (Chen & Nuñez 2010). Mittlerweile sind verschiedene Rezeptorfamilien identifiziert und untersucht worden. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf NOD-like-Rezeptoren (NLR), insbesondere NLRP2 (NLR Family Pyrin Domain Containing 2) -, NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3) -, NLRC4 (NLR Family CARD Domain Containing 4) -, und auf den AIM2 (Absent In Melanoma 2) -Rezeptoren, welche sich jeweils im Zytoplasma befinden (Martinon et al. 2002; Chen & Nuñez 2010). Im Folgenden wird der aktuelle Forschungsstand zu den oben genannten Inflammasomen erläutert.

Die Aktivierung des NLRP2 Inflammasoms supprimiert proinflammatorische Signalkaskaden, indem es die Inhibition des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor κB (nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-kB) induziert (Tilburgs et al. 2017). NF-kB spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort (Fontalba et al. 2007). NLRP3 ist das bislang am besten charakterisierte Inflammasom (De Nardo & Latz 2011). In-vitro-Studien haben gezeigt, dass für die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms in Makrophagen zwei getrennte Signale erforderlich sind (Bauernfeind et al. 2009). Zunächst erfolgt das sogenannte Priming, welches essenziell für die Aktivierung von NLRP3 ist. Es induziert eine NF-kB abhängige Transkription von pro-IL-1ß und NLRP3 (Mariathasan et al. 2006; Bauernfeind et al. 2009). Das zweite Signal erfolgt durch Stimuli, wie Adenosintriphosphat (ATP), Kaliumausstrom und bakterielle Toxine, die spezifisch zur NLRP3- und Caspase 1-Aktivierung führen (Sutterwala et al. 2014; Kelley et al. 2019). Das Low Density Lipoprotein-Cholesterin (LDL-Cholesterin), welches bei Adipositas erhöht ist, führt in vivo zum Priming bei Makrophagen (Shi et al. 2006; De Nardo & Latz 2011). Weiter zeigten Vandanmagsar et al. (2011) das Kalorienrestriktion und Sport bei Patienten mit Diabetes Mellitus zu einer niedrigeren NLRP3-Expression im Fettgewebe und weniger Inflammation führt.

Sie fanden dabei heraus, dass das NLRP3-Inflammasom den mit der Lipotoxizität verbundenen Anstieg des intrazellulären Ceramids wahrnimmt, um die Spaltung von Caspase-1 in Makrophagen und im Fettgewebe zu induzieren. Daraus wurde geschlussfolgert, dass das NLRP3 Inflammasom mit Adipositas verbundene Gefahrensignale wahrnimmt, eine Inflammation verursacht und zur Entstehung einer Insulinresistenz beiträgt (Vandanmagsar et al. 2011). Frauen, die an Endometriose erkrankt sind, zeigen eine höhere NLRP3- und Interleukin-Expression in der Follikelflüssigkeit (Fonseca et al. 2023). Ein experimentell induziertes PCOS in Mäusen führt ebenso zu einer höheren ovariellen NLRP3-Expression und einer starken Expressionserhöhung fibrotischer Faktoren (Wang et al. 2020). Es wurde angenommen, dass die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms eine Reihe von Pathologien, einschließlich einer follikulären Dysfunktion und einer ovariellen Fibrose, verursacht. Navarro-Pando et al. (2021) beobachteten außerdem eine erhöhte ovarielle NLRP3-Expression im Alter. Daraus folgerten sie, einen Zusammenhang von Inflammation und Eizellreifung und dass eine Inflammation im Ovar zu einem vorzeitigen Altern der Eizellen führen könnte. Die NLRC4-Expression wird durch proinflammatorische Signalstoffe wie dem Tumornekrosefaktor-alfa (TNF-α) hochreguliert (Gutierrez et al. 2004). Bakterielle Infektionen durch Salmonella typhimurium und enteropathogene Escherichia coli (Pathogenic Escherichia coli, EPEC) führen laut Franchi et al. (2012) zur NLRC4-Aktivierung und suggerieren eine wichtige Rolle des NLRC4 Inflammasoms für die Abwehr enterischer Krankheitserreger. Die NLRP3- und NLRC4-Expression bei Menschen mit Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose ist laut aktuellem Forschungsstand höher als die bei gesunden Menschen. Auch reagieren die Monozyten autoimmunerkrankter Menschen in vitro mit einer statistisch höheren Inflammasom-Expression auf Auslöser. Es wird angenommen, dass diese stark erhöhte Immunantwort aufgrund einer Dysregulation des Inflammasoms bei Autoimmunerkrankungen entsteht (Addobbati et al. 2018; Soares et al. 2019). AIM2 ist ein zytoplasmatischer Sensor, der bei Erkennung bakterieller oder viraler doppelsträngiger DNA (dsDNA), die Aktivierung des Inflammasoms induziert (Muruve et al. 2008). Eine Studie zeigte außerdem, dass das Vorliegen einer Steatohepatitis eine AIM2-Aktivierung auslöst (Csak et al. 2014).

Die Akkumulation eigener dsDNA im Zytosol, beispielsweise durch den Zelltod benachbarter Zellen, kann ebenso zur Aktivierung des AIM2 Inflammasoms führen, weshalb AIM2 auch eine wichtige Rolle in der Entstehung autoimmuner Erkrankungen spielt (Dombrowski et al. 2011).

3.6 Zusammenhang metabolischer Dysbalance und systemischer Inflammation

Im Rahmen einer Inflammation detektiert das Immunsystem Pathogene oder eigene geschädigte Zellen und induziert eine Immunantwort (Bröker et al. 2019b). Inflammatorische Prozesse sind dabei auf die Unterstützung des Stoffwechsels angewiesen, wobei die Umverteilung von Energie, insbesondere die Mobilisierung gespeicherter Lipide, eine wichtige Rolle spielt (Khovidhunkit et al. 2004). Die Energieumverteilung gespeicherter Lipide wird unter anderem über inflammatorische Signalwege gesteuert wie TNF alfa (Feingold et al. 1989).

In jüngsten Studien gibt es verschiedene Hinweise für eine interdependente Assoziation von metabolischer Dysbalance und low-grade Inflammation (Donath & Shoelson 2011; Pereira & Alvarez-Leite 2014).

Eine Ursache für diesen Zusammenhang ist viszerales Fettgewebe, welches insbesondere bei übergewichtigen Menschen vermehrt vorhanden und mit Stoffwechselstörungen assoziiert ist (de Heredia et al. 2012). Viszerales Fettgewebe befindet sich in der freien Bauchhöhle und ist stoffwechselaktiv, indem es eine Reihe an Botenstoffen, unter anderem Adipokine und Zytokine, sezerniert (Nishimura et al. 2009). Die meisten Adipokine sind entzündungsfördernd und werden von eingewanderten Entzündungszellen wie Makrophagen produziert (Kershaw & Flier 2004; Berg & Scherer 2005). Das Adipokin Leptin beispielsweise reguliert die Immunfunktion auf verschiedenen Wegen, indem es unter anderem die Monozytenstimulation und -differenzierung in Makrophagen induziert (Martí et al. 2001). Die Anzahl von Makrophagen im Fettgewebe ist bei Adipositas deutlich erhöht und korreliert mit dem Körperfettanteil (Weisberg et al. 2003a). Makrophagen sind für den Großteil der Zytokin-Expression verantwortlich. Hierbei exprimieren sie hauptsächlich die Botenstoffe Tumornekrosefaktor-alfa (TNF-alfa) und das Interleukin-6 (IL-6) (Weisberg et al. 2003b). Es ist bekannt, dass einige dieser Zytokine die Insulinwirkung reduzieren und somit zur Entwicklung einer Insulinresistenz beitragen können (Li et al. 2015).

Die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Monozyten-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) stören hierbei nachweislich die Insulinsignalübertragung in Fett-, Leber- und Muskelzellen (Kolb & Mandrup-Poulsen 2005; Sell et al. 2006).

Ein weiterer erforschter Zusammenhang zwischen metabolischer Dysbalance und low-grade Inflammation zeigt sich bei Vorhandensein einer gestörten Glukosetoleranz im Rahmen eines beginnenden T2DM. Pickup et al. (1997) postulierten als eine der ersten Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen T2DM und low-grade Inflammation. Heutzutage wird eine low-grade Inflammation als prädiktiver Marker für das Entstehen eines T2DM diskutiert (Spranger et al. 2003). Im Rahmen der KORA-Studie S4 (1999/2001) wurde gezeigt, dass Konzentrationen von zirkulierenden Akut-Phase-Proteinen wie CRP signifikant mit den Serumkonzentrationen von IL-6 korrelieren und bereits bei einer gestörten Glukosetoleranz erhöht sind (Herder et al. 2005; Klüppelholz et al. 2015). Festa et al. (2000) fanden zudem chronisch erhöhte Inflammationsparameter bei einer Gruppe von Nicht-Diabetikern mit Insulinresistenz. Weiter stellten Aboeldalyl et al. (2021) in ihrer Meta-Analyse signifikant erhöhte Serumkonzentrationen des Entzündungswertes C-reaktives Protein (CRP) bei PCOS-Patientinnen fest, die unabhängig vom BMI waren. Für chronische Inflammationen, die durch Übergewicht oder metabolische Dysbalancen ausgelöst werden, wurde der Begriff Metainflammation eingeführt (Kitamura et al. 2013).

3.7 Zusammenhang zwischen metabolischer Dysbalance, Inflammation und der Eizellqualität

Ordnungsgemäße Inflammationsabläufe sind für die Eizellqualität der Frau essenziell, da das Ovar im Rahmen der zyklischen Follikel- und Eizellreifung ständigen Umbauprozessen unterliegt, begleitet von inflammatorischen Prozessen (Espey 1980). Bei der Ovulation sind beispielsweise inflammatorische Prozesse im Rahmen der physiologischen Follikelruptur beteiligt. Es wird vermutet, dass Zytokine an diesen periovulatorischen zellulären Interaktionen beteiligt sind (Büscher et al. 1999). Eine regelrechte Immunreaktion ist vermutlich für eine hohe Eizellqualität relevant (Boots & Jungheim 2015).

Diverse Studien weisen darauf hin, dass metabolische Dysbalance und systemische Inflammationszustände das Ovar und die Eizellqualität der Frau über verschiedene Mechanismen negativ beeinflussen können (Chieri et al. 1969; Skaznik-Wikiel et al. 2016).

Im Rahmen der Kinderwunschbehandlung wird der weibliche Zyklus exogen gesteuert und vorherige Zyklusstörungen, wie chronische Anovulationen, werden ausgeschaltet (Nugent et al. 2015). Metabolische Dysbalancen und damit verbundene low-grade Inflammationen bleiben jedoch vorhanden. Inflammatorische Prozesse können sich dabei auch auf das Ovar auswirken (Robker et al. 2011).

Die vermutlichen Ursachen für den Zusammenhang einer niedrigeren Eizellreifung im Rahmen von metabolischen Dysbalancen sind hierbei komplex.

Zum einen können Zytokine und Adipokine, die bei inflammatorischen Prozessen in den Blutkreislauf abgegeben werden, inflammatorische Antworten in verschiedenen Geweben, einschließlich dem Ovar, induzieren und die Eizellqualität beeinflussen (Sarapik et al. 2012).

Ein anderer Pathomechanismus sind hormonelle Störungen der Hypophysen-Hypothalamus-Achse, welche durch metabolischen Stress, wie beispielsweise beim T2DM oder bei einer Magersucht (Anorexia nervosa, AN), aber auch durch akute Inflammationen verursacht werden können (Castellano et al. 2009; Codner & Cassorla 2009). Durch das hormonelle Ungleichgewicht von LH und FSH resultieren Zyklusstörungen mit gestörter endokriner Ovarialfunktion und defekter Eizellreifung und Sterilität (Ma et al. 2004).

Eine weitere Ursache ist das Vorliegen einer Insulinresistenz. Insulin ist ein wichtiger Regulator der Hypophysen-Hypothalamus-Achse (Burcelin et al. 2003; Salvi et al. 2006). Es hat außerdem einen gonadotropen Effekt und kann die Follikelreifung modulieren (Poretsky et al. 1999). Patientinnen, die an einer Insulinresistenz erkrankt sind, weisen kompensatorisch einen Insulinüberschuss im Blut auf (Hyperinsulinäme). Hohe Insulinkonzentrationen verkürzen den hypothalamischen GnRH-Takt und führen zu einer LH-Dominanz. Dies resultiert in einer Hyperandrogenämie durch ein Überwiegen der LH gesteuerten Theca interna Aktivität. Die Follikelreifung und somit der gesamte ovarielle Zyklus ist gestört (Codner et al. 2012). Wang et al. (2021) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Insulinresistenz und der Eizellqualität, indem sie bei einem Kollektiv von Frauen mit einem BMI < 25 kg/m^2 im IVF-Setting die Insulinresistenz bestimmten. Frauen mit Insulinresistenz wiesen einen signifikant geringeren prozentualen Anteil an reifen Eizellen auf als Frauen ohne Insulinresistenz. Aus diesen Ergebnissen folgerten sie, dass die Insulinresistenz mit der Eizellqualität zusammenhängen könnte. Auch wiesen im Tierexperiment an Diabetes mellitus erkrankte Mäuse Abnormalitäten im Follikelwachstum und eine schlechtere Eizellreifung auf (Chieri et al. 1969).

Es ist bekannt, dass Frauen, die vom PCOS betroffen sind, eine erhöhte Prävalenz für eine Insulinresistenz aufweisen (Dunaif 1997). Gleichzeitig geht das PCOS mit einer erhöhten Prävalenz für einen unerfüllten Kinderwunsch einher (Schmid et al. 2004). Ein Grund für die erhöhte Prävalenz der Sterilität ist die chronische Anovulation (Fica et al. 2008).

Als weitere Ursache werden chronische low-grade Inflammationen diskutiert, welche möglicherweise über metabolische Konstellationen mit Insulinresistenz beim PCOS induziert werden (Shorakae et al. 2015). Cakiroglu et al. (2016) wiesen nach, dass das PCOS auch unabhängig vom BMI mit erhöhten inflammatorischen Parametern und niedrigerem ART-Erfolg einhergeht. Marquard et al. (2011) fanden kleinere Eizellen bei Frauen mit PCOS im Gegensatz zu Frauen ohne PCOS im ART-Setting. Sie zeigten außerdem, dass die Anzahl an reifen Eizellen signifikant geringer bei schlanken Frauen mit PCOS ist als bei schlanken Frauen ohne PCOS war.

Bei verschiedenen gynäkologischen Erkrankungen sowie bei Adipositas kann es zudem zur Immuninfiltration kommen (Nteeba et al. 2014).

Die sogenannte pelvic disease oder Endometriose können chronische Inflammationen verursachen, welche zur ovariellen Immuninfiltration und Funktionsstörung führen (Symons et al. 2018; Zhao et al. 2020). Maheshwari et al. (2007) zeigten in ihrer Studie, dass Frauen mit einem BMI > 25 kg/m^2 im Vergleich zu Frauen mit einem BMI < 25 kg/m^2 eine niedrigere Schwangerschaftsrate nach ART-Behandlung aufwiesen.

Zuletzt kann oxidativer Stress zu Schäden an der nukleären DNA in Eizellen führen. Oxidativer Stress wird definiert als eine Störung des Gleichgewichts zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und der antioxidativen Abwehrkräfte (Betteridge 2000). ROS sind an der Modulation von physiologischen Fortpflanzungsfunktionen wie der Eizellreifung beteiligt und spielen eine Rolle bei der Befruchtung und der Embryonalentwicklung (Agarwal et al. 2005). Es wird vermutet, dass ROS am Prozess der ovariellen Alterung beteiligt sind und zum Altern der Eizellen und einer schlechteren Eizellqualität führen (Sasaki et al. 2019).

3.8 Einfluss des Gewichts auf die Eizellqualität der Frau

Die Frage, ob Über- oder Untergewicht bei Frauen im Allgemeinen zu einer geringeren Eizellqualität im ART-Setting führt, ist umstritten. Im Tierexperiment führte eine ernährungsbedingte Fettleibigkeit zu einer Erhöhung der Genexpression von Entzündungsmediatoren sowohl im Ovar als auch im umgebenden Fettdepot, welche womöglich die Funktion der Ovarien negativ beeinflussen (Nteeba et al. 2013). Bei übergewichtigen Frauen fanden sich beispielsweise stark erhöhte CRP-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit (Robker et al. 2009). In einem weiteren Tierexperiment fand man einen positiven Zusammenhang zwischen fettreicher Ernährung, einer abnormalen Ovarfunktion und einer erhöhten Makrophageninfiltration im Ovar bei Mäusen (Skaznik-Wikiel et al. 2016). Buyuk et al. (2017) zeigten, dass das Chemokin Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), welches Immunzellen wie Monozyten rekrutiert, sowohl im Serum als auch in der Follikelflüssigkeit von übergewichtigen Frauen deutlich erhöht und mit niedrigeren Schwangerschaftsraten assoziiert war. Kudesia et al. (2018) fanden im ART-Setting eine geringere Eizellzahl und weniger qualitativ hochwertige Embryonen aufgrund schlechterer Eizellreifung bei Frauen mit Übergewicht im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen.

Fedorcsak et al. (2004) fanden eine negative Korrelation zwischen dem BMI und der Eizellzahl und beobachteten zudem eine höhere kumulative Lebendgeburtenrate bei Frauen mit einem BMI < 25 kg/m^2 verglichen mit Frauen mit einem BMI > 30 kg/m^2. Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem BMI und der Embryoimplantationsrate oder der Schwangerschaftsrate gefunden. Rich-Edwards et al. (2002) fanden ein höheres relatives Risiko für Ovulationsstörungen sowohl bei übergewichtigen als auch bei untergewichtigen Frauen, wobei die Inzidenz von Übergewicht in ihrer Studie deutlich höher als die Inzidenz von Untergewicht war.

Eine aktuelle Meta-Analyse zeigt hingegen, dass es keinen signifikanten Einfluss auf die Embryoimplantation und Schwangerschaftsrate hat, wenn die Empfängerin einer Eizellspende im IVF-Setting übergewichtig (BMI > 30 kg/m^2) ist (Jungheim et al. 2013). In dieser Studie erfolgte die Gruppierung jedoch ausschließlich nach BMI und es wurden keine Vorerkrankungen oder inflammatorische Profile der Frauen erhoben. Bellver et al. (2010) zeigten in ihrer Studie, dass das Körpergewicht der Frau keinen Einfluss auf die Fertilisationsrate, die Anzahl transferierter Embryonen und die Embryonenqualität im ART-Setting hat. Die Schwangerschaftsraten jedoch waren signifikant niedriger bei Frauen mit Übergewicht. Ein Grund dafür könnte sein, dass eine begleitende Metainflammation auch die endometriale Funktion schädigt und die Embryoimplantation vermindert (Hill & Gilbert 2008). Zusammenfassend führt Übergewicht als alleiniger Parameter nicht zwingend zu einer herabgesetzten Eizellqualität. Komorbiditäten und Metainflammationen scheinen ein wichtiger Einflussfaktor zu sein.

4. Durchführung der Studie

Um den Zusammenhang zwischen metabolischen Dysbalancen, systemischen Inflammationen und der Eizellqualität im ART-Setting systematisch zu untersuchen, wurde eine klinische Studie konzipiert und durchgeführt. Das Ziel dieser Studie war, den korrelativen Zusammenhang verschiedener metabolisch-inflammatorischer Parameter, darunter Fetuin-B, und den beiden Fertilitätsparametern Fertilisationsrate und Eizellreifung, zu untersuchen. Mittels venöser Blutentnahme wurde den Patientinnen zu zwei Zeitpunkten im Behandlungszeitraum vier Röhrchen Blut entnommen (Abbildung 1). Die Expression der Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA) der Inflammasome NLRP2, NLRP3, NLRC4 und AIM2 wurde zur Bestimmung des molekularen Immunstatus bestimmt. Die Messungen erfolgten mittels quantitativer Echtzeit-PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, rt-qPCR) im Neurologie Labor des UKA und werden in Kapitel 4.4 ausführlich beschrieben.

Die Fetuin-B Serumkonzentrationen wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) im Neurologie Labor des UKA ermittelt (siehe Kapitel 4.5). Die Messung ausgewählter zellulärer inflammatorischer und metabolischer Parameter erfolgte im Zentrallabor des UKA (siehe Kapitel 4.6). Die Eizellreifung und die Fertilisationsrate nach Insemination im ICSI- oder IVF-Verfahren dienten als Surrogatparameter der weiblichen Fertilität. Die Daten wurden im IVF-Labor des UKA erhoben (siehe Kapitel 4.7).

Die erhobenen Messdaten werden in Kapitel 5 im korrelativen Zusammenhang betrachtet.

4.1 Kollektiv

In diese Studie wurden n = 56 Patientinnen im Zeitraum von 01.07.2019 bis 01.04.2020 eingeschlossen. Die Patientinnen kamen zur Kinderwunschbehandlung bei unerfülltem Kinderwunsch in die Frauenklinik für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin des UKA. Das Alter der Patientinnen betrug im Mittel 33 Jahre (25 - 40 Jahre). Es wurden ausschließlich Frauen nach Einwilligung in die Studie eingeschlossen. Onkologische Patientinnen wurden nicht eingeschlossen. Schwerwiegende Erkrankungen und akute Infektionen, die eine Kontraindikation für eine Schwangerschaft darstellen würden, wurden im Kollektiv bei Voruntersuchungen ausgeschlossen. Der Studie liegt ein Votum der Ethik-Kommission der RWTH Aachen zugrunde (EK201/14).

4.2 Ablauf der Kinderwunschbehandlung

In dieser Studie erhielten 14 Patientinnen einen GnRH-Agonisten und 42 Patientinnen einen GnRH-Antagonisten zur Downregulation. Im Mittel erhielten die Patientinnen im Anschluss 11,4 Tage (8 - 15 Tage) exogenes FSH zur täglichen subkutanen Applikation. Im Kollektiv wurde dafür rekombinantes (Follitropin alfa) und urinäres FSH (Urofollitropin) verwendet. Die kumulative FSH Dosierung lag im Mittel bei 2757 IE. Zur Ovulationsinduktion erhielten 29 Frauen hCG (Handelsname Brevactid). Von den 29 Frauen erhielten sieben Frauen eine Dosis von 5.000 IE und 22 Frauen eine Dosis von 10.000 IE. 19 Frauen erhielten eine zweimalige Gabe des GnRH-Agonisten Triptorelin (Handelsname Decapeptyl) mit einer Dosierung von 0,1 mg / 1 ml. Vier Frauen erhielten ein rekombinantes hCG (Ovitrelle) als einmalige Injektion mit einer Dosierung von 250 µg. Vier weitere Frauen erhielten eine Kombination aus GnRH-Agonisten und hCG.

