

# Inhaltsverzeichnis

<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung/Summary</b>	<b>4</b>
1.1 Zusammenfassung	5
1.2 Summary	7
<b>2 Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Begriffsbestimmungen</b>	<b>9</b>
2.1.1 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)	10
2.1.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	11
2.1.3 Stickstoffmonoxid (NO)	11
<b>2.2 Entstehung der Zytokine</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Mechanismen und Bedeutung</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Einfluss von Parametern der assistierten Reproduktion auf die Zytokinkonzentration</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Patientinnenkollektiv und Gruppeneinteilung</b>	<b>21</b>
3.1.1 Patientinnen	21
3.1.2 Einteilung der Patientinnen	21
3.1.2.1 <i>Stimulationsprotokoll</i>	21
3.1.2.2 <i>Schwangerschaft</i>	22
3.1.2.3 <i>Sterilität</i>	22
<b>3.2 Vorbereitung der Patientinnen (Ovarielle Stimulation)</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Materialgewinnung</b>	<b>23</b>
3.3.1 Follikelflüssigkeit (FF)	23
3.3.2 Serum (S)	23
3.3.3 Sperma– Beurteilung und Präparation	24
<b>3.4 Assistierte Reproduktionstechniken</b>	<b>24</b>
3.4.1 In-vitro Fertilisation (IVF)	24
3.4.2 Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)	25
3.4.3 Wahl der Befruchtungsmethode	25
<b>3.5 Messung von LIF, VEGF und NO in Follikelflüssigkeit und Serum</b>	<b>26</b>
3.5.1 Untersuchungsmethode	26
3.5.2 ELISA: Prinzip der Technik	27
3.5.3 Bestimmung von LIF mittels ELISA	27
3.5.4 Bestimmung von VEGF mittels ELISA	28
3.5.5 Bestimmung von NO mittels Griess-Reaktion	28
3.5.6 ELISA: Auswertung	30
<b>3.6 Statistische Auswertung</b>	<b>30</b>
3.6.1 Statistische Tests	30
3.6.2 Grafiken	30

3.6.3 Korrelationen	31
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>4.1 LIF, VEGF und NO in Follikelflüssigkeit (FF)</b>	<b>33</b>
4.1.1 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) in FF	33
4.1.2 LIF-Konzentration (FF) und Alter	34
4.1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in FF	34
4.1.4 VEGF-Konzentration (FF) und Alter	35
4.1.5 Stickstoffmonoxid (NO) in FF	36
4.1.6 NO-Konzentration (FF) und Alter	38
<b>4.2 LIF, VEGF und NO im Serum (S)</b>	<b>38</b>
4.2.1 LIF im Serum	38
4.2.2 LIF-Konzentration (S) und Alter	40
4.2.3 VEGF im Serum	40
4.2.4 VEGF-Konzentration (S) und Alter	41
4.2.5 Stickstoffmonoxid (NO) im Serum	42
4.2.6 NO-Konzentration (S) und Alter	43
<b>4.3 Untersuchung des Einflusses der LIF-, VEGF- und NO-Konzentration auf das Eintreten einer Schwangerschaft</b>	<b>44</b>
4.3.1 Einfluss der LIF-,VEGF- und NO-Konzentration in der Follikelflüssigkeit auf das Eintreten einer Schwangerschaft	44
4.3.1.1 LIF-Konzentration in FF und Schwangerschaft	45
4.3.1.2 VEGF-Konzentration in FF und Schwangerschaft	46
4.3.1.3 NO-Konzentration in FF und Schwangerschaft	48
4.3.2 Einfluss der LIF-,VEGF- und NO-Konzentration im Serum auf Eintreten einer Schwangerschaft	49
4.3.2.1 Serum LIF-Konzentration und Schwangerschaft	49
4.3.2.2 VEGF in Serum und Schwangerschaft	51
4.3.2.3 NO im Serum und Schwangerschaft	52
4.3.3 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in Follikelflüssigkeit (FF) und Serum (S)	53
4.3.3.1 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in FF und S in der Schwangeren-Gruppe	53
4.3.3.2 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in FF und S in der Nicht-Schwangeren-Gruppe	54
<b>4.4. Untersuchung des Einflusses des Stimulationsprotokolls auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration</b>	<b>56</b>
4.4.1 Untersuchung des Einflusses des Stimulationsprotokolls auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration in präovulatorischer Follikelflüssigkeit	56
4.4.1.1 LIF (FF) und Stimulationsprotokoll	56
4.4.1.2 VEGF (FF) und Stimulationsprotokoll	58
4.4.1.3 NO-Konzentration (FF) und Stimulationsprotokoll	59
4.4.2 Untersuchung des Einflusses des Stimulationsprotokolls auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration im Serum	60
4.4.2.1 LIF-Konzentration (S) und Stimulationsprotokoll	60
4.4.2.2 VEGF-Konzentration (S) und Stimulationsprotokoll	61
4.4.2.3 NO-Konzentration (S) und Stimulationsprotokoll	62
4.4.3 Vergleich der Zytokin-Konzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum	63
4.4.3.1 Ovarielle Stimulation mit FSH	63
4.4.3.2 Ovarielle Stimulation mit HMG	64
4.4.3.3 Ovarielle Stimulation mit HMG/FSH	64
4.4.3.4 Grafische Darstellung	64
<b>4.5 Untersuchung des Einflusses der Sterilitätsätiologie auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration</b>	<b>66</b>
4.5.1 Untersuchung des Einflusses der Sterilitätsätiologie auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration in präovulatorischer Follikelflüssigkeit	67
4.5.1.1 LIF (FF) und Sterilitätsätiologie	67
4.5.1.2 VEGF (FF) und Sterilitätsätiologie	68

