Die Rolle des Fetuin-B im menschlichen Fertilisationsprozess

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Janina Krebs

aus
Moers

Berichter: Univ.-Prof. Dr. med. Joseph Neulen
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Jahnen-Dechent

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2024

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Für meine Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung 6
1.1 Besteht ein Zusammenhang zwischen Fetuin-B und der Fertilisation? 6
1.2 Die Fetuine A und B 6
1.3 Fetuin-B ist essenziell für die Fertilisation 7
1.4 Synthese- und Wirkort des Fetuin-B 8
1.5 Ovastacin wird durch Fetuin-B inhibiert 9
1.6 Die Zona pellucida; eine wichtige Struktur im Fertilisationsprozess 10
1.7 Fetuin-B als möglicher Prognosemarker in der Reproduktionsmedizin 12
1.8 Fetuin-B außerhalb der Reproduktionsmedizin 12
1.9 Definition der Infertilität 13
1.10 Durchschnittliche Fertilisationsraten unter einer ART-Therapie 14
1.11 ART- allgemeines Prozedere 15
1.12 Steigende Anzahl an ART-Therapien 16
2) Zielsetzung 17
3) Methoden und Datengewinnung 18
3.1 Ethikerklärung 18
3.2 Studiendesign 18
3.3 Das Untersuchungskollektiv 20
3.4 Der Untersuchungsablauf 21
3.4.1 Durchführung der Therapie 21
3.4.2 Bestimmung der Fetuin-B Werte 22
3.4.3 Die Follikelpunktion 22
3.4.4 Die Befruchtung der Eizelle 23
3.4.5 Das Follow-up 24
3.5 Statistische Methoden 24
4) Ergebnisse 28
4.1 Übersicht 28
4.2 Fetuin-B zeigt eine Anstiegsdynamik 33
4.3 Fetuin-B steigt bei einem Fertilisationsversagen nicht an 34
4.4 Estradiol steigt unter Stimulation signifikant an 35
4.5 Fetuin-B korreliert negativ mit den Fertilisationsraten 36
4.6 Fetuin-B ist nicht mit einem Schwangerschaftseintritt assoziiert 38
4.7 Die Fetuin-B Werte stehen in *keinem* Zusammenhang mit der Dicke der Zona pellucida 38
4.8 Die Zona pellucida Dicke ist nicht mit den Fertilisationsraten assoziiert 39
4.9 Einflüsse des Alters auf den Reproduktionsvorgang 40
4.10 Keine Assoziation der Fetuin-B Werte mit dem Body-Mass-Index (BMI) 42

4.11 Zusammenhang der Infertilitätsätiologie mit den Fertilitätsraten? 43
4.12 Keine Beeinflussung der Fetuin-B Werte durch Nikotinkonsum 44
4.13 Keine Beeinflussung der Fetuin-B Werte durch ein PCOS 44
5) Diskussion 46
5.1 Fetuin-B Dynamik 46
5.2 Adäquater Estradiolanstieg unter hormoneller Stimulation 47
5.3 Fetuin-B korreliert negativ mit Fertilisationsraten 47
5.4 Fetuin-B als biologischer Prognosemarker 49
5.5 Einfluss der Fetuin-B Werte auf die Schwangerschaftsraten 50
5.6 Zusammenhang zwischen der Zona pellucida Dicke und den Fertilisationsraten 50
5.7 Der Einfluss des Alters auf die Fertilisationsraten 51
5.8 Der BMI-Wert ist nicht mit den Fetuin-B Werten assoziiert 52
5.9 Die Fetuin-B Werte unterscheiden sich je nach vorliegender Infertilitätsursache (primär vs. sekundär) 53
5.10 Der Nikotinkonsum beeinflusst die Fetuin-B Werte nicht 54
5.11 Ein PCOS nimmt keinen Einfluss auf die Fertilisationsraten 55
5.12 Der Einfluss des Therapieverfahrens (ICSI-/IVF-Therapie) auf die Fertilisationsraten 56
5.13 Diskussion der Methodik 57
6) Zusammenfassung und Ausblick 59
7) Literaturverzeichnis 60
8) Anhang 69
Danksagung 69

Abkürzungsverzeichnis

ART	Assistierte Reproduktionstechniken
ASO	Antisense-Oligonukleotid
BMI	Body-Mass-Index
CKD	chronic kidney disease
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESchG	Embryonenschutzgesetz
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
ET	Embryonentransfer
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-releasing-Hormon (Gonadorelin)
hCG	Humanes Choriongonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IL-6	Interleukin-6
IVF	In-vitro-Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
OAT	Oligo-Astheno-Teratozoospermie
PCOS	Polyzystisches ovarielles Syndrom
TFR	Totale Fertilitätsrate
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
ZP 1-4	Zona pellucida Proteine

1) Einleitung

1.1 Besteht ein Zusammenhang zwischen Fetuin-B und der Fertilisation?

Diese Dissertationsschrift analysiert die Rolle des Proteins Fetuin-B in der Reproduktionsmedizin. Als Kriterium hierfür, dient die Assoziation zwischen der Fetuin-B-Konzentration im Serum und der Fertilisation (Befruchtung).
In experimentellen Studien konnte dem Fetuin-B als Inhibitor des Ovastacin eine, für den Fertilisationsprozess essenzielle Bedeutung, zugeschrieben werden (Dietzel et al. 2017;Dietzel et al. 2013;Floehr et al. 2017;Stocker et al. 2014).
Eine Pilotstudie aus dem Jahr 2006 stellte einen positiven Zusammenhang zwischen ansteigenden Fetuin-B Serumkonzentrationen und den Fertilisationsraten während einer IVF-Therapie bei 25 Patientinnen dar (Floehr et al. 2016). Inwieweit diese Ergebnisse auf ein größeres Patientenkollektiv übertragbar sind und ob es Faktoren gibt, die, die Fetuin-B Werte und Fertilisationen beeinflussen, wird in dieser Dissertation untersucht.

1.2 Die Fetuine A und B

Die Gruppe der Fetuine wurde erstmals 1944 in fetalen Kälberseren entdeckt (Pedersen 1944). Aufgrund dessen kam es auch zur Namensgebung „Fetuin“, abgeleitet von dem lateinischen Wort Fetus.
Der Syntheseort der Fetuine liegt in der Leber. Fetuine sind nicht hormonelle Plasma- und Matrixproteine, die zu der Cystatin Protein Superfamilie gehören (Lee et al. 2009). Zu den Fetuinen gehören das Fetuin-A und das erst 2000 entdeckte Fetuin-B als Paralog des Fetuin-A (Olivier et al. 2000). Trotz der gemeinsamen phylogenetischen Herkunft und der engen nachbarschaftlichen chromosomalen Lokalisation, weisen das Fetuin-A und B unterschiedliche Proteinstrukturen und Genregulationen auf (Denecke et al. 2003). In einer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Fetuin-A und Fetuin-B Expression beobachtet werden und ließ vermuten, dass die Fetuine A und B überlappende, jedoch nicht identische Funktionen ausüben (Denecke et al. 2003). Hinsichtlich der Serumkonzentrationen konnte festgestellt werden, dass die Fetuin-B Konzentrationen bei Frauen zweimal so hoch sind wie bei Männern. Die Fetuin-A Konzentrationen hingegen unterscheiden sich nicht zwischen den Geschlechtern (Denecke et al. 2003).

Fetuin A

Fetuin-A, auch α2-Heremans-Schmid-Glycoprotein (AHSG) genannt (Karmilin et al. 2019), ist ein Akut-Phase-Protein und übernimmt vielfältige Funktionen im menschlichen Organismus (Dziegielewska et al. 1992). So besitzt es inhibierende Funktionen auf eine vorzeitige Knochenmineralisierung (Heiss et al. 2003;Schinke et al. 1996), hinsichtlich einer Insulinresistenz und einer vaskulären Verkalkung (Icer & Yildiran 2021).
Stimulierende Einflüsse nimmt es beispielsweise auf Diabetes und Adipositas (Icer & Yildiran 2021).
Außerdem wurde es als ein Biomarker für neurodegenerative Erkrankungen identifiziert (Mori et al. 2011).

Fetuin B

Fetuin-B dagegen ist essenziell für die Fertilisation, indem es eine frühzeitige Verhärtung der Zona pellucida verhindert und somit die Spermienpenetration in die Oozyte gewährleistet (Dietzel et al. 2013).
Eine weitere Schlüsselrolle von Fetuin-B wird in der Angiogenese, der Immunabwehr, der extrazellulären Matrixbildung und in der generellen interzellulären Kommunikation durch die Inhibierung des Meprins postuliert (Karmilin et al. 2019).

1.3 Fetuin-B ist essenziell für die Fertilisation

Das Fetuin-B inhibiert hochspezifisch Astacin-Metalloproteinasen wie Meprin α und Meprin β (Cuppari et al. 2019b) (Karmilin et al. 2019). Durch die Inhibierung des Ovastacin wird die Verhärtung der, die Oozyte umgebenden, Zona pellucida verhindert und somit eine Fertilisation (Befruchtung) gewährleistet (Floehr et al. 2016). Die Fetuin-B Wirkung hält so lange an, bis ein Spermium die Oozyte penetriert. Nach der Spermienfusion beginnt die Aushärtung der Zona pellucida, um die Bindung und Penetration mehrerer Spermien an und in die Oozyte zu verhindern. Hierdurch soll eine Polyspermie effektiv verhindert werden (Braden et al. 1954). Eine Studie mit Mäusen zeigte, dass durch die Unterdrückung des Fetuin-B, mittels Antisense-Oligonukleotide (ASO), eine Infertilität entsteht (Floehr et al. 2017). Aufgrund des fehlenden Fetuin B wird die Metalloproteinase Ovastacin nicht inhibiert, was zu einer frühzeitigen

Verhärtung der Zona pellucida führt (Dietzel et al. 2013). Eine Spermienpenetration in die Oozyte und somit Fertilisation sind nicht mehr möglich.
Dieser beschriebene Effekt kann dagegen bei Fetuin-A defizienten Mäusen *nicht* beobachtet werden. Aufgrund dessen wird angenommen, das Fetuin-A keinen (essenziellen) Einfluss auf die Fertilisation nimmt (Jahnen-Dechent et al. 2011).

1.4 Synthese- und Wirkort des Fetuin-B

Der Syntheseort des Plasmaproteins Fetuin-B liegt in der Leber (Denecke et al. 2003). der Wirkort hingegen ist der Eizellfollikel. Es wird angenommen, dass Fetuin-B frei aus dem Blut in den Eizellfollikel diffundieren kann (Floehr et al. 2016). Diese Annahme beruht auf der Erkenntnis zweier Studien, die zeigen, dass die Serum- und Follikel-Fetuin-B Werte positiv korrelieren (Fang et al. 2019a) (Dietzel et al. 2013). Sowohl die Serum- als auch die Follikel-Fetuin-B Werte liegen beim Menschen annähernd bei ~1 µg/ml (Dietzel et al. 2013).

Synthesetrigger für das Fetuin-B stellen beispielsweise Ethinylestradiol (EE2) (Rösing et al. 2012), endogene Sexualsteroide und der Farnesoid-X-Rezeptor dar (Murakami et al. 2007).
In einer Studie konnte eine Estradiol vermittelte hepatische Regulation des Fetuin-B beobachtet werden (Floehr et al. 2016). Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei erhöhten Estradiolwerten, wie sie unter einer ART-Therapie auftreten, die Fetuin-B Werte signifikant ansteigen. Bei fehlendem Estradiolanstieg findet sich auch kein Fetuin-B Anstieg.
Eine frühere Studie hatte bereits eine durch Sexualsteroide getriggerte Fetuin-B Synthese postuliert (Denecke et al. 2003).
In einer weiteren Studie wird eine Fetuin-B Genexpression in den Hepatozyten durch den nukleären Farnesoid X-Rezeptor induziert (Murakami et al. 2007). Der Farnesoid-X-Rezeptor wird durch Gallensäure aktiviert und scheint gemeinsam mit Fetuin-B Einflüsse auf metabolische und proliferative Prozesse sowie auf die Apoptose in Tumorzellen zu nehmen (Murakami et al. 2007). Bislang wurde jedoch noch nicht untersucht, ob durch die Farnesoid-X-Rezeptor induzierte Fetuin-B Expression auch Einflüsse auf den Reproduktionsvorgang genommen werden.

1.5 Ovastacin wird durch Fetuin-B inhibiert

Ovastacin, auch als SAS1B (Spermien akrosomales SLLP1 Bindungsprotein) bezeichnet (Burkart et al. 2012), wird in der Oozyte exprimiert (Díaz-Perales et al. 2005) und in der Granula, unterhalb der Zona pellucida, der unbefruchteten Eizelle gespeichert (Karmilin et al. 2019). Es wird *nach* der Fusion des Spermiums mit der Eizelle, von der Rindengranula der Oozyte ausgeschüttet. Durch die massive Ausschüttung des Ovasctacin in den perivitellinen Raum (Körschgen et al. 2019) wird die inhibierende Funktion des Fetuin-B überwunden. Durch die Ovastacin Wirkung wird der Spermienrezeptor zerstört (Körschgen et al. 2019) und das Zona pellucida Protein ZP2 (120 kDa) in ZP2f (90 kDa) hydrolysiert (Bleil et al. 1981). Dieser Prozess führt zur Aushärtung der Zona pellucida (Dietzel et al. 2013;Stocker et al. 2014). Die Verhärtung der Zona pellucida verhindert die Bindung weiterer Spermien (Polyspermie) an die bereits befruchtete Oozyte (Guevara et al. 2019).
Geringe Mengen an Ovastacin werden auch von der unbefruchteten Eizelle freigesetzt, welche aber durch die antagonisierende Wirkung des Fetuin-B inaktiviert werden.
Zum aktuellen Zeitpunkt ist Ovastacin die einzige bekannte Proteinase mit der Fähigkeit Zona pellucida Proteine zu spalten. Diese Annahme beruht auf einer Studie mit Mäusen. Hier konnte beobachtet werden, dass bei Ovastacin defizienten Mäusen das Zona pellucida Protein ungespalten blieb (Burkart et al. 2012) und die in-vitro-Fertilisationsraten anstiegen, aufgrund der ausbleibenden Zona-pellucida Verhärtung ($p= 0.043$) (Körschgen et al. 2017).

Zusammengefasst hat Fetuin-B, durch die Inhibierung der Metalloproteinase Ovastacin, einen entscheidenden Einfluss auf die Fertilisation, indem es die frühzeitige Aushärtung der Zona pellucida verhindert und somit eine Fertilisation der Oozyte gewährleistet (Dietzel et al. 2013;Stocker et al. 2014).
Neben Fetuin-B, konnte bislang noch kein anderer natürlicher Inhibitor des Ovastacin entdeckt werden (Cuppari et al. 2019a;Guevara et al. 2019;Karmilin et al. 2019).
Aktuell beschäftigt sich die Forschungen damit, die Ovastacin Wirkung mittels kleiner molekularer Inhibitoren zu hemmen und somit die Fetuin-B Wirkung nachzuahmen (Körschgen et al. 2019). Die endgültigen Ergebnisse sind jedoch noch ausstehend.

1.6 Die Zona pellucida; eine wichtige Struktur im Fertilisationsprozess

Im Folgenden wird der Aufbau und die Funktion der Zona pellucida, welche eine entscheidende Funktion in der Fertilisation einnimmt, erläutert.
Während eines Menstruationszyklus reifen die Primordialfollikel, die schon im weiblichen Fetus angelegt werden, bis zum reifen Tertiärfollikel heran (Peters et al. 1975;Werny & Schlatt 2019). Ab dem Stadium des Sekundärfollikels bildet sich die Zona pellucida, die zwischen dem Stratum granulosum und einer Basalmembranen liegt (Knight & Glister 2006). Es wird angenommen, dass die Zona pellucida sowohl von dem Follikelepithel, als auch von der Oozyte selbst synthetisiert wird (Bogner et al. 2004) .

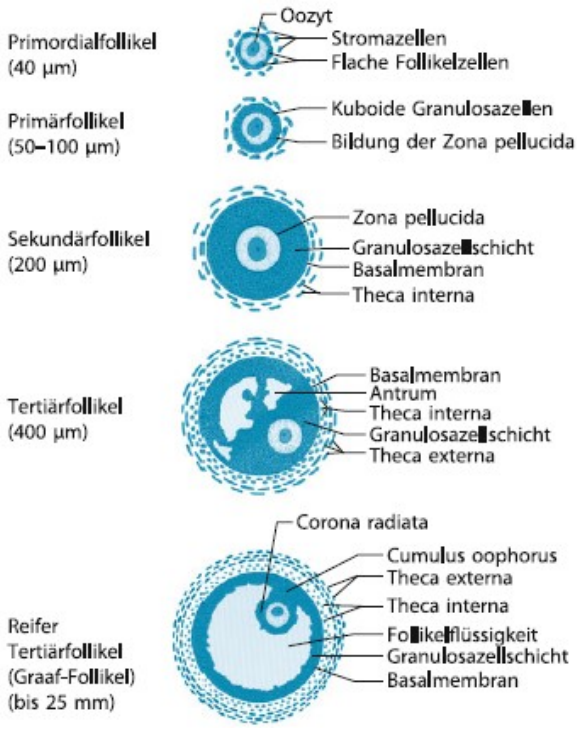

Abb. 1. Bildung der Zona pellucida während den Entwicklungsstadien eines Primordialfollikels zum dominanten Graaf-Follikel (Ludwig 2009) (Copyright Lizenz erhalten und anbei)

Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre Matrix, welche beim Menschen aus den Glykoproteinen ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 besteht (Lefievre et al. 2004;Sacco et al. 1981;Shabanowitz & O'Rand 1988). Eine wesentliche Bedeutung kommt dabei den Zona pellucida Proteinen zwei und drei zu, welche als Spermienrezeptoren agieren und für die Initiierung der Akrosomenreaktion des Spermiums verantwortlich sind (Bleil et al. 1988;Hinsch et al. 1998;Wassarman 1987).

Die Dicke der Zona pellucida nimmt mit der Reifung der Eizelle zu und erreicht beim Menschen im Durchschnitt 17µm im Meiosestadium zwei (Gook et al. 2008). Physiologischerweise beginnt sich die Zona pellucida etwa 30 Stunden nach der Ovulation zu verhärten, was das Zeitfenster für die Befruchtung der Oozyte begrenzt (Dodson et al. 1989). Denn durch die Aushärtung der Zona pellucida wird die Bindung und Penetration von Spermien an und in die Eizelle verhindert (Dietzel et al. 2013).
In Studien wird die Hypothese formuliert, dass die Dicke der Zona pellucida auch den Grad der Verhärtung angibt (Floehr et al. 2016) und mit dem Fertilisationserfolg assoziiert ist (Palmstierna et al. 1998). So scheint, in vitro, der Grad der Aushärtung direkt mit einem Fertilisationsversagen zu korrelieren (Downs et al. 1986;Gianfortoni & Gulyas 1985).
Eine weitere Aufgabe der Zona pellucida besteht in der Verhinderung einer Gameteninteraktion zwischen unterschiedlichen Spezies (Claw & Swanson 2012).

Strukturelle, sowie funktionelle Veränderungen der Zona pellucida können die Befruchtung beeinflussen und zur weiblichen Infertilität führen (Rankin et al. 1996;Rankin et al. 2001). Insbesondere Mutationen der Zona Proteine ZP1, ZP2 und ZP 3 scheinen für eine weibliche Infertilität verantwortlich zu sein (Rankin et al. 1996;Rankin et al. 2001;Zhou et al. 2019).
Eine weitere Studie hat bei Patientinnen mit erfolgloser Fertilisation vermehrt sequentielle Genveränderungen in den Zona Proteinen gefunden (Männikkö et al. 2005). Es wird demzufolge davon ausgegangen, dass der Aufbau der Zona pellucida essenziell für eine regelrechte Fertilisation ist (Männikkö et al. 2005;Rankin et al. 2001).
Aufgrund der maßgeblichen Bedeutung der Zona pellucida für den Fertilisationsprozess, werden bei einer ART-Therapie (assistierte Reproduktionstherapie) die Oozyten selektioniert, welche eine einwandfreie Zona pellucida besitzen (Assidi et al. 2015).