4.3 Datenerhebung

Bei jeder Patientin wurde zu zwei Zeitpunkten im Behandlungszeitraum Blut entnommen: t1) Zwei Tage vor medikamentöser Ovulationsinduktion (OI), t2) am Tag des Embryotransfers, 6,5 Tage nach t1.

Die Messzeitpunkte werden in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

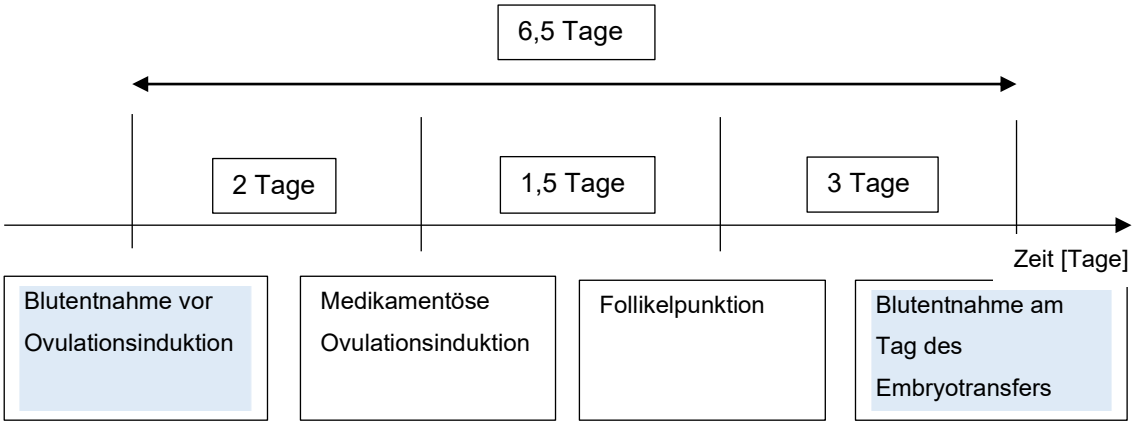


Abb. 1: Graphische Darstellung der Blutentnahmezeitpunkte.

Pro Blutentnahme wurden je zwei Serum- und zwei Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Vollblutröhrchen entnommen. Die Blutentnahme erfolgte ausschließlich nüchtern. Die Messung von inflammatorischen und metabolischen Parametern im Zentrallabor des UKA erfolgte am Tag der Entnahme. Für die anschließenden ELISA- und PCR-Messungen wurde je ein Serum- und ein Vollblutröhrchen bei -80°C aufbewahrt. Da die Inflammasomdaten ausschließlich bei 47 Patientinnen erhoben wurden, beträgt die Stichprobengröße dort n_2 = 47.

Zu Beginn wurde außerdem im Rahmen einer kurzen Anamnese das Körpergewicht und die Körpergröße der Patientinnen erhoben.

4.4 Messung der mRNA-Expression der Inflammasome mittels rt-qPCR

4.4.1 Hintergrundwissen zur PCR-Methode

Die Polymerasekettenreaktion wurde in den 1980er Jahren entwickelt und dient der in vitro Vervielfältigung spezifischer Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid, DNA) - Abschnitte. Die Vervielfältigung der DNA nennt man Amplifikation. Die spezifischen DNA-Abschnitte, die vervielfältigt werden, nennt man Amplikone (Mullis 1990). Der PCR-Ablauf kann in drei Schritte eingeteilt werden. Die Reaktion besteht aus mehreren Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Im ersten Schritt wird doppelsträngige DNA (dsDNA) bei Temperaturen über 90 °C aufgetrennt. Der zweite Schritt wird Annealing genannt. Unter Annealing versteht man das Anlagern von Oligonukleotid-Einzelsträngen an die entsprechenden Stellen der denaturierten einzelsträngigen Ziel-DNA bei 50 – 60 °C (Müller & Prange 2016). Diese Oligonukleotid-Einzelstränge sind spezifisch und heißen Primer. Die optimale Annealing-Temperatur wird für jeden Primer bestimmt, um Messfehler zu minimieren (Müller & Prange 2016). Die Oligonukleotid-Einzelstränge werden im dritten Schritt von der DNA-Polymerase verlängert, indem die Polymerase komplementär zur Matrizen-DNA DNA-Doppelstränge ausbildet. Der letzte Schritt erfolgt bei Temperaturen von 70 – 78 °C (Mackay 2004).

Bei der Endpunkt PCR erfolgt der Nachweis der gebildeten PCR-Produkte (Amplifikate) anhand ihrer Größe einmalig nach der eigentlichen PCR-Reaktion mittels Gelelektrophorese (Brandl 2006). Eine Quantifizierung erfolgt nicht.

4.4.2 Vorbereitung und Durchführung der rt-qPCR

Die real time-quantitative PCR (rt-qPCR) liefert mithilfe fluoreszierender dsDNA-Farbstoffe eine sehr genaue und reproduzierbare Quantifizierung der Genkopien (Heid et al. 1996). Die Fluoreszenzmessung erfolgt bei jedem Zyklus in Echtzeit und ist proportional zur Menge der vorhandenen Amplifikate (Karge et al. 1998). Die Daten werden somit zeitgleich während des gesamten PCR-Prozesses erfasst und nicht einmalig, wie bei der Endpunkt PCR (Kearns et al. 1999). Der Vorteil ist, dass Reaktionen anhand des Zeitpunkts, bei dem die Amplifikation eines Ziels erstmals erkannt wird, erfasst werden (Biosystems o.D.). Die rt-qPCR erfordert außerdem keine weitere Probenbearbeitung nach der PCR, wodurch

eine mögliche Kontamination von PCR-Produkten verhindert wird und Assays mit höherem Durchsatz durchgeführt werden können (Heid et al. 1996).

Im Folgenden werden die Abläufe der Messungen in einer Kurzfassung dargestellt. Für eine ausführliche Version wird auf Bodewig (2023) verwiesen.

Am Tag der Blutentnahme wird das EDTA-Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Zellmaterial bleibt über. Es erfolgt die Zugabe von 0,25 ml peqGOLD TriFast (Trizol), was zur Zelllyse führt. Das lysierte Blut wird anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

Die EDTA-Röhrchen werden zwei Tage vor Messbeginn aufgetaut. Als erster Schritt folgt die Isolierung der Ribonukleinsäuren (ribonucleic acid, RNA) durch Phenol-Chloroform Extraktion mittels Zugabe von peqGOLD TriFast. Es wird eine RNA Quantifizierung mittels einer Spektrophotometrie durchgeführt (Nanodrop 1000, PeqLap, Deutschland). Die RNA Quantifizierung dient der Messung der RNA Konzentration, um die weiteren Schritte anzupassen. Es folgt die reverse Transkription der mRNA zu komplementärerer DNA (complementary DNA, cDNA) mittels MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) - reverse Transkriptase. Grund für die Transkription ist, dass die cDNA für die nachfolgende Messung stabiler als RNA ist und die verwendeten Polymerasen DNA-abhängig sind.

Im Anschluss wird eine semi-quantitative PCR zur Überprüfung der cDNA durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte der cDNA werden mittels Elektrophorese auf Agarose Gel verifiziert und mit dem Farbstoff Midori Green gefärbt. Der cDNA-Gehalt wird anschließend mit einem Photometer gemessen. Durch die erste Messung wird die Ziel-cDNA quantifiziert, bevor man die aufwendigere rt-qPCR im Anschluss durchführt.

Bei der real-time quantitativen PCR wird die cDNA mit einem genspezifischen Primer amplifiziert. Die Primer sind in Tabelle 2 mit ihrer spezifischen Annealing Temperatur aufgelistet. Die Primer wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Es erfolgt die Zugabe des Mastermix nach Anleitung des Herstellers:

2 µL reversed-transcribed cDNA,

2 µL RNAse-free water (Invitrogen, Germany),

5 µL 2×SensiMix SYBR & Fluorescein (Bioline, Germany),

0.5 µL primers (10 pmol/µL).

Die Proben werden auf einer 96-Well-Platte aufgebracht. Die Messung erfolgt mit dem Thermocycler MyIQ RealTime-qPCR (Biorad). Es werden stets zwei Platten für einen Primer verwendet. Zum Nachweis der Amplifikate, welche sich im Lauf der PCR-Zyklen anreichern, wird der Farbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA (Morrison et al. 1998). Bei diesem Verfahren werden somit nicht nur die Zielsequenz, sondern auch unspezifische Reaktionsprodukte gebunden, weshalb die Reaktion gut optimiert sein muss. Nach abgelaufener PCR wird daher eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikate zu bestimmen (Ririe et al. 1997). Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen, indem bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur im PCR-Gefäß langsam erhöht wird. Bei der für das spezifische Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur wird der DNA-Doppelstrang wieder in zwei einzelsträngige Moleküle aufgetrennt. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und somit eine Fluoreszenzabnahme detektiert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische Amplifikate, ist eine Unterscheidung möglich und es können Verunreinigungen ausgeschlossen werden (Reed & Wittwer 2004; Schoiswohl o.D.).

4.4.3 Schwellenwertzyklus

Die Auswertung der rt-qPCR erfolgt anhand der Schwellenwertzyklenwerte (threshold cycle, CT). Der Ct-Wert wird als minimale Zyklusnummer definiert, bei der die Fluoreszenz den festgesetzten Schwellenwert überschreitet (Brandl 2006). Während der anfänglichen PCR-Zyklen verändert sich das Fluoreszenzsignal kaum. Dies definiert die Fluoreszenz-Baseline für die graphische Darstellung der Amplifikation. Ein festgesetzter Fluoreszenz-Schwellenwert kann oberhalb der Baseline festgelegt werden.

Ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz über die Baseline zeigt die Erkennung des angereicherten Amplifikats an. Ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz wird bei anfänglich hoher Kopienzahl des Nukleinsäureziels früher erfasst (Gibson et al. 1996). Das Konzept der Schwellenfluoreszenz ist die Grundlage einer genauen und reproduzierbaren Quantifizierung mit fluoreszenzbasierten PCR-Methoden. Er ist ein relatives Maß für die Konzentration des Ziels in der PCR-Reaktion. Neben der Konzentration des Ziels beeinflussen viele weitere Faktoren den Ct Wert (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016). Daher kann man PCR-Reaktionen, die unter unterschiedlichen Bedingungen laufen, nicht direkt vergleichen (Higuchi et al. 1993).

4.4.4 Relative Quantifizierung

Zur Normierung der Genexpression des Nukleinsäureziels erfolgt die Verrechnung der Rohdaten des PCR-Signals zunächst mit der delta-delta-CT-Methode, welche auch als Livak Methode bekannt ist. Diese Methode dient der relativen Quantifizierung der Zielgenexpression. Man benötigt dementsprechend keine Standardkurve wie bei einer absoluten Quantifizierung, sondern bezieht das PCR-Signal auf das Signal der Housekeeper (Livak & Schmittgen 2001). Housekeeper sind Gene, die in allen kernhaltigen Zelltypen vorhanden sind und essenziell für das Überleben der Zelle sind. Die mRNA-Genexpression dieser Gene gilt als stabil und auch während Experimenten unbeeinflussbar (Thellin et al. 1999; Pfaffl 2001). Zur Berechnung wird angenommen, dass die Amplifikationseffizienz des Zielgens und des Housekeeper-Gens gleich ist. In dieser Studie sind ß2-Mikroglobulin (ß2M), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), 18S ribosomale RNA (18 Svedberg rRNA) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (hHPRT) die Housekeeper.

Die Pfaffl Methode bietet eine weitere Optimierung zur Quantifizierung, indem sie zwei Modelle, u.a. auch die Livak Methode, kombiniert. Die bereits beschriebene Livak Methode ist ausschließlich anwendbar, wenn die Amplifikationseffizienz des Zielgens und der Housekeeper gleich ist. Die Pfaffl Methode berechnet das relative Expressionsverhältnis auf Basis der PCR-Effizienz und Kreuzungspunktabweichung der untersuchten Transkripte und bietet dadurch minimale Fehlerquoten und zuverlässigere Ergebnisse (Pfaffl 2001).

4.4.5 Primer

Tabelle 2 stellt eine Auflistung der Primer dar, die sowohl für die PCR als auch für die rt-qPCR verwendet wurden. Zusätzlich wird die spezifische Annealing Temperatur angegeben. Diese gibt die Temperatur an, bei welcher die Primer sich während der PCR an die spezifischen DNA-Abschnitte anlagern (Müller & Prange 2016).

Tab. 2: Auflistung verwendeter Primer mit zugehöriger Annealing Temperatur.

Bodewig (2023)

Primer	Sequenz	Annealing Temperatur
h ASC as	5`CATGTCGCGCAGCACGTTA 3`	60°C
h ASC s	5`CTTGGACCTCACCGACAA 3`	
h B2M as	5`AGCAAGCAAGCAGAATTTGGAA 3`	62 °C
h B2M s	5`TGGGATCGAGACATGTAAGCAG 3`	
h GAPDH as	5`AGCTTCCCCTTCTCAGCCTT 3`	60°C
h GAPDH s	5`TGGTCACCAGGGCTGCTTTT 3`	
h IL 1 β as	5`CTTCGAGGCACAAGGCACAA 3`	60°C
h IL 1 β s	5`TCCACTGGCGAGCTCAGGTA 3`	
h NLRP3 as	5`GCAGCAAACTGGAAAGGAAG 3`	60°C
h NLRP3 s	5`CTTCTCTGATGAGGCCCAAG 3`	
h 18s as	5`CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3`	60°C
h 18s s	5`GTAACCCGTTGAACCCCATT 3`	
h Caspase 1 as	5`TCTTCACTTCCTGCCCACAG 3`	63°C
h Caspase 1 s	5`TTGAGCAGCCAGATGGTAGAG 3`	
h AIM 2 as	5`GACACTTCTGGACGGCTTCA 3`	60°C
h AIM 2 s	5`TGTGGCTGCTAGTAGTGAGAACC 3`	
h NLRC4 as	5`AGGGCTCGGCTATTGTCCTTT 3`	60°C
h NLRC4 s	5`TGTGACCTTGCCCAGAACCC 3`	
h NLRP2 as	5`TCCCCCACAAGGAGATGGCG 3`	60°C
h NLRP2 s	5`AGAGGTGGTCGTTCTTTCCGT 3`	
h HPRT as	5`AGACGTTCAGTCCTGTCCAT 3`	60°C
h HPRT s	5`CCTGGCGTVGTGATTAGTA 3`	

4.5 Proteinbestimmung mittels ELISA-Verfahren

Der Enyzme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur quantitativen Messung (Clark et al. 1986). Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers und wird im Folgenden erläutert (BioVendor GmbH 2014).

Im ersten Schritt werden die Standardlösungen durch sukzessive Verdünnung einer Stammlösung gewonnen. Die Stammlösung basiert auf dem rekombinanten Protein Human Embryonic Kidney Cells 293 (HEK293). Die höchste Konzentration liegt bei 4 ng/ml und wird bis auf 0,125 ng/ml verdünnt. Die Proben werden gemäß Anleitung im Verhältnis 1:2000 verdünnt. Im zweiten Schritt erfolgt die Auftragung der Standards und Proben auf 96-Wells-Mikrotiterplatten. In Abbildung 2 ist schematisch eine 96-Wells-Mikrotiterplatte dargestellt. Die Spalten 1-12 und die Zeilen A-H stellen jeweils die Streifenplatten dar. Die Auftragung der Standards in Spalte 1 und 2 ist gelb markiert. Der Blank ist mit „B“ markiert. Die schraffierten Felder stellen die unbekannten Proben eins bis 40 dar, dabei wird jede Probe auf zwei Wells pipettiert.

Die Mikrotiterplatten sind mit polyklonalem Anti-Fetuin B Antikörper beschichtet. Im dritten Schritt folgt eine Inkubation für eine Stunde bei 25 °C auf einem orbitalem Mikroplattenschüttler bei 300 U/min. In dieser Inkubationszeit bindet das Antigen aus dem Serum (Fetuin-B) spezifisch an die Antikörper auf der Platte. Die Wells werden anschließend im vierten Schritt mit einer Pufferlösung gefüllt, durch welche die nicht gebundenen Anteile des Serums entfernt werden. Dieser Waschschritt wird dreimal wiederholt. Im fünften Schritt wird eine Lösung mit Biotin markiertem Anti-Fetuin-B Antikörper auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Antikörper binden das bereits gebundene Fetuin-B. Es folgen die erneute Inkubation auf dem Mikroplattenschüttler und drei Waschschritte analog zu Schritt vier. Im sechsten Schritt wird Meerrettichperoxidase (Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate, HRP) als Immunkonjugat hinzugegeben und es erfolgt eine Inkubation von 30 Minuten und die letzten drei Waschschritte analog zu Schritt vier. Der gebundene Anteil des Antigens wird im siebten Schritt mittels Zugabe der Substratlösung TMB (Tetramethylbenzidin) detektiert. Es kommt zu einer Farbreaktion zwischen TMB und HRP. Die Reaktionslösung färbt sich blau an. Im letzten, achten Schritt erfolgt die Zugabe einer Stopplösung, um die Reaktion zu beenden. Es kommt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb.

Die optische Dichte/Absorption des gelben Endprodukts wird bei definierter Wellenlänge (450nm und 630nm als Referenz) mittels Photometrie gemessen.

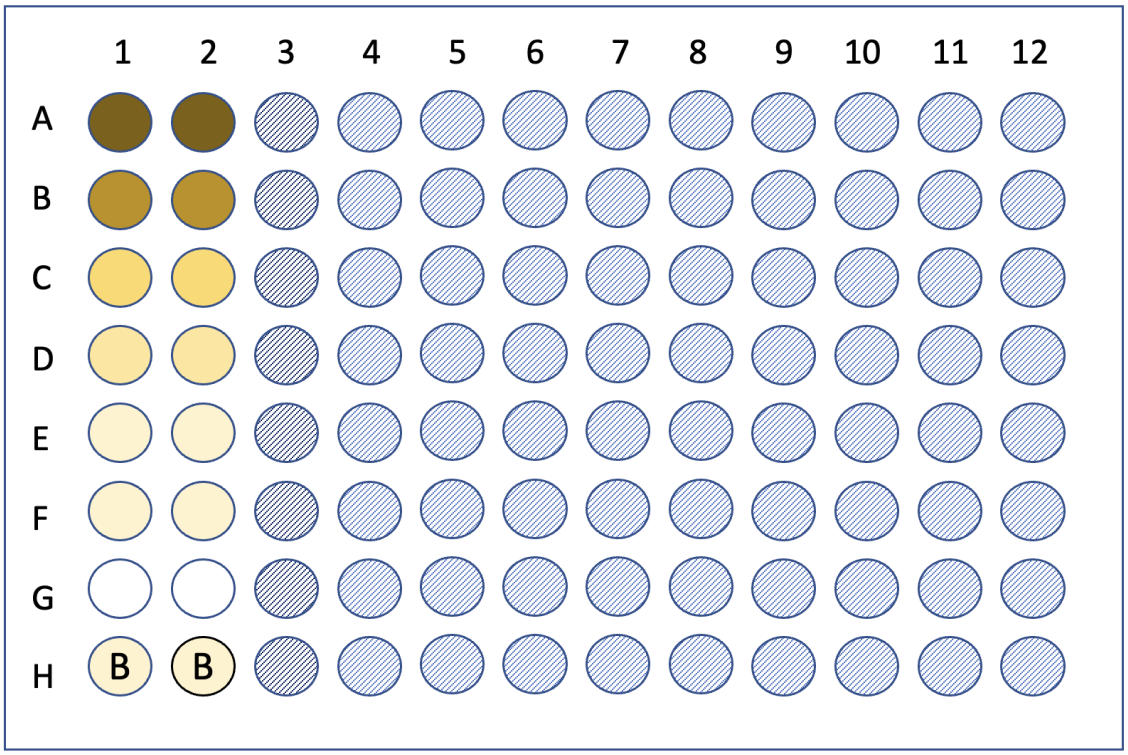


Abb. 2: Darstellung der 96-Wells-Mikrotiterplatte des ELISA-Kit inklusive Probenauftragung. In Spalte 1-2 werden die Standards, in Spalte 3-12 die unbekannten Proben pipettiert.

Zur Auswertung der unbekannten Proben wird eine Standardkurve erstellt. In Abbildung 3 wird diese dargestellt. Die Absorptionswerte der Fetuin-B Standards werden aus der Differenz von Messungen mit zwei Wellenlängen ermittelt. Die gefundenen Werte werden auf der Ordinate gegen die jeweilige Fetuin-B Konzentration auf der Abszisse in einer logarithmischen Skala aufgetragen. Im Experiment kann eine beliebige Absorption bestimmt werden, die zwischen den diskreten Werten der Standards liegt. Deshalb wird der Zusammenhang zwischen Absorption und der Fetuin-B Konzentration durch ein Polynom 4. Ordnung beschrieben, die durch die Methode der kleinsten quadratischen Abweichung gefunden wird (Albrecht 2022).

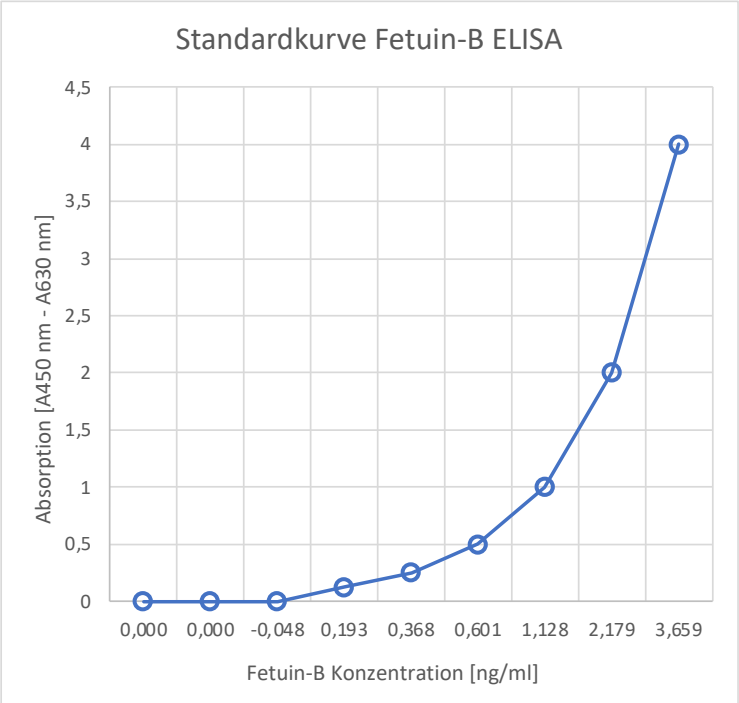


Abb. 3: Standardkurve des Fetuin-B ELISA.

Die Sensitivität, in diesem Fall die Nachweisgrenze, des verwendeten ELISA Kit beträgt 0,019 ng/ml (BioVendor GmbH 2014).