4.5.1.3 NO-Konzentration (FF) und Sterilitätsätiologie	69
4.5.2 Untersuchung des Einflusses der Sterilitätsätiologie auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration im Serum	70
4.5.2.1 LIF-Konzentration (S) und Sterilitätsätiologie	70
4.5.2.2 VEGF (S) und Sterilitätsätiologie	72
4.5.2.3 NO (S) und Sterilitätsätiologie	73
4.5.3 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum	74
4.5.3.1 Tubar bedingte Sterilität	74
4.5.3.2 Endometriose	74
4.5.3.3 Androgen bedingte Sterilität	75
4.5.3.4 Grafische Darstellung	75
<b>4.6 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen</b>	<b>77</b>
4.6.1 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen in FF	77
4.6.2 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen im Serum	77
4.6.3 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen in FF und Serum	77
<b>4.7 Zusammenhang zwischen Stimulationsart und weiteren IVF/ICSI-Parametern</b>	<b>78</b>
<b>4.8 Korrelation zwischen Zytokinen in FF und weiteren IVF/ICSI-Parametern</b>	<b>79</b>
<b>4.9 Korrelation zwischen Zytokinen im Serum und weiteren IVF/ICSI-Parametern</b>	<b>79</b>
<b>4.10 Zusammenhang zwischen dem Eintritt einer Schwangerschaft und weiteren IVF/ICSI-Parametern</b>	<b>80</b>
<b>4.11 Zusammenhang zwischen Sterilitätsätiologie und weiteren IVF/ICSI-Parametern</b>	<b>81</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>83</b>
<b>5.1 Nachweis von LIF, VEGF und NO in Follikelflüssigkeit und Serum</b>	<b>84</b>
5.1.1 Nachweis von Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) und Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen	84
5.1.2 Nachweis von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen	85
5.1.3 Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) und Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen	86
<b>5.2 Zusammenhang zwischen Sterilitätsursache und der Konzentration der Faktoren in der Follikelflüssigkeit/ im Serum</b>	<b>87</b>
<b>5.3 Zusammenhang zwischen dem Stimulationsprotokoll und der Konzentration der Faktoren in der Follikelflüssigkeit/ im Serum</b>	<b>90</b>
<b>5.4 Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme und der Konzentration der Faktoren in der Follikelflüssigkeit/ im Serum</b>	<b>93</b>
<b>5.5 Schlussfolgerung</b>	<b>98</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>7 Danksagung</b>	<b>122</b>
<b>8 Lebenslauf</b>	<b>124</b>