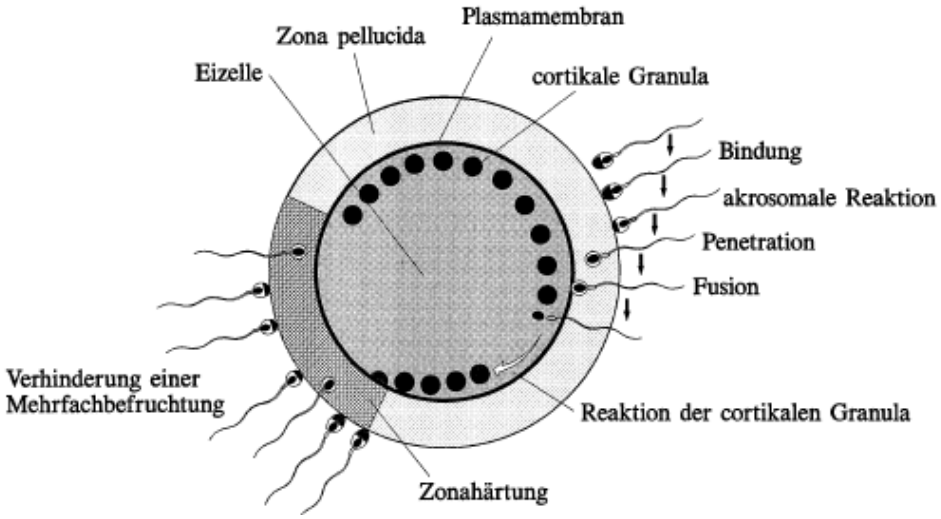

Abb.2. Interaktion von Spermien mit der Oozyte (Hägele et al. 1998) (Copyright Lizenz erhalten und anbei)

1.7 Fetuin-B als möglicher Prognosemarker in der Reproduktionsmedizin

Zum aktuellen Zeitpunkt konnte noch kein Marker etabliert werden, anhand dessen eine Prognoseabschätzung hinsichtlich der Fertilisationsraten unter einer ART-Therapie möglich ist. Ob, und wie viele Eizellen unter einer ART-Therapie befruchtet werden können, ist im Vorfeld ungewiss (Johnson et al. 2013;Montag et al. 2008)
Als Anhaltspunkt kann die lichtmikroskopische Beurteilung der Zona pellucida herangezogen werden (Pelletier et al. 2004;Rienzi et al. 2003;Wang et al. 2001), da wie zuvor beschrieben, ein Zusammenhang zwischen der Zona pellucida Morphologie und einer Fertilisation beobachtet wurde (Ebner et al. 2006). Ein weiterer, potenter Biomarker für den Fertilisationserfolg, könnte möglicherweise das Protein Fetuin-B sein. So konnte schon in vorangegangen Studien ein Zusammenhang zwischen Fetuin-B und der Fertilisation beobachtet werden. Ob Fetuin-B als ein möglicher Prognosemarker herangezogen werden kann, wird, unter Anderem, in dieser Dissertation untersucht.

1.8 Fetuin-B außerhalb der Reproduktionsmedizin

Neben den Funktionen des Fetuin-B auf die Fertilisation, werden dem Plasmaprotein auch Funktionen außerhalb der Reproduktion zugeschrieben.
So scheint Fetuin-B auch eine Rolle bei der Entstehung eines Adenocarcinoms der Lunge (Zhou et al. 2019), der nicht alkoholischen Fettleberkrankheit (NASH) (Lin et al. 2019), bei einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) (Lin et al. 2019) und einer

COPD (chronic obstruktive pulmonary disease) (Diao et al. 2016) zu spielen. Des Weiteren konnte eine Assoziation zwischen der Höhe der Fetuin-B Werte und dem Auftreten Koronarer Herzkrankheiten beobachtet werden (Zhu et al. 2017). Angesichts der eindeutigen Faktenlage der Funktion von Fetuin-B bei der Regulation von Astacin-Protease-Aktivitäten, sind diese, aufgrund von Assoziationsstudien postulierten Funktionen, bestenfalls als nachgelagert bzw. indirekt zu verstehen. Die Ergebnisse der aufgelisteten Studien werden dennoch im Diskussionsteil der Arbeit weiter aufgeführt.

Außerdem ist zu erwähnen, dass Fetuin-B physiologischerweise auch bei Männern nachzuweisen ist. Demnach muss Fetuin-B auch andere Funktionen auf Proteasen ausüben, die in keinem Zusammenhang mit der Eizelle stehen.

1.9 Definition der Infertilität

In der Medizin wird eine Infertilität als ein einzigartiger Zustand beschrieben, da es statt wie geläufig nicht nur ein Individuum, sondern zwei betrifft (Kuohung & Hornstein 2019). Definitionsgemäß wird von einer Infertilität gesprochen, wenn bei Frauen unter 35 Jahren nach 12 Monaten regelmäßiger Kohabitationen keine Schwangerschaft eingetreten ist (Kuohung & Hornstein 2019).
Bei Frauen über 35 Jahren wird bereits nach 6 Monaten Kohabitationen ohne Schwangerschaftseintritt von einer Infertilität gesprochen (Medicine. 2013).
Die WHO (World Health Organization) hat 1982-1985 eine multizentrische Studie durchgeführt und die Ätiologie der Infertilität näher untersucht. Demnach sind 38% der Infertilität durch eine weibliche Ätiologie, 20% durch eine männliche Ätiologie und 27% durch beide Geschlechter verursacht. Dahingegen konnten 15% keinem Geschlecht zugeordnet werden (Comhaire et al. 1987).

Arten der Infertilität

Grundlegend wird zwischen einer primären und einer sekundären Infertilität unterschieden. Primäre Infertilität bedeutet, dass eine Frau noch niemals in ihrem Leben schwanger werden konnte, auch Nulligravida genannt (Knörr et al. 1982). Der Begriff sekundäre Infertilität, drückt aus, dass eine Frau nach vorausgegangener Gravidität, zum jetzigen Zeitpunkt nicht erneut schwanger werden kann (Knörr et al. 1982).

Bei all dem Genannten, muss beachtet werden, dass sowohl die Erkenntnis infertil zu sein, sowie die Abklärung und Therapie einer Infertilität emotional und psychisch sehr belastend ist für beide Lebenspartner (Kuohung & Hornstein 2019). Auch dieser Aspekt bietet einen weiteren Ansporn, neue Erkenntnisse zu gewinnen, um die Reproduktionsmedizin verbessern zu können und möglicherweise sogar einen Prognosemarker einführen zu können.

1.10 Durchschnittliche Fertilisationsraten unter einer ART-Therapie

Die durchschnittlichen Fertilisationsraten unter einer ART-Therapie (assistierte Reproduktionstechnik) liegen, aktuellen Studien zu Folge, bei 62-68% (Liu et al. 2020). Die Fertilisationsrate beschreibt, wie viele, der gewonnen, reifen Oozyten durch Spermien in-vitro befruchtet werden. Zur Beurteilung einer regelrechten Befruchtung werden die Oozyten auf das Vorhandensein von 2 Pronuclei (haploider Kern der Oozyte) (Spektrum. 1999) ca. 20-22 Std. nach der Insemination untersucht (Miller 2019).
Des Weiteren wurde in Studien beobachtet, dass die Fertilisationsraten, je nach Therapieverfahren, unterschiedlich hoch ausfallen. So konnte gezeigt werden, dass die Erfolgsraten bei einer ICSI-Therapie (intrazytoplasmatische Spermieninjektion) höher sind, als bei einer IVF-Therapie (in-vitro-Fertilisation) (Diedrich et al. 2013b). So lagen die Fertilisationsraten bei einer ICSI-Therapie bei 70-80%, während die durchschnittlichen Fertilisationsraten unter einer konventionellen ART-Therapie bei 50-60% liegen (Inge et al. 2005).
Im Gegensatz hierzu, hat eine andere Studie gezeigt, dass *keine* Unterschiede in den Fertilisationsraten, in Abhängigkeit der durchgeführten Therapie, beobachtet wurden (Vitek et al. 2013) (Lintsen et al. 2007) (Farhi et al. 2019). Hier wurden bei einer IVF-Therapie durchschnittliche Fertilisationsraten von 66.5% (± 25.8) erreicht und bei einer ICSI Therapie 64.1% (± 22.2) (Vitek et al. 2013).

Ein Fertilisationsversagen im Allgemeinen, wird definiert als eine Fertilisationsrate unter 25% (Bundesausschuss. 2017). Ein Fertilisationsausfall bedeutet eine Fertilisationsrate von 0%. In diesem Fall hat bei keiner der Oozyten eine Entwicklung zu einem 2-Pronuclei-Stadium stattgefunden.

1.11 ART- allgemeines Prozedere

Die ART-Therapie ist eine Abkürzung für „Assistierte Reproduktionstechniken". Hierunter versteht man, im Allgemeinen, eine IVF-Therapie (in-vitro-Fertilisation) und eine ICSI-Therapie (intrazytoplasmatische Spermieninjektion). Daneben gibt es noch rein medikamentöse und chirurgische Therapieansätze. Die ART-Therapie kommt zum Einsatz, wenn das Eintreten einer klinischen Schwangerschaft auf natürlichem Wege nicht möglich ist.
Die Indikation für die jeweilige Therapie richtet sich nach der individuellen Ätiologie der Infertilität (Anawalt & S. 2020). Vor Durchführung einer IVF- oder ICSI-Therapie sollte deshalb, bei beiden Partnern eine umfassende Untersuchung zur Klärung der Infertilitätsursache, durchgeführt werden (Richard 2019).

Die allgemeine Vorgehensweise einer ART-Therapie gliedert sich in folgende Schritte: Der erste Schritt besteht in der medikamentösen, ovariellen Stimulation.
Hiernach wird bei der Patientin eine ultraschallgesteuerte, transvaginale Follikelpunktion durchgeführt. Die gewonnenen Oozyten werden mit den aufbereiteten Spermien in-vitro zusammengebracht (IVF-Therapie) oder direkt in die Oozyte injiziert (ICSI-Therapie). Bei einem Fertilisationserfolg kann nach ca. 20 Std. ein 2-Pronuclei Stadium der Oozyte beobachtet werden. Nach einigen Tagen können dann die befruchteten Oozyten der Patientin als mehrzellige Embryonen intrauterin eingesetzt werden.
In Deutschland dürfen, laut dem deutschen Embryonenschutzgesetz (ESCHG), maximal drei Embryonen in einem Behandlungszyklus in den Uterus der Frau zurückgesetzt werden. Um die Rate an Mehrlingsschwangerschaften gering zu halten, werden größtenteils, wie auch in dieser Studie, zwei Embryonen in den Uterus der Frau transferiert (Richard 2019).

Die IVF-Therapie

Als Indikationen für eine In-vitro-Fertilisation (IVF) oder auch extrakorporale Befruchtung können, chirurgisch nicht überwindbare Probleme in der Tubendurchgängigkeit, eine andrologische Subfertilität und eine idiopathische Sterilität, nach Ausschöpfung oder Aussichtslosigkeit aller anderen Therapiemaßnahmen, genannt werden (Richard 2019).

Nach der erfolgreichen Follikelpunktion werden die gewonnen Eizellen mit den vorbereiteten Spermien des Partners in vitro zusammengebracht. Im Folgenden muss das Spermium, wie auch bei der natürlichen Befruchtung, die Eizelle penetrieren (Edwards et al. 1969) (Gnoth et al. 2004).

Die ICSI-Therapie

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion kann als eine Erweiterung der IVF-Therapie, im Rahmen einer assistierten Fertilisation, angesehen werden und ist heutzutage, die, in Deutschland am häufigsten durchgeführte ART-Therapie (Deutsches-IVF-Register. 2019).
Erstmals angewendet, wurde die ICSI-Therapie 1988 (Lanzendorf et al. 1988). Die ersten Schwangerschaften gelangen 1992 in Belgien (Palermo et al. 1992).
Bei einer ICSI-Therapie wird das Spermium nach der Follikelpunktion, direkt in das Zytoplasma der Eizelle injiziert (Miller 2019). Das Spermium muss also nicht, wie bei der IVF- Therapie, die Zona pellucida eigenständig penetrieren.
Eine ICSI-Therapie ist primär indiziert bei einer männlichen Infertilität (Miller 2019). Ursachen für eine männliche Infertilität, liegen beispielsweise in einer endokrinen Störung, in einer veränderten Spermatogenese und/oder Spermientransport oder sind idiopathischer Ätiologie (Anawalt & Page 2019).

1.12 Steigende Anzahl an ART-Therapien

Seit 1978, als das erste in-vitro-Fertilisationskind (IVF-Kind) in England geboren wurde (Edwards & Steptoe 1980), wurden weltweit mehr als 8 Millionen Babys unter Zuhilfenahme einer IVF-Therapie geboren (Stand 2018) (Embryology. 2018). Jedes Jahr werden weltweit etwa 1,6 Millionen ART-Zyklen durchgeführt und ca. 400.000 Kinder mit Hilfe einer ART-Therapie geboren (ESHRE 2016). Dabei werden mit ca. 50% die meisten ART-Therapien in Europa durchgeführt (Embryology. 2017). Mittlerweile kommen in Deutschland etwa 3% der Lebendgeburten unter Zuhilfenahme einer ART-Therapie zur Welt (Deutsches-IVF-Register. 2019).

2) Zielsetzung

Diese Dissertation beschäftigt sich grundsätzlich mit der Rolle des Fetuin-B im Reproduktionsprozess. Hierbei lag das Augenmerk auf der Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Fetuin-B und der Fertilisation bzw. den Fertilisationsraten (Anzahl befruchteter Oozyten). Außerdem sollte durch Blutabnahmen vor und während der ART-Therapie untersucht werden, ob die Fetuin-B Werte zu den verschiedenen Messzeitpunkten unterschiedlich hoch ausfielen. Explorativ erörtert wurde, ob eine Beeinflussung der Fetuin-B Werte durch das Alter, den BMI-Wert, die Art der Infertilität (primäre vs. sekundäre) oder den Nikotinkonsum stattfindet. Zusätzlich wurde untersucht, ob Fetuin-B einen Einfluss auf die Dicke der Zona pellucida ausübt und, ob Zusammenhänge zwischen der Zonadicke und den Fertilisationsraten bestehen.

Des Weiteren wurde analysiert, ob Fetuin-B als ein biologischer Prognosemarker, hinsichtlich einer Fertilisation, eingesetzt werden kann. Fetuin-B kann als ein Biomarker beschrieben werden, da es physiologischerweise im menschlichen Organismus produziert wird. Da Fetuin-B frei im Blut zirkuliert, kann es mittels einer simplen Blutabnahme gewonnen werden. Die Einführung eines Prognosemarkers ist hilfreich, um frühestmögliche Hinweise auf ein Therapieversagen zu erhalten, und so die Möglichkeit zu bekommen, eine Therapieplanänderung vornehmen zu können. Damit könnte man, unter Umständen, die Erfolgsaussichten einer ART-Therapie steigern.

Die genannten Fragestellungen wurden, sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den Untergruppen Fertilisationserfolg (Fertilisationsraten > 25%) und Fertilisationsversagen (Fertilisationsraten< 25%) analysiert. Hierbei sollte insbesondere untersucht werden, ob sich die Fetuin-B Werte innerhalb der beiden Gruppen signifikant unterscheiden.

3) Methoden und Datengewinnung

3.1 Ethikerklärung

Die Studie wurde im Rahmen der Biomaterialbank „Biomaterialsammlung für Forschungsvorhaben zur Beurteilung der Eizellreifung, der Diagnostik des Endometriums und des endometrialen Milieus sowie zur Beurteilung der frühen Embryonalentwicklung“ der Uniklinik RWTH Aachen durchgeführt. Für den Betrieb der Biomaterialbank liegt ein Votum der lokalen Ethikkommission (EK 201/14) vor. Für die durchgeführten Untersuchungen haben alle Patientinnen eine Einverständniserklärung abgegeben und der pseudonymisierten Sammlung, Speicherung und Auswertung ihrer Daten zugestimmt.

3.2 Studiendesign

Die durchgeführte Studie ist als eine klinische Prognose- und Beobachtungsstudie zu bezeichnen.
Vor Durchführung der Studie wurde ein Studienprotokoll entworfen, das die Vorgehensweise, die Größe des Patientenkollektivs, den Studienort und den Studienzeitraum festlegte.
Die Vorgehensweise gliederte sich in verschiedene Schritte. Zunächst wurde die Größe des Studienkollektivs festgelegt. Da im Vorfeld der Studie eine Pilotstudie mit 25 Patientinnen durchgeführt wurde, konnte eine Schätzung des zu erwartenden Unterschiedes und der Wertestreuung erfolgen (Röhrig et al. 2010). Anhand der Ergebnisse wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik des Uniklinikums Aachen, eine Mindestanzahl von 100 Patientinnen und ein Studienzeitraum von vier Jahren (2012-2016) für die Datenerhebung vorgeschlagen, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, „echt“ Signifikanzen darlegen zu können (Eng 2003) und die Power der Studie zu steigern (Eng 2003;Halpern & Karlawish 2002). Die Studiendurchführung, sowie die Auswertung und Interpretation der Daten, erfolgte im Uniklinikum RWTH Aachen. Die labortechnischen Messungen der Fetuin-B Werte aus den Blutproben der Patientinnen erfolgte im Universitätsklinikum Aachen und im Labor IFLb in Berlin.

Als Einschlusskriterium der Studie wurde festgelegt, dass es sich um eine erstmalige Unterziehung einer ART-Therapie durch die Patientin handelte. Die anamnestischen Daten wurden in der Biomaterialbank pseudonymisiert gespeichert und zur Auswertung analysiert. Es erfolgte eine sequenzielle Rekrutierung in der klinischen Behandlungsroutine. Bei Erstvorstellung der Patientinnen im Uniklinikum Aachen wurde zunächst ein einheitlich entworfener Anamnesebogen ausgefüllt. Diese beinhalteten Fragen sowohl zur eigenen Person als auch zu dem jetzigen (und falls vorhanden zum früheren) Partner.
Zur eigenen Person wurden folgende Parameter abgefragt:

- Geburtsdatum,
- Größe und Gewicht,
- Nikotinkonsum,
- frühere Schwangerschaften/Geburten
- Vorliegen eines PCOS

Angaben zu dem jetzigen Lebenspartner beinhalteten Informationen zu Auffälligkeiten, die das männliche Geschlecht betreffen und therapierelevant sein könnten, wie z.B.:

- das Oligo-Astheno-Teratozoospermie-Syndrom (OAT) und andere Spermienauffälligkeiten (im Spermiogramm detektiert)
- das Vorliegen eines Hoden-Tumors
- das Vorliegen onkologischer Erkrankungen
- anamnestische urologische Erkrankungen
- das Vorliegen anderer relevanter Erkrankungen wie bspw. eine Hepatitis B oder C
- Angaben zu bisherigen Kindern (inkl. des Alters)

Nach der Anamneseerhebung und standardisierten Untersuchung wurde ein Entschluss bezüglich der individuell durchzuführenden Therapie (IVF- oder ICSI-Therapie) getroffen.
Während jeder ART-Therapie erfolgen verlaufskontrollierende hormonelle Blutentnahmen. Hier wurden die Estradiol-, Progesteron- und LH-Werte bestimmt. Da Fetuin-B frei im Blut zirkuliert, waren zu dessen Bestimmung im Serum für diese Studie keine zusätzlichen, gesonderten Blutabnahmen nötig.

Es wurde festgelegt, dass die Fetuin-B Werte zu Beginn des Therapiezyklus, während der Stimulation und zwei bis null Tage vor der Follikelpunktion bestimmt werden sollten.
Bei einer ICSI-Therapie hat nach der Follikelpunktion eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zona pellucida Morphologie stattgefunden. Die Dicke der Zona pellucida wurde ausgemessen und notiert. Des Weiteren wurden die Fertilisationsraten (Anzahl befruchteter Oozyten) dokumentiert.
Die Patientinnen wurden auch nach der ART-Therapie weiterbetreut, um das Eintreten einer Schwangerschaft und einer Geburt mitverfolgen zu können.

Alle erhobenen und gewonnenen Daten wurden in einer Excel Tabelle gesammelt. Die statistische Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik des Uniklinikums Aachen. Damit die Studienergebnisse nicht die Auswahl statistischer Testberechnungen beeinflussten (du Prel et al. 2010), wurde im Vorfeld festgelegt, welche Berechnungen durchgeführt werden sollten.
In Absprache mit dem Institut für medizinische Statistik sollte sich die Auswertung auf Frequenztafeln, Signifikanz- und Korrelationsberechnungen sowie Regressionsanalysen fokussieren.

3.3 Das Untersuchungskollektiv

Das Untersuchungskollektiv bestand ursprünglich aus 134 Patientinnen, jedoch sind in die Auswertung Daten von insgesamt 101 Patientinnen eingeflossen. Im Folgenden wird die Verkleinerung des Patientenkollektivs erläutert. Um ein möglichst homogenes und vergleichbares Patientenkollektiv zu generieren, wurde als Einheitskriterium festgelegt, dass nur Patientinnen mit erstmaligem ART-Therapieversuch berücksichtigt werden sollten. Um einen möglichen Bias hinsichtlich der Fertilisation zu vermeiden, kam es zu dieser Festlegung, basierend auf den Ergebnissen einer Studie von Osmanagaoglu et al. aus dem Jahr 2002. Hier konnte gezeigt werden, dass Frauen mit mehrmaligen ART-Therapieversuchen eine insgesamt schlechtere Prognose bezüglich des Eintreten einer spontanen Schwangerschaft aufwiesen als Frauen ohne Therapieversuch (Osmanagaoglu et al. 2002).

Der Vorstellungsgrund der Patientinnen in der Klinik für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin im Uniklinikum Aachen war eine ungewollte Kinderlosigkeit. Nach ausführlicher Erhebung der Anamnese wurde in Abhängigkeit der individuellen Faktoren eine IVF- oder eine ICSI-Therapie durchgeführt.
Bei zwei Patientinnen wurde die Therapie frühzeitig abgebrochen und bei sechs Patientinnen konnten keine Oozyten gewonnen werden, sodass insgesamt acht Patientinnen aus dem Kollektiv ausschieden.
Daraus ergab sich, dass insgesamt 68 ICSI- und 25 IVF -Therapiezyklen ausgewertet wurden.
Das mittlere Alter der Patientinnen lag bei 34.46±4.27 Jahren.

3.4 Der Untersuchungsablauf

Die Untersuchung der Patientinnen und Datensammlung erfolgte in dem Zeitraum 2012-2016.