Die verwendeten Fetuin-B Antikörper sind spezifisch für humanes Fetuin-B ohne nachweisbare Kreuzreaktivitäten zu humanem Fetuin-A bei 100 µg/mL und humanem Cystatin C bei 10 µg/ml (BioVendor GmbH 2014).

Der Intra-Assay Variationskoeffizient des verwendeten ELISA-Kit beträgt laut Hersteller zwischen 2,18 % und 5,19 % (BioVendor GmbH 2014).

Der Inter-Assay Variationskoeffizient beträgt laut Hersteller zwischen 4,4 % und 6,09 % (BioVendor GmbH 2014).

4.6 Messung der zellulären inflammatorischen und metabolischen Parameter und Bestimmung des Hormonstatus

Zur Erhebung des zellulären Immunstatus wurde ein großes Blutbild inklusive eines Differentialblutbildes im Zentrallabor des UKA erhoben. Hierbei wurden Leukozyten und ihre verschiedenen Untergruppen, wie Lymphozyten und Monozyten, bestimmt (siehe Kapitel 3.4).

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Serumkonzentration der Inflammationsmarker CRP, IL-6, IL-10 und TNF-α (siehe Kapitel 3.4). Die Konzentration von IL-10 und TNF-alfa war im Kollektiv so niedrig, dass sie beim Großteil der Patientinnen im Labor unter dem niedrigsten detektierbaren Wert lag. Daher war keine Auswertung dieser beiden Werte möglich.

Der metabolische Status wurde anhand der Serumkonzentrationen von Triglyzeriden, Insulin, Glukose und Harnsäure bestimmt. Zur Gradeinteilung einer möglichen Insulinresistenz wurde der HOMA-Index bestimmt. Ab einem Cut-Off Wert von 2,5 wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Insulinresistenz angenommen (Matli 2020). In dieser Studie wiesen 20 Frauen einen HOMA-Index >2,5 auf.

Der BMI wurde zur Gradeinteilung des Übergewichts bestimmt. Er wurde als BMI = Gewicht / Größe^2, [BMI] = [kg/m^2] berechnet und lag im Kollektiv im Mittel bei 23,5 kg/m^2 [18,3 - 38,7 kg/m^2] (Volkert 2006).

Im Rahmen der Hormonstatuserhebung zur Überprüfung der Medikation wurden Östrogen, LH, Progesteron und ßHCG im Zentrallabor gemessen.

4.7 Beurteilung der weiblichen Fertilität

Zur Beurteilung der weiblichen Fertilität wurden in dieser Studie zwei Parameter aus der Reproduktionsmedizin bestimmt, die Eizellreifung und die Fertilisationsrate.

Die Eizellreifung wird nach der Eizellentnahme bestimmt und gibt die Anzahl der ausgereiften Eizellen in der Metaphase II (MII-EZ) im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der entnommenen Eizellen an. Sie ist ein Maß für die Eizellqualität, da ausschließlich regulär ausgereifte MII-Eizellen unmittelbar nach Eizellentnahme mittels in-vitro-Verfahren befruchtet werden können (Berendt 2007; Humeidan & Jank 2012).

Die Fertilisationsrate wird 16 - 18 Stunden nach Eizellbefruchtung (Insemination) bestimmt und gibt die Anzahl der Eizellen im PN-Stadium (PN-EZ) im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der entnommenen Eizellen an. Eizellen, welche das PN-Stadium erreichen, zeigen eine erfolgreiche Insemination und Entwicklung an. Qualitätskriterien sind unter anderem die Größe, Anzahl und Symmetrie der Vorkerne. Ordnungsgemäß entwickelte Eizellen weisen 2 Vorkerne auf und befinden sich nebeneinander im Zentrum der Eizelle (Greuner & Montag 2014).

Schwangerschaftsraten wurden nicht bestimmt, da der Fokus in dieser Studie auf der Präimplantationsphase und der Eizellqualität liegt.

4.8 Statistik

4.8.1 Statistische Methoden

Für jede Variable wurde jeweils das arithmetische Mittel ($\overline{\mathbf{mean}}$) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Die Standardabweichung dient als Maß für die Streuung der Daten (Collier & Collier 1921). Das arithmetische Mittel und die Standardabweichung sind im Ergebnisteil graphisch dargestellt (siehe Abbildung 4, 5)

4.8.2 Mittel der Statistik

Der Variationskoeffizient (coefficient of variation, CV) gibt das Verhältnis von der Standardabweichung zum Mittelwert aller Daten einer Stichprobe an (Kühlmeyer 1970). Er wird berechnet als $CV = SD / \overline{\mathbf{mean}}$. Die Angabe des CV erfolgt in Prozent (Kühlmeyer 1970). In dieser Arbeit erfolgte die Berechnung des CV, um die Reproduzierbarkeit der Fetuin-B Messergebnisse anzugeben. Der Intra-Assay Variationskoeffizient gibt die Reproduzierbarkeit zwischen den Wells innerhalb einer Platte an. So wird sichergestellt, dass die Ergebnisse einer Messung vergleichbar sind. Der Inter-Assay Variationskoeffizient gibt die Reproduzierbarkeit zwischen Messungen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt worden sind, an (Reed et al. 2002).

4.8.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Darstellung der Graphen werden im Ergebnisteil (siehe Kapitel 5) dargestellt. Sie erfolgten mittels der Statistiksoftware GraphPad Prism 8 (Version 8.4.0 (455), February 20, 2020).

Der größere Teil der Zusammenhangsbetrachtungen erfolgte wegen großer Streuung der Messdaten im Quartilsvergleich. In der Regel wurden zwei Gruppen, Q1 und Q4, miteinander verglichen. Ein kleinerer Teil der Zusammenhangsbetrachtungen erfolgte über Korrelationsanalysen, dabei wurden maximal zwei Variablen in Korrelation gesetzt (siehe Abbildung 6).

Die erhobenen Daten wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft (Shapiro & Wilk 1965). Der Shapiro-Wilk-Test besitzt eine hohe Teststärke bei kleinerem Stichprobenumfang und wurde daher gegenüber dem Kolmogorov-Smirnov-Test bevorzugt (Razali & Wah 2011).

Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden parametrische Tests angewandt. Bei dem Vergleich zweier unabhängiger Gruppen, beispielsweise im Quartilsvergleich, wurde der ungepaarte t-Test verwendet (Cleophas & Zwinderman 2016). Lag keine Normalverteilung vor, so wurden zur statistischen Auswertung ausschließlich nichtparametrische Tests verwendet. Der Wilcoxon matched-pairs signed rank test wurde verwendet, wenn die Messdaten derselben Gruppe zu zwei verschiedenen Zeitpunkten verglichen wurden (t1, t2) (Woolson 2007). Beim Vergleich zweier unabhängiger Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt (Nachar 2008). Für den Zusammenhang zwischen inflammatorischen und metabolischen Parametern wurden Korrelationsanalysen erstellt. Da die Parameter für die korrelativen Vergleiche nicht normalverteilt sind, wurde der Rangkorrelationskoeffizient Spearman‘s Rho (r) zur Beurteilung der Signifikanz der Zusammenhänge zwischen zwei Variablen genutzt (Hauke & Kossowski 2011). Die Interpretation der Effektstärke erfolgte anhand der Richtlinien einer aktuellen Meta-Analyse. Demnach spricht ein Rangkorrelationskoeffizient (r) von r = 0,15 für einen schwachen, 0,25 für einen mittleren und 0,35 für einen starken Zusammenhang (Gignac & Szodorai 2016). Zusätzlich erfolgte bei Korrelationsbetrachtungen eine Regressionsanalyse im Sinne einer linearen Regression mit Angabe des Bestimmtheitsmaß r^2 (Seber & Lee 2012).

Die Korrelations- und Regressionsanalysen sind im Ergebnisteil dargestellt (siehe Abbildung 6, 15). Ein zweiseitiger P-Wert von $p < 0,05$ wurde bei allen Tests als statistisch signifikant gewertet.

5. Ergebnisse

Die untenstehende Tabelle 3 stellt eine Gesamtübersicht der demographischen, klinischen und metabolischen Merkmale, sowie die Transkriptions-Level der Inflammasome des Studienkollektivs dar. Die erste Spalte stellt die gemessenen Variablen dar. „n“ repräsentiert die Anzahl der Messdaten. Die Messdaten werden in der dritten Spalte als arithmetisches Mittel ($\overline{\mathbf{mean}}$) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patientinnen liegt bei 33 Jahren mit einem durchschnittlichen BMI von 24,07 kg/m^2. Im Mittel liegt die Fertilisationsrate (PN-EZ/EZ gesamt) im Kollektiv bei 62,46 % und die Eizellreifung (MII-EZ/EZ gesamt) bei 75 %.

Die Inflammationsmarker und metabolischen Marker lagen im Durchschnitt an t1 im Normbereich sowie an t2 im leicht erhöhten Bereich. Der HOMA Index lag im Durchschnitt bei 2,57. Es zeigen sich insgesamt höhere Fetuin-B Werte an t2 als an t1. Die Inflammasom-Genexpression von Nlrp2 und 3 zeigt sich an t2 höher als an t1, wohingegen die Inflammasom-Genexpression von Nlrc4 an t2 niedriger ist und die von Aim2 unverändert bleibt.

Tab. 3: Übersicht klinischer und metabolischer Merkmale im Studienkollektiv.

Variable	**n**	$\overline{\mathbf{mean}}$ **± SD**
Alter [y]	56	*33,16 ± 4,13*
EZ [n]	56	*10,29 ± 7,53*
injizierte EZ [n]	56	*7,8 ± 6,17*
PN-EZ [n]	56	*5,14 ± 3,87*
Eizellreifung [%]	56	*75 ± 28*
Fertilisationsrate [%]	56	*62,46 ± 30,1*
Fetuin-B [ng/ml] (t1)	56	*3439,66 ± 999,11*
Fetuin-B [ng/ml] (t2)	54	*4184,20 ± 761,76*
Caspase-Genexpression - t1	29	*1,62 ± 1,45*
IL-1ß-Genexpression - t1	29	*0,59 ± 0,63*
Nlrp2-Genexpression - t1	47	*1,12 ± 1,41*

Nlrp3-Genexpression - t1	47	*1,26 ± 1,11*
Nlrc4-Genexpression - t1	47	*1,19 ± 1,02*
Aim2-Genexpression - t1	47	*1,34 ± 1,3*
Caspase-Genexpression - t2	29	*24,94 ± 34,29*
IL-1ß-Genexpression - t2	29	*1,21 ± 1,34*
Nlrp2-Genexpression - t2	47	*0,4 ± 0,49*
Nlrp3-Genexpression - t2	47	*0,86 ± 0,91*
Nlrc4-Genexpression - t2	47	*1,21 ± 1,54*
Aim2-Genexpression - t2	47	*2,02 ± 1,79*
Leukozyten [abs/nl] - t1	56	*8,15 ± 2,28*
Leukozyten [abs/nl] - t2	56	*9,11 ± 2,68*
Lymphozyten [abs/nl] - t1	56	*2,14 ± 0,61*
Lymphozyten [abs/nl] - t2	56	*2,26 ± 0,67*
Neutrophile [abs/nl] - t1	56	*5,26 ± 1,83*
Neutrophile [abs/nl] - t2	56	*5,99 ± 2,41*
Monozyten [abs/nl] - t1	56	*0,52 ± 0,14*
Monozyten [abs/nl] - t2	56	*0,64 ± 0,19*
CRP [mg/l] - t1	56	*2,53 ± 4,16*
CRP [mg/l] - t2	56	*7,32 ± 7,94*
IL-6 [pg/ml] - t1	56	*2,26 ± 1,93*
IL-6 [pg/ml] - t2	56	*4,08 ± 4,32*
IL-10 [pg/ml] - t1	56	*5,34 ± 1,62*
IL-10 [pg/ml] - t2	56	*5,19 ± 1,12*
TNF-alfa [ng/l] - t1	56	*6 ± 2,01*
TNF-alfa [ng/l] - t2	54	*6,08 ± 2,49*
Triglyzeride [mg/dl] - t1	56	*114,39 ± 45,01*
Glucose [mg/dl] - t1	56	*87,18 ± 9,27*

Harnsäure [mg/dl] - t1	55	*4,35 ± 1,02*
Insulin [mU/l] - t1	56	*11,53 ± 8,42*
HbA1c [%] - t1	55	*5,14 ± 0,19*
BMI [kg/m^2] - t1	56	*24,07 ± 4,57*
HOMA Index - t1	56	*2,57 ± 2,08*
ßHCG [U/l] - t1	56	*2,34 ± 2,01*
ßHCG [U/l] - t2	56	*38,46 ± 40,56*
Östrogen [ng/l] - t1	56	*2676,51 ± 1783,29*
Östrogen [ng/l] - t2	56	*1102,47 ± 1010,41*
LH [U/l] - t1	55	*2,3 ± 2,66*
LH [U/l] - t2	55	*0,63 ± 0,75*
Progesteron [ng/ml] - t1	56	*0,93 ± 0,86*
Progesteron [ng/ml] - t2	56	*62,92 ± 58,55*

5.1 Fetuin-B Serumkonzentration und Fertilitätsparameter

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Fetuin-B und der Eizellqualität darzustellen, werden im Folgenden die Fertilisationsrate und die Eizellreifung gegen die Fetuin-B Serumkonzentration aufgetragen. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen Fetuin-B und der Fertilisationsrate und Eizellqualität sind in der untenstehenden Tabelle 4 dargestellt. Der p-Wert und der Rangkorrelationskoeffizient Spearman's Rho (r) werden angegeben.

Tab. 4: Korrelation zwischen Fetuin-B und Fertilitätsparametern.

Parameter (n = 56)	**Fertilisationsrate [%]**		**Eizellreifung [%]**	
	p	*r*	*p*	*r*
Fetuin-B [ng/ml] – t1	*0.84*	*- 0.05*	*0.83*	*0.01*
Fetuin-B [ng/ml] – t2	*0.73*	*- 0.08*	*0.95*	*0.01*

Aufgrund des kleinen Kollektivs erfolgte die Auftragung der Fertilisationsrate und Eizellreifung im nächsten Schritt im Quartilsvergleich. Im Quartilsvergleich der Fertilitätsparameter mit der Fetuin-B Serumkonzentration an t1 und t2 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede oder Trends. Eine hohe Eizellqualität wurde in den folgenden Abbildungen mit der Farbe Grün markiert, eine niedrigere Eizellqualität mit der Farbe Rot.

Das Säulendiagramm in Abbildung 4 zeigt einen Quartilsvergleich zwischen der Eizellreifung und der Fetuin-B Serumkonzentration an t1. Statistisch lässt sich mittels Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied finden (p = 0.88).

Das Säulendiagramm in Abbildung 5 zeigt einen Quartilsvergleich zwischen der Fertilisationsrate und der Fetuin-B Serumkonzentrationen an t1. Statistisch lässt sich mittels ungepaartem t-Test kein signifikanter Unterschied finden (p = 0.84).

Im Quartilsvergleich der Fertilitätsparameter und der Fetuin-B Serumkonzentration an t2 liegt der zweiseitige p-Wert für die Eizellreifung bei p = 0.54 und für die Fertilisationsrate bei p = 0.76. Die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

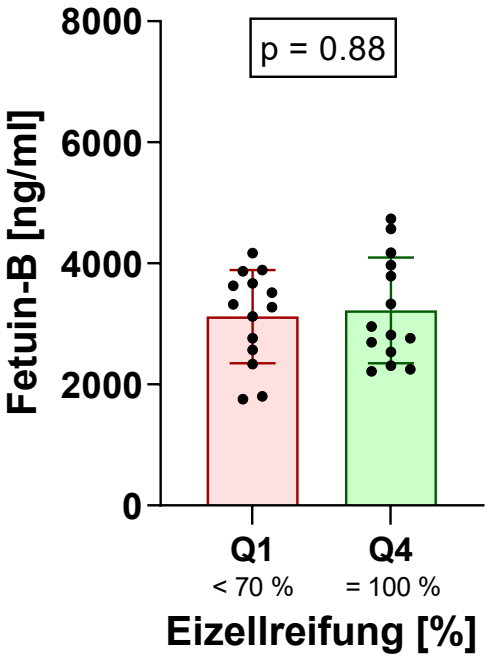


Abb. 4: Quartilsvergleich der Eizellreifung und der Fetuin-B Serumkonzentration an t1.

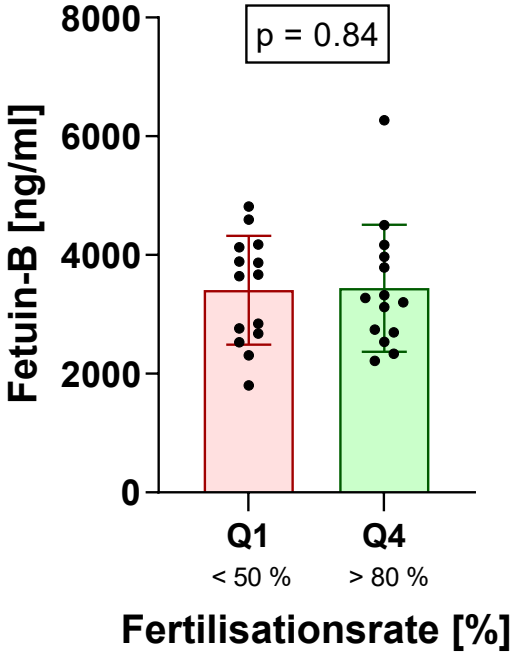


Abb. 5: Quartilsvergleich der Fertilisationsrate und der Fetuin-B Serumkonzentration an t1.

Die in Tabelle 5 präsentierten Ergebnisse zeigen einen Quartilsvergleich von Fetuin-B im Zusammenhang mit den Charakteristika der Studienteilnehmerinnen. Die erste Spalte stellt die erhobenen metabolischen und klinischen Variablen dar. Das erste und vierte Quartil der Messdaten werden jeweils in der dritten Spalte als $\overline{\mathbf{mean}} \pm$ SD dargestellt. Es werden die Daten zum Messzeitpunkt t1 dargestellt. Der p-Wert wurde bei gegebener Normalverteilung mittels ungepaartem t-Test berechnet. Bei Verletzung der Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Es zeigt sich, dass Frauen im obersten Quartil (Q4) für Fetuin-B signifikant höhere Werte in mehreren biologischen Markern aufweisen. Insbesondere ist zu beobachten, dass Frauen mit hohem Fetuin-B (Q4) eine signifikant höhere Anzahl an Eizellen aufweisen. Dies betrifft sowohl die Gesamtzahl der Eizellen als auch die Anzahl der injizierten Eizellen und der Eizellen im PN-Stadium. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass diese Frauen erhöhte Werte für CRP, Triglyceride und NLRP3-Expression haben. Auch der HOMA-Index war in dieser Gruppe signifikant höher.

Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Eizellzahl ergibt sich ein negativer Trend ($p = 0.057$, $r = -0{,}26$).

Tab. 5: Charakteristika der Studienteilnehmerinnen entsprechend der Fetuin-B Serumkonzentration im Quartilsvergleich zum Messzeitpunkt t1.

	Fetuin-B Quartile [ng/ml]		
Variable	**1. Quartil (n = 14)**	**4. Quartil (n = 14)**	**p – Wert**
Alter [y]	*32,6 ± 3,96*	*33,79 ± 3,8*	*0.52*
BMI [kg/m^2]	*22,68 ± 3,43*	*26,26 ± 5,82*	*0.33*
EZ gesamt [n]	*6,29 ± 4,04*	*12,64 ± 5,68*	*0.006***
Inj. EZ [n]	*4,64 ± 3,13*	*10,54 ± 4,92*	*0.004***
PN-EZ [n]	*3,14 ± 2,39*	*6,92 ± 3,81*	*0.01**
Eizellreifung [%]	*80,45 ± 18,49*	*82,73 ± 13,62*	*0.91*
Fertilisationsrate [%]	*66,49 ± 30,16*	*66,96 ± 19,54*	*0.45*
Leukozyten [abs/nl]	*6,88 ± 1,63*	*9,25 ± 2,81*	*0.29*
Monozyten [abs/nl]	*0,47 ± 0,09*	*0,55 ± 0,17*	*0.71*
CRP [mg/dl]	*0,79 ± 0,55*	*4,13 ± 5,09*	*0.01**
IL-6 [pg/ml]	*1,53 ± 0,09*	*3,1 ± 2,38*	*0.12*
HOMA-IR	*1,93 ± 0,65*	*3,89 ± 2,8*	*0.03**
Triglyzeride [mg/dl]	*86,29 ± 27,69*	*91 ± 11,24*	*0.002***
Nüchtern-Insulin [mU/l]	*8,87 ± 2,93*	*17,12 ± 10,98*	*0.14*
Nüchtern-Glukose [mg/dl]	*83,93 ± 6,31*	*91 ± 11,24*	*0.01**
HbA1c [%]	*5,12 ± 0,15*	*5,22 ± 0,09*	*0.29*
Nlrp2-Genexpression	*0,53 ± 0,62*	*1,36 ± 1,42*	*0.59*
Nlrp3-Genexpression	*0,77 ± 0,67*	*1,48 ± 0,94*	*0.047**
Nlrc4-Genexpression	*0,76 ± 0,54*	*1,31 ± 1*	*0.54*
Aim2-Genexpression	*1 ± 0,84*	*1,44 ± 0,70*	*0.42*

*p < 0.05, **p < 0.01

5.2 Fetuin-B Serumkonzentration und Anzahl entnommener Eizellen

Im Folgenden wird die Fetuin-B Serumkonzentration gegen die Anzahl bei der Follikelpunktion entnommener Eizellen aufgetragen. Es resultiert ein positiver Zusammenhang zwischen Fetuin-B und der Eizellzahl an beiden Messzeitpunkten.

Abbildung 6 zeigt ein Streudiagramm, das den positiven korrelativen Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration an t2 und der Anzahl entnommener Eizellen darstellt. In der Punktewolke liegt die Regressionsgerade einer linearen Einfachregression [$r^2 = 0,13$]. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Spearman Test ermittelt (Spearman r = 0,44, p = 0.0008). Der Rangkorrelationskoeffizient spricht für eine starke Korrelation. Zum Messzeitpunkt t1 ist der korrelative Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Anzahl entnommener Eizellen ebenso statistisch signifikant (r = 0,3, p = 0.02).