## ***1.1 Zusammenfassung***

### Zytokinkonzentrationen (LIF, VEGF, NO) in Serum und in präovulatorischer Follikelflüssigkeit in Abhängigkeit von Parametern der assistierten Reproduktion und ihr Einfluss auf das IVF-/ICSI-Ergebnis

Zytokine spielen nach dem aktuellen Stand der Forschung eine wichtige Rolle in der weiblichen Reproduktionsphysiologie. Sie wirken dort über Regulationsmechanismen oder treten in Wechselwirkungen mit Hormonen und beeinflussen so Follikulogenese, Ovulation, Implantation und embryonale Entwicklung. In der assistierten Reproduktionsmedizin hat die Erforschung von Zytokinen und deren Wirkmechanismen in der letzten Zeit immer mehr an Bedeutung gewonnen.

In der vorliegenden Studie wurden das Serum und die präovulatorische Follikelflüssigkeit von Patientinnen, die sich einer IVF-/ICSI-Behandlung unterzogen, auf das Vorhandensein von LIF, VEGF und NO hin untersucht.

Die Konzentrationen wurden mittels enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) gemessen.

Es wurde versucht, ein Zusammenhang zwischen den ermittelten Zytokinkonzentrationen und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme, der Sterilitätsätiologie oder dem angewandten Stimulationsprotokoll herzustellen. Somit sollten die Zytokine auf ihre mögliche Aussagekraft als prognostische oder diagnostische Parameter für die assistierte Reproduktionsmedizin hin untersucht werden.

In allen untersuchten Follikelflüssigkeitsproben konnte LIF ( $47,2 \text{ pg/ml} \pm 20,7 \text{ pg/ml}$ ), VEGF ( $3370,6 \pm 895,8 \text{ pg/ml}$ ) und NO ( $40,9 \text{ } \mu\text{mol/l} \pm 11,2 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) nachgewiesen werden. Auch in allen Serumproben war LIF ( $3,3 \text{ pg/ml} \pm 2,4 \text{ pg/ml}$ ), VEGF ( $370,8 \text{ pg/ml} \pm 175,7 \text{ pg/ml}$ ) und NO ( $36,7 \text{ } \mu\text{mol/l} \pm 17,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) vorhanden.

Es fand sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration von VEGF in Follikelflüssigkeit und dem angewandten Stimulationsprotokoll ( $p=0,042$ ).

Zwischen der Zytokinkonzentration und dem Ergebnis der IVF/ICSI- Behandlung konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Auch bezüglich der Sterilitätsursache der Patientinnen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen festgestellt werden.

Folglich eignen sich die in der vorliegenden Studie untersuchten Zytokine nicht als prognostische Parameter hinsichtlich des Erfolges einer assistierten Reproduktionsmaßnahme. Inwiefern das Stimulationsprotokoll die Produktion dieser Zytokine beeinflusst und welche biologischen Folgen das nach sich zieht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## **1.2 Summary**

### Cytokine concentrations (LIF, VEGF, NO) in serum and follicular fluid with regard to different parameters of assisted reproduction and their influence on IVF/ICSI-outcome

Cytokines have been shown to play an important role in several physiological processes in the reproductive tract. They act as regulators of steroidogenesis and they are involved in folliculogenesis and embryonal implantation. Thus, cytokine research has become more and more important for assisted reproduction.

The aim of this study was to determine the presence and the concentration of Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Nitric Oxide (NO) in serum (S) and follicular fluid (FF).

The concentrations were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

It was searched for an association of cytokine concentration and the ethiology of sterility or the ovarian stimulation regimen. Besides it was investigated into the possibility of a correlation between cytokine concentrations and IVF/ICSI outcome.