3.4.1 Durchführung der Therapie

Ein ART-Zyklus umfasst, wie schon erwähnt mehrere Schritte.
Zunächst ist es nötig, das Ovar, also den Ort der Follikelreifung (Barber & Park 2019), zu stimulieren. Dadurch wird versucht, möglichst mehrere Eizellen simultan heranreifen zu lassen, um die Erfolgsraten der Therapie zu steigern (Ingerslev et al. 2001).
In dieser Studie wurden zur ovariellen Stimulation die Gonadotropine Menogon HP (hochgereinigtes HMG) (n=3) oder Puregon (rekombinantes menschliches FSH (Follitropin β) (n=53) oder eine Kombination aus Medikamenten verwendet.
Kombiniert wurden folgende Medikamente:

- Menogon HP mit Puregon (n=33)
- Menogon HP mit Elonva (FSH-CTP Corifollitropin α) (n=1)
- Puregon mit Elonva (n=8)

Aufgrund einer ovariellen Stimulation können sehr hohe endogene Estradiolwerte auftreten, welche durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus auf der Hypothalamusebene zu einer verfrühten LH-Freisetzung (Luteinisierendes Hormon), also einem Gonadotropin, aus der Hypophyse führen können. Das wiederum kann sich negativ auf die Oozytenentwicklung auswirken und eine frühzeitige Ovulation auslösen (Loumaye 1990). Um dieser unerwünschten, vorzeitigen Ovulation vorzubeugen, wurde den Patientinnen vor Stimulationsbeginn ein Gonadoliberin (GnRH)-Agonist oder Antagonist verabreicht, welcher die LH-Freisetzung unterdrückt und somit eine frühzeitige Ovulation verhindert (Richard 2019).
In der vorliegenden Studie wurden der GnRH-Agonist Enantone und die GnRH-Antagonisten Cetrotide oder Orgalutran verwendet.

Das Follikelwachstum wurde mittels transvaginaler Ultraschalluntersuchungen überwacht. Während des Follikelwachstums kommt es bei einer regelrechten Proliferation der Granulosazellen zu einem Anstieg der Estradiolwerte (Richard 2019). Die Estradiolwerte wurden in den routinemäßig durchgeführten Blutabnahmen kontrolliert.

3.4.2 Bestimmung der Fetuin-B Werte

Die Ermittlung der Fetuin-B Werte aus den Blutproben erfolgte mittels eines konventionellen „Sandwich-ELISA“ kit (Fa. LifeSpan Biosciences).
Die ELISA-Technik ist eine Antigen-Antikörper Methode zur Quantifizierung spezifischer Antikörper (Engvall & Perlmann 1972).

3.4.3 Die Follikelpunktion

Sobald im Ultraschall sichtbar wurde, dass zwei bis drei Follikel einen Durchmesser von ca. 17-20 mm erreicht hatten, wurde durch die einmalige Gabe von 10000 IE Humanem Choriongonadotropin (hCG) die Ovulation ausgelöst. Zur Gewinnung der Eizellen wurde in leichter Sedierung oder Vollnarkose eine transvaginale Follikelpunktion beider Ovarien unter Ultraschallkontrolle durchgeführt. Bei der Punktion wurde der Inhalt mehrerer Follikel abgesaugt und mikroskopisch auf Vorhandensein reifer Eizellen untersucht.

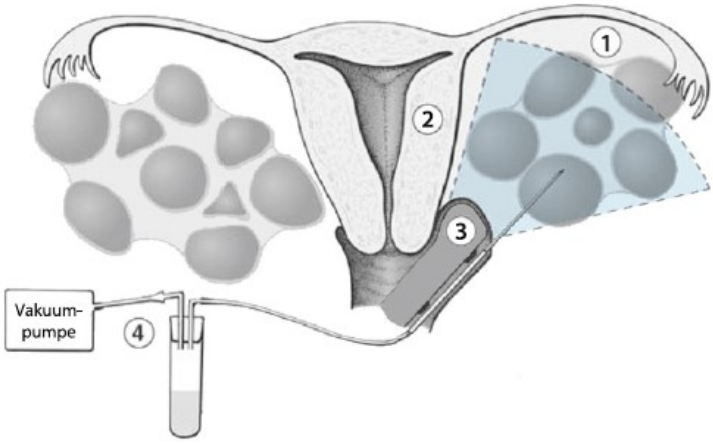

Abb. 17.1 Sonographisch gesteuerte Follikelpunktion (nach Ludwig 2002). Die Ovarien werden stimuliert (1), das Endometrium baut sich auf (2). Die Follikel werden transvaginal unter sonographischer Kontrolle punktiert (3) und die Eizellen mit umgebenden Granulosazellen und Flüssigkeit abgesaugt (4). (Mod. nach Ludwig 2007)

Abb. 3. Transvaginale Follikelpunktion unter sonographischer Kontrolle (Diedrich et al. 2013a) (Copyright Lizenz erhalten und anbei)

Das Datum der Follikelpunktion und die jeweilig gewonnene Anzahl an Oozyten wurden dokumentiert.

3.4.4 Die Befruchtung der Eizelle

Im weiteren Verlauf wurde die Oozyte mit aufbereiteten Spermien des Partners im Kulturmedium zusammengebracht. Wie schon erwähnt, muss bei der IVF-Therapie das Spermium, wie bei der natürlichen Befruchtung, die Eizelle penetrieren (Edwards et al. 1969). Bei der ICSI-Therapie hingegen, wird mittels einer Pipette ein immobilisiertes Spermium durch die Zona pellucida und das Oolemma in die Oozyte injiziert (Miller 2019). Zusätzlich wurde bei einer ICSI-Therapie die Dicke der Zona pellucida lichtmikroskopisch bestimmt. Dabei wurde die Dicke der Zona pellucida folgendermaßen definiert:
<17µm≙ dünne Zona pellucida, 18-20µm≙ normal dicke Zona pellucida, >22µm≙ dicke Zona pellucida.
Zur Beurteilung einer regelrechten Befruchtung wurde die Oozyte auf das Vorhandensein von 2 Pronuclei untersucht (Miller 2019).
Für jede Patientin wurde ihre individuelle Fertilisationsrate (Anzahl befruchteter Oozyten) berechnet. Diese berechnet sich je nach Therapieverfahren unterschiedlich:
Bei einer IVF-Therapie: Anzahl befruchteter Eizellen/ Gesamtanzahl der gewonnenen Oozyten.

Bei einer ICSI-Therapie: Anzahl befruchteter Eizellen/ Anzahl mit Spermien injizierte Oozyten.
Definitionsgemäß spricht man von einer erfolgreichen Fertilisation, wenn mind. 25% der Eizellen befruchtet sind (Bundesausschuss. 2017). Dieser cut-off Wert diente als Grundlage zur Unterteilung des Gesamtkollektivs in die Gruppen „Fertilisationserfolg“ (Fertilisationsraten >25%) und „Fertilisationsversagen“ (Fertilisationsraten <25%)
Bei regelrechter Fertilisation und Embryonenentwicklung wurden bis zu 2 Embryonen in den Uterus der Frau transferiert. Auf Patientenwunsch wurden überzählige Eizellen kryokonserviert.

3.4.5 Das Follow-up

Nach dem Embryonentransfer (ET) wurde zur Feststellung einer Schwangerschaft der hCG-Wert mittels einer Blutuntersuchung überprüft.
Als weitere Identifikationskriterien einer Schwangerschaft wurden Ultraschalluntersuchungen zur Identifizierung einer Fruchthöhle durchgeführt und mittels Kardiotokographie (CTG) die fetale Herzaktivität festgestellt. Bei Eintreten einer Schwangerschaft wurde im Follow-up beobachtet, ob es zu einer Geburt eines lebenden Kindes oder zu einer Fehlgeburt (Abort) kam.

Die anamnestischen Daten, die Informationen aus den Akten, die ermittelten Blutwerte, die laborinternen Eizellbeurteilungen und das Follow-up bis zur Geburt wurden für alle Patientinnen in einer Excel-Tabelle zusammengetragen.

3.5 Statistische Methoden

Die zusammengestellte Excel Tabelle wurde mittels der Statistik Software SAS 9.4 für Microsoft Windows ausgewertet. Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde dieselbe Software verwendet.
Mittels der deskriptiven Statistik wurden die Maximal- und Minimalwerte, der Mittelwert und der Median, die Standardabweichung und der Standardfehler, das 25. und 75. Perzentil sowie der Interquartilsabstand bestimmt. Zur Veranschaulichung absoluter und relativer Häufigkeiten wurden Frequenztafeln angelegt.

Bei der statistischen Analyse lag das Augenmerk auf der Anwendung des Mann-Whitney U-Test (= Wilcoxon-Rangsummentest), der Korrelationsuntersuchung nach Spearman und der linearen sowie der logistischen Regressionsanalyse.
Da sich das Patientenkollektiv als nicht normalverteilt darstellte, konnte nicht der Student´s t-Test angewendet werden, sondern der Wilcoxon-Rangsummentest, der keine Normalverteilung der Daten voraussetzt (du Prel et al. 2010) .
Der Mann-Whitney U-Test (= Wilcoxon-Rangsummentest) ist geeignet, um zwei unverbundene Stichproben bezüglich eines nicht normalverteilten, jedoch mindestens ordinalskalierten Merkmals zu untersuchen (Altman 1991).
Da im Vorfeld nicht sicher war, ob ein Unterschied bestehen würde, war es nötig eine zweiseitige Testung durchzuführen (du Prel et al. 2010).
Die Korrelationsanalyse wurde angewandt, um die Stärke eines Zusammenhangs zwischen zwei Zielgrößen zu ermitteln. Dabei kann die Stärke des Zusammenhangs Werte zwischen −1 und +1 annehmen. Liegt ein Wert nahe Eins, kann von einem starken Zusammenhang ausgegangen werden. Der hier angewendete Spearman Rangkorrelationskoeffizient untersucht, ob zwischen zwei stetigen oder mindestens ordinalen Variablen ein monotoner Zusammenhang besteht. Der Vorteil der Korrelationsberechnung nach Spearman besteht in seiner Robustheit gegenüber Ausreißern und einer schiefen Verteilung (du Prel et al. 2010).
Für das Signifikanzniveau α wurde, als geläufiger Maßstab, ein p-Wert < 0.05 angenommen. Diese Angabe bedeutet, dass bei der Dateninterpretation ein Fehler erster Art mit maximal 5%-iger Wahrscheinlichkeit begangen wird. Ein Fehler erster Art, bedeutetet, dass die Nullhypothese irrtümlicherweise, zu Gunsten der Alternativhypothese, abgelehnt wird (du Prel et al. 2010).
Zur Identifikation und Festlegung möglicher Einflussfaktoren auf die Fertilisationsraten, wurde das Patientenkollektiv in die Gruppen Fertilisationserfolg (Fertilisationsraten >25%) und Fertilisationsversagen (Fertilisationsraten <25%) unterteilt.
Innerhalb dieser Subgruppen wurden ebenfalls, unter Zuhilfenahme des Mann-Whitney U-Test, Signifikanzberechnungen sowie Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt.
Damit die Zielgröße, in diesem Falle der Bezug zwischen den Fetuin-B Werten und den Fertilisationsraten, korrekt interpretiert werden kann, mussten mögliche Confounder eruiert werden. Confounder bzw. Störgrößen üben genauso wie das zu untersuchende Merkmal (hier Fetuin-B) Einflüsse auf die Zielgröße (hier Fertilisationsrate) aus

(Röhrig et al. 2009b). Bei einer validen Interpretation der Ergebnisse, kann man solche Confounder nicht unberücksichtigt lassen (Hammer et al. 2009).
Als mögliche Confounder bzw. Störgrößen wurden folgende festgelegt:

Das Alter der Patientinnen

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Oozytenanzahl und die Fertilisationswahrscheinlichkeit mit zunehmendem Alter stark abnimmt (Faddy & Gosden 2007;Tinneberg & Ottmar 1995). Aufgrund dessen kann der Einfluss des Alters auf den Fertilisationsprozess nicht unberücksichtigt bleiben. Daher wurde das Gesamtkollektiv in folgende Altersgruppen unterteilt:

- Altersgruppe 1 umfasste alle 25-30-Jährigen
- Altersgruppe 2 umfasste alle 31-35-Jährigen
- Altersgruppe 3 umfasste alle 36-40-Jährigen
- Altersgruppe 4 umfasste alle 41-45-Jährigen

Die Klassifizierung nach BMI

Die Intention zur Unterteilung des Gesamtkollektivs in unterschiedliche BMI-Gruppen rührte daher, dass ein Über- oder Untergewicht ein Risikofaktor für eine Infertilität darstellt (Lake et al. 1997) und mit ovariellen Dysfunktionen assoziiert sein kann (Grodstein et al. 1994;McKinnon et al. 2016;Rich-Edwards et al. 1994). Außerdem wurden in einigen Studien verminderte Fertilisationsraten (Depalo et al. 2011;Fedorcsák et al. 2004;Metwally et al. 2007;Orvieto et al. 2009;Vural et al. 2015;Zhang et al. 2010) und verminderte klinische Schwangerschaftsraten bei übergewichtigen Frauen beobachtet (Jungheim et al. 2013).
Des Weiteren wurden in einer Studie Zusammenhänge zwischen den Fetuin-B Werten mit den Cholesterinwerten, mit dem Nüchtern-Blutzuckerwert und mit einer Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung beobachtet (Lin et al. 2019). Aufgrund dessen kam die Frage auf, ob möglicherweise auch ein Zusammenhang zwischen den BMI-Werten und den Fetuin-B Werten besteht und der BMI-Wert somit eine Störgröße hinsichtlich des Fertilisationsprozesses darstellt.
Anhand dieser Fragestellung wurden die Patientinnen anhand ihres BMI-Wertes gemäß der standardisierten BMI-Einteilung (NationalInstitutesofHealth 1998;WorldHealthOrganization 2000) in fünf Gruppen unterteilt:

- BMI <19 ≙Untergewicht
- BMI 19-24 ≙Normalgewicht
- BMI 25-30 ≙Übergewicht
- BMI 31-40 ≙Adipositas
- BMI >40 ≙starke Adipositas

Die Art der Infertilität

Die Patientinnen stellten sich, wie oben beschrieben, entweder aufgrund einer primären oder einer sekundären Infertilität vor. Auch hier muss man von unterschiedlichen Ausgangsbedingungen ausgehen, die möglicherweise den Fertilisationsprozess beeinflussen könnten. So durfte nicht davon ausgegangen werden, dass eine Frau, die schon einmal schwanger war (sekundäre Infertilität) (WorldHealthOrganization 1991) mit einer Frau, die noch nie in ihrem Leben schwanger werden konnte (primäre Infertilität), gleichzusetzen ist. Aus diesem Grund erfolgte die Unterteilung des Gesamtkollektivs anhand der vorliegenden Infertilität in die Gruppen „primäre und sekundäre Infertilität“.

Der Nikotinkonsum

In einigen Studien wurde beobachtet, dass der Nikotinkonsum einen Einfluss auf die Fertilität (Augood et al. 1998), auf die Oozytenanzahl sowie die Ovarqualität ausübt (Adena & Gallagher 1982;Cramer et al. 1994). Deshalb wurde das Gesamtkollektiv in die Gruppen „Raucherinnen“ und „Nichtraucherinnen“ unterteilt.

Alle aufgelisteten Untergruppen wurden ebenfalls auf signifikante Unterschiede und Korrelationen untersucht.

4) Ergebnisse

Die Ergebnisauswertung umfasste 101 Patientinnen, die sich, in dem Zeitraum 2012-2016, einer ICSI- oder IVF-Therapie unterzogen haben. Insgesamt wurden 68 ICSI-Zyklen und 25 IVF-Zyklen durchgeführt. Von den ART-Zyklen resultierten insgesamt 22 (22%) in einer Schwangerschaft und 5 (5%) in einer Geburt. Die restlichen 15 Schwangerschaften endeten in einem Abort.

4.1 Übersicht

Im Nachfolgenden wird zunächst eine Übersicht hinsichtlich der Altersverteilung, der Fertilisationsraten, der Therapiedurchführung und dem Auftreten von Oozyten mit normal dicker, dicker und dünner Zona pellucida gegeben. Darauffolgend werden die Messwerte des Fetuin-B und die Fertilisationsraten aufgeführt.

Altersverteilung

Die 101 Patientinnen waren im Durchschnitt 34.36±4.27 (MW±SD) Jahre alt, wobei die jüngste Patientin 25 Jahre und die Älteste 44 Jahre alt war. Mit einem durchschnittlichen BMI von 24.71±5.30 (MW±SD) lag das Patientenkollektiv im normalgewichtigen Bereich (NationalInstitutesofHealth 1998;WorldHealthOrganization 2000).

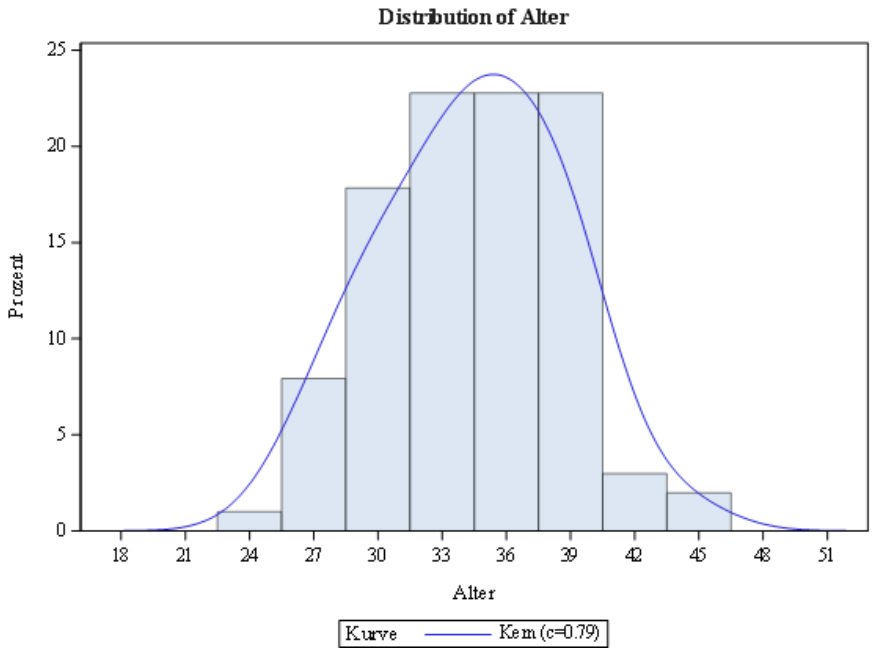

Abb.4 Verteilung der Patientinnen anhand ihres Alters
75% aller Patientinnen waren zwischen 30 und 40 Jahren alt.
Die jüngste Patientin war 25 Jahre und die älteste Patientin 44 Jahre alt.

Fertilisationsraten

Der Fertilisationserfolg wurde definiert als ein cut-off-Wert bei dem mindestens 25% der gewonnenen Eizellen befruchtet waren. Bei einem Wert von unter 25% befruchteter Eizellen spricht man definitionsgemäß von einem Fertilisationsversagen (Bundesausschuss. 2017).

Von den 93 vollendeten ART-Zyklen endeten 64 in einem Fertilisationserfolg (69%) und 29 in einem Fertilisationsversagen (31%).

Im Durchschnitt lag die Fertilisationsrate bei 44±34% (MW±SD) (n=93).

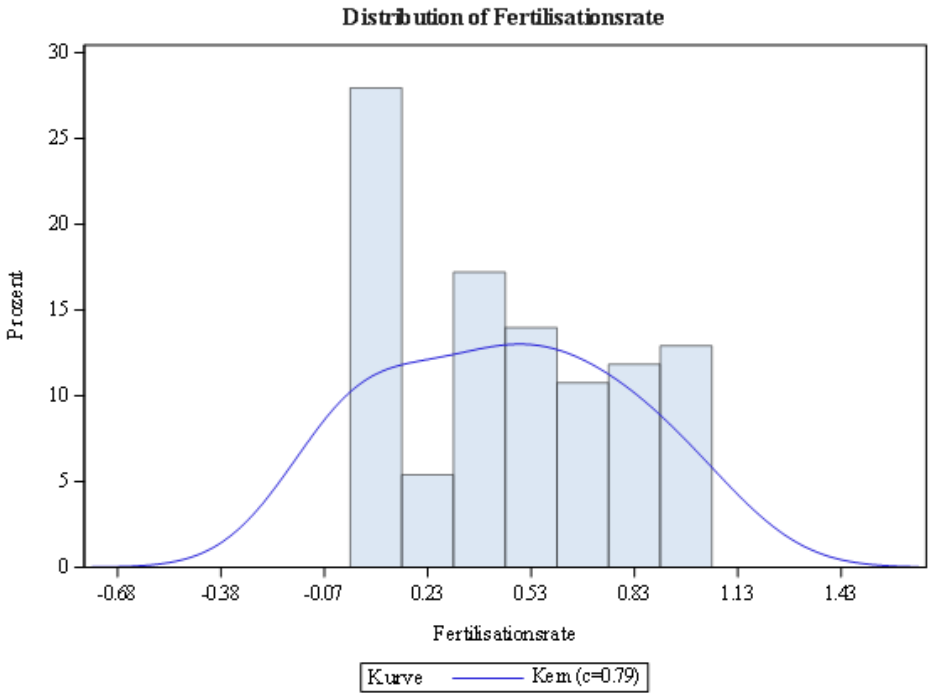

Abb.5 Durchschnittliche Fertilisationsraten
Die durchschnittlich erreichten Fertilisationsraten lagen bei 44±34% (MW±SD) (n=93). Wobei 0 bedeutet, dass 0 der gewonnenen Oozyten befruchtet wurden und 1 bedeutet 100% der gewonnenen Oozyten wurden befruchtet.

Therapieverfahren

Betrachtet man die Therapieverfahren ICSI- bzw. IVF-Therapie getrennt voneinander, konnte festgestellt werden, dass ein signifikanter Unterschied in den Fertilisationsraten zwischen den beiden Therapieformen bestand. So waren die Fertilisationsraten bei einer ICSI-Therapie mit 52.88±32.20% (MW±SD; n=68) signifikant höher (p=0.0003) als bei einer IVF-Therapie mit 22.04±29.03% (MW±SD, n=25).