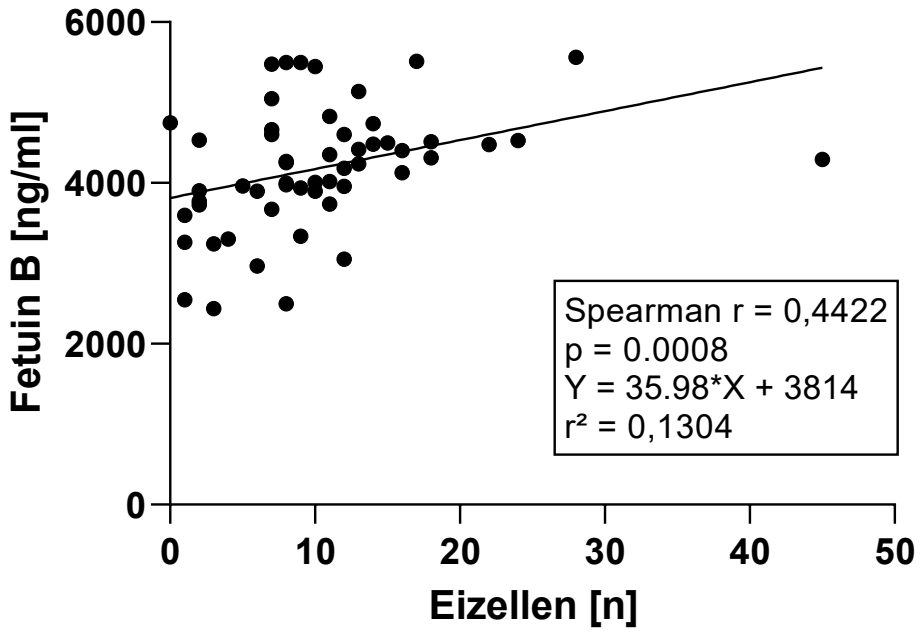


Abb. 6: Korrelation zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration an t2 und der Anzahl entnommener Eizellen.

5.3 Metabolisch-inflammatorischer Status im Zusammenhang mit Fertilitätsparametern

In diesem Kapitel werden die Fertilisationsrate und die Eizellreifung sowohl mit den zellulären und molekularen inflammatorischen Parametern als auch mit den metabolischen Parametern im Zusammenhang betrachtet.

5.3.1 Eizellreifung und NLRC4-Genexpression

In der untenstehenden Tabelle 6 werden zunächst die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der Inflammasomexpression und der Eizellreifung dargestellt. Der p-Wert (p) und der Rangkorrelationskoeffizient Spearman's Rho (r) werden angegeben.

Tab. 6: Korrelation zwischen der Eizellreifung und der Inflammasomexpression.

Parameter (n_2 = 47)	**Eizellreifung [%]**	
	p	*r*
NLRP2-Genexpression - t1	*0.44*	*- 0.05*
NLRP3-Genexpression - t1	*0.12*	*- 0.10*
NLRC4-Genexpression - t1	*0.44*	*- 0.29*
AIM2-Genexpression - t1	*0.55*	*- 0.16*

Abkürzungen: r = Spearman's Rho, *p < 0.05, **p < 0.01

Die Eizellreifung und die Genexpression der vier Inflammasome NLRP2, NLRP3, NLRC4 und AIM2 werden im Folgenden im Quartilsvergleich betrachtet.

Abbildung 7 zeigt vier Säulendiagramme, welche jeweils die Quartilsvergleiche von der Eizellreifung (MII-EZ/EZ gesamt) zu NLRP2 (A), NLRP3 (B), NLRC4 (C) und AIM2 (D) zum Messzeitpunkt t1 darstellen. Statistisch zeigt sich mittels Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Quartilsunterschied bei NLRC4 (C) ($p = 0.02$). Im Quartilsvergleich weisen Frauen mit einer niedrigen Eizellreifung (Q1 < 70 %) eine höhere NLRC4-Genexpression auf als Frauen mit einer hohen Eizellreifung (Q4 = 100 %). Außerdem lässt sich ein allgemeiner negativer Trend von einer höheren Inflammasom-Expression bei einer niedrigeren Eizellreifung (< 70 %) beobachten.

Zum Messzeitpunkt t2 zeigt sich kein Trend. Da die Inflammasomdaten ausschließlich bei $n_2 = 47$ Patientinnen erhoben wurden, beträgt die Gruppengröße der Quartile jeweils $n_{2q} = 12$.

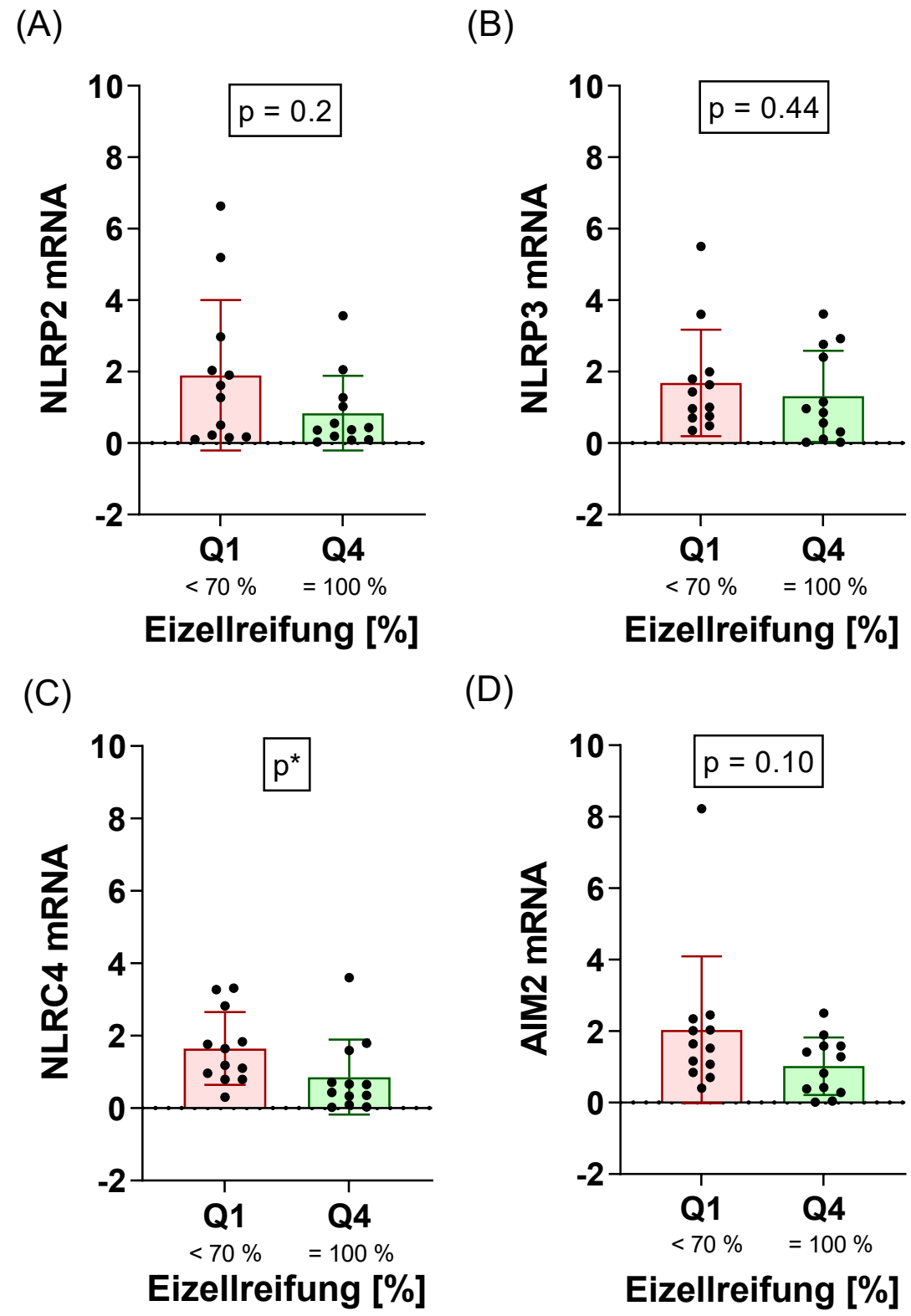


Abb. 7: Verteilung von gereiften Eizellen und Inflammasom: Vergleich der Quartile Q1 und Q4 im Säulendiagramm.

Die Höhe der Säulen gibt die Stärke der Inflammasom-Expression an t1 an.
Q1 steht für die Gruppe von Frauen mit einer niedrigen Eizellreifung (Q1 < 70 %),
Q4 steht für die Gruppe mit einer hohen Eizellreifung (Q4 = 100 %).

5.3.2 Fertilitätsparameter und metabolisch-inflammatorischer Status

Im Folgenden wird die Fertilisationsrate gegen metabolische und inflammatorische Parameter aufgetragen. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der Fertilisationsrate (PN-EZ/ EZ gesamt) und dem HOMA-Index und der Monozytenzahl sind in der untenstehenden Tabelle 7 dargestellt. Der p-Wert (p) und der Rangkorrelationskoeffizient Spearman's Rho (r) werden angegeben.

Tab. 7: Korrelation zwischen der Fertilisationsrate und dem HOMA-Index und der Monozytenzahl.

Parameter (n = 56)	**Fertilisationsrate [%]**	
	p	*r*
HOMA-Index	*0.87*	*- 0.16*
Monozyten [abs/nl] – t1	*0.07*	*- 0.14*
Monozyten [abs/nl] – t2	*0.01**	*- 0.22*

*p < 0.05, **p < 0.01

Im darauffolgenden Quartilsvergleich zeigt sich ein negativer Trend zwischen der Fertilisationsrate und dem HOMA-Index. Außerdem zeigt sich ein negativer Trend zwischen der Fertilisationsrate und der Monozytenzahl an t2.

Das Säulendiagramm in Abbildung 8 stellt den Quartilsvergleich der Fertilisationsrate mit dem HOMA-Index am Messzeitpunkt t1 dar. Es lässt sich ein negativer Trend erkennen, welcher eine höhere Fertilisationsrate mit einem niedrigeren HOMA-Index assoziiert. Statistisch lässt sich mittels Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied erkennen (p = 0.2).

Zwischen BMI und Fertilisationsrate zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Quartilsvergleich (p = 0.99).

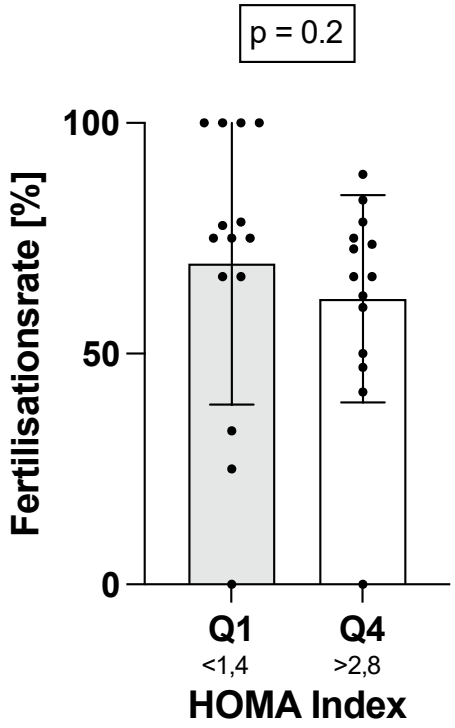


Abb. 8: Quartilsvergleich der Fertilisationsrate und des HOMA Index an t1.

Abbildung 9 zeigt ein Säulendiagramm, das den Quartilsvergleich der Fertilisationsrate mit der Monozytenzahl an t2 darstellt. Es lässt sich ein negativer Trend erkennen. Frauen mit niedriger Monozytenzahl zeigen höhere Fertilisationsraten. Statistisch lässt sich mittels Mann-Whitney-U-Test jedoch kein signifikanter Unterschied erkennen (p = 0.06).

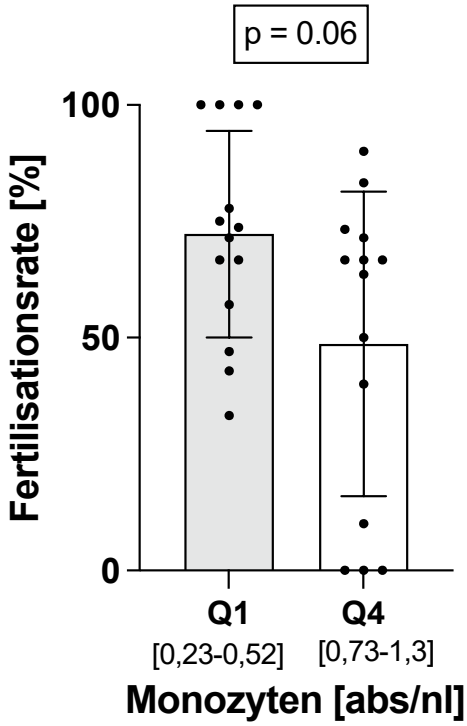


Abb. 9: Quartilsvergleich der Fertilisationsrate und der Monozytenzahl an t2.

Es findet sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Fertilitätsparametern Eizellreifung und Fertilisationsrate und zellulären inflammatorischen (Leukozyten, CRP) und metabolischen Parametern (HOMA-Index, Triglyzeride).

5.4 Inflammatorischer Status und Fetuin-B

5.4.1 Inflammatorische Parameter auf molekularer Ebene und Fetuin-B

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Genexpression der vier Inflammasome NLRP2, NLRP3, NLRC4 und AIM2 zu t1 werden zunächst in der untenstehenden Tabelle 8 dargestellt. Der p-Wert (p) und der Rangkorrelationskoeffizient Spearman's Rho (r) werden angegeben. Anschließend erfolgt die Betrachtung oben genannter Parameter im Quartilsvergleich.

Tab. 8: Korrelation zwischen der Fetuin-B und der Inflammasomexpression.

Parameter (n_2 = 47)	**Fetuin-B [ng/ml]**	
	p	*r*
NLRP2-Genexpression - t1	*0.63*	*0.14*
NLRP3-Genexpression - t1	*0.11*	*0.33*
NLRC4-Genexpression - t1	*0.52*	*0.13*
AIM2-Genexpression - t1	*0.64*	*0.13*

*p < 0.05, **p < 0.01

Abbildung 10 zeigt vier Säulendiagramme, welche jeweils die Quartilsvergleiche von Fetuin-B zu NLRP2 (A), NLRP3 (B), NLRC4 (C) und AIM2 (D) zum Messzeitpunkt t1 darstellen. Im Quartilsvergleich zu NLRP3 (B) zeigt sich eine erhöhte Genexpression bei höheren Fetuin-B Serumkonzentrationen (Q4 > 4170 ng/ml). Mittels ungepaartem t-Test findet sich ein statistisch signifikanter Unterschied (p = 0.046). Der Quartilsvergleich zwischen Fetuin-B und der Genexpression der Inflammasome NLRP2, NLRC4 und AIM2 zeigt einen Trend von hohen Fetuin-B Serumkonzentrationen zu einer hohen Genexpression. Es lässt sich mittels Mann-Whitney-U-Test und ungepaartem t-Test jedoch kein weiterer signifikanter Unterschied finden. Im Quartilsvergleich von Zytokin IL-1ß (p = 0.44) und Caspase-1 (p = 0.27) mit der Fetuin-B Serumkonzentration zeigt sich mittels Mann-Whitney-U-Test kein statistisch signifikanter Unterschied.

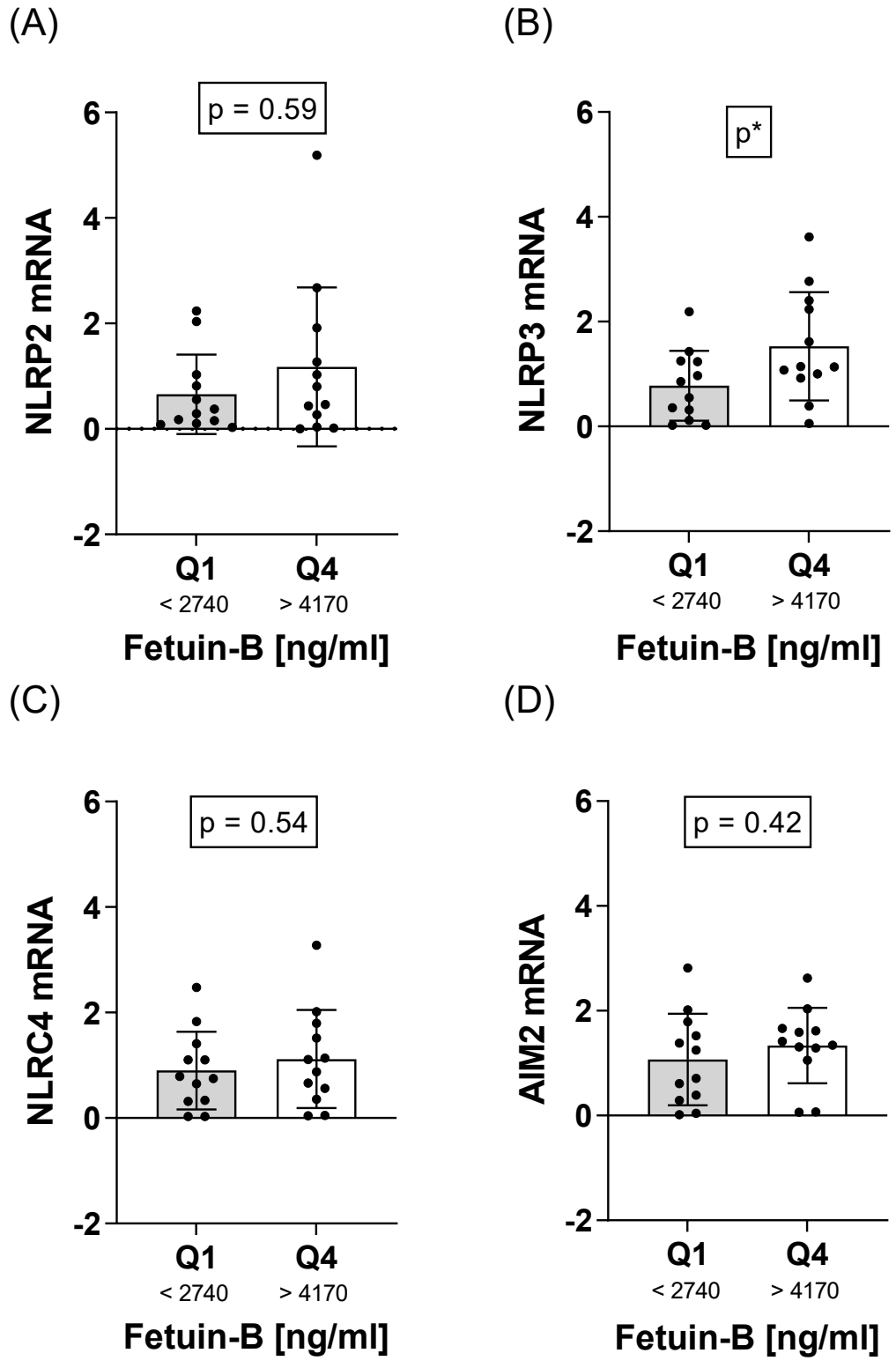


Abb. 10: Quartilsvergleich der Inflammasom-Genexpression (NLRP2, NLRP3, NLRC4, AIM2) und der Fetuin-B Serumkonzentration an t1.

5.4.2 Inflammatorische Parameter auf zellulärer Ebene und Fetuin-B

Im Folgenden werden die Fetuin-B Serumkonzentration und die zellulären inflammatorischen Parameter CRP und Leukozytenzahl gegeneinander aufgetragen.

Abbildung 11 zeigt ein Streudiagramm, das den positiven korrelativen Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Leukozytenzahl zum Messzeitpunkt t1 darstellt. In der Punktewolke liegt die Regressionsgerade einer linearen Einfachregression ($r^2 = 0,09$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Spearman Test ermittelt (Spearman r = 0,35). Der Rangkorrelationskoeffizient spricht für eine starke Korrelation. Der zweiseitige p-Wert liegt bei p = 0.005. Zum Messzeitpunkt t2 ist der korrelative Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Leukozytenzahl ebenso statistisch signifikant (r = 0,35, p = 0.009).

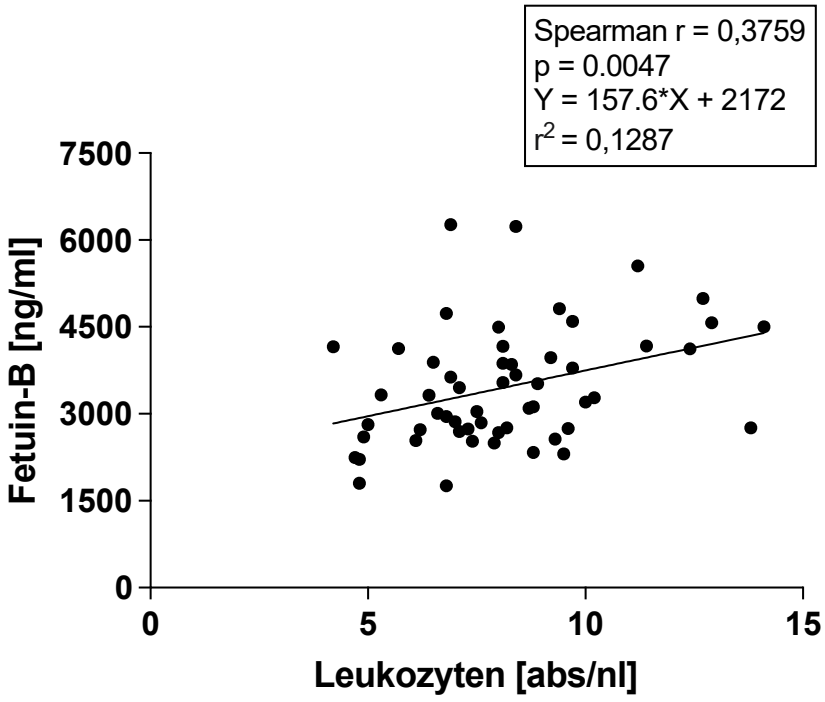


Abb. 11: Korrelation zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Leukozytenzahl an t1.

Eigene Darstellung nach Hangen et al. (2020)

Abbildung 12 zeigt ein Streudiagramm, das den positiven korrelativen Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der CRP-Serumkonzentration zum Messzeitpunkt t1 darstellt. In der Punktewolke liegt die Regressionsgerade einer linearen Einfachregression ($r^2 = 0,16$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Spearman Test ermittelt (Spearman r = 0,28). Der Rangkorrelationskoeffizient spricht für eine mittelstarke bis starke Korrelation. Der zweiseitige p-Wert liegt bei p = 0.04. Zum Messzeitpunkt t2 ist der korrelative Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der CRP-Serumkonzentration ebenso statistisch signifikant (r = 0,58, p < 0.0001).

Auch das Zytokin Interleukin-6 korreliert zu beiden Messzeitpunkten signifikant positiv mit der Fetuin-B Serumkonzentration [t1: r = 0,38, p = 0.004; t2: r = 0,55, p < 0.0001]. Je höher die Fetuin-B Serumkonzentration, desto höher die Inflammationsmarker CRP, Leukozytenzahl und IL-6. Am Messzeitpunkt t2 korreliert außerdem die Monozytenzahl schwach positiv mit der Fetuin-B Serumkonzentration [r = 0,28].