Thus, it should be found out whether these cytokines could be used as diagnostic and predictive factors of IVF-/ICSI-therapy.

LIF, ( $47,2 \text{ pg/ml} \pm 20,7 \text{ pg/ml}$ ), VEGF ( $3370,6 \pm 895,8 \text{ pg/ml}$ ) and NO ( $40,9 \text{ } \mu\text{mol/l} \pm 11,2 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) were found in all follicular fluids investigated, just as in all serum samples ( $3,3 \text{ pg/ml} \pm 2,4 \text{ pg/ml}$ ;  $370,8 \text{ pg/ml} \pm 175,7 \text{ pg/m}$ ;  $36,7 \text{ } \mu\text{mol/l} \pm 17,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ).

A statistical significance was found between the concentration of VEGF in follicular fluid and the applied ovarian stimulation regimen ( $p=.0,042$ ).

No specific relationship was observed between the cytokine concentrations, and the ethiology of sterility or the IVF/ICSI outcome.

In conclusion, the examined cytokines can not be used as prognostic parameters for success of assisted reproduction cycles. Further studies will be necessary to clarify to what extend the applied ovarian regimen can influence the production of VEGF.





## **2 Einleitung**

Zytokine waren vor Jahrzehnten noch vor allem in ihrer Funktion als Mediatoren des Immunsystems bekannt; heute wird ihrer Rolle in der Reproduktionsphysiologie immer mehr Bedeutung beigemessen. Es ist bekannt, dass das Immunsystem über autokrine, parakrine und endokrine Regulationsmechanismen in Ovulation, Luteinisierung und Implantation involviert ist (Simón et al., 1994). Viele Vorgänge bei der Ovulation (Espey, 1994) und der embryonalen Implantation (Finn, 1986) zeigen Ähnlichkeiten mit den Prozessen einer Entzündungsreaktion auf. Gerade die Bedeutung der Zytokine als Komponenten der Immunabwehr in schwangerschaftsspezifischen Prozessen hat in den letzten Jahren immer mehr das Interesse der Forschung geweckt. So wurde nach Arici et al. (1997) in Studien belegt, dass Zytokine an der Regulation der ovariellen Steroidhormonsynthese, der Corpus-Luteum-Funktion, der embryonalen Entwicklung und der Implantation beteiligt sind (Brannström und Norman et al., 1993; Adashi et al., 1994)

Besonders im Hinblick auf die assistierte Reproduktionsmedizin stellen die möglichen Zusammenhänge zwischen Zytokinen und der Physiologie des weiblichen Reproduktionstrakts einen interessanten Forschungsansatz dar.

### ***2.1 Begriffsbestimmungen***

Zytokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht kleiner als 100 kDa. Ehemals wurden sie auch als Lymphokine und Monokine bezeichnet (Simón et al., 1994). Zytokine bilden ein außerordentlich komplexes Netzwerk, in dem die einzelnen Moleküle antagonistisch oder synergistisch interagieren. Die Tatsache, dass der gleiche Stoff an verschiedenen Zielzellen unterschiedliche Effekte erzielen kann, und dass umgekehrt mehrere Zytokine die gleiche Reaktion an einer Zelle hervorrufen können, macht es schwierig, einem einzelnen Zytokin eine bestimmte Funktion zuzuordnen (Moqattash et al., 2004).

In der Literatur stößt man auf unterschiedliche Vorschläge bezüglich der Einteilung der Zytokine, was vor allem auf die unscharfe Abgrenzung der Funktionen und Wirkungen der einzelnen Stoffe untereinander zurückzuführen ist. So fallen nach Dinarello (1990) die Zy-

tokine hinsichtlich ihrer Wirkungsweise in zwei große Hauptgruppen; die der Wachstumsfaktoren und die der proinflammatorisch wirkenden Zytokine. Gebräuchlich ist heute eine Unterteilung der Zytokine in Interleukine (1-n), Tumor Nekrose Faktor (TNF), Transforming-Growth-Factor (TGF), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), Colony Stimulating Factor und Interferone (INF) (Simón et al., 1994).