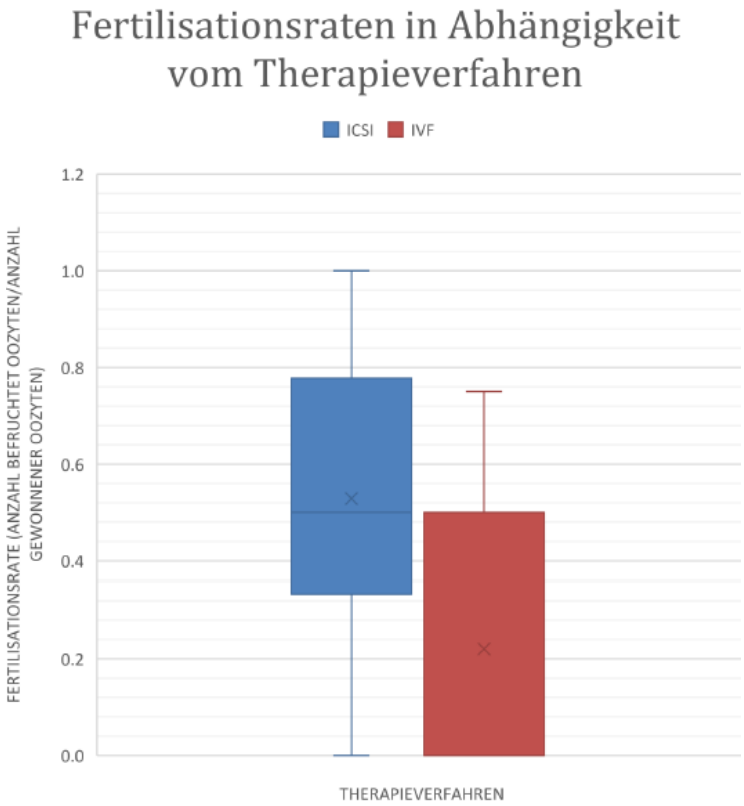

Abb.6 Signifikante Unterschiede in den Fertilisationsraten in Abhängigkeit des Therapieverfahrens (ICSI-/IVF-Therapie)
Bei einer ICSI-Therapie waren die Fertilisationsraten mit 52.88±32.20% (MW±SD; n=68) signifikant höher (p=0.0003) als bei einer IVF-Therapie mit 22.04±29.03% (MW±SD; n=25).

Die durchschnittlich gewonnene Oozytenanzahl pro Patientin lag bei 8.07±5.52 (MW±SD; n=99). Die maximal gewonnen Anzahl an Oozyten einer Patientin lag bei 29.

Im Anschluss einer ICSI-Therapie erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zona pellucida Dicke. Die Zona pellucida Dicke wurde in drei Gruppen unterteilt: normal dick, dick und dünn.
Im Zuge einer ICSI-Therapie wurden durchschnittlich 7.20±5.20 (MW±SD; n=68) Oozyten beurteilt. Der durchschnittliche Anteil an Oozyten mit einer normal dicken

Zona pellucida lag bei 75.77±31.54% (MW±SD; n=68), der Anteil mit einer dicken Zona pellucida bei 19.90±29.95% (MW±SD; n=68), und der Anteil mit einer dünnen Zona pellucida bei 4.31±14.07% (MW±SD; n=68).

Hauptergebnis

Als wichtigstes Ergebnis der Dissertation ist zu nennen:
Die Fetuin-B Werte stiegen unter der hormonellen Stimulation signifikant an (p=0.005) und sind damit mit den Ergebnissen der vorangegangenen Pilotstudie vergleichbar.
Der zu Beginn der Stimulation gemessene Fetuin-B Wert betrug 1.72±1.18 µg/ml (MW±SD; (n=72) und stieg 2-0 Tage vor der Follikelpunktion auf einen Wert von 2.17±1.46 µg/ml (MW±SD; n=58) an. Der Mittelwerte der Fetuin-B Werte lag bei 1.82±1.07 µg/ml (MW±SD; n= 101).

4.2 Fetuin-B zeigt eine Anstiegsdynamik

In dieser Studie konnte beobachtet werden, dass die Fetuin-B Werte unter der Stimulation der ART-Therapie auf das ca. 1,3-fache anstiegen. Es konnte also ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Fetuin-B Werte zwischen dem zu Beginn der Stimulation gemessenen Fetuin-B Wert und dem zuletzt gemessenen Fetuin-B Wert (2 bis 0 Tage vor Follikelpunktion) beobachtet werden (p=0.005). Dieser signifikante Unterschied bestand sowohl in dem Gesamtkollektiv (p=0.005) als auch bei einem Fertilisationserfolg (Fertilisationsraten >25%) (p=0.007).

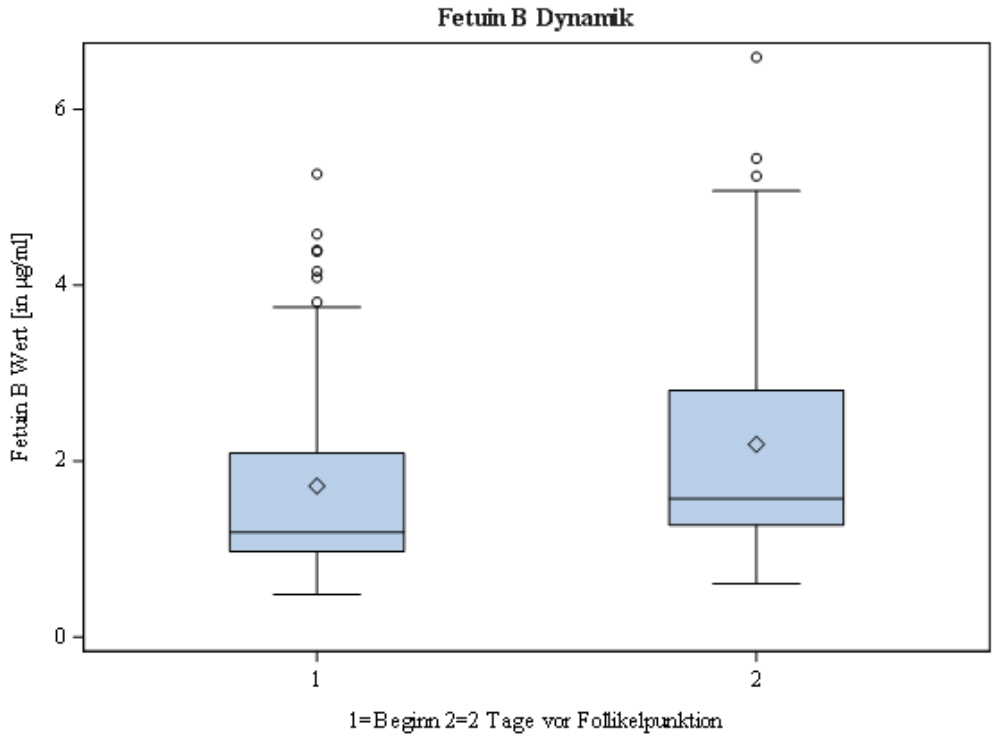

Abb.13 Signifikanter Unterschied zwischen den zu Beginn und den zuletzt gemessenen Fetuin-B Werten (2-0 Tage vor Follikelpunktion)
In dem Gesamtkollektiv bestand ein signifikanter Unterschied (p=0.005) zwischen den zu Beginn und 2-0 Tage vor Follikelpunktion gemessenen Fetuin-B Werten. Der zuerst gemessene Fetuin-B Wert betrug 1.72±1.18 µg/ml (MW±SD; (n=72) und stieg 2-0 Tage vor der Follikelpunktion auf einen Wert von 2.17±1.46 µg/ml (MW±SD; n=59) an.

4.3 Fetuin-B steigt bei einem Fertilisationsversagen nicht an

Wie zuvor erwähnt, konnte beobachtet werden, dass Fetuin-B bei einem Fertilisationserfolg (Fertilisationsraten >25%) eine Anstiegsdynamik unter der Stimulation einer ART-Therapie zeigte.

Bei einem Fertilisationsversagen (Fertilisationsrate <25%) hingegen, stiegen die Fetuin-B Werte *nicht* signifikant an.

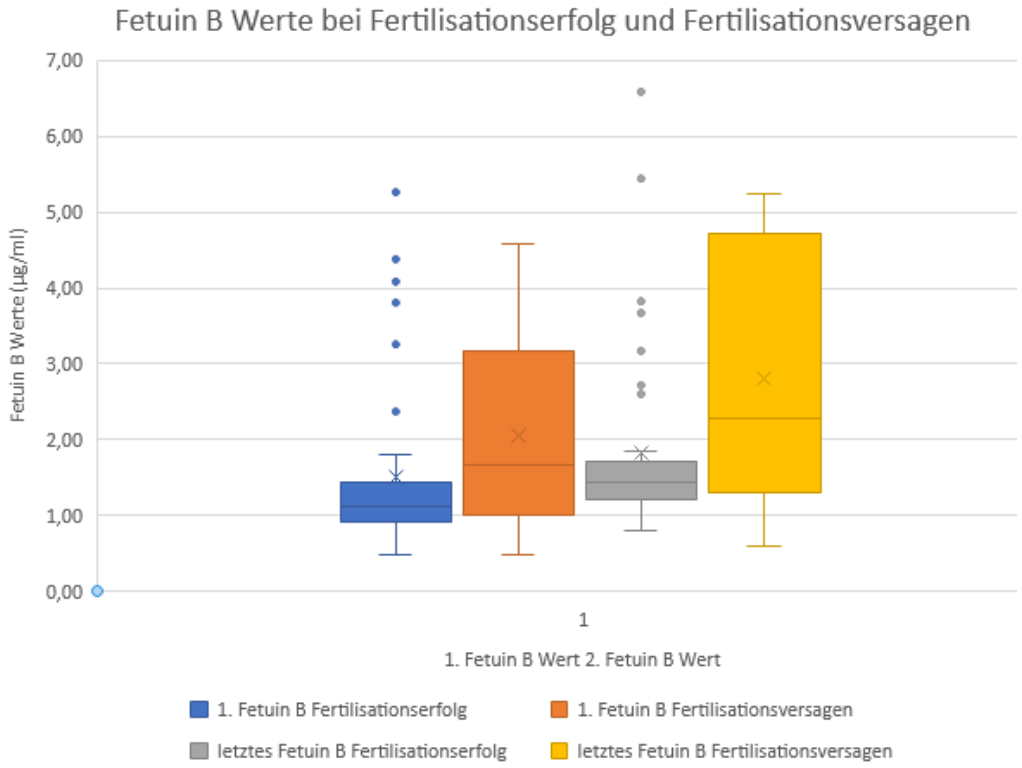

Abb.14 Anstiegsdynamik der Fetuin-B Werte bei Fertilisationsraten >25% und <25%.
Bei einem Fertilisationserfolg (Fertilisationsraten >25%) bestand ein signifikanter Anstieg (p=0.007) der Fetuin-B Werte vom Beginn bis 2-0 Tage vor der Follikelpunktion. Die zu Beginn gemessenen Fetuin-B Werte betrugen 1.50±1.10 µg/ml (MW±SD; n=32) und stiegen auf einen Wert von 1.82±1.32 µg/ml (MW±SD; n=29) 2-0 Tage vor der Follikelpunktion an. Bei einem Fertilisationsversagen (Fertilisationsraten <25%) bestand *kein* signifikanter Unterschied (p=0.17) zwischen den zu Beginn und 2-0 Tage vor der Follikelpunktion gemessenen Fetuin-B Werten. Die zu Beginn gemessenen Fetuin-B Wert betrugen 2.14±1.25 µg/ml (MW±SD; n=22) und lagen 2-0 Tage vor der Follikelpunktion bei 2.89±1.70 µg/ml (MW±SD; n=14).

4.4 Estradiol steigt unter Stimulation signifikant an

Unter der hormonellen Stimulation der ART-Therapie stieg der das Hormon Estradiol auf das 14-fache an.

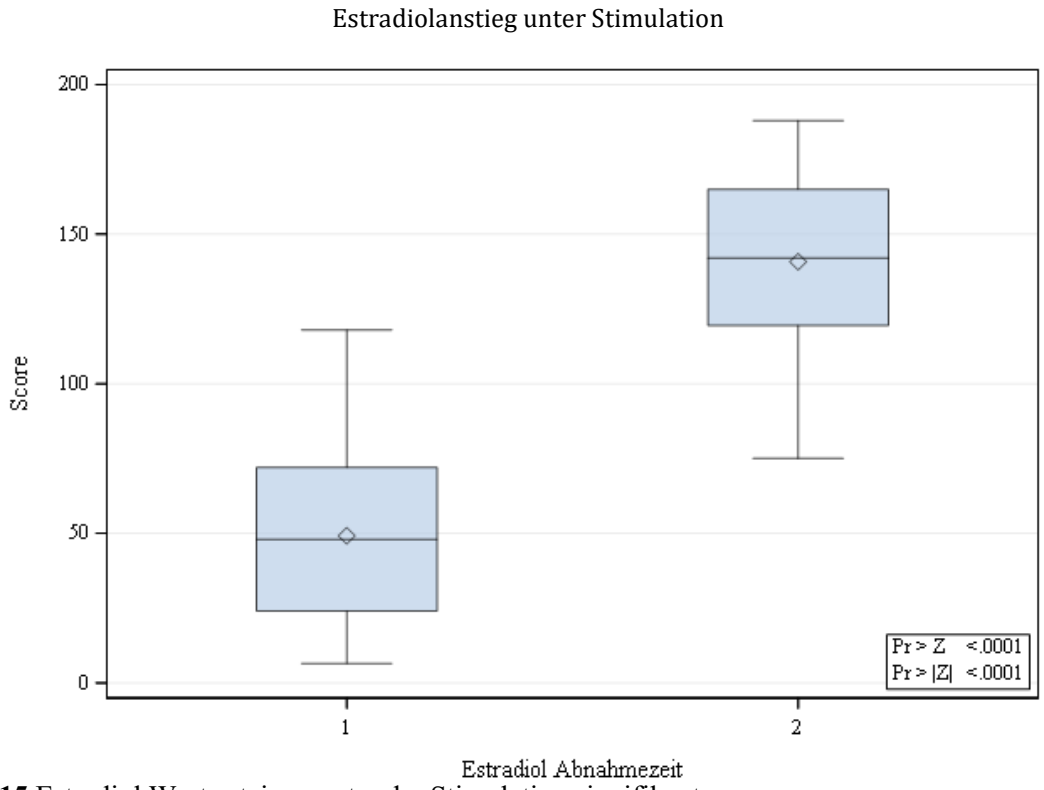

Abb.15 Estradiol Werte steigen unter der Stimulation signifikant an.
Der Estradiol Wert steigt von initial 153.14±223.36 pg/ml auf einen Wert von 2207±1402 pg/ml (n=93) zwei Tage vor der Follikelpunktion an. Die ersten und letzten Estradiol Wert unterscheiden sich signifikant (p <.0001).

Im Gegensatz zu Fetuin-B und Estradiol fallen die Hormone LH (Luteinisierendes Hormon) und Progesteron unter der hormonellen Stimulation einer ART-Therapie signifikant ab.

Das Luteinisierendes Hormon (LH) sinkt von initial 3.23±4.17 µg/ml auf einen Wert von 1.50±1.76 µg/ml (n=95) zwei Tage vor der Follikelpunktion ab. Es handelt sich um ein signifikantes Abfallen der Hormonwerte (p<.0001).

Der Progesteron Wert sinkt von initial 2.17±4.985 ng/ml auf einen Wert von 1.42±0.88 ng/ml (n=25) zwei Tage vor der Follikelpunktion ab. Auch hier besteht ein signifikanter Abfall (p = 0.7077).

4.5 Fetuin-B korreliert negativ mit den Fertilisationsraten

Zur Überprüfung, ob ein Zusammenhang zwischen den Fetuin-B Werte und den Fertilisationsraten besteht, wurde eine Korrelationsberechnung nach Spearman durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Fetuin-B Werte negativ mit den Fertilisationsraten korrelierten.
Anhand der verschiedenen Messzeitpunkte ergaben sich folgende Fetuin-B Werte. Das zu Beginn gemessene Fetuin-B, das 2 bis 0 Tage vor Follikelpunktion gemessene Fetuin-B, der Fetuin-B Mittelwert (errechnet), sowie der Fetuin-B Anstieg vom Beginn bis 2 bis 0 Tage vor Follikelpunktion (errechnet).
Die Auswertung zeigte einen negativen Zusammenhang zwischen

- den Fertilisationsraten und den Fetuin-B Werten, die zwei bis null Tage vor der Follikelpunktion gemessen wurden,
- den Fertilisationsraten und den Fetuin-B Mittelwerten
- den Fertilisationsraten und dem Fetuin-B Anstieg (höhere Fertilisationsraten bei geringerem Fetuin-B Anstieg).

Die zu Beginn des ART-Zyklus gemessenen Fetuin-B Werte zeigten jedoch nur einen allenfalls schwach negativen Zusammenhang mit den Fertilisationsraten.
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle gemessenen und berechneten Fetuin-B Werte, ausgenommen der Ausgangs-Fetuin-B Werte, eine negative Korrelation mit den Fertilisationsraten aufzeigten.

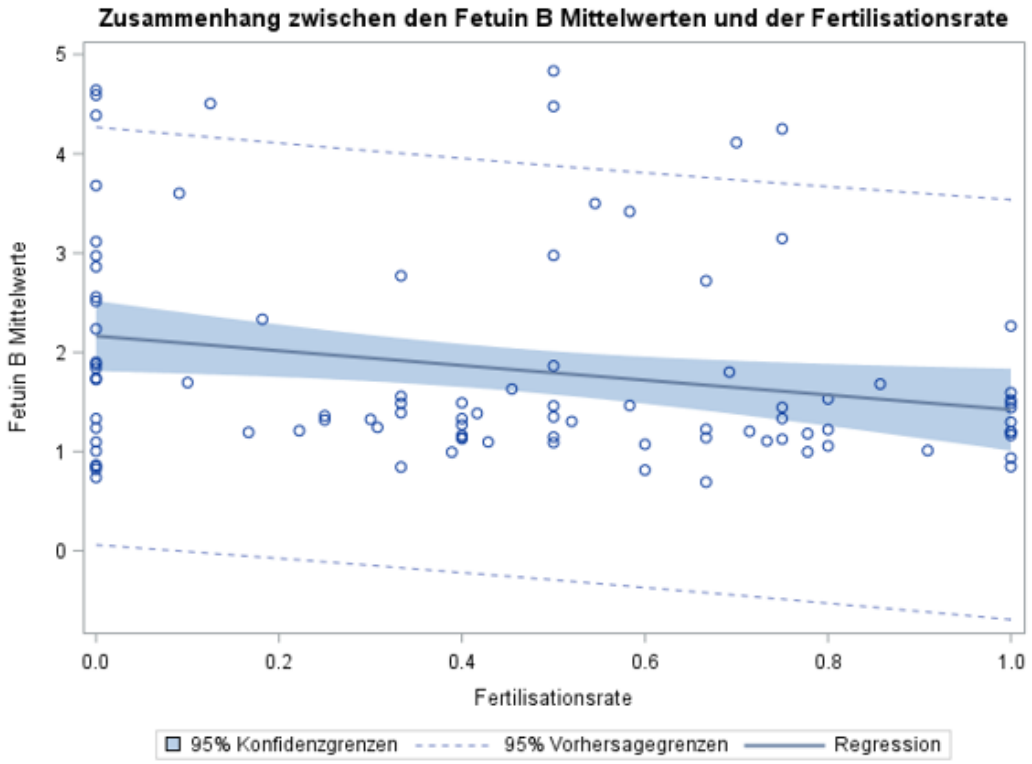

Abb.16 Die Fetuin-B Mittelwerte (µg/ml) korrelierten negativ mit den Fertilisationsraten
Fertilisationsrate bei ICSI-Therapie ≙ Anzahl befruchteter Eizellen / Anzahl mit Spermien injizierten Eizellen.
Fertilisationsrate bei IVF-Therapie ≙ Anzahl befruchteter Eizellen / Anzahl Oozyten.
Fertilisationsrate 0.0≙0% der gewonnenen Oozyten waren befruchtet.
Fertilisationsrate 1.0≙100% der gewonnenen Oozyten waren befruchtet.
Die Fetuin-B Mittelwerte 1.82±1.07 µg/ml (MW±SD; n= 101) zeigten eine negative Korrelation mit den Fertilisationsraten (p= 0.0223 Spearman r= -0.24 n=93).

4.6 Fetuin-B ist nicht mit einem Schwangerschaftseintritt assoziiert

In dieser Studie kam unter der jeweilig durchgeführten ART-Therapie zu insgesamt 22 Schwangerschaften (22%).

Hierbei konnte *kein* Zusammenhang zwischen den Fetuin-B Werten (Fetuin-B Werte zu Beginn, 2-0 Tage vor der Follikelpunktion, Fetuin-B Mittelwert) und dem Eintreten einer Schwangerschaft beobachtet werden (Likelihood Ratio p= 0.96 n=63).