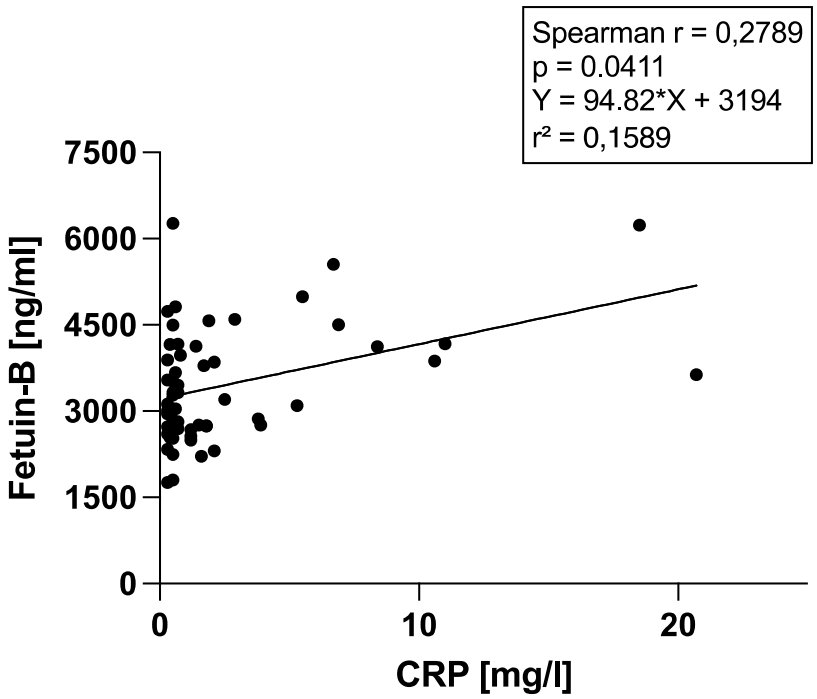


Abb. 12: Korrelation zwischen der Fetuin-B und der CRP Serumkonzentration an t1.

Eigene Darstellung nach Hangen et al. (2020)

5.5 Metabolischer Status und Fetuin-B

Im Folgenden erfolgt die Betrachtung des metabolischen Status und der Fetuin-B Serumkonzentration. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen Fetuin-B und dem HOMA-Index und dem BMI werden in der untenstehenden Tabelle 9 dargestellt. Der p-Wert (p) und der Rangkorrelationskoeffizient Spearman's Rho (r) werden angegeben.

Tab. 9: Korrelation zwischen Fetuin-B und dem HOMA-Index und dem BMI.

Parameter (n = 56)	**Fetuin-B [ng/ml]**	
	p	r
HOMA-Index	*0.002***	*0.34*
BMI [kg/m^2]	*0.06*	*0.25*

*p < 0.05, **p < 0.01

Abbildung 13 zeigt ein Säulendiagramm, das den Quartilsvergleich zwischen dem HOMA-Index und der Fetuin-B Serumkonzentration zum Messzeitpunkt t1 darstellt. Die Gruppe mit niedrigeren HOMA-Indices (Q1 < 1,4) weist im Vergleich signifikant niedrigere Fetuin-B Werte auf als die Gruppe mit höheren HOMA-Indices (Q4 > 2,8). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt (p = 0.004).

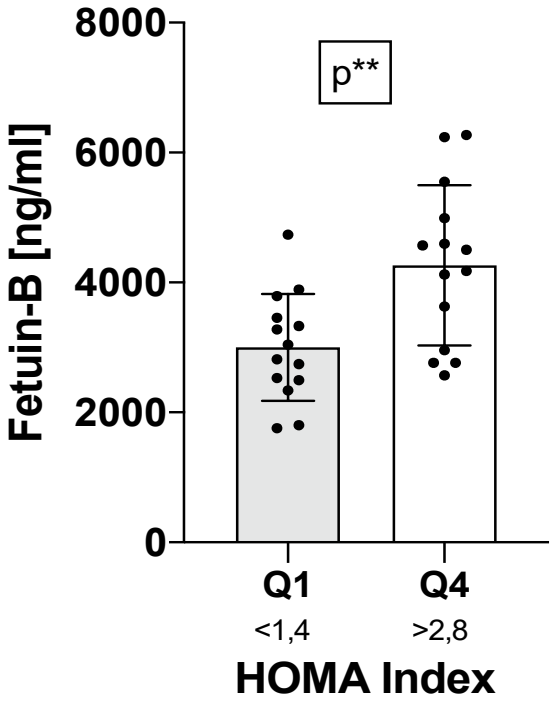


Abb. 13: Quartilsvergleich der Fetuin-B Serumkonzentration und des HOMA Index an t1.

Abbildung 14 zeigt ein Säulendiagramm, das den Quartilsvergleich der BMI und Fetuin-B Werte zum Messzeitpunkt t1 darstellt. Es zeigt sich ein positiver Trend zwischen höheren BMI Werten und höheren Fetuin-B Serumkonzentrationen. Mittels Mann-Whitney-U-Test zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0.26$).

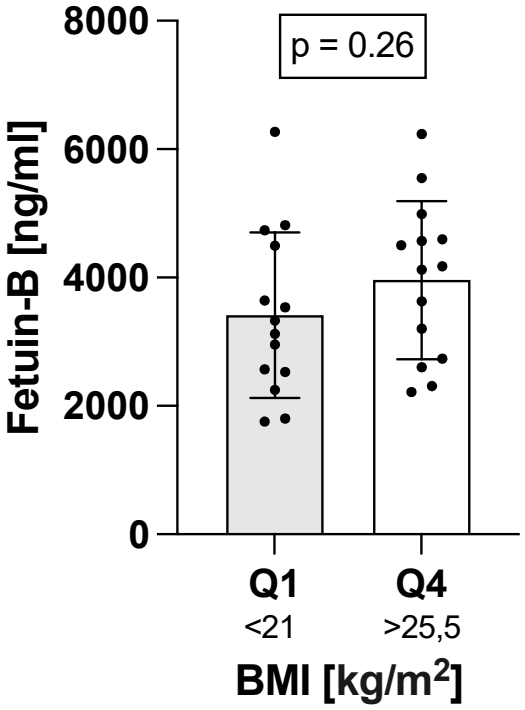


Abb. 14: Quartilsvergleich der Fetuin-B Serumkonzentration und des BMI an t1.

Die Insulin- und die Triglyzerid Serumkonzentrationen weisen signifikant positive Korrelationen zum Zeitpunkt t1 mit der Fetuin-B Serumkonzentration auf.

Abbildung 15 zeigt ein Streudiagramm (A), das den positiven korrelativen Zusammenhang zwischen der Fetuin-B und der Insulin Serumkonzentration zum Messzeitpunkt t1 darstellt. In der Punktewolke liegt die Regressionsgerade einer linearen Einfachregression ($r^2 = 0,18$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Spearman Test ermittelt (Spearman r = 0,35). Der Rangkorrelationskoeffizient spricht für eine mittlere bis starke Korrelation. Der zweiseitige p-Wert liegt bei p = 0.0083.

Außerdem ist ein Säulendiagramm (B) abgebildet, das den Quartilsvergleich zwischen der Fetuin-B und der Insulinkonzentration an t1 darstellt. Mittels Mann-Whitney-U-Test lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied berechnen (p = 0.004).

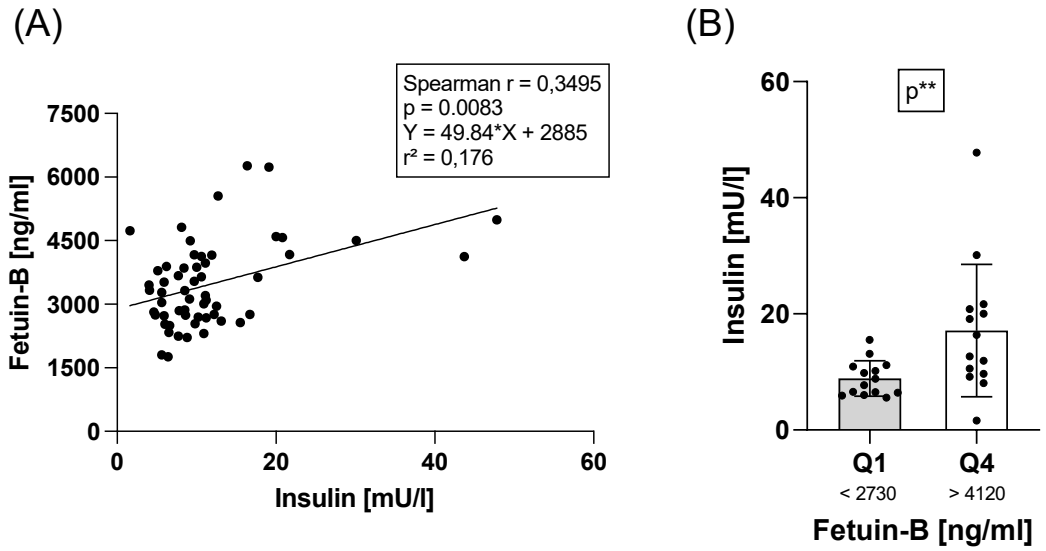


Abb. 15: Fetuin-B und Insulin Serumkonzentration im korrelativen Zusammenhang (links) und im Quartilsvergleich (rechts) an t1.

Abbildung 16 zeigt ein Streudiagramm (A), das den positiven korrelativen Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Triglyzeridzahl zum Messzeitpunkt t1 darstellt. In der Punktewolke liegt die Regressionsgerade einer linearen Einfachregression ($r^2 = 0,15$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Spearman Test ermittelt (Spearman r = 0,4). Der Rangkorrelationskoeffizient spricht für eine starke Korrelation. Der zweiseitige p-Wert liegt bei p = 0.0024.

Zudem ist ein Säulendiagramm (B) abgebildet, das den Quartilsvergleich zwischen Fetuin-B und der Triglyzeridzahl zu t1 darstellt. Mittels ungepaartem t-Test lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied berechnen (p = 0.0024).

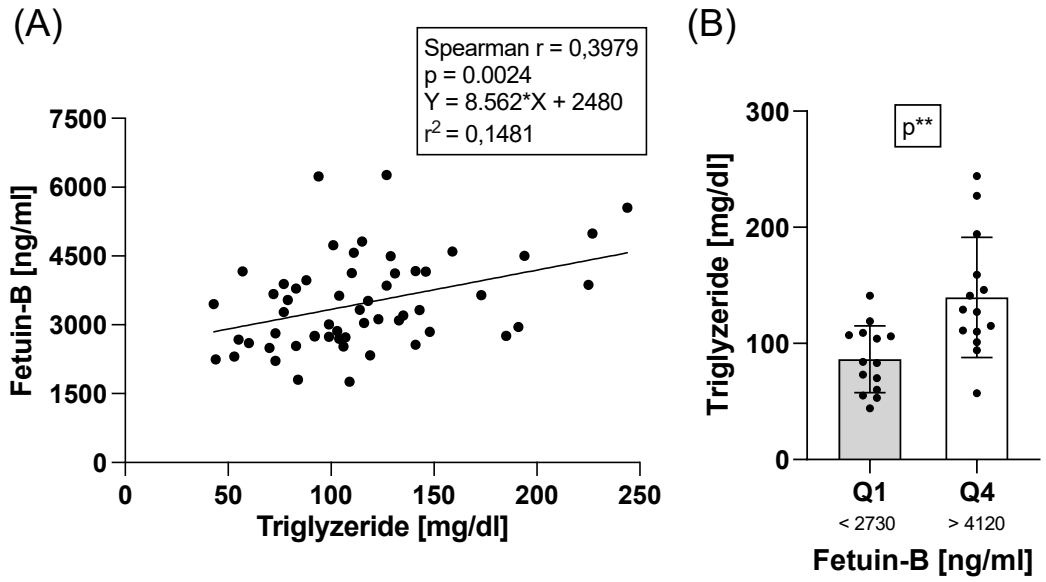


Abb. 16: Fetuin-B und Triglyzerid Serumkonzentration im korrelativen Zusammenhang (links) und im Quartilsvergleich (rechts) an t1.

Eigene Darstellung nach Hangen et al. (2020)

5.6 Fetuin-B im zeitlichen Verlauf

Im Mittel liegen die Fetuin-B Serumkonzentrationen am Messzeitpunkt t1 bei 3440 ng/ml mit einer Standardabweichung von 999 ng/ml und einem Variationskoeffizienten von 28,6 %. Der Mittelwert der Fetuin-B Werte an Messzeitpunkt t2 liegt bei 4184 ng/ml mit einer Standardabweichung von 762 ng/ml und einem Variationskoeffizienten von 18,5 %.

Abbildung 17 zeigt einen Box-Plot. Die Median-Differenz der Fetuin-B Serumkonzentrationen des Kollektivs unterscheiden sich vor und nach Follikelpunktion statistisch signifikant ($p < 0.001$). Die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon matched-pairs signed rank test ermittelt.

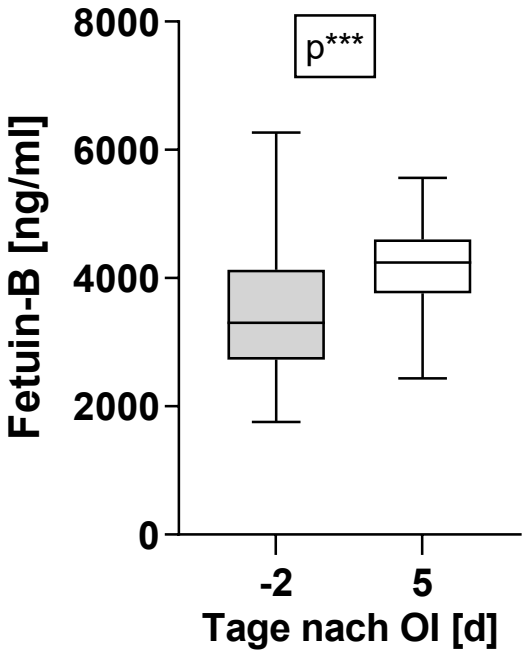


Abb. 17: Vergleich der Fetuin-B Serumkonzentrationen an t1 und t2.

Eigene Darstellung nach Hangen et al. (2020)

5.7 Korrelationsanalyse zwischen HOMA-Index und metabolisch-inflammatorischen Parametern

Die unten aufgeführte Tabelle 10 stellt eine Korrelationstabelle dar. Es werden korrelative Zusammenhänge zwischen der abhängigen Variable HOMA-Index und den unabhängigen Variablen BMI, CRP-Serumkonzentration, Triglyzerid-Serumkonzentration, Leukozyten- und Monozytenzahl zum Messzeitpunkt t1 dargestellt. Die unabhängigen Variablen werden in der ersten Spalte dargestellt. Die zweite Spalte gibt das arithmetische Mittel ($\overline{\mathbf{mean}}$) und die dritte Spalte die Standardabweichung (SD) der unabhängigen Variablen an. In der vierten Spalte „HOMA-Index“ werden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse angegeben. Die obere Zahl gibt den Rangkorrelationskoeffizienten Spearman’s Rho (r) an. Ein zweiseitiger p-Wert von $p < 0.001$ wird mit „***“ hinter dem Rangkorrelationskoeffizient gekennzeichnet, ein zweiseitiger p-Wert von $p < 0.005$ wird mit „**“ gekennzeichnet. In eckigen Klammern ist das 95%-Konfidenzintervall angegeben. Alle dargestellten Rangkorrelationskoeffizienten sprechen für einen starken korrelativen Zusammenhang ($r > 0,35$).

Tab. 10: Korrelationstabelle zwischen HOMA-Index und metabolisch-inflammatorischen Parametern.

Unabhängige Variable	$(\overline{\mathbf{mean}})$	**SD**	**HOMA-Index**
BMI [kg/m^2]	*24,1*	*4,6*	*.42*** *[.17, .62]*
CRP [mg/l]	*4,1*	*6*	*.45**** *[.21, .64]*
Triglyzeride [mg/dl]	*114*	*45*	*.38*** *[.12, .59]*
Leukozyten [abs/nl]	*9,2*	*2,6*	*.43**** *[18, .63]*
Monozyten [abs/nl]	*0,6*	*0,2*	*.40*** *[.14, .61]*

5.8 Korrelationsanalyse zwischen BMI und metabolisch-inflammatorischen Parametern

Es resultieren signifikante Zusammenhänge zwischen dem BMI und inflammatorischen Parametern. Die CRP-Serumkonzentration (Spearman r = 0,72, p < 0.0001) und die Leukozyten- (Spearman r = 0,4, p = 0.0025) und Monozytenzahl (Spearman r = 0,29, p = 0.0068) korrelieren an Messzeitpunkt t1 statistisch signifikant mit dem BMI.

Abbildung 18 zeigt ein Streudiagramm, das den positiven korrelativen Zusammenhang zwischen dem BMI und der CRP Serumkonzentration zum Messzeitpunkt t1 darstellt. In der Punktewolke liegt die Regressionsgerade einer linearen Einfachregression (r^2 = 0,63). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Spearman Test ermittelt (Spearman r = 0,72). Der Rangkorrelationskoeffizient spricht für eine starke Korrelation.

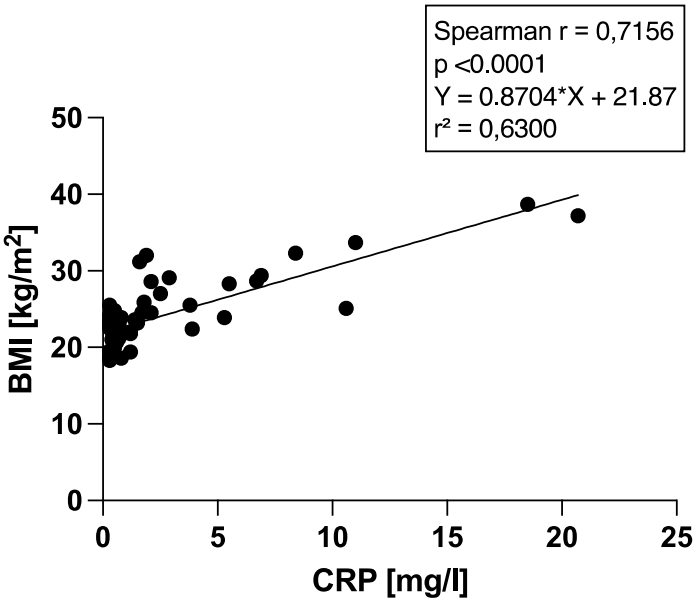


Abb. 18: Korrelation zwischen dem BMI und der CRP Serumkonzentration an t1.

Abbildung 19 zeigt ein Streudiagramm, das den positiven korrelativen Zusammenhang zwischen dem BMI und der Leukozytenzahl zum Messzeitpunkt t1 darstellt. In der Punktewolke liegt die Regressionsgerade einer linearen Einfachregression (r^2 = 0,15). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Spearman Test ermittelt (Spearman r = 0,4). Der Rangkorrelationskoeffizient spricht für eine starke Korrelation.

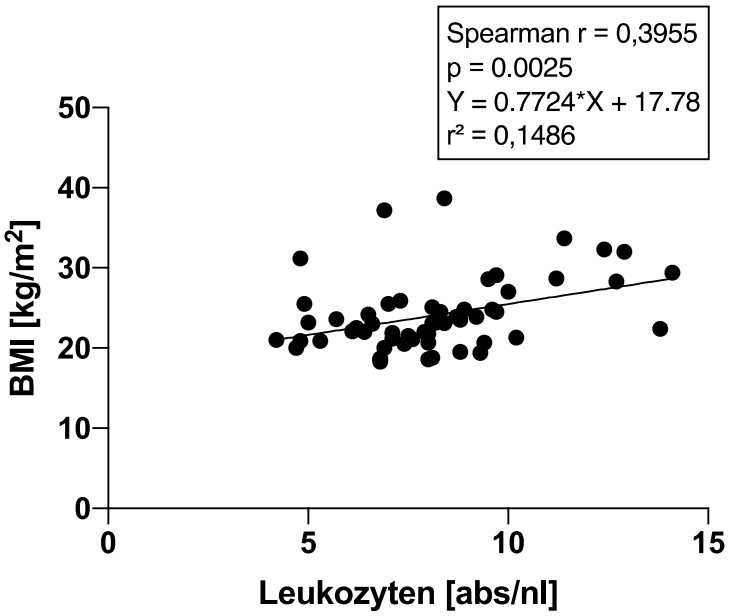


Abb. 19: Korrelation zwischen dem BMI und der Leukozytenzahl an t1.

Auch zwischen BMI und metabolischen Parametern zeigen sich signifikante Korrelationen. Insulin (p = 0.0016) und Harnsäure (p = 0.0012) weisen am Messzeitpunkt t1 positive Korrelationen mit dem BMI auf.

6. Diskussion

6.1 Zusammenhang zwischen Fetuin-B und Fertilitätsparametern

Eine ordnungsgemäße Eizellreifung ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung und wird mit einer hohen Eizellqualität und Fertilisationsrate assoziiert (Navot et al. 1991; Hourvitz et al. 2009; Fang et al. 2019). Metabolische Dysbalancen können Störungen von Stoffwechselsignalen und die Ausschüttung proinflammatorischer Botenstoffe induzieren und somit die Eizellqualität negativ beeinflussen (Shorakae et al. 2015; Wang et al. 2021).

Fetuin-B ist ein hepatisches Zytokin, welches als Akut-Phase-Protein im metabolisch-inflammatorischen Kontext diskutiert wird und im in vitro Experiment die Glukosetoleranz beeinflusst (Meex et al. 2015). Daher bestand die Hypothese, dass hohe Fetuin-B Serumkonzentrationen durch ihren Einfluss auf den metabolischen Haushalt in negativem Zusammenhang mit den Fertilitätsparametern stehen. Die Ergebnisse der Studie zeigten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Fertilisationsrate und der Eizellreifung zur Fetuin-B Serumkonzentration im Quartilsvergleich (Abbildung 4, 5). Zu Beginn dieser Studie war in der Reproduktionsklinik des UKA die Beobachtung gemacht worden, dass hohe Fetuin-B Konzentrationen mit niedrigen Fertilisationsraten auftraten (Hangen et al. 2020). Dieser Trend konnte jedoch in der finalen Auswertung der Daten nicht bestätigt werden. Weiter wurde, im Gegensatz zu den Forschungsergebnissen von Fang et al. (2019), auch kein Zusammenhang zwischen niedrigen Fetuin-B Konzentrationen und niedrigen Fertilisationsraten beobachtet. Es ist möglich, dass die metabolischen und inflammatorischen Dysbalancen im Patientenkollektiv zu gering waren, um deutliche Effekte zu sehen. Der durchschnittliche BMI lag im Kollektiv mit einem Wert von 23 kg/m^2 im Normbereich. Auch die zellulären inflammatorischen Parameter lagen im Mittel zu beiden Zeitpunkten im Normbereich. Zudem wäre eine erneute Überprüfung mit größerer Kohorte oder zusätzlichen Fertilitätsparametern bei der hohen Streuung der Daten denkbar. Die Verwendung von Fetuin-B als Prognoseparameter für einen ART-Erfolg ist bis dahin bei dem aktuellen Stand der Forschung nicht indiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration nach Follikelpunktion (t2) und der Anzahl entnommener Eizellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6). Dieses Ergebnis würde die These von Floehr et al. (2016) unterstützen, dass nicht die absoluten Fetuin-B Konzentrationen entscheidend sind, sondern dass der Anstieg von Fetuin-B zu Beginn der Stimulationstherapie aus (eher) niedrigen Werten in hohe Konzentrationen kurz vor der Ovulation (Follikelpunktion), auf eine gute Fertilisation hinweist. Der Anstieg der Fetuin-B Konzentrationen zwischen t1 und t2 zeigte in diesem Kollektiv keinen korrelativen Zusammenhang zur Eizellqualität, was vermutlich daran liegt, dass der Messzeitpunkt t1 kurz vor Ende der Stimulation liegt.