### 2.1.1 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)

LIF gehört zu der Familie der IL-6-Typ-Zytokine, die alle das Glycoprotein gp 130 als gemeinsame Rezeptoruntereinheit nutzen und folglich auch ähnliche Effekte in ihren Zielzellen auslösen. Sie haben allesamt eine Molekülmasse von ungefähr 20 kDa und werden zu den langkettigen 4-Helix-Bündel-Zytokinen gezählt (Heinrich et al., 1998, vgl. Abbildung 1).

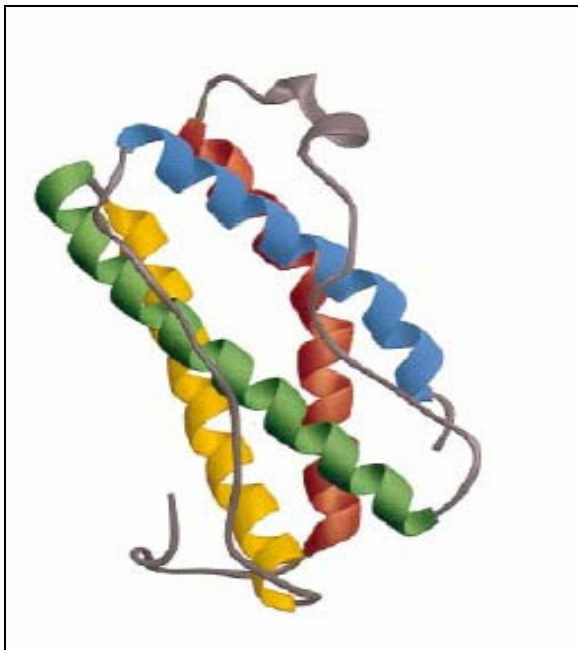


Abbildung 1: Die vier langen alpha-Helices und ihre Verbindungsschleifen (Heinrich et al.1998): Helix A (rot), Helix B (grün), Helix C (gelb), Helix D (blau) und Connecting loop (grau).

### 2.1.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist ein glykosiliertes heparinbindendes Protein von etwa 46kDa, das eine hohe Spezifität zu Endothelzellen aufweist (Ferrara and Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989). Früher war es auch unter der Bezeichnung Vascular Permeability Factor (VPF) bekannt, was auf seine Fähigkeit, die Permeabilität von Gefäßen zu erhöhen, zurückzuführen ist (Senger et al., 1983). Robertson et al. (1995) bewiesen, dass diese vermehrte Durchlässigkeit von venösen Gefäßen und Kapillaren mit einer Fenestrierung von zuvor geschlossenem Epithel einhergeht. VEGF bindet spezifisch an zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren, die primär auf vaskulären Endothelzellen exprimiert werden und in der Literatur als flt-1 und flk-1/KDR bezeichnet werden (reviewed von Neufeld et al., 1999, vgl. Abbildung 2). Von VEGF sind mehrere Isoformen, bestehend aus unterschiedlich vielen Aminosäuren, bekannt, die durch alternatives Spleißen von m-RNA zustande kommen und die sowohl in gelöster Form als auch membrangebunden vorkommen können (Houck et al., 1992).

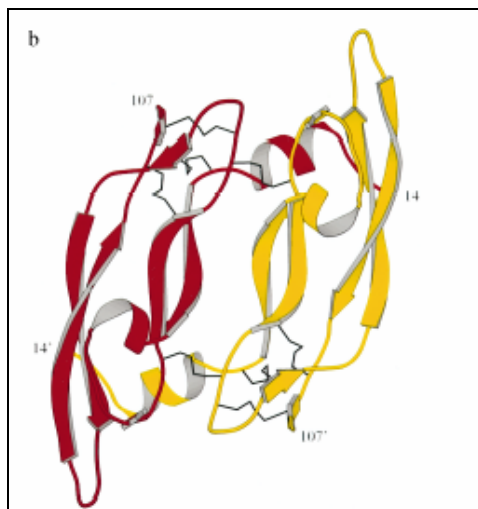


Abbildung 2: Die rezeptorbindende Domäne von VEGF. Die beiden Monomere sind in Rot und Gelb, die Disulfidbrücken in Schwarz dargestellt (Muller et al. 1997).