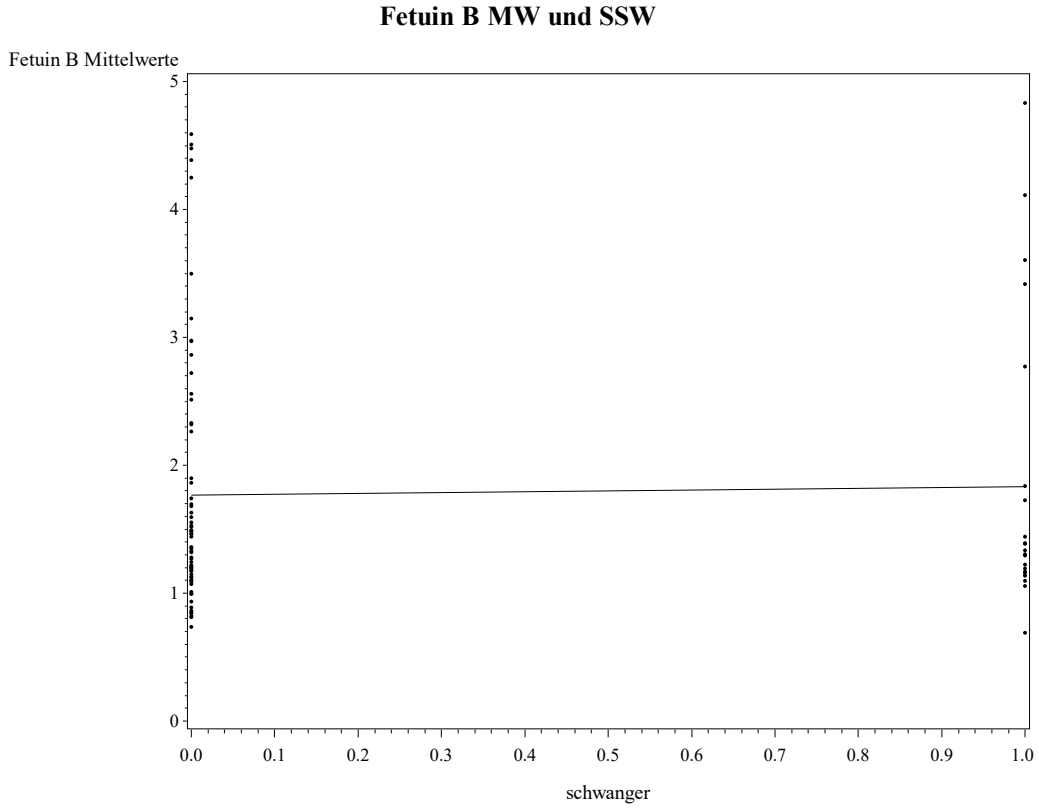

Abb.17 Zusammenhang zwischen den Fetuin B Mittelwerten und dem Eintreten einer Schwangerschaft.
schwanger 0.0≙ keine Schwangerschaft eingetreten.
schwanger 1.0≙ eine Schwangerschaft ist eingetreten.
Die Fetuin B Mittelwerte korrelieren nicht mit dem Eintreten einer Schwangerschaft (p = 0.23 Pearson r= 0.12 n=94).

4.7 Die Fetuin-B Werte stehen in *keinem* Zusammenhang mit der Dicke der Zona pellucida

In der vorliegenden Studie konnte *kein* Zusammenhang zwischen den Fetuin-B Werten und der Zona pellucida Dicke festgestellt werden, unabhängig vom Messzeitpunkt des Fetuin-B.

So bestand keine Korrelation zwischen den Fetuin-B Werten und einer normal dicken (p= 0.93 Spearman r= -0.01 n=68), zwischen den Fetuin-B Werten und einer dünnen

(p= 0.36 Spearman r= -0.11 n=68) oder zwischen den Fetuin-B Werten und einer dicken Zona pellucida (p= 0.59 Spearman r= 0.071 n=68).
Die Dicke der Zona pellucida wurde folgendermaßen definiert:
<17µm≙ dünne Zona pellucida, 18-20µm≙ normal dicke Zona pellucida, >22µm≙ dicke Zona pellucida.

4.8 Die Zona pellucida Dicke ist nicht mit den Fertilisationsraten assoziiert

Mittels der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte *kein* Zusammenhang zwischen der Dicke der Zona pellucida mit den Fertilisationsraten festgestellt werden.
So bestand keine Korrelation zwischen Oozyten mit einer normal dicken Zona pellucida (18-20µm) und der Fertilisationsrate (p=0.83 Pearson r=0.03 n= 68), zwischen Oozyten mit einer dicken Zona pellucida >22µm und der Fertilisationsrate (p=0.78 Pearson r=0.04 n= 68) oder zwischen Oozyten mit einer dünnen Zona pellucida <17µm und der Fertilisationsrate (p=0.30 Pearson r=-0.13 n= 68).

4.9 Einflüsse des Alters auf den Reproduktionsvorgang

Kein Einfluss des Alters auf die Fertilisationsraten

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass in Abhängigkeit des Alters *kein* signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fertilisationsraten oder dem Eintreten einer Schwangerschaft bestand.

Die Verteilung der Patientinnen in die unterschiedlichen Altersgruppen ähnelte nicht der Gaußschen Normalverteilung, wie es der Abbildung 1 zu entnehmen ist. Aufgrund dessen wurde zur weiteren Datenanalyse nicht der T-Test, sondern der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test angewendet.

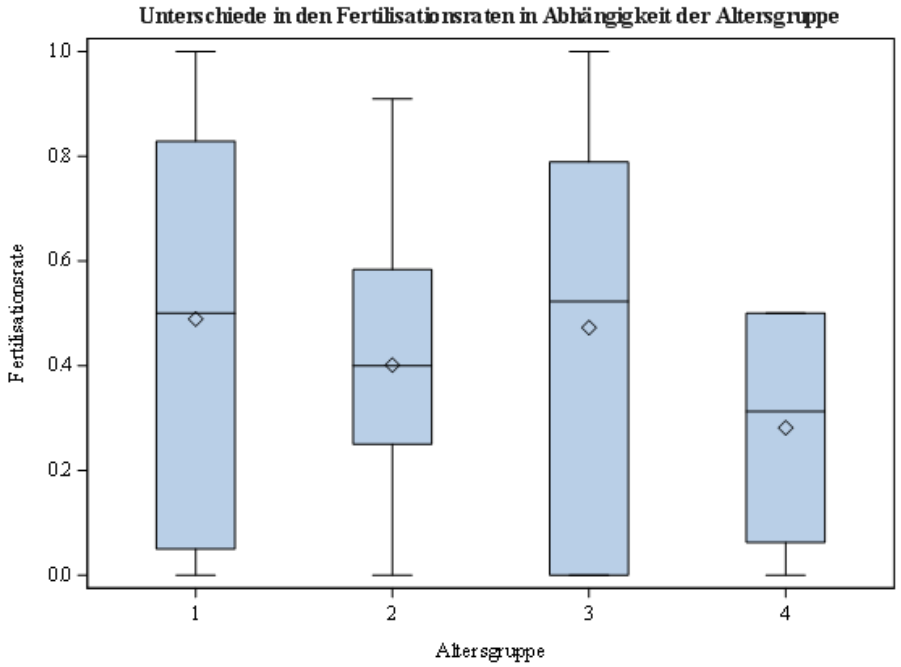

Abb.18 Altersgruppen in Bezug auf die Fertilisationsrate
Mittelwert= 34.46 Jahre, Standardabweichung= 4.27, n=101
Altersgruppe 1: 25-30-jährige n= 21
Altersgruppe 2: 31-35-jährige n= 35
Altersgruppe 3: 36-40-jährige n= 40
Altersgruppe 4: 41-45-jährige n= 5
Es bestand kein signifikanter Unterschied (p=0.62) in den Fertilisationsraten in Abhängigkeit vom Alter (n=101).

Je jünger die Frau, desto mehr Oozyten

Es konnte jedoch ein signifikanter Unterschied (p=0.0003) bezüglich der Anzahl der gewonnenen Oozyten zwischen den Altersgruppen beobachtet werden. So wurden die meisten Oozyten bei den jüngsten Patientinnen gewonnen (Altersgruppe 1 mit 7.76± 4.0 (MW±SD; n= 21) und die wenigsten Oozyten bei den ältesten Patientinnen (Altersgruppe 4 mit 4.20±3.63 (MW±SD; n=5).

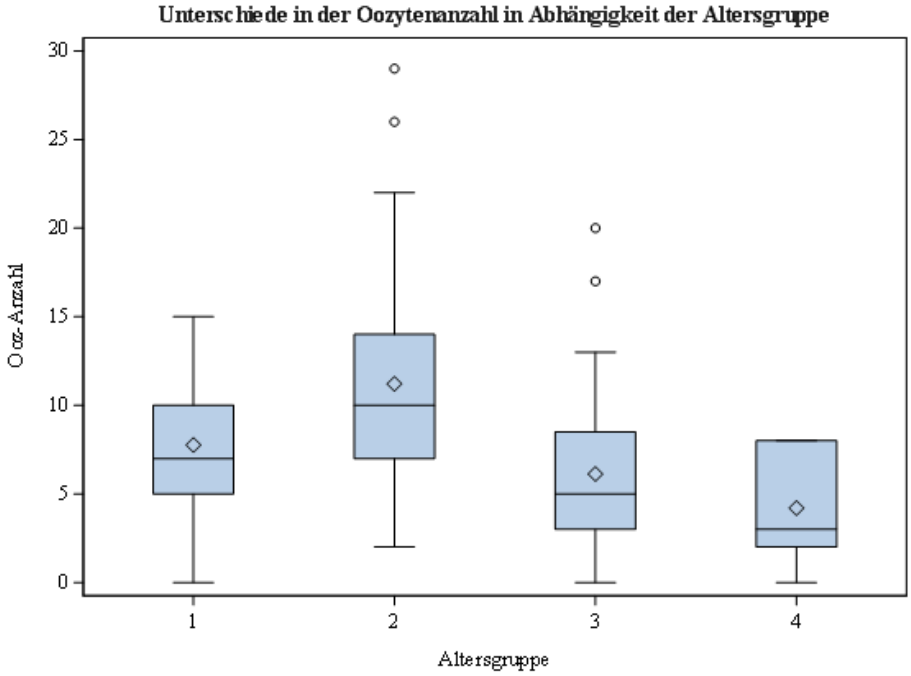

Abb.19 Signifikanter Unterschied in der Anzahl der gewonnenen Oozyten innerhalb der verschiedenen Altersgruppen.
Altersgruppe 1: 25-30-jährige n= 21
Altersgruppe 2: 31-35-jährige n= 35
Altersgruppe 3: 36-40-jährige n= 40
Altersgruppe 4: 41-45-jährige n= 5
Es bestand ein signifikanter Unterschied (p=0.0003) in der Anzahl der gewonnenen Oozyten in Abhängigkeit des Alters.
Die meisten Oozyten konnten in der Altersgruppen 1 mit 7.76± 4.0 (MW±SD; n= 21) Oozyten gewonnen werden, gefolgt von der Altersgruppe 2 mit 11.21±6.21 (MW±SD; n=35) Oozyten. In der Altersgruppe 3 (n=40) betrug die Anzahl 6.12±4.68 (MW±SD) und in Altersgruppe 4 4.20±3.63 (MW±SD; n=5).

4.10 Keine Assoziation der Fetuin-B Werte mit dem Body-Mass-Index (BMI)

In der vorliegenden Studie konnten *keine* signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Fetuin-B Werte, der Fertilisationsraten oder der Oozytenanzahl in Abhängigkeit des BMI-Wertes festgestellt werden. Des Weiteren unterschieden sich die BMI-Werte innerhalb der Gruppen Fertilisationserfolg (Fertilisationsrate >25%) und Fertilisationsversagen (Fertilisationsrate <25%) *nicht* signifikant voneinander.
Die Patientinnen wurden anhand ihres Body-Mass-Index (BMI) in fünf Gruppen gemäß der standardisierten BMI-Einteilung unterteilt (NationalInstitutesofHealth 1998;WorldHealthOrganization 2000).

- Gruppe 1: BMI <19 ≙Untergewicht, n= 5
- Gruppe 2: BMI 19-24 ≙Normalgewicht, n= 35
- Gruppe 3: BMI 25-30 ≙Übergewicht, n= 18
- Gruppe 4: BMI 31-40 ≙Adipositas, n= 10
- Gruppe 5: BMI >40 ≙starke Adipositas, n= 1

4.11 Zusammenhang der Infertilitätsätiologie mit den Fertilitätsraten?

In dieser Studie konnten *keine* Unterschiede in den Fertilitätsraten, in Abhängigkeit der jeweils vorliegenden Infertilitätsätiologie (primär vs. sekundär) (p=0,5) beobachtet werden.

Dahingegen konnte bei Patientinnen mit einer sekundären Infertilität (vorausgegangene erfolgreiche Schwangerschaft) signifikant höhere Fetuin-B Werte zwei-null Tage vor der Follikelpunktion gemessen werden, im Vergleich zu Patientinnen mit einer primären Infertilität (Nulligravida). Die zu Beginn gemessenen Fetuin-B Werte unterschieden sich jedoch allenfalls schwach (p=0.052).

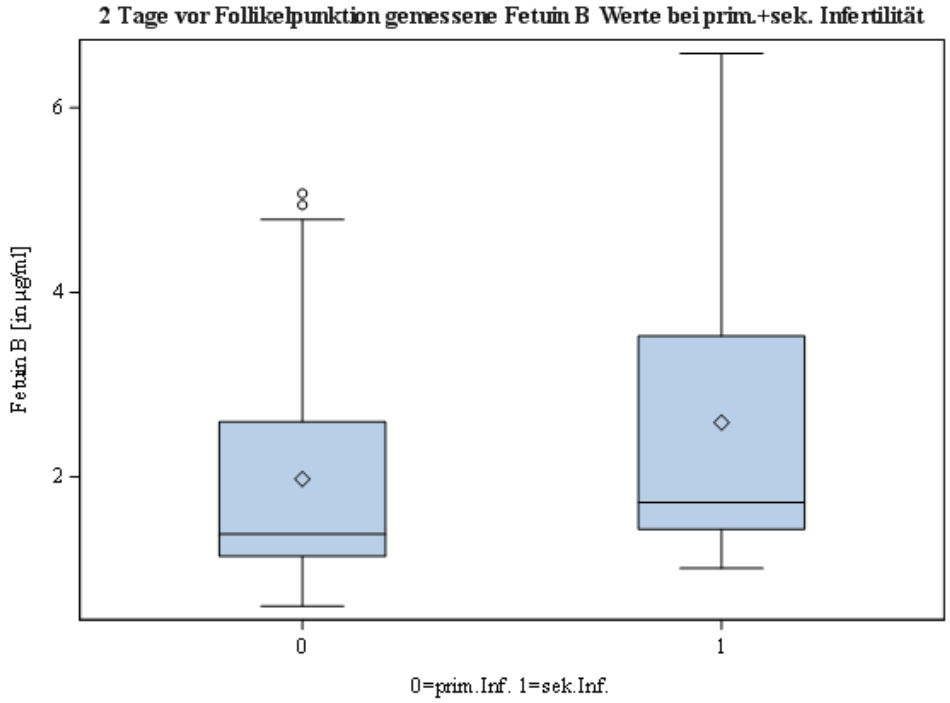

Abb.20 Unterschiede in den zuletzt gemessenen Fetuin-B Werte (2-0 Tage vor Follikelpunktion) bei Vorliegen einer primären oder sekundären Infertilität
Innerhalb der Gruppen primäre und sekundäre Infertilität bestand ein signifikanter Unterschied (p=0.04) in den Fetuin-B Werten 2-0 Tage vor Follikelpunktion.
Bei einer sekundären Infertilität waren die 2-0 Tage vor Follikelpunktion gemessenen Fetuin-B Werte mit 2.59±1.60 µg/ml (MW±SD; n=24) signifikant höher als bei einer primären Infertilität mit Fetuin-B Werten von 1.98±1.36 µg/ml (MW±SD; n=31).

4.12 Keine Beeinflussung der Fetuin-B Werte durch Nikotinkonsum

Von den insgesamt 101 Patientinnen waren 22 Raucherinnen und 75 Nichtraucherinnen. Die restlichen Patientinnen machten bezüglich ihres Nikotinkonsums keine Angabe. Sowohl die zu Beginn gemessenen Fetuin-B Werte (p=0.47, n=70), die 2-0 Tage vor Follikelpunktion gemessenen Fetuin-B Werte (p=0.52, n=56) und die Fetuin-B Mittelwerte (p=0.83, n=97) unterschieden sich *nicht* signifikant zwischen den Gruppen Raucherinnen oder Nichtraucherinnen. Ebenso konnte *kein* Unterschied in den Fertilisationsraten (p=0.10, n=90) und der Oozytenanzahl (p=0.14, n=96), in Abhängigkeit des Rauchverhaltens, beobachtet werden.

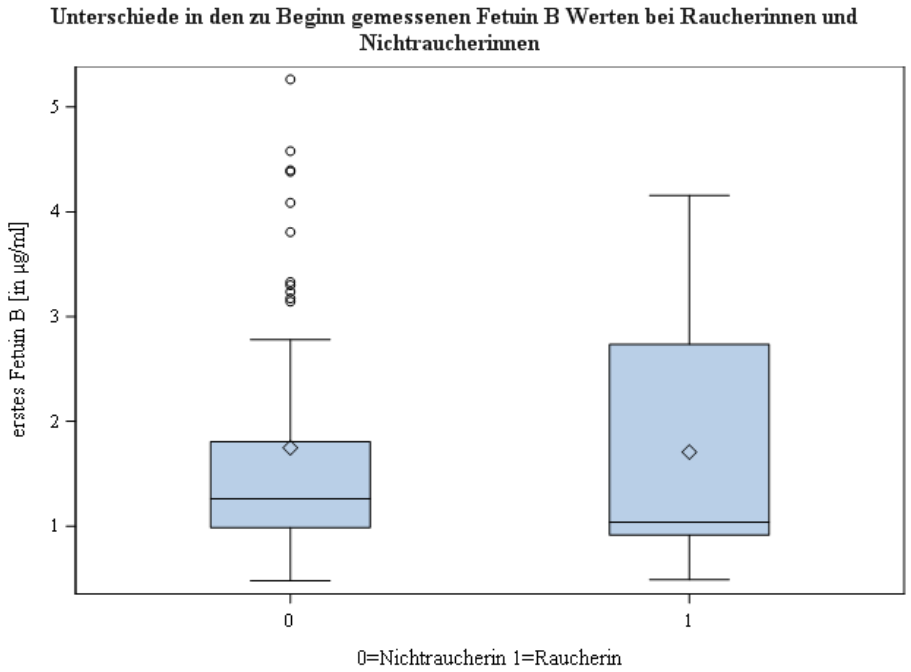

Abb.21 Kein Unterschied in den zu Beginn gemessenen Fetuin-B Werte bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen
Die zu Beginn gemessenen Fetuin-B Werte unterschieden sich *nicht* signifikant zwischen Raucherin und Nichtraucherin (p=0.47, n=70).
Der zu Beginn gemessene Fetuin-B Wert betrug bei Raucherinnen 1.71±1.21 µg/ml (MW±SD; n=22) und bei Nichtraucherinnen 1.75±1.19 µg/ml (MW±SD; n=75)

4.13 Keine Beeinflussung der Fetuin-B Werte durch ein PCOS

In dem Anamnesefragebogen wurde die Frage nach Vorliegen eines PCOS (polyzystisches Ovar-Syndrom) von 15 Patientinnen bejaht. Hierunter waren jedoch zwei, bei denen bislang nur der Verdacht auf ein PCOS gestellt wurde und noch nicht

bestätigt wurde.76 Patientinnen negierten die Frage, die restlichen Patientinnen machten keine Angaben.
Hinsichtlich der Fetuin-B Werte und der Fertilisationsraten konnte *kein* signifikanter Unterschied in Abhängigkeit eines Vorhandseins oder Nichtvorhandenseins eines PCOS festgestellt werden.

5) Diskussion

5.1 Fetuin-B Dynamik

Das Hauptergebnis der Studie ist, dass die Fetuin-B Werte unter der Stimulation einer ART-Therapie signifikant anstiegen (p=0.005) (Abbildung 13). Die Beobachtungen der vorausgegangenen Pilotstudie von Julia Floehr können somit bestätigt werden. Interessanterweise zeigte das Fetuin-B in der Gruppe „Fertilisationsversagen“ (Fertilisationsrate <25%) *keine* signifikante Anstiegsdynamik (p=0.17) (Abbildung 14), trotz ansteigender Estradiolwerte. Auch dieses Phänomen konnte bereits Julia Floehr in ihrer Pilotstudie bei 25 Patientinnen feststellen (Floehr et al. 2016). Ein Ziel der Studie war es zu überprüfen, ob die Ergebnisse von Floehr auf ein größeres Patientenkollektiv übertragen werden können. Durch die übereinstimmenden Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse auf ein größeres Patientenkollektiv übertragen werden können.

Neben der Pilotstudie kann auch Bezug auf eine Studie mit Mäusen genommen werden. In der Studie konnte ein zwei-facher Anstieg der Fetuin-B Werte zum Ende des ovariellen Zyklus bei Mäusen gemessen werden (Dietzel et al. 2013). Eine Anstiegsdynamik des Fetuin-B, wie sie sich in dieser Studie zeigte, konnte also auch schon in einer Studie mit Mäusen beobachtet werden.
Da jedoch die Fetuin-B Werte in Mäusen 31-mal höher sind als beim Menschen, wird eine speziesspezifische Regulation der Fetuin-B Werte angenommen (Denecke et al. 2003). Ob und inwieweit die Ergebnisse der Studie an Mäusen also auch auf den Menschen zu übertragen sind, bleibt fraglich. Nichtsdestotrotz, kann festgehalten werden, dass beim Menschen, genauso wie bei Mäusen, ein signifikanter Anstieg der Fetuin-B Werte während des ovariellen Reifungsprozesses beobachtet werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein fehlender Fetuin-B Anstieg, trotz adäquatem Estradiolanstieg, mit einem Fertilisationsversagen (Fertilisationsrate <25%) assoziiert ist und somit auf eine ovarielle Dysfunktion hindeuten kann. Die bereits publizierte essenzielle Funktion des Fetuin-B auf die Fertilisation, konnte somit in dieser Studie bekräftigt werden (Dietzel et al. 2013).