In dieser Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Fetuin-B Serumkonzentrationen im Behandlungsverlauf zwischen Ovulationsinduktion und Embryotransfer (siehe Abbildung 17). Im Rahmen der Stimulation steigt Estradiol und somit auch Fetuin-B an. Periovulatorisch ist somit die maximale Konzentration zu erwarten (Orellana-Guerrero et al. 2022).

6.2 Niedrige NLRC4-Genexpression bei hoher Eizellreifung

Inflammasome sind intrazelluläre Proteinkomplexe, die zum angeborenen Immunsystem gehören und wichtige Signalfaktoren darstellen (Martinon et al. 2002). Sie können unter anderem durch metabolische Auslöser aktiviert werden und systemische Metainflammationen induzieren (Skeldon et al. 2014).

Erstmals erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine gemeinsame Betrachtung der Inflammasome NLRP2, NLRP3, NLRC4 und AIM2 und der Eizellreifung. Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang der NLRC4-Genexpression im Serum zu der Eizellreifung (MII-EZ/EZ gesamt) im Quartilsvergleich gezeigt werden (siehe Abbildung 7). Frauen mit einer niedrigen Eizellreifung (Q1 < 70 %) wiesen eine höhere NLRC4-Genexpression auf als Frauen mit einer hohen Eizellreifung (Q4 = 100 %). Bei den restlichen Inflammasome (NLRP2, NLRP3, AIM2) stellte sich ein Trend zwischen einer hohen Eizellreifung und niedriger Inflammasom-Genexpression heraus. In Bezug auf die Fertilisationsrate zeigte sich kein Zusammenhang zu der Inflammasom-Genexpression. Es ist bekannt, dass die NLRC4-Expression durch proinflammatorische Stimuli wie TNF-α hochreguliert wird (Gutierrez et al. 2004).

Außerdem wird NLRC4 zunehmend mit autoimmunen Erkrankungen assoziiert (Romberg et al. 2017). Hierbei wird unter anderem eine Dysregulation des Inflammasoms, im Sinne einer Überexpression, als Ursache der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen diskutiert (Addobbati et al. 2018; Soares et al. 2019). Es wäre interessant zu überprüfen, wie Inflammasome, insbesondere NLRC4, im Ovar wirken und wodurch sie aktiviert werden. Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit konnte keine Publikation gefunden werden, in welcher ein Zusammenhang zwischen der NLRC4-Genexpression und der Eizellreifung beschrieben wurde. Eine erhöhte NLRP3-Genexpression wurde beispielsweise bei chronischen Erkrankungen wie der Endometriose oder dem PCOS in der Follikelflüssigkeit gefunden und mit einer schlechteren Eizellqualität assoziiert (Wang et al. 2020; Fonseca et al. 2023). Navarro-Pando et al. (2021) beobachteten außerdem eine erhöhte ovarielle NLRP3-Genexpression im Alter. Sie schlussfolgerten, dass die damit verbundene Inflammation im Ovar zu einem vorzeitigen Altern der Eizellen führt.

Da die Ergebnisse dieser Studie keine kausalen Zusammenhänge darstellen, sollten zukünftige Studien eine Überprüfung erbringen.

6.3 Trends von Fertilisationsrate mit HOMA-Index und Monozytenzahl

Die Insulinresistenz beschreibt eine verminderte Wirkung von Insulin auf den Stoffwechsel und wird klinisch anhand des HOMA-Index diagnostiziert (Müller et al. 2007; Matli 2020). Mehrere Studien haben den Einfluss einer bestehenden Insulinresistenz auf die Fertilität der Frau untersucht (Sakumoto et al. 2010; Diamanti-Kandarakis & Dunaif 2012; Saleh et al. 2020; Wang et al. 2021). Dieser Forschungsbereich hat durch die Assoziation der Insulinresistenz mit dem PCOS, welches 5-10 % der Frauen betrifft und mit verminderten Fertilisationsraten einhergeht, eine hohe Relevanz in der Reproduktionsmedizin (Fica et al. 2008). Im Vergleich der Fertilisationsrate mit metabolischen Parametern zeigt sich ein negativer Trend mit dem HOMA-Index im Quartilsvergleich. Der Trend geht von niedrigen HOMA-Indices (Q1 < 1,4) zu hohen Fertilisationsraten (siehe Abbildung 8). Dieser Trend korrespondiert mit den Forschungsergebnissen von Wang et al. (2021). Sie verglichen die Eizellqualität von schlanken Frauen im IVF-Setting mit vorhandener Insulinresistenz und ohne PCOS mit einer Kontrollgruppe.

Frauen mit Insulinresistenz wiesen dabei einen signifikant geringeren prozentualen Anteil an reifen Eizellen auf. Der hier angedeutete Zusammenhang ist jedoch statistisch nicht signifikant und sollte daher in Zukunft überprüft werden.

Monozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Erhöhte Monozytenzahlen im Blut werden unter anderem bei chronischen Inflammationen beobachtet (Van Furth 1982; Fenyo & Gafencu 2013). Im Vergleich der Fertilisationsrate mit inflammatorischen Parametern zeigt sich ein negativer Trend mit der Monozytenzahl an t2. Der Trend geht von einer niedrigen Monozytenzahl im Blut (Q1 < 0,52 abs/nl) zu hohen Fertilisationsraten (siehe Abbildung 9). Dieses Ergebnis impliziert einen Zusammenhang von geringer Inflammationsreaktion und hoher Eizellqualität und ähnelt damit den Forschungsergebnissen von Buyuk et al. (2017). Letztere wiesen in ihrer Forschung eine Korrelation zwischen einer erhöhten Monozytenrekrutierung in Serum und Follikelflüssigkeit und niedrigen Schwangerschaftsraten nach. Daneben findet sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Fertilitätsparametern und zellulären inflammatorischen oder metabolischen Parametern. Weiter zeigt sich zwischen dem BMI und der Fertilisationsrate kein statistisch signifikanter Zusammenhang im Quartilsvergleich. In diesem Themenbereich ist die Studienlage ohnehin kontrovers. Auf der einen Seite existieren Studien, die eine niedrigere Eizellgewinnung und Eizellreifung vermehrt bei Übergewichtigen im ART-Setting beobachteten (Fedorcsak et al. 2004; Kudesia et al. 2018). Andere Studien wiederum fanden keinen Zusammenhang zwischen Übergewicht und Fertilisationsrate im ART-Setting (Bellver et al. 2010; Jungheim et al. 2013). Grund dafür ist, dass ein Übergewicht zum einen verschieden stark ausgeprägt sein kann und zum anderen nicht zwingend mit Folgeerkrankungen wie metabolischen Erkrankungen auftritt (Weltgesundheitsorganisation 2000; Wildman et al. 2008). Daher ist der BMI in dieser Arbeit als Prognoseparameter einer ART-Behandlung nicht ausreichend. Es ist bekannt, dass Untergewicht ebenso wie Übergewicht zu einer verminderten Fertilität führt (Rich-Edwards et al. 2002). Untergewicht besteht definitionsgemäß ab einem BMI von < 18,5 kg/m^2 (Weltgesundheitsorganisation 2000). In diesem Kollektiv gab es eine Frau mit einem BMI von 18,3 kg/m^2, die anderen Frauen wiesen einen BMI > 18,5 kg/m^2 auf. Deshalb ist diese Gruppe nicht repräsentativ.

6.4 Positiver Zusammenhang von NLRP3 und Fetuin-B

NLRP3 ist eins der bislang am besten charakterisierten Inflammasome (De Nardo & Latz 2011). Mehrere Studien assoziierten bereits eine erhöhte NLRP3-Expression mit Adipositas, Inflammation und zuletzt Insulinresistenz, ähnlich wie bei dem Hepatokin Fetuin-B (Shi et al. 2006; De Nardo & Latz 2011; Vandanmagsar et al. 2011). Erstmals erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine gemeinsame Betrachtung von Fetuin-B und dem Inflammasom NLRP3.

In dieser Arbeit konnte ein schwach positiver signifikanter Zusammenhang zwischen der NLRP3-Genexpression und der Fetuin-B Serumkonzentration nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10). Frauen mit höheren Fetuin-B Serumkonzentrationen (Q4 > 4170 ng/ml) wiesen eine signifikant höhere NLRP3-Genexpression auf als Frauen mit niedrigen Fetuin-B Serumkonzentrationen (Q1 < 2740 ng/ml). Der nachgewiesene Zusammenhang zwischen NLRP3 und Fetuin-B stimmt mit dem bisherigen Forschungsstand überein, da beide Parameter im metabolischen Kontext diskutiert werden (De Nardo & Latz 2011; Meex et al. 2015). Der Zusammenhang in dieser Studie ist jedoch nur schwach signifikant und unsere Stichprobengröße war im Vergleich zu anderen Studien klein. Hier können zukünftige Studien mit größeren Stichproben eine Überprüfung unseres Ergebnisses erbringen. Die Genexpression der Inflammasome NLRP2, NLRC4 und AIM2 inklusive IL-1ß und Caspase 1 zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Fetuin-B Serumkonzentration.

6.5 Erhöhte Fetuin-B Konzentrationen bei metabolisch-inflammatorisch suboptimalem Status

Die Ergebnisse dieser Studie suggerieren einen positiven Zusammenhang zwischen Fetuin-B und metabolischen und inflammatorischen Markern.

Es zeigte sich ein stark signifikanter Zusammenhang zwischen Fetuin-B und inflammatorischen Parametern. Das Akut-Phase-Protein CRP und die Leukozytenzahl korrelierten zu beiden Messzeitpunkten signifikant mit Fetuin-B (siehe Abbildung 11, 12). Zuvor belegten Meex et al. (2015) in ihrer Arbeit, dass Fetuin-B in vitro keine proinflammatorischen Signalwege induziert. Sie beobachteten dennoch positive Assoziation zwischen der Fetuin-B und der CRP Konzentration (Meex et al. 2015; Qu et al. 2018).

Sowohl Fetuin-B als auch CPR sind Akut-Phase-Proteine der Leber. Die Ergebnisse können daher verschieden interpretiert werden. Zum einen könnte die starke Assoziation ein Hinweis dafür sein, dass die Fetuin-B Sekretion durch Inflammationszustände induziert wird. Zum anderen wäre es bei dem aktuellen Forschungsstand wahrscheinlicher, dass die inflammatorischen Parameter und die Fetuin-B Serumkonzentration durch ähnliche Auslöser, wie metabolische Dysbalancen, ansteigen (Pereira & Alvarez-Leite 2014; El-Ashmawy & Ahmed 2019). Letztere würden die Assoziation zwischen Fetuin-B und inflammatorischen Parametern als Störvariablen beeinflussen. Inwiefern die Follikelpunktion, die vor dem zweiten Messzeitpunkt stattfindet, sowohl den Anstieg inflammatorischer Parameter als auch von Fetuin-B verursachen könnte, ist unklar (Sarhan & Muasher 2007).

Bei Frauen mit höherem HOMA-Index (Q4 > 2,8) wurden signifikant höhere Fetuin-B Serumkonzentrationen als bei Frauen mit niedrigem HOMA-Index (Q1 < 1,4) zum Zeitpunkt t1 gemessen (siehe Abbildung 13). Hierbei liegt bei einem HOMA-Index von > 2,5 eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Insulinresistenz vor (Matli 2020). Diese Ergebnisse lassen sich mit den Forschungsergebnissen von Meex et al. (2015) erklären, der im in-vitro Experiment nachweisen konnte, dass Fetuin-B eine Insulinresistenz in Leber- und Muskelzellen induziert und die Glukosetoleranz beeinflusst. In vivo führte die Injektion von Fetuin-B bei Mäusen zu einer Glukoseintoleranz, aber nicht zur Insulinresistenz. Auch fand die Forschungsgruppe erhöhte Fetuin-B Werte, die unabhängig vom Gewicht waren, bei Diabetikern. Der BMI zeigte im Quartilsvergleich keinen signifikanten Zusammenhang zu Fetuin-B (siehe Abbildung 14). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass in der Berechnung des BMI lediglich Körpergewicht und Körpergröße miteinbezogen wird, so dass er als metabolischer Marker nicht ausreicht. Die Körperfettverteilung und kardiovaskuläre Risikofaktoren werden beim BMI nicht miteinbezogen (Hall & Cole 2006). Dies ist auch konsistent mit den Beobachtungen von Wildman et al. (2008). Sie fanden heraus, dass ein solider Anteil der Übergewichtigen metabolisch gesund bleibt. Dies spricht dafür, dass die funktionellen Veränderungen im Fettgewebe, und nicht nur die Erhöhung der Fettmasse, bestimmen, inwiefern sich eine lokale Inflammation mit metabolischen Erkrankungen wie einer Insulinresistenz entwickelt.

Die metabolischen Parameter Triglyzeride, Nüchtern-Insulin, Harnsäure und Nüchtern-Blutzucker korrelierten zum Zeitpunkt t1 statistisch signifikant mit Fetuin-B (siehe Abbildung 15, 16). Ähnliche Ergebnisse publizierte bereits El-Ashmawy & Ahmed (2019). In seiner Studie zeigte er, dass erhöhte Fetuin-B Werte ein unabhängiger Marker für eine NAFLD bei an Diabetes Mellitus erkrankten Patienten sind. Zhu et al. (2017) wiesen zudem positive Korrelationen zwischen der Fetuin-B Serumkonzentration und der Cholesterin Serumkonzentration und dem Nüchternblutzucker nach. Zusammenfassend bedeutet das, dass bei metabolisch gesunden Frauen zu Beginn des Zyklus (relativ) niedrige Fetuin-B Werte gefunden werden.

Bereits bekannte Zusammenhänge wie der Zusammenhang zwischen dem BMI und inflammatorischen Parametern korrelieren auch in dieser Studie (siehe Abbildung 18, 19) (Kershaw & Flier 2004; Berg & Scherer 2005). Diese Ergebnisse korrespondieren mit der vorhandenen Literatur und lassen sich durch die systemische Aktivierung des Immunsystems und die anschließende Infiltration der Immunzellen in das Fettgewebe interpretieren (siehe Kapitel 3.6). Auch resultierten stark signifikante Zusammenhänge zwischen dem HOMA-Index und metabolischen und inflammatorischen Parametern (siehe Tabelle 10). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das Vorliegen einer Insulinresistenz Einfluss auf den systemischen metabolischen und inflammatorischen Status hat (Howard 1999; Shi et al. 2006). Die Korrelationsanalysen bekannter Zusammenhänge dienen unter anderem zur Überprüfung der Genauigkeit der Messergebnisse.

6.6 Beurteilung der Studie

Diese Studie zeigt trotz moderater Stichprobengröße einige der erwarteten Interaktionseffekte zwischen inflammatorischer Regulation, metabolischer Disposition und Eizellqualität. Zum Messzeitpunkt t1 sind die Messwerte und die verschiedenen Korrelationen bis auf die vorher stattgefundene Hormonbehandlung unbeeinflusst und es hat noch kein Gewebstrauma (Follikelpunktion) stattgefunden, welches die inflammatorischen Parameter beeinflussen könnte. Schwerwiegende Erkrankungen und akute Infektionen, die eine Kontraindikation für eine Schwangerschaft darstellen würden, wurden im Kollektiv bei Voruntersuchungen ausgeschlossen.

Es handelt sich demnach bei erhöhten Inflammationsparametern mit großer Wahrscheinlichkeit um sterile, low-grade Inflammationen, die klinisch zunächst nicht auffallen (Friedrichsen 2018). Beim Auswerten der Ergebnisse sollten dennoch einige Einschränkungen der Studie beachtet werden. Die gemessenen Fetuin-B Serumkonzentrationen zeigen eine hohe Streuung und Effekte lassen sich nicht deutlich zeigen. Die Fetuin-B Konzentrationen wurden im Labor anhand des ELISA nachgewiesen. Hier wurde vorausgesetzt, dass die Antikörper keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen aufweisen. Laut Hersteller sind die Fetuin-B Antikörper spezifisch für Fetuin-B und zeigen keine Kreuzreaktivitäten zu den beiden ähnlichen Proteinen humanem Cystatin-C und Fetuin-A (BioVendor GmbH 2014). Es wäre gegebenenfalls interessant, die Proben mit einem Western Blot zu überprüfen, um das Protein Fetuin-B über eine Gelelektrophorese spezifisch nachzuweisen. In vorherigen Studien zu Fetuin-B erfolgte die Proteinbestimmung jedoch ebenso ausschließlich über die ELISA-Methode. Auch wenn die Messungen stets nach Anleitung des Herstellers durchgeführt wurden, sind Messfehler nicht auszuschließen (BioVendor GmbH 2014). Für die umfangreiche Vergleichbarkeit dieser Studie mit anderen Studien des Forschungsbereiches wäre es nützlich gewesen, die Inflammasome und das Interleukin IL-1ß zusätzlich zur Genexpression über Proteinbestimmungsverfahren nachzuweisen.

Die Datenerhebung in dieser Studie erfolgte größtenteils aus Blutproben. Grund dafür war, dass der Fokus auf systemischen Erkrankungen lag und nicht nur auf dem Ovar. Zukünftige Forschungen könnten als Ergänzung eine Bestimmung der metabolischen und inflammatorischen Parameter aus Gewebeproben oder der Follikelflüssigkeit anstreben, um mögliche systemische, nicht metabolische Störeinflüsse des Körpers auf die Laborwerte zu minimieren.

Insgesamt gibt es viele Korrelationsstudien, die sich mit dem Einfluss metabolischer Dysbalancen und Übergewicht auf die Fertilität der Frau befassen (siehe Kapitel 3.7, 3.8). Hierbei ist anzumerken, dass Korrelationen keine kausalen Mechanismen darstellen, was wiederum die Aussagekraft der Ergebnisse mindert (Gehrau et al. 2022). In diese Studie wurden verschiedene Parameter miteinbezogen, da der unerfüllte Kinderwunsch einer Frau viele Ursachen haben kann (siehe Kapitel 1.1).

Die durchgeführte Studie kann demnach auch als eine grundlegende Exploration des Zusammenhangs zwischen metabolisch-inflammatorischen Dysbalancen und der Eizellqualität verstanden werden. Weitere Studien mit einer höheren Fallzahl, die eine differenzierte Bewertung von Einflüssen wie der Hormonbehandlung, Follikelpunktion oder Vorerkrankungen ermöglichen, werden gebraucht.

6.7 Klinische Relevanz der Arbeit

Insgesamt muss man positiv bewerten, dass der Zusammenhang zwischen Fetuin-B und der erfolgreichen Kinderwunschbehandlung in der untersuchten Gruppe der Frauen nicht korreliert. Aus dem Ergebnis folgt, dass diese Korrelation bei dem untersuchten Kollektiv mit einem durchschnittlichen BMI von 23 kg/m^2 nicht relevant für die Qualität der Eizellen ist. Jedoch widersprechen die Ergebnisse auch nicht dem Therapieansatz und der klinischen Erfahrung Frauen mit höherem BMI zunächst durch Gewichtsreduktion auf den Eingriff vorzubereiten und so den Behandlungserfolg positiv zu beeinflussen.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit signifikante Zusammenhänge zwischen Fetuin-B und metabolisch-inflammatorischen Parametern nachgewiesen werden. Der metabolische Einfluss auf Fetuin-B konnte auch in dieser Studie bestätigt werden. Ein immunmodulatorischer Einfluss von Fetuin-B konnte in dieser Arbeit weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden. Nach aktuellem Forschungsstand ist es wahrscheinlicher, dass der Anstieg von Fetuin-B und den inflammatorischen Parametern durch ähnliche Auslöser, wie metabolische Dysbalancen, ausgelöst wird.

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass Frauen mit einer niedrigen NLRC4-Genexpression im Serum eine signifikant höhere Eizellreifung aufweisen. In Zukunft kann dies als Anknüpfungspunkt für weitere Forschungsprojekte dienen und so einen neuen Ansatz für eine mögliche Prognosevorhersage von Kinderwunschbehandlungen darstellen. Weiterführende Untersuchungen könnten helfen, neue Therapiestrategien und prognostische Marker zu entwickeln. Fehlregulierte Inflammasome in Autoimmunerkrankungen spielen in der Forschung eine immer größere Rolle (Addobbati et al. 2018; Soares et al. 2019).

Dabei gibt es bereits Forschungen, die sich mit der spezifischen Inhibition verschiedener Inflammasome als Therapieoption beschäftigen (Sebastian-Valverde et al. 2021). Außerdem konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der NLRP3-Genexpression und der Fetuin-B Serumkonzentration nachgewiesen werden. Zukünftige Forschungen könnten sich mit der Fragestellung beschäftigen, ob Fetuin-B und das NLRP3 Inflammasom lediglich durch dieselben Auslöser aktiviert werden, oder ob sie auch einen gemeinsamen Signalweg besitzen.

Die Untersuchung der Fetuin-B Serumkonzentration könnte in der Praxis weiter standardisiert vorgenommen werden und der in dieser Studie entwickelte Arbeitsablauf dafür verwendet werden, um mit Zeit und mehr Patientinnen letztendlich eine statistisch besser abgesicherte Aussage zu machen. Es kann empfohlen werden, den BMI vor der Kinderwunschbehandlung weiterhin zu senken und mögliche metabolische Dysbalancen zu therapieren. Die Fetuin-B Serumkonzentration, die zu den Zeitpunkten dieser Studie (vor der Eizellentnahme, nach dem Embryotransfer) gemessen wird, ist als Parameter zur Vorhersage eines Behandlungserfolgs dann nicht nötig.