### 2.1.3 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein besonderer Signaltransmitter im Menschen: Er hat von allen bekannten synthetisierten Zellprodukten das geringste Molekulargewicht, besitzt eine hohe Reaktivität und eine kurze Halbwertszeit (Nathan, 1992). Seine Aufgaben liegen sowohl im Bereich der intra- und interzellulären Signalvermittlung als auch in seiner Zytotoxizität (Knowles et al., 1994).

## ***2.2 Entstehung der Zytokine***

Zytokine können in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers synthetisiert werden, in den meisten Fällen entstehen sie jedoch in T-Lymphozyten und Makrophagen (Chard, 1995). Die Produktion eines Zytokins wird häufig von anderen Zytokinen reguliert (Moqattash et al., 2004). Zytokine werden oft während immunologischen Abwehrreaktionen ausgeschüttet, aber genauso bei physiologischen Vorgängen des Körpers wie der zum Beispiel der weiblichen Ovulation (Dinarello, 1990).

LIF kann ebenfalls von fast allen Zellen produziert werden, wenn nur der passende Stimulus vorausgeht (Waring et al., 1992). So wurde LIF sowohl bereits in T-Lymphozyten und Endothelzellen (Lubbert et al., 1991), als auch in Knochenmarkszellen, Fibroblasten und Tumorzellen nachgewiesen (Patterson et al., 1992). Auch in Zellen des weiblichen Reproduktionstraktes wird LIF synthetisiert. So wiesen Kojima et al. (1994) LIF in menschlichem Endometrium und in Dezidualzellen nach; Arici et al. (1997) in Thekazellen und Granulosa-Luteinzellen. Bei Patienten im septischen Schock konnten erhöhte LIF-Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Waring et al., 1992). Die Expression von LIF wird von verschiedenen anderen Zytokinen reguliert, so kann zum Beispiel Interleukin-4 die Produktion von LIF erhöhen, während Interleukin-12 und Interferone die LIF-Konzentrationen senken (Piccinni et al., 1999). Auch Glucocortikoide wirken inhibitorisch auf die Sekretion von LIF in Endothelzellen (Grosset et al., 1995).

VEGF wurde erstmals aus Follikelzellen der Hypophyse isoliert (Ferrara und Henzel, 1989). Später konnte man VEGF in vielen anderen Zelltypen nachweisen, zum Beispiel in glatten Muskelzellen (Tischer et al., 1991) und in Endothelzellen (Namiki et al., 1995). Vor allem in Geweben, in denen vermehrt Neovaskularisationen ablaufen, wird VEGF produziert (Namiki et al., 1995); somit ist die VEGF-Konzentration in vielen Tumorgeweben erhöht (Clauss et al., 1990). Charnock-Jones et al. (1993) berichteten über den Nachweis von VEGF in Drüsen- und Stromazellen des Uterus, wobei die gemessenen Konzentrationen zyklusabhängig schwankten. Auch in der Plazenta, vor allem in dezidualen Zellen und Makrophagen, konnte VEGF nachgewiesen werden (Sharkey et al., 1993). Hypoxie und NO steigern die Synthese von VEGF (Shibuya, 2001), auch endokrine Faktoren scheinen

an der Regulation von VEGF beteiligt zu sein: So gelang Hazzard et al. (1999) der Nachweis dafür, dass die Sekretion von VEGF im präovulatorischem Follikel in vivo von Gonadotropinen reguliert wird.