Außerdem kann angenommen werden, dass Fetuin-B aufgrund der Ergebnisse als ein prognostischer Biomarker eingesetzt werden kann (s.unten).

5.2 Adäquater Estradiolanstieg unter hormoneller Stimulation

Erwartungsgemäß konnte unter der hormonellen Stimulation ein Anstieg der Estradiolwerte auf das 14-fache beobachtet werden. Dieser Estradiolanstieg dient als eine Kontrolle der durchgeführten ART-Therapie. Der erste Schritt der ART-Therapie besteht, wie oben beschrieben, in der hormonellen Stimulation. Hierdurch erwünscht man sich ein Follikelwachstum, bei dem es bei einer regelrechten Proliferation der Granulosazellen zu einem Anstieg der Estradiolwerte kommt (Richard 2019). Die weitere Bedeutung und Rolle der Estradiolwerte auf die Eizellreifung sollen hier nicht diskutiert werden. Dennoch muss der adäquate Estradiolanstieg unter der ART-Therapie aufgezeigt werden, um eine fehlerhafte hormonelle Stimulation als Genese eines Fertilisationsversagen (Fertilisationsrate <25%) ausschließen zu können.

5.3 Fetuin-B korreliert negativ mit Fertilisationsraten

Erstaunlicherweise wurden in dieser Studie bei allen, außer bei den zu Beginn gemessenen Fetuin-B Werte, eine negative Korrelation mit den Fertilisationsraten beobachtet. In der vorausgegangenen Pilotstudie bestand jedoch eine positive Korrelation zwischen ansteigenden Fetuin-B Werten und einer erfolgreichen IVF-Therapie (Floehr et al. 2016). Auch zwei weitere Studien von Hu X (Hu et al. 2017) und Li Fang (Fang et al. 2019b) haben ähnliche Beobachtungen wie Julia Floehr.
Li Fang hat in seiner Studie von 2019 festgestellt, dass hohe Fertilisationsraten (≙2-Pronucleirate > 70%) mit höheren Fetuin-B Werten assoziiert waren als niedrigere Fertilisationsraten (≙2-Pronucleirate < 30%) (Fang et al. 2019b). Es bestand also wie in der Pilotstudie eine positive Korrelation der Fetuin-B Werte mit den Fertilisationsraten. Auch wenn Li Fang nicht in erfolgreiche und erfolglose Fertilisation unterteilte, sondern in hohe und niedrige Fertilisationsrate, ist die Kernaussage identisch zu Julia Floehr.
In Li Fangs Studie wurden, ebenso wie in der Pilotstudie, lediglich IVF-Zyklen und keine ICSI-Zyklen durchgeführt.

In der Studie von Hu konnten ebenfalls signifikant niedrigere Fetuin-B Werte bei niedrigen Fertilisationsraten festgestellt werden, im Vergleich zu normalen Fertilisationsraten (Hu et al. 2017). Lediglich anzumerken ist, dass die Begriffe niedrige und normale Fertilisationsrate nicht definiert wurden.

Um es zusammenzufassen, scheint, die, in dieser Studie gemessene negative Korrelation zwischen Fetuin-B und den Fertilisationsraten, nicht in den allgemein wissenschaftlich anerkannten Konsens zu passen. Die Messwerte wurden nach bestem Gewissen erhoben, aber es kann natürlich auch eine Unsicherheit in den Werten liegen. Eine wissenschaftlich fundierte Erklärung, warum eine negative Korrelation zwischen Fetuin-B und den Fertilisationsraten vorliegen sollte, kann auf Grundlage der aktuellen Datenlage nicht gegeben werden. So gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass Fetuin-B der Kausalitätsfaktor für eine Fertilitätsminderung sein könnte. Vielmehr wird Fetuin-B als essenziell für den Reproduktionsvorgang angesehen (Dietzel et al. 2013), was auch in dieser Studie anhand der Fetuin-B Dynamik bei einem Fertilisationserfolg beobachtet werden konnte.
Einzig anzumerken ist, dass in anderen Studien ferner der Reproduktionsmedizin höhere Fetuin-B Werte mit pathologischen Prozessen assoziiert waren.

So wurden signifikant höhere Fetuin-B Werte bei einer nicht alkoholischen Fettleber Erkrankung ((NAFLD) bzw. einer Lebersteatose (Adamska et al. 2019), sowie bei Frauen mit einem Schwangerschafts-Diabetes (Kralisch et al. 2017) festgestellt. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten Fetuin-B Werten und erhöhten Nüchtern- Blutzuckerwerten (Lin et al. 2019), sowie eine positive Korrelation der Fetuin-B Werte mit der Insulinkonzentration im Serum beobachtet (Adamska et al. 2019). Allerdings scheint es, dass hier kein kausaler Zusammenhang anzunehmen ist, vielmehr scheint die Lebersynthese schlichtweg die kalorische Versorgung der Probandinnen widerzuspiegeln. Das ist an den Albuminwerten zu erkennen, die, wenn mitgemessen, auch immer erhöht waren.

Eine weitere Studie berichtete eine Assoziation zwischen erhöhten Fetuin-B Werten und dem Auftreten koronarer Herzerkrankungen feststellen können (Zhu et al. 2017). Allerdings wurden in der Studie wesentlich höhere Werte gemessen als in unseren eigenen Studien, sodass die Qualität der Messungen fraglich ist. Die Fetuin-B Werte gesunder Kontrollpatienten (90.7 ± 32.1 µg/ml) Patienten mit Koronarerkrankungen

(110.0 ± 32.7 µg/ml) und akutem Koronarsyndrom (115.0 ± 35.2 µg/ml) lagen alle ca. 100-fach hoher als die von uns gemessenen Fetuin-B Mittelwerte von 1.82±1.07 µg/ml, (MW±SD; n= 101)). Des Weiteren wird in der Studie nicht erklärt, welche Protease, die im Zusammenhang mit einer Koronarer Herzkrankheit steht, durch Fetuin-B inhibiert wurde. Wissenschaftlich belegt ist, dass Fetuin-B ein Proteaseinhibitor des Ovastacin ist (Karmilin et al. 2019). Auch die Funktion des Ovastacin wurde schon in mehreren Studien beschrieben, wobei keine Funktion in Zusammenhang mit einer Koronaren Herzkrankheit beobachtet wurde (Körschgen et al. 2017) (Bleil et al. 1981) (Burkart et al. 2012). Zusammenfassend scheinen die Ergebnisse von Zhu sehr zweifelhaft, aufgrund der extremen Erhöhung der gemessenen Fetuin-B Werte und der fehlenden Beschreibung einer Protease, die durch Fetuin-B inhibiert werden soll.

Weitere Studien bei denen signifikant höhere Fetuin-B Werte gemessen wurden sind: bei einem nikotininduzierten Adenocarcinoms der Lunge (Zhou et al. 2019), bei einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (Diao et al. 2016) sowie bei einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) (Lin et al. 2019). Eine weitere Diskussion der aufgelisteten Studien erfolgt nicht, da die gemessenen Fetuin-B Werte unglaubwürdig hoch sind.

5.4 Fetuin-B als biologischer Prognosemarker

Das Hauptergebnis der Studie war die Beobachtung, dass Fetuin-B bei einem Fertilisationserfolg (Fertilisationsrate >25%) signifikant ansteigt, während bei einem Fertilisationsversagen (Fertilisationsrate < 25%) kein signifikanter Anstieg beobachtet werden konnte. Da diese Beobachtung schon in der Pilotstudie gemacht werden konnte, sollte in dieser Studie eine Übertragbarkeit auf ein größeres Patientenkollektiv überprüft werden. Da die Beobachtungen von Julia Floehr, mit denen dieser Studie übereinstimmen, kann von einer Übertragbarkeit auf ein größeres Patientenkollektiv ausgegangen werden. So kann auch vorgeschlagen werden Fetuin-B als einen prognostischen Biomarker hinsichtlich des Fertilisationserfolges einzusetzen.
Bei fehlendem signifikantem Anstieg des Fetuin-B kann von einem Fertilisationsversagen (Fertilisationsrate <25%) ausgegangen werden, während bei

einem signifikanten Anstieg von einem Fertilisationserfolg (Fertilisationsrate >25%) auszugehen ist.
Fetuin-B als einen Prognosemarker einzusetzen, scheint sehr vorteilhaft, da Fetuin-B physiologischerweise im menschlichen Organismus produziert wird und mittels einer simplen Blutabnahme gewonnen werden kann. Routinemäßige Blutabnahme erfolgen routinemäßig unter einer ART-Therapie, sodass keine weitere Diagnostik nötig wäre. Bei Einführung des Fetuin-B als einen biologischen Prognosemarker, wäre also eine kostengünstige Methode etabliert.

5.5 Einfluss der Fetuin-B Werte auf die Schwangerschaftsraten

In der Studie konnte keine Korrelation zwischen den Fetuin-B Werten und dem Eintreten einer klinischen Schwangerschaft festgestellt werden. Zu diesem Ergebnis, ist auch eine Studie von Li Fang gekommen (Fang et al. 2019b). So war es auch nicht zu erwarten, dass Fetuin-B mit seiner inhibierenden Funktion auf das Ovastacin (Dietzel et al. 2013) (Floehr et al. 2017) (Dietzel et al. 2017) (Karmilin et al. 2019), auch den komplexen Ablauf einer Schwangerschaft beeinflussen könnte.
Daneben bestand auch keine Korrelation zwischen den Fertilisationsraten und dem Eintreten einer klinischen Schwangerschaft. Anhand dieser Beobachtungen kann Fetuin-B als ein prognostischer Biomarker hinsichtlich der Fertilisationsraten eingeführt werden. Eine Aussage bezüglich des Eintretens einer klinischen Schwangerschaft kann hiervon jedoch nicht abgeleitet werden.

5.6 Zusammenhang zwischen der Zona pellucida Dicke und den Fertilisationsraten

In der vorliegenden Studie konnte *keine* signifikante Assoziation der Fertilisationsraten mit der Zonadicke festgestellt werden. Auch innerhalb der Gruppen Fertilisationserfolg (Fertilisationsraten >25%) und Fertilisationsversager (Fertilisationsraten <25%) wurden *keine* signifikanten Unterschiede in der Dicke der Zona pellucida in Abhängigkeit der Fertilisationsraten festgestellt.
Außerdem konnte in der vorliegenden Studie *keine* Korrelation zwischen den Fetuin-B Werten und der Zonadicke festgestellt werden. Folglich kann anhand der Studienergebnisse nicht von einem Einfluss der Fetuin-B auf die Dicke der Zona

pellucida ausgegangen werden. Daraus ableitend, könnte man postulieren, dass die Dicke der Zona pellucida keinen Einfluss auf die Embryonenimplantation nimmt, sondern vielmehr den Embryonen stabilisiert und einen Transport ermöglicht.

In einer früheren Studie konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Dicke der Zona pellucida und Fetuin-B defizienten Mäusen beobachtet werden. In der Studie wurde Fetuin-B durch antisense Oligonukleotide (ASO) unterdrückt (Fetuin-B defiziente Mäuse). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Dicke der Zona pellucida der Fetuin-B defizienten Mäusen signifikant niedriger war als bei Wildtyp-Mäusen. (Dietzel et al. 2013). Hier ist anzumerken, dass Ergebnisse, die anhand von Tierversuchen festgestellt wurden, nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können.
Morphologische Veränderungen innerhalb der Zona pellucida, die vor allem das Zona Protein 3 betreffen, scheinen jedoch mit einem Fertilisationsversagen assoziiert zu sein (Oehninger et al. 1996). Bringt man diese Studienergebnisse in Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie, könnte man folgende Vermutung anstellen: Es ist nicht die Dicke der Zona pellucida entscheidend für den Fertilisationserfolg, sondern vielmehr der strukturelle Aufbau der Zona pellucida.

Bei einer anderen Studie mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine dicke Zona pellucida und zusätzlich Proakrosin-defiziente Spermien mit stark erniedrigten Fertilisationsraten assoziiert waren (Nayernia et al. 2002). Man könnte vermuten, dass die Dicke der Zona pellucida an sich, nicht mit den Fertilitätsraten assoziiert ist, jedoch ein Hindernis für veränderte Spermien darstellt, die nicht in der Lage sind, die Dicke zu überwinden. Das ist jedoch rein spekulativ. Zur Überprüfung der Hypothese müsste man unterschiedlich dicke Zonae pellucida mit gesunden und veränderten Spermien zusammenführen.

5.7 Der Einfluss des Alters auf die Fertilisationsraten

Es ist wissenschaftlich belegt, dass ein höheres Alter einen negativen Einfluss auf die Fertilisationsraten nehmen kann. So wurde in einer Studie aus dem Jahre 1995 beobachtet, dass die Fertilisationswahrscheinlichkeit von 50-60% bei 20 Jährigen, auf 30% bei 30 Jährigen und auf 3% bei über 40-jährigen fiel (Tinneberg & Ottmar 1995) .

Aufgrund dessen konnte das Alter, als möglicher Einflussfaktor auf die Fertilisationsraten, bei der Datenauswertung nicht unbeachtet bleiben, da die Probandinnen unterschiedlichen Alters waren.
In dieser Studie zeigte sich eine signifikante Abnahme der Oozytenanzahl bei Frauen >35 Jahren. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Fetuin-B Werte oder der Fertilisationsraten wurden jedoch *nicht* beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie, die ebenfalls gezeigt hat, dass das weibliche Alter *kein* Prädiktor für ein Fertilisationsversagen ist (Krog et al. 2015). Auch die Ergebnisse der Studie von Gnoth aus dem Jahre 2003 zeigten, dass die Fertilität im steigenden Alter sehr heterogen ist. So wurde beobachtet, dass auch Frauen über 35 Jahre noch hochfertil sind (Gnoth et al. 2003b). Eine weitere Studie zeigte, dass ein fortgeschrittenes Alter der Patientinnen Einfluss auf die Oozytenanzahl nimmt (Kuohung & Hornstein 2017). Außerdem muss berücksichtigt werden, dass nicht zwangsläufig die Anzahl der Oozyten, sondern deren Qualität für den Fertilisationserfolg entscheidend sind (Navot et al. 1991;Sabatini 2019).
Die in der Studie beobachtete signifikante Abnahme der Oozytenanzahl mit steigendem Alter ist physiologisch leicht zu erklären. Die in der Pubertät angelegte Reserve von 400.000 Primordialfollikeln sinkt auf nur noch 25.000 Follikel ab dem 37. Lebensjahr ab (Faddy & Gosden 2007), womit die Wahrscheinlichkeit der Gewinnung geeigneter Oozyten bei einem reduzierten Ausgangpool an Ooyzten nachvollziehbar sinkt.
Des Weiteren ist die Anzahl der gewonnen Oozyten vielmehr als ein Resultat der hormonellen Stimulation anzusehen und weniger nützlich zur Prognose der Fertilisationsraten. Da keine signifikanten Unterschiede in den Fetuin-B Werten zwischen den verschiedenen Altersgruppen festgestellt werden konnte, scheint es keinen Einfluss des Alters auf das hepatische Induktionspotenzial des Fetuin-B zu geben.

5.8 Der BMI-Wert ist nicht mit den Fetuin-B Werten assoziiert

Diese Studie konnte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Fetuin-B Werte, der Fertilisationsraten oder der Oozytenanzahl in Abhängigkeit der Höhe des BMI-Wertes feststellen. Die Intention zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhanges zwischen den BMI-Werten mit den Fetuin-B Werten bestand darin, dass in früheren Studien eine Assoziation der Fetuin-B Werte mit den Cholesterinwerten, mit dem Nüchtern-Blutzucker und mit einer Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (Lin et al.

2019) beobachtet wurde. In den Studien waren hohe Cholesterinwerte (Mashnafi et al. 2019) und hohe Nüchtern- Blutzuckerwerte (Coleman et al. 2017), wie sie auch gehäuft bei Menschen mit hohem BMI auftreten, mit hohen Fetuin-B Werten assoziiert. Eine Hypothese der vorliegenden Studie war, dass der BMI-Wert, der häufig mit dem Körperfett-Anteil assoziiert ist (Perreault 2019), möglicherweise auch einen Einfluss auf die Höhe der Fetuin-B Werte nehmen könnte. Zudem konnte, wie oben beschrieben, in einigen Studien beobachtet werden, dass die Fetuin-B Werte bei pathologischen metabolischen Prozessen ansteigen.
So wäre es denkbar, dass bei einem hohen BMI-Wert auch erhöhte Fetuin-B Werte vorliegen. Genauso wie bei hohen Cholesterin Werten hohe Fetuin-B Werte beobachtet wurden. Entgegengesetz der Überlegungen und der vorausgegangenen Studie, konnte in dieser Studie *keine* Korrelation der BMI-Werte mit den Fetuin-B Werten und *kein* signifikanter Unterschied in der Höhe der Fetuin-B Werte innerhalb der unterschiedlichen BMI-Gruppen festgestellt werden. Ebenso wenig konnte ein signifikanter Unterschied in den BMI-Werten innerhalb der Gruppen Fertilisationserfolg (Fertilisationsrate >25%) und Fertilisationsversager (Fertilisationsrate <25%) festgestellt werden. Auch wenn diese Studie unterschiedlich hohe Fetuin-B Werte festgestellt hätte, sagt die Höhe der Fetuin-B Werte ja nicht grundsätzlich etwas über die Funktion aus. So weiß man bereits, dass 10% des Fetuin-B ausreichend sind, um eine Zona pellucida Verhärtung zu verhindern (Dietzel et al. 2013). Dennoch hätte man bei einer Assoziation eines hohen BMI-Wertes mit hohen Fetuin-B Werte, Hypothesen hinsichtlich der Synthesetrigger des Fetuin-B aufstellen können.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass individuelle Faktoren wie das Alter oder der BMI-Wert keinen signifikanten Einfluss auf die Fetuin-B Werte und die Fertilisationsraten ausüben. Demnach kann auch nicht davon ausgegangen werden, dass diese als Confounder oder Störgröße die Ergebnisse der Studie verfälscht hätten.

5.9 Die Fetuin-B Werte unterscheiden sich je nach vorliegender Infertilitätsursache (primär vs. sekundär)

Interessanterweise konnten in der Studie signifikant höhere Fetuin-B Werte in der Gruppe der Patientinnen mit sekundärer Infertilität, im Vergleich zu den Patientinnen mit einer primären Infertilität festgestellt werden. Julia Floehr hat im Allgemeinen

beobachtet, dass höhere Fetuin-B Werte mit einer erfolgreichen Fertilisation assoziiert waren (Floehr et al. 2016). In dieser Studie konnte jedoch keine Assoziation der Fetuin-B Werte mit den Fertilitätsraten, in Abhängigkeit der Infertilitätsursache, beobachtet werden.
Im Gegensatz dazu, ist eine Studie zu erwähnen, die beobachtet hat, dass ein Fertilisationsversagen signifikant häufiger bei einer primären Infertilität als bei einer sekundären Infertilität auftrat (Zhu et al. 2015).
Auch wenn wir wissen, dass 10% des Fetuin-B ausreichend ist, um eine Zona pellucida Verhärtung zu verhindern (Dietzel et al. 2017), sind die Ergebnisse, dass eine primäre Infertilität häufiger mit einem Fertilisationsversagen assoziiert ist (Zhu et al. 2015) und niedrigere Fetuin-B Werte bei Nulligravida gemessen wurden, interessant.
Vorzuschlagen wäre, eine Überprüfung der Messergebnisse mittels eines größeren Patientenkollektives und eine erneute Testung hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes in den Fertilisationsraten in Abhängigkeit der Infertilitätsursache.
Eine Möglichkeit wäre eine Verlaufsdokumentation der Fetuin-B Werte vorzunehmen. So könnten bei Patientinnen mit einer sekundären Infertilität die Fetuin-B Werte von der ersten erfolgreichen, natürlich eingetretenen Schwangerschaft mit den Fetuin-B Werte vor und während einer ART-Therapie verglichen werden.

5.10 Der Nikotinkonsum beeinflusst die Fetuin-B Werte nicht

Als weiterer Einflussfaktor auf den Fertilisationsprozess ist der Nikotinkonsum zu nennen (Jick & Porter 1977), der immerhin in 13% der Fälle ursächlich für eine Infertilität ist (Medicine. 2018). So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der Nikotinkonsum mit einem statistisch signifikanten Anstieg einer Infertilität assoziiert ist, im Gegensatz zu Nichtraucherinnen (Augood et al. 1998). Außerdem konnte in der Studie gezeigt werden, dass eine durch Nikotinkonsum ausgelöste Subfertilität auch nicht mittels einer ART-Therapie überwunden werden kann (Augood et al. 1998). Als Ursache für die verminderte Fertilität bei Rauchern wurde eine verminderte Oozytenreserve und ein frühzeitiges Altern der Ovarien angegeben (Adena & Gallagher 1982;Cramer et al. 1994).
Aufgrund der vielen Auswirkungen, die ein Nikotinkonsum auf den Fertilitätsprozess sowie den Schwangerschaftsverlauf hat (Burton et al. 1989;Bush et al. 2000;Larsen et

al. 2002), sollte in dieser Studie untersucht werden, ob der Nikotinkonsum auch einen Einfluss auf die Fetuin-B Werte nimmt.
In dieser Studie konnte jedoch *keine* Beeinflussung der Fetuin-B Werte durch einen Nikotinkonsum festgestellt werden. Es wurde auch nicht beobachtet, dass Raucherinnen eine niedrigere Fertilisationsrate als Nichtraucherinnen aufwiesen. Vor dem Hintergrund der vorausgegangenen Studienergebnisse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Nikotinkonsum einen Einfluss auf die Fertilisationsraten nimmt und somit eine Störgröße darstellt.