7. Zusammenfassung

In Deutschland bleibt etwa jedes zehnte Paar zwischen 25 und 45 Jahren mit Kinderwunsch kinderlos. Dabei können die Ursachen für unerfüllten Kinderwunsch bei beiden Geschlechtern liegen. Wie man den Erfolg einer ART-Behandlung (assistierte Reproduktionstechnologie) bei Frauen vorhersagen kann, ist bislang unklar. Es gibt Hinweise, dass Stoffwechselerkrankungen und entzündliche Zustände die Eizellqualität im ART-Setting beeinträchtigen können. Fetuin-B, ein Protein aus der Leber, spielt eine wichtige Rolle bei der Spermienbindung an die Zona pellucida in Mäusen und könnte auch im entzündlich-metabolischen Kontext von Bedeutung sein. Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen metabolischen Dysbalancen, systemischen Entzündungen und der Eizellqualität im ART-Setting zu untersuchen. Insbesondere wurde geprüft, ob Fetuin-B als Prognoseparameter für den Erfolg einer ART-Behandlung verwendet werden kann. Die Studie umfasste 56 Frauen, die zwischen Juni 2019 und April 2020 aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches die Reproduktionsklinik des Universitätsklinikums Aachen (UKA) aufsuchten. Blutproben wurden jeweils zwei Tage vor der Ovulationsinduktion (t1) und am Tag des Embryotransfers (t2) entnommen. Die Genexpression von Inflammasomen (NLRP2, NLRP3, NLRC4, AIM2) wurde mittels real-time PCR analysiert, die Fetuin-B-Serumkonzentrationen mittels ELISA gemessen. Weitere Parameter wurden im Zentrallabor des UKA bestimmt. Eizellreifung und Fertilisationsrate dienten als Fertilitätsindikatoren. Die Ergebnisse zeigten keine direkte Korrelation zwischen Fetuin-B und Fertilitätsparametern, jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen der Gesamtzahl entnommener Eizellen und Fetuin-B [t1: $p = 0.02$, t2: $p = 0.0008$]. Frauen mit einer Eizellreifung von 100% (MII-EZ/EZ gesamt) wiesen eine signifikant niedrigere NLRC4-Expression auf als Frauen mit einer Eizellreifung unter 70% [$p = 0.02$]. Fetuin-B korrelierte positiv mit CRP, Leukozyten, HOMA-Index und Triglyzeriden. Die periovulatorische Messung von Fetuin-B als Prognoseparameter für den ART-Erfolg scheint nicht indiziert. Es wird weiterhin empfohlen, metabolische Störungen vor einer ART-Behandlung zu therapieren und den BMI zu senken. Der Zusammenhang zwischen NLRC4-Expression und Eizellreifung könnte für zukünftige Forschungsprojekte relevant sein.

Literaturverzeichnis

Aboeldalyl, S., James, C., Seyam, E., Ibrahim, E. M., Shawki, H. E. , Amer, S.: The Role of Chronic Inflammation in Polycystic Ovarian Syndrome-A Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Mol Sci (2021), 22.

Addobbati, C., da Cruz, H. L. A., Adelino, J. E., Melo Tavares Ramos, A. L., Fragoso, T. S., Domingues, A., Branco Pinto Duarte, A. L., Oliveira, R. D. R., Louzada-Junior, P., Donadi, E. A., Pontillo, A., de Azevedo Silva, J., Crovella, S. , Sandrin-Garcia, P.: Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. Inflamm Res (2018), 67: 255-264.

Agarwal, A., Gupta, S. , Sharma, R.: Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. Reprod Biomed Online (2005), 11: 641-50.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N. , Tschopp, J.: NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. Immunity (2004), 20: 319-25.

Albrecht, H. 2022. Die Methode der kleinsten Quadrate. *Geometrie und GPS: Mathematische, physikalische und technische Grundlagen der Satellitenortung verständlich erklärt.* Springer.

Antuna-Puente, B., Disse, E., Rabasa-Lhoret, R., Laville, M., Capeau, J. , Bastard, J. P.: How can we measure insulin sensitivity/resistance? Diabetes Metab (2011), 37: 179-88.

Barton, M., Minotti, R. , Haas, E.: Inflammation and atherosclerosis. Circ Res (2007), 101: 750-1.

Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V. , Latz, E.: Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol (2009), 183: 787-91.

Bellver, J., Ayllón, Y., Ferrando, M., Melo, M., Goyri, E., Pellicer, A., Remohí, J. , Meseguer, M.: Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. Fertility and Sterility (2010), 93: 447-454.

Berendt, F.-J. N. 2007. *Proteomanalyse des bovinen Endometriums und zweier Oozytenstadien.* lmu.

Berg, A. H. , Scherer, P. E.: Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ Res (2005), 96: 939-49.

Betteridge, D. J.: What is oxidative stress? Metabolism (2000), 49: 3-8.

Biosystems, A. o.D. Essentials of Real Time PCR.

BioVendor GmbH: Quantitative Determination of human Fetuin-B. (2014), RD191172200R.

Bodewig, L.: Der Einfluss von hCG auf die systemische Immunmodulation (im Druck). (2023).

Boots, C. E. , Jungheim, E. S.: Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics. Semin Reprod Med (2015), 33: 270-5.

Brandl, A.: Entwicklung und Optimierung von PCR-Methoden zur Detektion und Identifizierung von brauereirelevanten Mikro-organismen zur Routine-Anwendung in Brauereien. (2006).

Bröker, B., Schütt, C. , Fleischer, B. 2019a. Immunmodulation. *In:* Bröker, B., Schütt, C. & Fleischer, B. (eds.) *Grundwissen Immunologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Bröker, B., Schütt, C., Fleischer, B. , VISUV.: Grundwissen Immunologie (2019b), Springer.
Brozek, J. , Keys, A.: The evaluation of leanness-fatness in man; norms and interrelationships. Br J Nutr (1951), 5: 194-206.
Burcelin, R., Thorens, B., Glauser, M., Gaillard, R. C. , Pralong, F. o. P.: Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. Endocrinology (2003), 144: 4484-4491.
Büscher, U., Chen, F., Kentenich, H. , Schmiady, H.: Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? Human reproduction (1999), 14: 162-166.
Buyuk, E., Asemota, O. A., Merhi, Z., Charron, M. J., Berger, D. S., Zapantis, A. , Jindal, S. K.: Serum and follicular fluid monocyte chemotactic protein-1 levels are elevated in obese women and are associated with poorer clinical pregnancy rate after in vitro fertilization: a pilot study. Fertil Steril (2017), 107: 632-640 e3.
Cakiroglu, Y., Vural, F. , Vural, B.: The inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: association with obesity and IVF outcomes. J Endocrinol Invest (2016), 39: 899-907.
Castellano, J. M., Roa, J., Luque, R. M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. , Tena-Sempere, M.: KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: Physiologic roles and putative physiopathological implications. Peptides (2009), 30: 139-145.
Castillo, J. C., Humaidan, P. , Bernabéu, R.: Pharmaceutical options for triggering of final oocyte maturation in ART. Biomed Res Int (2014), 2014: 580171.
Chen, G. Y. , Nunez, G.: Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol (2010), 10: 826-37.
Chen, G. Y. , Nuñez, G.: Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature Reviews Immunology (2010), 10: 826-837.
Chieri, R. A., Pivetta, O. H. , Foglia, V. G.: Altered ovulation pattern in experimental diabetes. Fertil Steril (1969), 20: 661-6.
Clark, M. F., Lister, R. M. , Bar-Joseph, M. 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology.* Academic Press.
Cleophas, T. J. , Zwinderman, A. H. 2016. Unpaired Continuous Data (Unpaired T-Test, Mann-Whitney, 20 Patients). *SPSS for Starters and 2nd Levelers.* Springer.
Codner, E. , Cassorla, F.: Puberty and ovarian function in girls with type 1 diabetes mellitus. Hormone Research in Paediatrics (2009), 71: 12-21.
Codner, E., Merino, P. M. , Tena-Sempere, M.: Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings. Hum Reprod Update (2012), 18: 568-85.
Collier, W. , Collier, W.: Die Standardabweichung. Einführung in die Variationsstatistik: Mit Besonderer Berücksichtigung der Biologie (1921): 62-63.
Committee, A. P.: Optimal evaluation of the infertile female. Journal (2000).
Cordes, T. 2020. Endokrine Kontrolle der Ovarfunktion. *Reproduktionsmedizin.* Springer.
Cousineau, T. M. , Domar, A. D.: Psychological impact of infertility. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology (2007), 21: 293-308.
Csak, T., Pillai, A., Ganz, M., Lippai, D., Petrasek, J., Park, J. K., Kodys, K., Dolganiuc, A., Kurt-Jones, E. A. , Szabo, G.: Both bone marrow-derived and

non-bone marrow-derived cells contribute to AIM2 and NLRP3 inflammasome activation in a MyD88-dependent manner in dietary steatohepatitis. Liver Int (2014), 34: 1402-13.
de Heredia, F. P., Gomez-Martinez, S. , Marcos, A.: Obesity, inflammation and the immune system. Proc Nutr Soc (2012), 71: 332-8.
De Nardo, D. , Latz, E.: NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. Trends Immunol (2011), 32: 373-9.
Depalo, R., Jayakrishan, K., Garruti, G., Totaro, I., Panzarino, M., Giorgino, F. , Selvaggi, L. E.: GnRH agonist versus GnRH antagonist in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). Reprod Biol Endocrinol (2012), 10: 26.
Deutsches IVF-Register, e. V.: D.I.R-Jahrbuch 2020. J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2021; 18 (Sonderheft 3), 1-60 (2021).
Diamanti-Kandarakis, E. , Dunaif, A.: Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. Endocr Rev (2012), 33: 981-1030.
Die ESHRE Leitliniengruppe zur ovariellen Stimulation: ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI. Human reproduction open (2020), 2020: hoaa009.
Die ESHRE-Arbeitsgruppe für Ultraschall in der ART: Empfehlungen für die gute Praxis bei der Ultraschalluntersuchung: Eizellenentnahme Hum Reprod Open (2019), 2019: hoz025.
Die ESHRE-Leitliniengruppe für gute Praxis in IVF-Laboren, De los Santos, M. J., Apter, S., Coticchio, G., Debrock, S., Lundin, K., Plancha, C. E., Prados, F., Rienzi, L. , Verheyen, G.: Überarbeitete Leitlinien für die gute Praxis in IVF-Laboren (2015). Human Reproduction (2016), 31: 685-686.
Dietzel, E., Wessling, J., Floehr, J., Schafer, C., Ensslen, S., Denecke, B., Rosing, B., Neulen, J., Veitinger, T., Spehr, M., Tropartz, T., Tolba, R., Renne, T., Egert, A., Schorle, H., Gottenbusch, Y., Hildebrand, A., Yiallouros, I., Stocker, W., Weiskirchen, R. , Jahnen-Dechent, W.: Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. Dev Cell (2013), 25: 106-12.
Dinarello, C. A.: Proinflammatory cytokines. Chest (2000), 118: 503-508.
Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Göss, C., Anz, D., Simanski, M., Gläser, R., Harder, J., Hornung, V., Gallo, R. L., Ruzicka, T., Besch, R. , Schauber, J.: Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. Sci Transl Med (2011), 3: 82ra38.
Donath, M. Y. , Shoelson, S. E.: Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nat Rev Immunol (2011), 11: 98-107.
Dunaif, A.: Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. Endocr Rev (1997), 18: 774-800.
Dunaif, A., Segal, K. R., Shelley, D. R., Green, G., Dobrjansky, A. , Licholai, T.: Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. Diabetes (1992), 41: 1257-66.
Duncan, J. A. , Canna, S. W.: The NLRC4 Inflammasome. Immunol Rev (2018), 281: 115-123.
Eckel, R. H., Grundy, S. M. , Zimmet, P. Z.: The metabolic syndrome. The Lancet (2005), 365: 1415-1428.
El-Ashmawy, H. M. , Ahmed, A. M.: Serum fetuin-B level is an independent marker for nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. Eur J Gastroenterol Hepatol (2019), 31: 859-864.
Erdmann, J., Kallabis, B., Oppel, U., Sypchenko, O., Wagenpfeil, S. , Schusdziarra, V.: Development of hyperinsulinemia and insulin resistance during the early

stage of weight gain. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism (2008), 294: E568-E575.
ESHRE/ASRM: Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Journal (2004) 19: 41-47.
Espey, L. L.: Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. Biol Reprod (1980), 22: 73-106.
Eunpu, D. L.: The impact of infertility and treatment guidelines for couples therapy. The American Journal of Family Therapy (1995), 23: 115-128.
Fang, L., Hu, X., Cui, L., Lv, P., Ma, X. , Ye, Y.: Serum and follicular fluid fetuin-B levels are correlated with fertilization rates in conventional IVF cycles. J Assist Reprod Genet (2019), 36: 1101-1107.
Farquhar, C. , Marjoribanks, J.: Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. Cochrane Database Syst Rev (2018), 8: CD010537.
Fedorcsak, P., Dale, P. O., Storeng, R., Ertzeid, G., Bjercke, S., Oldereid, N., Omland, A. K., Abyholm, T. , Tanbo, T.: Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. Hum Reprod (2004), 19: 2523-8.
Feingold, K. R., Soued, M., Staprans, I., Gavin, L. A., Donahue, M. E., Huang, B. J., Moser, A. H., Gulli, R. , Grunfeld, C.: Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. J Clin Invest (1989), 83: 1116-21.
Fenyo, I. M. , Gafencu, A. V.: The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. Immunobiology (2013), 218: 1376-1384.
Ferin, M., Jewelewicz, R. , Warren, M.: The menstrual cycle: physiology, reproductive disorders, and infertility (1993), Oxford University Press, USA.
Festa, A., D'Agostino Jr, R., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R. P. , Haffner, S. M.: Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). Circulation (2000), 102: 42-47.
Fica, S., Albu, A., Constantin, M. , Dobri, G. A.: Insulin resistance and fertility in polycystic ovary syndrome. J Med Life (2008), 1: 415-22.
Fillenberg, S. 2017. Der menstruelle Zyklus. *Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe.* Springer.
Floehr, J., Dietzel, E., Neulen, J., Rosing, B., Weissenborn, U. , Jahnen-Dechent, W.: Association of high fetuin-B concentrations in serum with fertilization rate in IVF: a cross-sectional pilot study. Hum Reprod (2016), 31: 630-7.
Fonseca, B. M., Pinto, B., Costa, L., Felgueira, E. , Rebelo, I.: Increased expression of NLRP3 inflammasome components in granulosa cells and follicular fluid interleukin(IL)-1beta and IL-18 levels in fresh IVF/ICSI cycles in women with endometriosis. J Assist Reprod Genet (2023), 40: 191-199.
Fontalba, A., Gutierrez, O. , Fernandez-Luna, J. L.: NLRP2, an inhibitor of the NF-κB pathway, is transcriptionally activated by NF-κB and exhibits a nonfunctional allelic variant. The Journal of Immunology (2007), 179: 8519-8524.
Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A., Kuffa, P., Suzuki, S., Shaw, M. H., Kim, Y. G. , Núñez, G.: NLRC4-driven production of IL-1β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. Nat Immunol (2012), 13: 449-56.
Friedrichsen, H.-P.: Silent Inflammation–stumme Entzündung. Erfahrungsheilkunde (2018), 67: 192-196.

Ganz, C.: Ganzheitliche Ansätze bei chronischen Erkrankungen. Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin/Swiss Journal of Integrative Medicine (2015), 27: 269-273.

Gehrau, V., Maubach, K. , Fujarski, S. 2022. Korrelationen. *Einfache Datenauswertung mit R.* Springer.

Ghaffarzad, A., Amani, R., Mehrzad Sadaghiani, M., Darabi, M. , Cheraghian, B.: Correlation of Serum Lipoprotein Ratios with Insulin Resistance in Infertile Women with Polycystic Ovarian Syndrome: A Case Control Study. Int J Fertil Steril (2016), 10: 29-35.

Gibson, U. E., Heid, C. A. , Williams, P. M.: A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res (1996), 6: 995-1001.

Gignac, G. E. , Szodorai, E. T.: Effect size guidelines for individual differences researchers. Personality and Individual Differences (2016), 102: 74-78.

Gonen, Y., Balakier, H., Powell, W. , Casper, R. F.: Use of gonadotropin-releasing hormone agonist to trigger follicular maturation for in vitro fertilization. J Clin Endocrinol Metab (1990), 71: 918-22.

Greuner, M. , Montag, M.: Morphological Selection of Gametes and embryos: 2PN/zygote. A practical guide to selecting gametes and embryos (2014), 2097.

Gutierrez, O., Pipaon, C. , Fernandez-Luna, J. L.: Ipaf is upregulated by tumor necrosis factor-alpha in human leukemia cells. FEBS Lett (2004), 568: 79-82.

Hall, D. M. , Cole, T. J.: What use is the BMI? Archives of disease in childhood (2006), 91: 283-286.

Hangen, R. S., Bodewig, L., Habib, P., Neulen, J. , Rösing, B.: Korrelation von Fetuin B mit der systemischen Immunmodulation in Kinderwunsch-Patientinnen. Geburtshilfe und Frauenheilkunde (2020), 80: P412.

Hauke, J. , Kossowski, T.: Comparison of values of Pearson's and Spearman's correlation coefficients on the same sets of data. Quaestiones geographicae (2011), 30: 87.

Hauner, H., Bosy-Westphal, A. , Müller, M. 2013. Definition–Klassifikation–Untersuchungsmethoden. *Adipositas.* Springer.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. , Williams, P. M.: Real time quantitative PCR. Genome Res (1996), 6: 986-94.

Hennige, A. M., Staiger, H., Wicke, C., Machicao, F., Fritsche, A., Haring, H. U. , Stefan, N.: Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. PLoS One (2008), 3: e1765.

Herder, C., Illig, T., Rathmann, W., Martin, S., Haastert, B., Muller-Scholze, S., Holle, R., Thorand, B., Koenig, W., Wichmann, H. E., Kolb, H. , Group, K. S.: Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. Gesundheitswesen (2005), 67 Suppl 1: S115-21.

Herrler, A. , Beier, H. M.: Die Beurteilung der Eizellreifung und frühen Embryonalentwicklung bei der assistierten Reproduktion. Reproduktionsmedizin (1998), 14: 131-142.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. , Watson, R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y) (1993), 11: 1026-30.

Hill, J. , Gilbert, R.: Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. Australian veterinary journal (2008), 86: 312-316.

Hölzle, C. 1989. Physische und psychische Belastung durch In-vitro-Fertilisation. *Management der Unfruchtbarkeit.* Springer.

Hourvitz, A., Machtinger, R., Maman, E., Baum, M., Dor, J. , Levron, J.: Assisted reproduction in women over 40 years of age: how old is too old? Reprod Biomed Online (2009), 19: 599-603.

Howard, B. V.: Insulin resistance and lipid metabolism. The American journal of cardiology (1999), 84: 28-32.

Humeidan, F. A. , Jank, A.: Bedeutung der morphologischen Analyse von Eizellen und Embryonen in der Reproduktionsmedizin. Frauenheilkunde up2date (2012), 6: 273-284.

Iborra, A., Palacio, J. R. , Martínez, P.: Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman. Immunology of Gametes and Embryo Implantation (2005), 88: 150-162.

Ix, J. H., Wassel, C. L., Kanaya, A. M., Vittinghoff, E., Johnson, K. C., Koster, A., Cauley, J. A., Harris, T. B., Cummings, S. R. , Shlipak, M. G.: Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. Jama (2008), 300: 182-8.

Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., Eisenbarth, S. C., Florquin, S., Flavell, R. A. , Leemans, J. C.: Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. Proceedings of the National Academy of Sciences (2009), 106: 20388-20393.

Jarry, H. , Hinney, B.: Endo – und parakrine Regulation der LH – und Prolaktinsekretion der Adenohypophyse. Reproduktionsmedizin (1998), 14: 106-114.

Joost, H., Giesen, K., Kluge, R., Ortlepp, J. , Plum, L.: Insulinresistenz und metabolisches syndrom. Zeitschrift für Kardiologie (2000), 89: 377-382.

Jungheim, E. S., Schon, S. B., Schulte, M. B., DeUgarte, D. A., Fowler, S. A. , Tuuli, M. G.: IVF outcomes in obese donor oocyte recipients: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod (2013), 28: 2720-7.

Karge, W. H., Schaefer, E. J. , Ordovas, J. M. 1998. Quantification of mRNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) Using an Internal Standard and a Nonradioactive Detection Method. *In:* Ordovas, J. M. (ed.) *Lipoprotein Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press.

Kearns, A. M., Seiders, P. R., Wheeler, J., Freeman, R. , Steward, M.: Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. Journal of Hospital Infection (1999), 43: 33-37.

Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. , He, Y.: The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. Int J Mol Sci (2019), 20.

Kershaw, E. E. , Flier, J. S.: Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab (2004), 89: 2548-56.

Khovidhunkit, W., Kim, M. S., Memon, R. A., Shigenaga, J. K., Moser, A. H., Feingold, K. R. , Grunfeld, C.: Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. J Lipid Res (2004), 45: 1169-96.

Kissin, D. M., Kulkarni, A. D., Kushnir, V. A. , Jamieson, D. J.: Number of embryos transferred after in vitro fertilization and good perinatal outcome. Obstet Gynecol (2014), 123: 239-247.

Kitamura, H., Kimura, S., Shimamoto, Y., Okabe, J., Ito, M., Miyamoto, T., Naoe, Y., Kikuguchi, C., Meek, B., Toda, C., Okamoto, S., Kanehira, K., Hase, K., Watarai, H., Ishizuka, M., El-Osta, A., Ohara, O. , Miyoshi, I.: Ubiquitin-specific protease 2-69 in macrophages potentially modulates metainflammation. FASEB J (2013), 27: 4940-53.

Klüppelholz, B., Thorand, B., Koenig, W., de Las Heras Gala, T., Meisinger, C., Huth, C., Giani, G., Franks, P. W., Roden, M., Rathmann, W., Peters, A. , Herder,

C.: Association of subclinical inflammation with deterioration of glycaemia before the diagnosis of type 2 diabetes: the KORA S4/F4 study. Diabetologia (2015), 58: 2269-77.

Koenderman, L., Buurman, W. , Daha, M. R.: The innate immune response. Immunol Lett (2014), 162: 95-102.

Kolb, H. , Mandrup-Poulsen, T.: An immune origin of type 2 diabetes? Diabetologia (2005), 48: 1038-1050.

Kopp, A., Gross, P., Falk, W., Bala, M., Weigert, J., Buechler, C., Neumeier, M., Scholmerich, J. , Schaffler, A.: Fatty acids as metabolic mediators in innate immunity. Eur J Clin Invest (2009), 39: 924-33.

Kudesia, R., Wu, H., Hunter Cohn, K., Tan, L., Lee, J. A., Copperman, A. B. , Yurttas Beim, P.: The effect of female body mass index on in vitro fertilization cycle outcomes: a multi-center analysis. J Assist Reprod Genet (2018), 35: 2013-2023.

Kühlmeyer, M. 1970. Der Variationskoeffizient einer Stichprobe. *Die nichtzentrale t-Verteilung.* Springer.

Kumar, H., Kawai, T. , Akira, S.: Pathogen Recognition by the Innate Immune System. International Reviews of Immunology (2011), 30: 16-34.