5.11 Ein PCOS nimmt keinen Einfluss auf die Fertilisationsraten

Die Ergebnisse der Studie demonstrierten, dass *kein* signifikanter Unterschied der Fetuin-B Werte und der Fertilisationsraten bei Vorhandensein oder Fehlen eines PCOS festgestellt werden konnte. Im Vergleich hierzu kann Bezug genommen werden auf eine Studie, die deutlich höhere Fetuin-B Werte bei Patientinnen mit einem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) beobachtet hat, im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe ($p<0.05$) (Adamska et al. 2019). In den Rotterdam Kriterien 2003 wurde das PCOS definiert als ein Zeichen und Syndrom ovarieller Dysfunktion.

Parameter	**Adamska et al 2019**
Fetuin-B (µg/mL) bei *PCOS*	88.1 ±26.7 (n=57)
Fetuin-B (µg/mL) in der Kontrollgruppe	79.2 ±16.7 (n=51)
Assay	ELISA
Signifikanz	p<0.05

Auch in einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Fertilisationsraten bei PCOS-Patientinnen signifikant niedriger waren im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Patientinnen (MacDougall et al. 1993).

Parameter	**MacDougall et al 1993**
Fertilisationsrate bei *PCOS* (%)	52.8 ±3.4% (n=76)
Fertilisationsrate in der Kontrollgruppe (%)	66.1 ±3.4% (n=76)
Assay	IVF-Therapie
Signifikanz	p=0.007

Anzumerken ist, dass in dieser Studie nur 15 Patientinnen aussagten unter einem PCOS zu leiden. Aufgrund dieser geringen Anzahl ist es schwierig valide Ergebnisse zu

erhalten. Da das PCOS eine ovarielle Dysfunktion ist, scheint es einleuchtend, dass auch niedrigere Fertilisationsraten beobachtet werden können. Anhand des aktuellen Wissenstandes kann keine Erklärung gegeben werden, weshalb höhere Fetuin-B Werte bei einem PCOS vorliegen könnten. Die Höhe der Fetuin-B Werte sagt ja nichts über die Funktion aus und 10% reichen aus, um eine Verhärtung der Zona pellucida zu verhindern (Floehr et al. 2016).

5.12 Der Einfluss des Therapieverfahrens (ICSI-/IVF-Therapie) auf die Fertilisationsraten

In der Datenauswertung der Studie durfte nicht ungeachtet bleiben, dass die beiden Therapieverfahren (IVF- und ICSI-Therapie) im Allgemeinen unterschiedlich hohe Erfolgsraten hinsichtlich der Fertilisationsraten aufweisen. Die ICSI-Therapie liegt mit einem 94,9%igem Fertilisationserfolg vor der IVF-Therapie mit einem 92,3%igem Fertilisationserfolg (Deutsches-IVF-Register. 2020). Der Fertilisationserfolg definiert sich in Deutschland jedoch über mindestens eine befruchtete Oozyte pro Zyklus (Deutsches-IVF-Register. 2019). Auch in der vorliegenden Studie waren die Fertilisationsraten bei einer ICSI-Therapie mit 52.88±32.20% (n=68) signifikant höher ($p=0.0003$) als bei einer IVF-Therapie mit 22.04±29.03% (n=25). Somit sind die Ergebnisse in die Reihe des aktuellen Wissenstandes einzusortieren.

5.13 Diskussion der Methodik

Die vorliegende Studie ist eine klinische Prognosestudie in Form einer Beobachtungsstudie. Klinische Studien leisten heutzutage einen großen Beitrag in der medizinischen Forschung (Wissenschaftsrat. 2018).
Es muss angemerkt werden, dass die Problematik des multiplen Testens, wie es häufig bei Prognosestudien vorkommt, auch in dieser Studie nicht gänzlich umgangen werden konnte. Multiples Testen schwächt die Power einer Studie und steigert die Wahrscheinlichkeit einer Falschaussage (Victor et al. 2010). Da bis zum jetzigen Zeitpunkt die vollumfängliche Rolle des Fetuin-B im menschlichen Reproduktionsprozess noch nicht komplett entschlüsselt ist und potenzielle Einflussfaktoren auf den Fertilisationsprozess noch unerforscht sind, ließ sich ein multiples Testen nicht umgehen. Außerdem wurde durch die Bildung von Untergruppen das Patientenkollektiv aufgeteilt und somit die Fallzahl in der jeweiligen Untergruppe reduziert. Aufgrund der geringeren Fallzahl wurde somit auch die Aussagkraft der Ergebnisse gemindert und die Power der Studie reduziert (Röhrig et al. 2009a).

Die Studiendauer war mit vier Jahren ausreichend lang, um die im Vorfeld festgelegte Fallzahl zu erreichen.
Das Studiendesign an sich gehört zu den wichtigsten Faktoren bei der Konstruktion einer Studie (Röhrig et al. 2009a). Darunter fällt beispielsweise die Bestimmung der Fallzahl für die geplante Studie (Röhrig et al. 2010), um die Power der Studie zu steigern und statische Fehler zu vermeiden. Um einen Anhaltpunkt für eine geeignete Fallzahl für die vorliegende Studie zu bekommen, wurde im Vorfeld eine Pilotstudie mit 25 Patientinnen durchgeführt. Anhand der Ergebnisse der Pilotstudie wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik RWTH Aachen, eine Fallzahlplanung erarbeitet. Die Durchführung einer Pilotstudie hatte zudem den Vorteil einen Anhaltspunkt bezüglich des zu erwartenden Unterschiedes und der Streuung der Werte zu erhalten (Röhrig et al. 2010).

Das Nutzen-Risiko-Verhältnis der vorliegenden Studie erwies sich als sehr gut (Schumacher & Schulgen 2007). Die Patientinnen mussten bei Teilnahme an der Studie keine zusätzliche Arbeit leisten oder invasive Eingriffe über sich ergehen lassen. Die Anamneseerhebung ist ein Teil der Behandlungsroutine. Da die Bestimmung des

Fetuin-B aus den routinemäßig durchgeführten Blutuntersuchungen erfolgte, bestand auch hier keine zusätzliche Belastung.
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es im Wesentlichen keinen Unterschied bzw. Beeinträchtigung/Risiko der Patientinnen durch die Studienteilnahme im Vergleich zu einer ART-Therapie ohne Studienteilnahme gab. Ein direkter Nutzen für die teilgenommenen Studienteilnehmerinnen konnte nicht erzielt werden.
Anzumerken ist, dass die Patientencompliance sehr hoch war. Diese erfreuliche Feststellung beruht am ehesten auf dem patientenfreundlichen Studiendesign. Folglich war auch die Zahl an drop-outs mit zwei Patientinnen sehr gering.

Hinsichtlich der Messmethodik kann erwähnt werden, dass die Messergebnisse durch standardisierte Abnahmezeitpunkte (Blutabnahme bei Beginn der Therapie und zwei-null Tage vor Follikelpunktion) vergleichbar waren (Röhrig et al. 2009a).
Bei der Fragestellung, ob Fetuin-B möglicherweise die Rolle eines prognostischen Biomarkers einnehmen kann, muss berücksichtigt werden, dass neue potenzielle Prognosefaktoren immer in einer multivarianten Analyse mit bereits bekannten Prognosemarkern untersucht werden sollten (Schumacher & Schulgen 2007). Da es bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keinen Biomarker bezüglich der Fertilisationsrate gibt, war eine derartige Analyse nicht möglich. Des Weiteren muss erwähnt werden, dass der Fertilisationsprozess an sich sehr komplex ist und noch nicht vollständig erforscht ist. Welche Komponenten Einflüsse auf die Fertilisation nehmen können, sind also noch nicht vollständig identifiziert. Auch die Tatsache, dass Fetuin-B erst vor 20 Jahren entdeckt wurde und beispielsweise Synthesetrigger noch nicht vollständig identifiziert wurden, zeigt, dass noch Forschungsbedarf besteht.

6) Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Dynamik des Fetuin-B bei einer erfolgreichen Fertilisation (Fertilisationsrate >25%), wie auch in der Pilotstudie zuvor, beobachtet werden konnte. Dahingegen kam es zu keinem signifikanten Fetuin-B Anstieg bei einer erfolglosen Fertilisation (Fertilisationsrate <25%).
Auf Grundlage der übereinstimmenden Ergebnisse mit der vorausgegangenen Pilotstudie scheint es möglich, Fetuin-B als einen biologischen Prognosemarker einzuführen. Bei einem fehlenden Fetuin-B Anstieg könnte somit von einer erfolglosen Fertilisation ausgegangen werden.

Eine weitere wichtige Erkenntnis der Studie ist, dass die Fetuin-B Werte *nicht* durch individuelle Faktoren wie dem Alter, dem BMI-Wert, der vorliegenden Art der Infertilität (primär vs. sekundär) oder dem Nikotinverhalten beeinflusst werden.

Des Weiteren konnte *kein* Einfluss des Fetuin-B auf die Dicke der Zona pellucida festgestellt werden. Es konnte auch *kein* Zusammenhang zwischen der Zona pellucida Dicke mit den Fertilisationsraten beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie die essenzielle Rolle des Fetuin.B auf die Fertilisation unterstrichen werden. Die Studienergebnisse der vorausgegangenen Pilotstudie konnten bestätigt werden, sodass es möglich scheint Fetuin-B als einen biologischen Prognosemarker in der menschlichen Reproduktionsmedizin einzuführen. In der Zukunft wäre es nun interessant den Promotor zur Genregulation des Fetuin-B genauer zu untersuchen und zu erforschen, ob es weitere Assoziationspartner des Fetuin-B gibt.

7) Literaturverzeichnis

Adamska, A., Polak, A., Krentowska, A., Łebkowska, A., Hryniewicka, J., Leśniewska, M., Kowalska, I.: Increased serum fetuin-B concentration is associated with HOMA-β and indices of liver steatosis in women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. Endocrine Connections (2019) 8: 1159-1167, https://doi.org/10.1530/EC-19-0243

Adena, M., Gallagher, H.: Cigarette smoking and the age at menopause. Ann Hum Biol (1982) 9: 121-130

Altman, D.: Practical statistics for medical research. Chapman and Hall London (1991):

Anawalt, B., Page, S.: Causes of male infertility. wwwuptodatecom (2019):

Anawalt, B., S., P.: Treatments for male infertility. wwwuptodatecom (2020):

Assidi, M., Montag, M., Sirard, M.: Use of both cumulus cells' transcriptomic markers and zona pellucida birefringence to select developmentally competent oocytes in human assisted reproductive technologies. BMC Genomics (2015) 16: 9 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25923296), 10.1186/1471-2164-16-S1-S9

Augood, C., Duckitt, K., Templeton, A.: Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod (1998) 13: 1532-1539

Barber, M., Park, A.: Surgical female pelvic anatomy. wwwuptodatecom (2019):

Bleil, Greve, Wassarman: Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. Dev Biol (1988) 128: 376–385

Bleil, J., Beal, C., Wassarman, P.: Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. Developmental Biology (1981) 86: 189-197, https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90329-8

Bogner, K., Hinsch, K., Nayudu, P., Konrad, L., Cassara, C., Hinsch, E.: Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (Callithrix jacchus) ovary. Mol Hum Reprod (2004) 10: 481–488

Braden, A., Austin, C., David, H.: The reaction of zona pellucida to sperm penetration. . Aust J Biol Sci (1954) 7: 391–409

Bundesausschuss., G.: Spermiogrammparameter für eine Indikation zur Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) statt In-vitro-Fertilisation (IvF). Beratungsverfahren gemäß § 135 Absatz1 Fünftes Buch Sozialgesetzbuch (SGB V) (2017), www.g-ba.de

Burkart, D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., Dean, J.: ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. J Cell Biol (2012) 197: 37-44

Burton, G., Palmer, M., Dalton, K.: Morphometric differences between the placental vasculature of non-smokers, smokers and ex-smokers. Br J Obstet Gynaecol (1989) 8: 907-915

Bush, P., Mayhew, T., Abramovich, D., Aggett, P., Burke, M., Page, K.: A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. Placenta (2000) 21: 247-256

Claw, K., Swanson, W.: Evolution of the egg: new findings and challenges. Annu Rev Genomics Hum Genet (2012) 13: 109–125, https://doi.org/10.1146/annurev-genom

Coleman, C., Kiel, J., Mitola, A., Arterburn, L.: Comparative effectiveness of a portion-controlled meal replacement program for weight loss in adults with and without diabetes/high blood sugar. Nutr Diabetes (2017) 7: 284, 10.1038/nutd.2017.32

Comhaire, F., Organization., W.H., Infertility., T.F.o.t.D.a.T.o.: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. International journal of andrology (1987) 7:

Cramer, D., Barbieri, R., Xu, H., Reichardt, J.: Determinants of basal follicle-stimulating hormone levels in premenopausal women. J Clin Endocrinol Metab (1994) 79: 1105-1109

Cuppari, A., Körschgen, H., Fahrenkamp, D., Schmitz, C., Guevara, T., Karmilin, K., Kuske, M., Olf, M., Dietzel, E., Yiallouros, I., Sanctis, D., Goulas, T., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., Stoecker, W., Jovine, L., Gomis-Rüth, F.: Structure of mammalian plasma fetuin-B and its mechanism of selective metallopeptidase inhibition. IUCrJ Biology Medicine (2019a) 6: 317–330, https://doi.org/10.1107/S2052252519001568

Cuppari, A., Körschgen, H., Fahrenkamp, D., Schmitz, C., Jahnen-Dechent, W., Stöcker, W., Jovine, L., Gomis-Rüth, F.X.: Selective inhibition of astacin metallopeptidases by mammalian fetuin-B. Acta Crystallogr Sect Found Adv 75 (2019b), e135–e135. 10.1107/s205327331909421x

Denecke, B., Graber, S., Schafer, C., Heiss, A., Woltje, M., Jahnen-Dechent, W.: Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. Biochem J (2003) 376: 135–145

Depalo, R., Garruti, G., Totaro, I., Panzarino, M., Vacca, M., Giorgino, F., Selvaggi, L.: Oocyte morphological abnormalities in overweight women undergoing in vitro fertilization cycles. Gynecol Endocrinol (2011) 27: 880-884

Deutsches-IVF-Register.: Deutsches IVF Register. Jahrbuch 2018. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie (2019): 279–315

Deutsches-IVF-Register.: Jahrbuch 2019. Reproduktionsmedizin Endokrinologie (2020): 199-239

Diao, W., Shen, N., Du, Y., Liu, B., Sun, X., Xu, M., He, B.: Fetuin-B (FETUB): a Plasma Biomarker Candidate Related to the Severity of Lung Function in COPD. Sci Rep (2016) 6: 30045, 10.1038/srep30045

Díaz-Perales, Quesada, Peinado, Ugalde, Alvarez, Suárez, Gomis-Rüth, López-Otín: Identification and characterization of human archaemetzincin-1 and -2, two novel members of a family of metalloproteases widely distributed in Archaea. J Biol Chem (2005) 280: 30367-30375

Diedrich, K., Ludwig, M., Griesinger, G.: Reproduktionsmedizin Springer Medizin (2013a): 29

Diedrich, K., Ludwig, M., Griesinger, G.: Reproduktionsmedizin (2013b) Springer Medizin, 10.1007/978-3-642-30181-0

Dietzel, E., Floehr, J., Van de Leur, E., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W.: Recombinant fetuin-B protein maintains high fertilization rate in cumulus cell-free mouse oocytes. Mol Hum Reprod (2017) 23: 25-33 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733489), 10.1093/molehr/gaw067

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: 106-112 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562279), 10.1016/j.devcel.2013.03.001

Dodson, M., Minhas, B., Curtis, S., Palmer, T., Robertson, J.: Spontaneous zona reacion in the mouse as a limiting factor for the time in which oocyte may be fertilized. J In Vitro Fert Embryo Transf (1989) 6: 101-106

Downs, S., Schroeder, A., Eppig, J.: Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing the hardening of the zona pellucida. Gamete Rca (1986) 15: 115-122
du Prel, J., Röhrig, B., Hommel, G., Blettner, M.: Auswahl statistischer Testverfahren-Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. Deutsches Ärzteblatt Int (2010) 107 343-348, 10.3238/arztebl.2010.0343
Dziegielewska, K., Brown, W., Gould, C., Matthews, N., Sedgwick, J., Saunders, N.: Fetuin: an acute phase protein in cattle. Journal of Comparative Physiology B (1992) 162: 168–171
Ebner, T., Moser, M., Tews, G.: Die Bedeutung der Morphologie der Oozyte hinsichtlich ihres weiteren Entwicklungspotentials. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie - Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology (2006) 3: 17-23
Edwards, R., Bavister, B., Steptoe, P.: Early Stages of Fertilization in vitro of Human Oocytes Matured in vitro. Nature volume (1969) 221: 632–635
Edwards, R., Steptoe, P.: A Matter of Life, the Story of a Medical Breakthrough (1980) William Morrow and Company
Embryology., E.S.o.H.R.a.: ART fact Sheet (2016) (https://www.eshre.eu/~/media/sitecore-files/Guidelines/ART-fact-sheet-2016.pdf?la=en) [Zugriff am 12.09.2017]
Embryology., E.S.o.H.R.a.: The IUI revival in unexplained infertility. Focus on reproduction (2017):
Embryology., E.S.o.H.R.a.: More than 8 million babies born from IVF since the world's first in 1978 (2018)
Eng, J.: Sample size estimation: how many individuals should be studied? Radiology (2003) 227: 309-313
Engvall, E., Perlmann, P.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa
III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. J Immunol (1972) 109: 129-135
Faddy, M., Gosden, R.: Numbers of ovarian follicles and testing germ line renewal in the postnatal ovary: facts and fallacies. Cell Cycle (2007) 6: 1951–1952
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. Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2019a) 36: 1101-1107
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. Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2019b) 36: 1101–1107
Farhi, J., Cohen, K., Mizrachi, Y., Weissman, A., Raziel, A., Orvieto, R.: Should ICSI be implemented during IVF to all advanced-age patients with non-male factor subfertility? Reproductive Biology and Endocrinology (2019) 17: 30
Fedorcsák, P., Dale, P., Storeng, R., Ertzeid, G., Bjercke, S., Oldereid, N., Omland, A., Abyholm, T., Tanbo, T.: Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. Hum Reprod (2004) 19: 2523-2528
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: 630-637 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26759143), 10.1093/humrep/dev340
Floehr, J., Dietzel, E., Schmitz, C., Chappell, A., Jahnen-Dechent, W.: Down-regulation of the liver-derived plasma protein fetuin-B mediates reversible female infertility. Mol Hum Reprod (2017) 23: 34-44 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733488), 10.1093/molehr/gaw068

Gianfortoni, J., Gulyas, B.: The effects of short-term incubation (aging) of mouse oocytes on in vitro fertilization, zona solubility, and embryonic development. Gamete Rca (1985) 11: 59-68

Gnoth, C., Godehardt, D., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Freundl, G.: Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. Hum Reprod (2003b) 18: 1959–1966

Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., Freundl, G.: Zur Definition und Prävalenz von Subfertilität und Infertilität. Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology (2004) 1: 272-278

Gook, D., Edgar, D., Borg, J., Martic, M.: Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. Hum Reprod (2008) 23: 394-402

Grodstein, F., Goldman, M., Cramer, D.: Body mass index and ovulatory infertility. Epidemiology (1994) 5: 247-250

Guevara, T., Körschgen, H., Cuppari, A., Schmitz, C., Kuske, M., Yiallouros, I., Floehr, J., Jahnen-Dechent, W., Stöcker, W., Gomis-Rüth, F.: The C-terminal region of human plasma fetuin-B is dispensable for the raised-elephant-trunk mechanism of inhibition of astacin metallopeptidases. scientific reports (2019) 9: 14683, https://doi.org/10.1038/s41598-019-51095-y

Hägele, W., Hinsch, K., Hinsch, E.: Zona pellucida-Proteine und ihre Rolle bei der Spermatozoen-Eizell-Interaktion Physiologie, Klinische Relevanz und Kontrazeption. Reproduktionsmedizin Springer Medizin (1998) 14: 171-179

Halpern, S., Karlawish, J.: The continuing unethical conduct of underpowered clinical trails. JAMA (2002) 288:

Hammer, G., du Prel, J., Blettner, M.: Vermeidung verzerrter Ergebnisse in Beobachtungsstudien. Deutsches Ärzteblatt Int (2009) 106: 664–668, DOI: 10.3238/arztebl.2009.0664

Heiss, A., DuChesne, A., Denecke, B., Grötzinger, J., Yamamoto, K., Renne, T., Jahnen-Dechent, W.: Structural basis of calcification inhibition by α2-HS glycoprotein/fetuin-A: formation of colloidal calciprotein particles. J Biol Chem (2003) 278: 13333–13341

Hinsch, E., Hagele, W., Bohle, R., Schill, W., Hinsch, K.: Evaluation of ZP2 domains of functional importance with antisera against synthetic ZP2 peptides. J Reprod Fertil (1998) 114: 245–251

Hu, X., Mo, F., Ma, Q., Cui, L., Lyu, P., Ye, Y.: Correlation of fetuin-B concentrations in serum and follicular fluid with outcomes of in vitro fertilization. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban (2017) 46: 285-289

Icer, M., Yildiran, H.: Effects of fetuin-A with diverse functions and multiple mechanism on human health. ClinBiochem (2021), 10.1016/j.clinbiochem.2020.11.004

Inge, G., Brinsden, P., Elder, K.: Oocyte number per live birth in IVF: were Steptoe and Edwards less wasteful? Human Reproduction (2005) 20: 588–592

Ingerslev, H., Højgaard, A., Hindkjaer, J., Kesmodel, U.: A randomized study comparing IVF in the unstimulated cycle with IVF following clomiphene citrate. Hum Reprod (2001) 16: 696-702, 10.1093/humrep/16.4.696

Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., Ketteler, M.: Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. Circ Res 108 (2011): 1494–1509

Jick, H., Porter, J.: Relation between smoking and age of natural menopause. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. Lancet (1977) 1: 1354

Johnson, L., Sasson, I., Sammel, M., Dokras, A.: Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and

meta-analysis. Fertility and Sterility (2013) 100: 704-711, http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.038
Jungheim, E., Schon, S., Schulte, M., DeUgarte, D., Fowler, S., Tuuli, M.: IVF outcomes in obese donor oocyte recipients: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod (2013) 28: 2720-2727
Karmilin, K., Schmitz, C., Kuske, M., Körschgen, H., Olf, M., Meyer, K., Hildebrand, A., Felten, M., Fridrich, S., Yiallouros, I., Becker-Pauly, C., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., Stöcker, W.: Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. scientific reports (2019) 9: 546, 10.1038/s41598-018-37024-5
Knight, P., Glister, C.: TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction (2006) 132: 191-206, doi: 10.1530/rep.1.01074
Knörr, K., H., K.-G., Beller, F., Lauritzen, C.: Sterilität-Infertilität. Lehrbuch der Geburtschilfe und Gynäkologie Springer, Berlin, Heidelberg (1982): 512-518, https://doi.org/10.1007/978-3-662-00526-2_47
Körschgen, H., Jäger, C., Tan, K., Buchholz, M., Stöcker, W., Ramsbeck, D.: Primary Evaluation of Potential Small Molecule Inhibitors of the Astacin Metalloproteinase Ovastacin, A Novel Drug Target in Female Infertility Treatment. ChemRxiv (2019), doi.org/10.26434/chemrxiv.11306867.v1
Körschgen, H., Kuske, M., Karmilin, K., Yiallouros, I., Balbach, M., Floehr, J., Wachten, D., Jahnen-Dechent, W., Stöcker, W.: Intracellular activation of ovastacin mediates pre-fertilization hardening of the zona pellucida. Molecular Human Reproduction (2017) 23: 607–616
Kralisch, S., Hoffmann, A., Lössner, U., Kratzsch, J., Blüher, M., Stumvoll, M., Fasshauer, M., Ebert, T.: Regulation of the novel adipokines/hepatokines fetuin a and fetuin b in gestational diabetes mellitus. Metabolism: Clinical and Experimental (2017) 68: 88–94, https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.11.017
Krog, M., Prior, M., Carlsen, E., Loft, A., Forman, J., Pinborg, A., Andersen, A.: Fertilization failure after IVF in 304 couples—A case-control study on predictors and long-term prognosis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology (2015) 184: 32-37, https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.10.037
Kuohung, W., Hornstein, M.: Causes of female infertility. wwwuptodatecom (2017), www.uptodate.com
Kuohung, W., Hornstein, M.: Overview of infertility wwwuptodatecom (2019), www.uptodate.com
Lake, J., Power, C., Cole, T.: Women's reproductive health: the role of body mass index in early and adult life. Int J Obes Relat Metab Disord (1997) 21: 432-438
Lanzendorf, S., Maloney, M., Veeck, L., Slusser, J., Hodgen, G., Rosenwaks, Z.: A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. Fertil Steril (1988) 49: 835-842
Larsen, L., Clausen, H., Jønsson, L.: Stereologic examination of placentas from mothers who smoke during pregnancy. Am J Obstet Gynecol (2002) 186: 531-537
Lee, C., Bongcam-Rudloff, E., Sollner, C., Jahnen-Dechent, W., Claesson-Welsh, L.: cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein Frontiers in Bioscience (2009) 14: 2911-2922
Lefievre, L., Conner, S., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I., Monk, M.: Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. Hum Reprod (2004) 19: 1580–1586
Lin, M., Liu, C., Liu, Y., Wang, D., Zheng, C., Shi, X., Chen , Z., Liu, J., Li, X., Yang, S., Li, Z.: Fetuin-B Links Nonalcoholic Fatty Liver Disease to Chronic Kidney

Disease in Obese Chinese Adults: A Cross-Sectional Study. Ann Nutr Metab (2019) 74: 287-295, 10.1159/000499843
Lintsen, A., Eijkemans, M., Hunault, C., Bouwmans, C., Hakkaart, L., Habbema, J., Braat, D.: Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study. Human Reproduction (2007) 22: Human Reproduction
Liu, J., Juan, Y., Jianyuan, S., Yajun, H., Kun, Q.: Normal fertilisation rates and serum 25-OHD levels among couples undergoing in-vitro fertilisation: a prospective cohort study. BMC Pregnancy Childbirth (2020) 20, 10.1186/s12884-020-02959-z
Loumaye, E.: The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod (1990) 4: 357–376
Ludwig, M.: Regulation der Ovarfunktion. Klinische Endokrinologie für Frauenärzte (2009) 4:
MacDougall, M., Tan, S., Balen, A., Jacobs, H.: A controlled study comparing patients with or without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilisation. Hum Reprod (1993) 8: 233-237
Männikkö, M., Törmälä, R., Tuuri, T., Haltia, A., Martikainen, H., Ala-Kokko, L., Tapanainen, J., Lakkakorpi, J.: Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. Human Reproduction (2005) 20: 1578–1585
Mashnafi, S., Plat, J., Mensink, R., Baumgartner, S.: Non-Cholesterol Sterol Concentrations as Biomarkers for Cholesterol Absorption and Synthesis in Different Metabolic Disorders: A Systematic Review. Nutrients (2019) 11: 124, 10.3390/nu11010124
McKinnon, C., Hatch, E., Rothman, K., Mikkelsen, E., Wesselink, A., Hahn, K., Wise, L.: Body mass index, physical activity and fecundability in a North American preconception cohort study. Fertil Steril (2016) 106: 451-459
Medicine., P.C.o.t.A.S.f.R.: Definitions of infertility and recurrentpregnancy loss: a committee opinion. Fertility and Sterility (2013) 99, http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.023
Medicine., P.C.o.t.A.S.f.R.: Smoking and infertility: a committee opinion. Fertil Steril (2018) 110: 611-618
Metwally, M., Cutting, R., Tipton, A., Skull, J., Ledger, W., Li, T.: Effect of increased body mass index on oocyte and embryo quality in IVF patients. Reprod Biomed Online (2007) 15: 532-538
Miller, K.: Intracytoplasmic sperm injection. wwwuptodatecom (2019), www.uptodate.com
Montag, M., Schimming, T., Köster, M., Zhou, C., Dorn, C., Rösing, B., van der Ven, H., Ven der Ven, K.: Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. Reprod Biomed Online (2008) 2: 239-244
Mori, K., Emoto, M., Inaba, M.: Fetuin-a: a multifunctional protein. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov (2011), 10.2174./187221411799015372
Murakami, T., Walczak, R., Caron, S., Duhem, C., Vidal, V., Darteil, R., Staels, B.: The farnesoid X receptor induces fetuin-B gene expression in human hepatocytes. Biochem J (2007) 407: 461–469, 10.1042/BJ20070658
NationalInstitutesofHealth: Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. Obes Res (1998) 2: 51-209

Navot, D., Bergh, R., Williams, M., Garrisi, J., Guzman, I., Sandler, B., Grunfeld, L.: Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. The Lancet (1991) 337: 1375-1377

Nayernia, Adham, Shamsadin, Müller, Sancken, Engel: Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. Mol Hum Reprod (2002) 8: 434–440

Oehninger, S., Hinsch, E., Pfisterer, S., Veeck, L., Kolm, P., Schill, W., Hodgen, G., Hinsch, K.: Use of a specific zona pellucida (ZP) protein 3 antiserum as a clinical marker for human ZP integrity and function. Fertility and Sterility (1996) 65: 139-145, https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58041-8

Olivier, E., Soury, E., Ruminy, P., Husson, A., Parmentier, F., Daveau, M., Salier, J.: Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. Biochem J (2000) 350: 589-597

Orvieto, R., Meltcer, S., Nahum, R., Rabinson, J., Anteby, E., Ashkenazi, J.: The influence of body mass index on in vitro fertilization outcome. Int J Gynaecol Obstet (2009) 104: 53-55

Osmanagaoglu, K., Collins, J., Kolibianakis, E., Tournaye, H., Camus, M., Van Steirteghem, A., Devroey, P.: Spontaneous pregnancies in couples who discontinued intracytoplasmic sperm injection treatment: a 5-year follow-up study. Fertil Steril (2002) 78: 550–556

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet (1992) 340: 17-18

Palmstierna, M., Murkes, D., Csemiczky, G., Andersson, O., Wramsby, H.: Zona pellucida thickness variation and occurence of visible mononucleated blastomeres in preembryos are associated with a high pregnancy rate in IVF treatment. J Assist Reprod Genet (1998) 15: 70-75

Pedersen, K.: Fetuin, a New Globulin Isolated from Serum. Nature (1944) 154: 575

Pelletier, C., Keefe, D., Trimarchi, J.: Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. Fertility Sterility (2004) 81: 850–856

Perreault, L.: Overweight and obesity in adults: Health consequences. wwwuptodatecom (2019):

Peters, H., Byskov, A., Himelstein-Braw, R., Faber, M.: Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. J Reprod Fertil (1975) 45: 559-566

Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Drago, J., Westphal, H., Dean, J.: Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zona pellucida and are infertile. Development (1996) 122: 2903–2910

Rankin, T., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J., Dean, J.: Defective zonae pellucidae in ZP2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. Development (2001) 128: 1119–1126.

Rich-Edwards, J., Goldman, M., Willett, W., Hunter, D., Stampfer, M., Colditz, G., Manson, J.: Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. Am J Obstet Gynecol (1994) 171: 171-177

Richard, P.: In vitro fertilization. wwwuptodatecom (2019), www.uptodate.com

Rienzi, L., Ubaldi, F., Martinez, F., Iacobelli, M., Minasi, M., Ferrero, S., Tesarik, J., Greco, E.: Relationship between meiotic spindle location with regard to polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. Human Reproduction (2003) 18: 1289–1293

Röhrig, B., du Prel, J., Blettner, M.: Studiendesign in der medizinischen Forschung Teil 2 der Serie zur Bewertung wisserschaftlicher Publikationen. Deutsche Ärzteblatt Int (2009a) 106: 184-189, 10.3238/arztebl.2009.0184

Röhrig, B., du Prel, J., Wachtlin, D., Blettner, M.: Studientypen in der medizinischen Forschung-Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. Deutsche Ärzteblatt Int 2009 (2009b) 106: 262-268, 10.3238/arztebl.2009.0262

Röhrig, B., du Prel, J., Wachtlin, D., Kwiecien, R., Blettner, M.: Fallzahlplanung in klinischen Studien Teil 13 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. Deutsches Ärzteblatt Int (2010) 107: 552-556, 10.3238/arztebl.2010.0552

Rösing, B., Floehr , J., Dietzel, E., Jahnen-Dechent, W., Neulen, J.: Fetuin-B als Faktor der humanen Fertilität. DGGG Poster (2012):

Sabatini, M.: Evaluation and management of infertility in women of advancing age. wwwuptodatecom (2019):

Sacco, A., Yurewicz, E., Subramanian, M., DeMayo, F.: Zona pellucida composition: species cross reactivity and contraceptive potential of antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA). Biol Reprod (1981) 25: 997–1008

Schinke, T., C., A., Trindl, A., Pöschke, O., Müller-Esterl, W., Jahnen-Dechent, W.: The serum protein α2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. J Biol Chem (1996) 271: 20789–20796

Schumacher, M., Schulgen, G.: Methodik klinischer Studien Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung. Springer Medizin (2007):

Shabanowitz, R., O'Rand, M.: Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. J Reprod Fertil (1988) 82: 151–161

Spektrum.: Pronucleus. Lexikon der Biologie (1999), https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/pronucleus/53974

Stocker, W., Karmilin, K., Hildebrand, A., Westphal, H., Yiallouros, I., Weiskirchen, R., Dietzel, E., Floehr, J., Jahnen-Dechent, W.: Mammalian gamete fusion depends on the inhibition of ovastacin by fetuin-B. Biol Chem (2014) 395: 1195-1199 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25205729), 10.1515/hsz-2014-0189

Tinneberg, H., Ottmar, C.: Gynäkologische Grundlagen der Fortpflanzungsmedizin unter Berücksichtigung möglicher Sterilitätsursachen. Moderne Fortpflanzungsmedizin (1995):

Victor, A., Elsäßer, A., Hommel, G., Blettner, M.: Wie bewertet man die p-Wert-Flut? Hinweise zum Umgang mit dem multiplen Testen Teil 10 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. Deutsche Ärzteblatt Int (2010) 107: 50-56, 10.3238/arztebl.2010.0050

Vitek, W., Galarraga, O., Klatsky, P., Robins, J., Carson, S., Blazar, A.: Management of the first in vitro fertilization cycle for unexplained infertility: a cost-effectiveness analysis of split in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril (2013) 100: 1381–1388, 10.1016/j.fertnstert.2013.06.035

Vural, F., Vural, B., Çakıroğlu, Y.: The Role of Overweight and Obesity in In Vitro Fertilization Outcomes of Poor Ovarian Responders. Biomed Res Int (2015): 781543

Wang, W., Meng, L., Hackett, R., Keefe, D.: Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by PolScope before insemination. Human Reproduction (2001) 16: 1464–1468

Wassarman, P.: Early events in mammalian fertilization. Annu Rev Cell Biol (1987) 3: 109–142

Werny, F., Schlatt, S.: Pubertät, Adoleszenz, Menopause. In: Brandes, R., et al. (Hrsg.): Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie (2019) Springer Berlin Heidelberg: 977-980 (https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4_82), 10.1007/978-3-662-56468-4_82

Wissenschaftsrat.: Empfehlungen zu Klinischen Studien. Drs 7301 -18 (2018):

WorldHealthOrganization: Infertility. A tabulation of available data on prevalence of priamry and secondary infertility. Programme of Maternal and Child Health and Family Planning Unit (1991):

WorldHealthOrganization: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep (2000): 894

Zhang, D., Zhu, Y., Gao, H., Zhou, B., Zhang, R., Wang, T., Ding, G., Qu, F., Huang, H., Lu, X.: Overweight and obesity negatively affect the outcomes of ovarian stimulation and in vitro fertilisation: a cohort study of 2628 Chinese women. Gynecol Endocrinol (2010) 26: 325-332

Zhou, D., Y, S., Jia, Y., Liu, D., Wang, J., Chen, X., Zhang, Y., Ma, X.: Bioinformatics and functional analyses of key genes in smoking-associated lung adenocarcinoma. Oncol Lett 4 (2019): 3613–3622

Zhu, J., Jiang, H., He, R., Yin, H., Li, C., Wang, Y., Du, X.: Association between etiologic factors in infertile couples and fertilization failure in conventional in vitro fertilization cycles. Andrology (2015) 3: 717–722, 10.1111/andr.12048

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 Connections (2017) 58: 97–105, https://doi.org/10.1007/s12020-017-1387-1

8) Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben und ohne deren Hilfe die Fertigstellung dieser Doktorarbeit niemals gelungen wäre.

Zu Beginn möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Leonhard Joseph Neulen bedanken, der es mir ermöglicht hat meine Promotionsarbeit, in seiner Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin anzufertigen. Außerdem danke ich Ihm vielmals für seine Ratschläge und Hilfestellungen.

Meinem Betreuer Herrn Dr. med. Benjamin Rösing, möchte ich meinen Dank für die langwährende Zusammenarbeit, Unterstützung und Anregungen aussprechen. Insbesondere richte ich meinen Dank an Ihn für die stetige Gesprächsmöglichkeit, ob persönlich oder telefonisch, innerhalb oder außerhalb der Klinik.

Auch danke ich Frau Dr. rer. nat. Ute Weißenborn, für die stetige Hilfsbereitschaft, insbesondere in Bezug auf die Datenauswertung der Laborergebnisse, sowie Computerbetreuung.

Außerdem möchte ich mich bei dem Institut für medizinische Statistik des Uniklinikums Aachen, insbesondere bei Frau Ann-Christina Foldenauer, für die Bemühungen und Ratschläge hinsichtlich der Datenanalyse bedanken.

Dem Labor IFLb in Berlin danke ich für die Unterstützung in den labortechnischen Messungen der Fetuin-B Werte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während meines gesamten Studiums und der Promotionsphase in jederlei Hinsicht liebevoll und unentwegt unterstützt und gefördert haben. Insbesondere die immer wieder motivierenden Worte, der endlose Beistand und die fürsorgliche Zuwendung waren ein großer Rückhalt für mich, der die Fertigstellung der Dissertation ermöglicht hat.

In ewiger Dankbarkeit bin ich meinen Großeltern für die liebevolle Zuneigung, Unterstützung und Vermittlung von Lebensweisheiten in allen meinen Lebensabschnitten.

Meinen Freunden danke ich für zahlreiche aufmunternde und motivierende Gespräche.

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Aug 13, 2024

This Agreement between Janina Krebs ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5843630535300
License date	Aug 07, 2024
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Follikelpunktion und Eizellgewinnung
Licensed Content Author	Michael Ludwig
Licensed Content Date	Jan 1, 2020
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Aug 13, 2024

This Agreement between Janina Krebs ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5843630229162
License date	Aug 07, 2024
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Reproduktionsmedizin
Licensed Content Title	Zona pellucida-Proteine und ihre Rolle bei der Spermatozoen-Eizell-Interaktion
Licensed Content Author	W. Hägele et al
Licensed Content Date	Dec 31, 1969
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no

Aug 12, 2024

This Agreement between Janina Krebs ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5843640176535
License date	Aug 07, 2024
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Regulation der Ovarfunktion
Licensed Content Author	Michael Ludwig Prof.Dr.med.
Licensed Content Date	Jan 1, 2009
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no

Tabelle 1.Deskriptive Daten

	n	MW (Mittelwert)	± SD (Standardabweichung)
Alter in Jahren	101	34.36	4.27
Größe in m	97	1.68	0.06
Körpergewicht in kg	97	69.44	15.98
BMI	97	24.71	5.30
Fetuin B in µg/ml (erste Messung)	72	1.72	1.18
Fetuin B in µg/ml (letzte Messung)	59	2.17	1.46
Fetuin B MW in µg/ml	101	1.82	1.07
Fetuin B Anstieg in µg/ml	45	0.51	0.87
Fetuin B Anstieg in %	44	0.36	0.60
Fetuin B Anstieg in µg/ml bei erfolgreicher Fertilisation	30	0.31	1.07
Fetuin B Anstieg in µg/ml bei erfolgloser Fertilisation	16	0.40	0.87
Estradiol in pg/ml (erste Messung)	95	153.14	223.36
Estradiol in pg/ml (letzte Messung)	93	2207	1402
Estradiol MW in pg/ml	97	1123	894.12
Estradiol Anstieg in pg/ml	88	2045	1408
Estradiol Anstieg in %	88	143.88	240.05
Estradiol Anstieg in pg/ml bei erfolgreicher Fertilisation	61	2062.27	1406.998
Estradiol Anstieg in pg/ml bei erfolgloser Fertilisation	25	2073.14	1398.89
LH in U/L (erste Messung)	95	3.23	4.17
LH in U/L (letzte Messung)	95	1.50	1.76
LH MW in U/L	97	2.3	4.2
LH-Abfall in U/L	94	-1.75	3.54
Progesteron in ng/ml (erste Messung)	61	2.17	4.985
Progesteron in ng/ml (letzte Messung)	25	1.42	0.88
Progesteron MW in ng/ml	72	1.0	1.0
Progesteron-Abfall in ng/ml	14	0.74	0.899
Fertilisationsrate (%)	93	0.44	0.34
Oozyten Anzahl	99	8.07	5.52
Zona pell. Dünn (%)	68	4.84	14.62
Zona pell. Dick (%)	68	19.60	29.83
Zona pell. Normal (%)	68	75.54	31.36
schwanger	22		
Primäre Infertilität	52		
Sekundäre Infertilität	43		
Agonist-Gabe	70		
Antagonist-Gabe	29		
PCOS	15		

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

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

nach Schließung der Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums Aachen 2020, zur Einlagerung an die Storage-Firma Rhenus Archiv Service GmbH, Hornpotterweg 9, 51375 Leverkusen geschickt worden. Zudem wurden alle Akten digitalisiert und sind somit in der Uniklinik RWTH Aachen verfügbar.

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

Hiermit erkläre ich, Janina Krebs, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Die Rolle des Fetuin-B im menschlichen Fertilisationsprozess“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:
Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Doktorandin, Janina Krebs	Dipl.-Math. Ann Christina Foldenauer	Betreuer Dr. med. Benjamin Rösing	Doktorvater Prof. Dr. Neulen	Summe (%)
Studienüberwachung		20	60	20	100
Studiendesign/Konzeption	60	10	30		100
Untersuchung der Probanden			100		100
Datenauswertung	100				100
Statistische Auswertung	80	20			100
Bereitstellung von Materialien		30	60	10	100
Interpretation der Datenauswertung	90		10		100

_____
Unterschrift der Doktorandin/des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Janina Krebs

_____
Unterschrift des Doktorvaters