Latz, E., Xiao, T. S. , Stutz, A.: Activation and regulation of the inflammasomes. Nat Rev Immunol (2013), 13: 397-411.

Lebovitz, H.: Insulin resistance: definition and consequences. Experimental and clinical endocrinology & diabetes (2001), 109: S135-S148.

Leong, K. S. , Wilding, J. P.: Obesity and diabetes. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism (1999), 13: 221-237.

Li, P., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Lagakos, W. S., Talukdar, S., Osborn, O., Johnson, A., Chung, H., Maris, M., Ofrecio, J. M., Taguchi, S., Lu, M. , Olefsky, J. M.: LTB4 promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. Nat Med (2015), 21: 239-247.

Livak, K. J. , Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (2001), 25: 402-8.

Ma, X., Dong, Y., Matzuk, M. M. , Kumar, T. R.: Targeted disruption of luteinizing hormone β-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. Proceedings of the National Academy of Sciences (2004), 101: 17294-17299.

Mackay, I. M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect (2004), 10: 190-212.

Maheshwari, A., Stofberg, L. , Bhattacharya, S.: Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review. Human Reproduction Update (2007), 13: 433-444.

Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M. , Dixit, V. M.: Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature (2006), 440: 228-32.

Marnell, L., Mold, C. , Du Clos, T. W.: C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. Clinical immunology (2005), 117: 104-111.

Marquard, K. L., Stephens, S. M., Jungheim, E. S., Ratts, V. S., Odem, R. R., Lanzendorf, S. , Moley, K. H.: Polycystic ovary syndrome and maternal obesity affect oocyte size in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril (2011), 95: 2146-9, 2149 e1.

Martí, A., Marcos, A. , Martínez, J. A.: Obesity and immune function relationships. Obes Rev (2001), 2: 131-40.

Martinon, F., Burns, K. , Tschopp, J.: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell (2002), 10: 417-26.

Matli, B. 2020. *Homa-Index in einer bevölkerungsbasierten Kohorte – Verteilung mit Einflussgrößen.*

Matsuda, M. , DeFronzo, R. A.: Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. Diabetes Care (1999), 22: 1462-1470.

Meex, R. C., Hoy, A. J., Morris, A., Brown, R. D., Lo, J. C., Burke, M., Goode, R. J., Kingwell, B. A., Kraakman, M. J., Febbraio, M. A., Greve, J. W., Rensen, S. S., Molloy, M. P., Lancaster, G. I., Bruce, C. R. , Watt, M. J.: Fetuin B Is a Secreted Hepatocyte Factor Linking Steatosis to Impaired Glucose Metabolism. Cell Metab (2015), 22: 1078-89.

Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O. D., Fryer, L. G. D., Müller, C., Carling, D. , Kahn, B. B.: Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature (2002), 415: 339-343.

Morrison, T. B., Weis, J. J. , Wittwer, C. T.: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques (1998), 24: 954-8, 960, 962.

Müller, H.-J. , Prange, D. R.: PCR-Polymerase-Kettenreaktion (2016), Springer.

Müller, M., Bosy-Westphal, A., Hitze, B., Postler, J., Kossel, E. , Pfeuffer, M.: Insulinresistenz. Aktuelle Ernährungsmedizin (2007), 32: 167-174.

Müller-Esterl, W. 2018. Hormonelle Steuerung komplexer Systeme. *Biochemie.* Springer.

Mullis, K. B.: The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American (1990), 262: 56-65.

Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., White, L. R., Clark, S. A., Ross, P. J., Parks, R. J. , Tschopp, J.: The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. Nature (2008), 452: 103-7.

Nachar, N.: The Mann-Whitney U: A test for assessing whether two independent samples come from the same distribution. Tutorials in quantitative Methods for Psychology (2008), 4: 13-20.

Nauck, M., Petermann, A., Müller-Wieland, D., Kerner, W., Müller, U. A., Landgraf, R., Freckmann, G. , Heinemann, L.: Definition, klassifikation und diagnostik des diabetes mellitus. Diabetologie und Stoffwechsel (2017), 12: S94-S100.

Navarro-Pando, J. M., Alcocer-Gómez, E., Castejón-Vega, B., Navarro-Villarán, E., Condés-Hervás, M., Mundi-Roldan, M., Muntané, J., Pérez-Pulido, A. J., Bullon, P. , Wang, C.: Inhibition of the NLRP3 inflammasome prevents ovarian aging. Science advances (2021), 7: eabc7409.

Navot, D., Bergh, P. A., Williams, M. A., Garrisi, G. J., Guzman, I., Sandler, B. , Grunfeld, L.: Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. Lancet (1991), 337: 1375-7.

Nelson, S. M. , Lawlor, D. A.: Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: a prospective study of 144,018 treatment cycles. PLoS medicine (2011), 8: e1000386.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T. , Nagai, R.: CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat Med (2009), 15: 914-20.

Nteeba, J., Ganesan, S. , Keating, A. F.: Progressive obesity alters ovarian folliculogenesis with impacts on pro-inflammatory and steroidogenic signaling in female mice. Biol Reprod (2014), 91: 86.

Nteeba, J., Ortinau, L. C., Perfield, J. W., 2nd , Keating, A. F.: Diet-induced obesity alters immune cell infiltration and expression of inflammatory cytokine genes in mouse ovarian and peri-ovarian adipose depot tissues. Mol Reprod Dev (2013), 80: 948-58.

Nugent, D., Vanderkerchove, P., Hughes, E., Arnot, M. , Lilford, R.: WITHDRAWN: Gonadotrophin therapy for ovulation induction in subfertility associated with polycystic ovary syndrome. Cochrane Database Syst Rev (2015): Cd000410.

Olivier, E., Soury, E., Ruminy, P., Husson, A., Parmentier, F., Daveau, M. , Salier, J.-P.: Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. Biochemical Journal (2000), 350.

Orellana-Guerrero, D., Dini, P., Santos, E., de la Fuente, A., Meyers, S., Koshak, S. , Dujovne, G.: Effect of transvaginal aspiration of oocytes on blood and peritoneal fluid parameters in mares. Journal of Equine Veterinary Science (2022), 114: 103949.

Ou, H. Y., Yang, Y. C., Wu, H. T., Wu, J. S., Lu, F. H. , Chang, C. J.: Increased fetuin-A concentrations in impaired glucose tolerance with or without nonalcoholic fatty liver disease, but not impaired fasting glucose. J Clin Endocrinol Metab (2012), 97: 4717-23.

Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S. S. , Bhattacharya, S.: Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. Nat Med (2012), 18: 1279-85.

Pandian, Z., Akande, V. A., Harrild, K. , Bhattacharya, S.: Surgery for tubal infertility. Cochrane Database of Systematic Reviews (2008).

Parhofer, K. , Wu, L.: Pathogenese und Bedeutung der diabetischen Dyslipidämie. Der Diabetologe (2019), 15: 7-12.

Pedersen, K. O.: Fetuin, a new globulin isolated from serum. Nature (1944), 154: 575-575.

Pereira, S. S. , Alvarez-Leite, J. I.: Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. Curr Obes Rep (2014), 3: 422-31.

Peter, A., Kovarova, M., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Konigsrainer, A., Konigsrainer, I., Schleicher, E., Fritsche, A., Haring, H. U. , Stefan, N.: The hepatokines fetuin-A and fetuin-B are upregulated in the state of hepatic steatosis and may differently impact on glucose homeostasis in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab (2018), 314: E266-E273.

Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research (2001), 29: e45-e45.

Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D. , Burt, D.: NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. Diabetologia (1997), 40: 1286-92.

Poretsky, L., Cataldo, N. A., Rosenwaks, Z. , Giudice, L. C.: The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr Rev (1999), 20: 535-82.

Qu, H., Qiu, Y., Wang, Y., Liao, Y., Zheng, Y. , Zheng, H.: Plasma fetuin-B concentrations are associated with insulin resistance and first-phase glucose-stimulated insulin secretion in individuals with different degrees of glucose tolerance. Diabetes Metab (2018), 44: 488-492.

Quabbe, H. J.: Modifikation der radioimmunologischen Insulinbestimmung nach Hales und Randle. Diabetologia (1969), 5: 101-107.

Raschke, S., Eckardt, K., Bjorklund Holven, K., Jensen, J. , Eckel, J.: Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. PLoS One (2013), 8: e62008.

Razali, N. M. , Wah, Y. B.: Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. Journal of statistical modeling and analytics (2011), 2: 21-33.

Reaven, G. M.: The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. Annual review of nutrition (2005), 25: 391.

Rebar, R. W.: Techniken der assistierten Reproduktion. MSD Manual (2019), Januar 2019.

Reed, G. F., Lynn, F. , Meade, B. D.: Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. Clinical and Vaccine Immunology (2002), 9: 1235-1239.

Reed, G. H. , Wittwer, C. T.: Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. Clin Chem (2004), 50: 1748-54.

Rensing, L. , Rippe, V.: Altern: zelluläre und molekulare Grundlagen, körperliche Veränderungen und Erkrankungen, Therapieansätze (2013), Springer-Verlag.

Rich, S. S.: Mapping Genes in Diabetes: Genetic Epidemiological Perspective. Diabetes (1990), 39: 1315-1319.

Rich-Edwards, J. W., Spiegelman, D., Garland, M., Hertzmark, E., Hunter, D. J., Colditz, G. A., Willett, W. C., Wand, H. , Manson, J. E.: Physical activity, body mass index, and ovulatory disorder infertility. Epidemiology (2002), 13: 184-90.

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. , Wittwer, C. T.: Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. Analytical Biochemistry (1997), 245: 154-160.

Robker, R. L., Akison, L. K., Bennett, B. D., Thrupp, P. N., Chura, L. R., Russell, D. L., Lane, M. , Norman, R. J.: Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2009), 94: 1533-1540.

Robker, R. L., Wu, L. L. , Yang, X.: Inflammatory pathways linking obesity and ovarian dysfunction. J Reprod Immunol (2011), 88: 142-8.

Romberg, N., Vogel, T. P. , Canna, S. W.: NLRC4 inflammasomopathies. Current opinion in allergy and clinical immunology (2017), 17: 398.

Rost, R. 1992. Fettstoffwechselstörungen als Teil des metabolischen Syndroms. *Bewegungstips bei erhöhten Blutfettwerten.* Springer.

Sakumoto, T., Tokunaga, Y., Tanaka, H., Nohara, M., Motegi, E., Shinkawa, T., Nakaza, A. , Higashi, M.: Insulin resistance/hyperinsulinemia and reproductive disorders in infertile women. Reproductive medicine and biology (2010), 9: 185-190.

Saleh, A. A. E. W., Amin, E. M., Elfallah, A. A. , Hamed, A. M.: Insulin resistance and idiopathic infertility: A potential possible link. Andrologia (2020), 52: e13773.

Salvi, R., Castillo, E., Voirol, M.-J., Glauser, M., Rey, J.-P., Gaillard, R. C., Vollenweider, P. , Pralong, F. o. P.: Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. Endocrinology (2006), 147: 816-826.

Sarapik, A., Velthut, A., Haller-Kikkatalo, K., Faure, G. C., Bene, M. C., de Carvalho Bittencourt, M., Massin, F., Uibo, R. , Salumets, A.: Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. Clin Dev Immunol (2012), 2012: 606459.

Sarhan, A. , Muasher, S. J.: Surgical complications of in vitro fertilization. Middle East Fertility Society Journal (2007), 12: 1-7.

Sasaki, H., Hamatani, T., Kamijo, S., Iwai, M., Kobanawa, M., Ogawa, S., Miyado, K. , Tanaka, M.: Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. Front Endocrinol (Lausanne) (2019), 10: 811.

Schienkiewitz, A., Mensink, G., Kuhnert, R. , Lange, C.: Übergewicht und adipositas bei erwachsenen in deutschland. (2017).

Schmid, J., Kirchengast, S., Vytiska-Binstorfer, E. , Huber, J.: Infertility caused by PCOS—health-related quality of life among Austrian and Moslem immigrant women in Austria. Human Reproduction (2004), 19: 2251-2257.

Schoiswohl, S. G.: Der Thr164Ile-Polymorphismus des humanen β2-adrenergen Rezeptorgens bei systemischer Meningokokkenerkrankung. (o.D.).

Sebastian-Valverde, M., Wu, H., Al Rahim, M., Sanchez, R., Kumar, K., De Vita, R. J. , Pasinetti, G. M.: Discovery and characterization of small-molecule inhibitors of NLRP3 and NLRC4 inflammasomes. J Biol Chem (2021), 296: 100597.

Seber, G. A. , Lee, A. J.: Linear regression analysis (2012), John Wiley & Sons.

Sell, H., Dietze-Schroeder, D. , Eckel, J.: The adipocyte–myocyte axis in insulin resistance. Trends in Endocrinology & Metabolism (2006), 17: 416-422.

Shapiro, S. S. , Wilk, M. B.: An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika (1965), 52: 591-611.

Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H. , Flier, J. S.: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest (2006), 116: 3015-25.

Shi, J., Fan, J., Su, Q. , Yang, Z.: Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. Front Endocrinol (Lausanne) (2019), 10: 703.

Shorakae, S., Teede, H., de Courten, B., Lambert, G., Boyle, J. , Moran, L. J.: The Emerging Role of Chronic Low-Grade Inflammation in the Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. Semin Reprod Med (2015), 33: 257-69.

Simon-Vermot, I. , Keller, U.: Folgen und Komplikationen der Adipositas. Therapeutische Umschau (2000): 493-497.

Skaznik-Wikiel, M. E., Swindle, D. C., Allshouse, A. A., Polotsky, A. J. , McManaman, J. L.: High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice. Biol Reprod (2016), 94: 108.

Skeldon, A. M., Faraj, M. , Saleh, M.: Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. Immunology and cell biology (2014), 92: 304-313.

Smacklon, N. , Fauser, B. C.: Regulation of follicle development and novel approaches to ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod Update (2000), 6: 307-12.

Smith, S., Pfeifer, S. M. , Collins, J. A.: Diagnosis and Management of Female Infertility. JAMA (2003), 290: 1767-1770.

Soares, J. L., Oliveira, E. M. , Pontillo, A.: Variants in NLRP3 and NLRC4 inflammasome associate with susceptibility and severity of multiple sclerosis. Mult Scler Relat Disord (2019), 29: 26-34.

Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H. , Pfeiffer, A. F.: Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective

Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. Diabetes (2003), 52: 812-7.
Strowitzki, T.: Indikationsbereiche IVF bs. ICSI. Der Gynäkologe (2000), 11: 777-781.
Sutterwala, F. S., Haasken, S. , Cassel, S. L.: Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. Ann N Y Acad Sci (2014), 1319: 82-95.
Symons, L. K., Miller, J. E., Kay, V. R., Marks, R. M., Liblik, K., Koti, M. , Tayade, C.: The Immunopathophysiology of Endometriosis. Trends in Molecular Medicine (2018), 24: 748-762.
Szalai, A. J., van Ginkel, F. W., Dalrymple, S. A., Murray, R., McGhee, J. R. , Volanakis, J. E.: Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice. J Immunol (1998), 160: 5294-9.
te Velde, E. R., Nieboer, D., Lintsen, A. M., Braat, D. D., Eijkemans, M. J., Habbema, J. D. , Vergouwe, Y.: Comparison of two models predicting IVF success; the effect of time trends on model performance. Hum Reprod (2014), 29: 57-64.
Templeton, A., Morris, J. K. , Parslow, W.: Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. The Lancet (1996), 348: 1402-1406.
Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. , Heinen, E.: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. Journal of Biotechnology (1999), 75: 291-295.
Thermo Fisher Scientific Inc.: Real-Time PCR: Understanding Ct-Value. (2016).
Tilburgs, T., Meissner, T. B., Ferreira, L. M. R., Mulder, A., Musunuru, K., Ye, J. , Strominger, J. L.: NLRP2 is a suppressor of NF-ƙB signaling and HLA-C expression in human trophoblasts†,‡. Biology of Reproduction (2017), 96: 831-842.
Tsilchorozidou, T., Overton, C. , Conway, G. S.: The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) (2004), 60: 1-17.
Van Furth, R.: Current View on the Mononuclear Phagocyte System. Immunobiology (1982), 161: 178-185.
van Loendersloot, L., Repping, S., Bossuyt, P. M., van der Veen, F. , van Wely, M.: Prediction models in in vitro fertilization; where are we? A mini review. J Adv Res (2014), 5: 295-301.
Vandanmagsar, B., Youm, Y. H., Ravussin, A., Galgani, J. E., Stadler, K., Mynatt, R. L., Ravussin, E., Stephens, J. M. , Dixit, V. D.: The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. Nat Med (2011), 17: 179-88.
Volkert, D.: Der Body-Mass-Index (BMI)-ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Ernährungszustands. Aktuelle Ernährungsmedizin (2006), 31: 126-132.
Wang, D., Weng, Y., Zhang, Y., Wang, R., Wang, T., Zhou, J., Shen, S., Wang, H. , Wang, Y.: Exposure to hyperandrogen drives ovarian dysfunction and fibrosis by activating the NLRP3 inflammasome in mice. Science of The Total Environment (2020), 745: 141049.
Wang, H., Zhang, Y., Fang, X., Kwak-Kim, J. , Wu, L.: Insulin Resistance Adversely Affect IVF Outcomes in Lean Women Without PCOS. Front Endocrinol (Lausanne) (2021), 12: 734638.
Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. , Ferrante, A. W.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. Journal of Clinical Investigation (2003a), 112: 1796-1808.
Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. , Ferrante, A. W., Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest (2003b), 112: 1796-808.

Weltgesundheitsorganisation: Obesity: preventing and managing the global epidemic. (2000).

Wilcox, A. J., Weinberg, C. R. , Baird, D. D.: Timing of sexual intercourse in relation to ovulation—effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. New England Journal of Medicine (1995), 333: 1517-1521.

Wildman, R. P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A. P., Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J. , Sowers, M. R.: The Obese Without Cardiometabolic Risk Factor Clustering and the Normal Weight With Cardiometabolic Risk Factor Clustering: Prevalence and Correlates of 2 Phenotypes Among the US Population (NHANES 1999-2004). Archives of Internal Medicine (2008), 168: 1617-1624.

Wintermantel, T. M., Campbell, R. E., Porteous, R., Bock, D., Gröne, H.-J., Todman, M. G., Korach, K. S., Greiner, E., Pérez, C. A., Schütz, G. , Herbison, A. E.: Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility. Neuron (2006), 52: 271-280.

Woolson, R. F.: Wilcoxon signed-rank test. Wiley encyclopedia of clinical trials (2007): 1-3.

Xu, H., Schultze-Mosgau, A., Agic, A., Diedrich, K., Taylor, R. N. , Hornung, D.: Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril (2006), 86: 1616-20.

Yakut, E.: Caspase-1 abhängige-/unabhängige Freisetzung von Interleukin-1β (IL-1β) durch Einsatz der experimentellen Photopherese. (2013).

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L. , van der Poel, S.: The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017†‡§. Human Reproduction (2017), 32: 1786-1801.

Zhang, R., Cheng, F., Cheng, W., Wang, X., Zhang, B., Tian, M., Li, K. , Liu, D.: The Relationships among Plasma Fetuin-B, Thyroid Autoimmunity, and Fertilization Rate In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Int J Endocrinol (2022), 2022: 9961253.

Zhao, Y., Xia, Z., Lin, T. , Yin, Y.: Significance of hub genes and immune cell infiltration identified by bioinformatics analysis in pelvic organ prolapse. PeerJ (2020), 8: e9773.

Zhu, K., Wang, Y., Shu, P., Zhou, Q., Zhu, J., Zhou, W., Du, C., Xu, C., Liu, X. , Tang, L.: Increased serum levels of fetuin B in patients with coronary artery disease. Endocrine (2017), 58: 97-105.

Zimmermann, J. , Biakowski, A. 2020. Beratung bei ungewollter Kinderlosigkeit. *Interkulturelle Kommunikation in der Medizin.* Springer.

Zoe, R.: Causes of infertility in women at reproductive age. Health science journal (2009), 3: 0-0.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Entstehung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Joseph Neulen, für seine wertvolle Betreuung und Engagement. Durch seine Expertise, sein kritisches Feedback und seine kontinuierliche Unterstützung konnte ich viele Hürden überwinden und wertvolle wissenschaftliche Fortschritte erzielen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Betreuern, Herrn Dr. med. Benjamin Rösing und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Pardes Habib, für ihre geduldige Unterstützung und ihre stets hilfreichen Ratschläge. Sie haben maßgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit entstehen konnte, und standen mir bei fachlichen und organisatorischen Herausforderungen immer zur Seite.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. Weißenborn sowie den Mitarbeitenden des IVF-Labors für die Erhebung und Bereitstellung der Daten zur Fertilität bedanken, die eine zentrale Grundlage dieser Arbeit bilden. Ebenso danke ich den Mitarbeitenden des neurologischen Labors für ihre fachliche Unterstützung bei der Durchführung der ELISA-Analysen.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meiner Mitdoktorandin Lena Bodewig, die mir freundlicherweise ihre Daten zur Verfügung gestellt hat. Ihr Beitrag hat diese Arbeit entscheidend vorangebracht.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für ihre stetige Unterstützung danken. Ihr Zuspruch hat mir immer wieder neue Energie gegeben und mich durch die herausfordernden Phasen getragen. Ohne eure Rückendeckung und euren Glauben an mich wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen.

Erklärung zur Datenaufbewahrung

gemäß § 5 Abs. 1

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Aachen

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung über den Eigenanteil

gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Sara Gabriela Hangen Rodriguez,** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Korrelation von Fetuin-B mit der systemischen Immunmodulation in Kinderwunsch-Patientinnen**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:
Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	HANGEN RODRIGUEZ (DOKTORAN-DIN)	BODEWIG (MITDOKTO RANDIN)	DR. MED. RÖSING (BETREUER)	PRIV.-DOZ. DR. MED. DR. RER. NAT. HABIB (BETREUER)	DR. RER. NAT. WEIßENBERG (EMBRYOLOGIN)	UNIV-PROF. DR. MED. NEULEN (DOKTOR-VATER)	ZENTRAL-LABOR UKA	SUMME (%)
STUDIENÜBER-WACHUNG			55	25	10	10		100
STUDIENDESIGN/ KONZEPTION	20		50			30		100
UNTERSUCHUNG DER PROBANDEN	30	30	40					100
BLUTABNAHME	50	50						100
AUSWERTUNG LABORPARAMETER							100	100
DURCHFÜHRUNG + DATENAUSWER-TUNG ELISA	80			20				100
DURCHFÜHRUNG + DATENAUSWER-TUNG REAL TIME PCR		80		20				100
DURCHFÜHRUNG IVF-BEHANDLUNG + DATENERFASSUNG FERTILITÄTSPARA-METER			35		30	35		
STATISTISCHE AUSWERTUNG	100							100
BEREITSTELLUNG VON MATERIALIEN			50	50				100
INTERPRETATION DER DATENAUSWERT-UNG	50		20	10		20		100