NO wird aus seiner Vorstufe L-Arginin von drei verschiedenen Enzymen produziert, den NO-Synthasen, die in fast allen Zellen des Körpers vorzufinden sind (Gellar und Billiar, 1998). Neben Endothelzellen setzen beispielsweise auch Makrophagen (Hibbs et al., 1988), Neutrophile und HL-60 Leukämiezellen (Schmidt et al., 1989) NO frei. Gerade nach Aktivierung der Immunabwehr wird NO von vielen Zellen produziert (Moncada et al., 1991). Die Aktivität der NO-Synthasen wird von verschiedenen Faktoren reguliert. FAD, FMN und Häm können als Kofaktoren der Enzyme fungieren (Nathan, 1992). Außerdem arbeiten die Synthasen zum Teil in Abhängigkeit von Calcium und Calmodulin (Forstermann et al., 1991). Auch NO selbst kann als Inhibitor der NO-Synthase wirken (Griscavage et al., 1993). Östrogene können an Endotheliumzellen die biologische Aktivität von NO steigern und auf diese Weise die gefäßprotektiven Eigenschaften dieser Hormone vermitteln (Arnal et al., 1996).

### ***2.3 Mechanismen und Bedeutung***

Im Allgemeinen wirken Zytokine auf autokrinem oder parakrinem, seltener auch auf endokrinem Weg über einen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche auf ihre Zielzellen (Heinrich et al., 1998). Dort können sie das Zellwachstum stimulieren oder hemmen, die Differenzierung regulieren, Chemotaxis induzieren und die Expression anderer Zytokine modulieren (Nash et al., 1999). Zytokine nehmen direkt oder indirekt über Regulationsmechanismen auch Einfluss auf Prozesse im weiblichen Reproduktionstrakt. So induzieren sie das Wachstum, die Differenzierung und die Apoptose in vielen Zellen des menschlichen Ovars und regulieren dort das Vorkommen von Lymphozyten, die wiederum selbst Zytokine sezernieren (Nash et al., 1999).

LIF wurde zuerst als der Faktor beschrieben, der die Differenzierung von myeloischen leukämischen Zellen einer Maus in Makrophagen induzierte (Gearing et al., 1987). LIF löst die Differenzierung bestimmter leukämischer Zellen (Tomida et al., 1984) und die Prolife-

ration hämatopoetischer Stammzellen (Metcalf et al., 1990) aus. Zusätzlich besitzt der Faktor ein breites Wirkungsspektrum auf viele unterschiedliche Organsysteme: LIF greift regulierend in den Knochen- und Energiehaushalt ein, inhibiert die Differenzierung embryonaler pluripotenter Stammzellen und wirkt modulierend auf das Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-System (Auernhammer, 2000). Auch im Serum von Patienten mit septischem Schock oder in verschiedenen entzündlichen Transsudaten konnten erhöhte LIF-Spiegel nachgewiesen werden, wobei die genaue Wirkungsweise von LIF in der Pathogenese der Entzündungsreaktion noch nicht vollständig geklärt ist (Waring et al., 1992). Anscheinend moduliert LIF über die Synthese anderer Zytokine Entzündungsreaktionen und pathologische Prozesse im menschlichen Körper (Villiger et al., 1993).

Bei der Entstehung von Blutgefäßen werden zwei Mechanismen unterschieden: Die Angiogenese, bei der sich Gefäße aus bereits bestehendem Endothel heraus entwickeln, und die Vaskulogenese, bei der Endothelzellen aus embryonalem Mesenchymgewebe differenzieren und somit eine Gefäßentwicklung *de novo* stattfindet (Ferrara, 1992). Beide Mechanismen sind sowohl in die Entstehung des embryonalen Gefäßbaums als auch in postnatale Neovaskularisationsvorgänge involviert (Springer et al., 1998). VEGF spielt aufgrund seiner Spezifität zu Endothelzellen eine direkte Schlüsselrolle in der Angiogenese (Leung et al., 1989). Folglich ist VEGF auch in die Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems eingebunden (Jakeman et al., 1993).

Daneben kann VEGF rasch eine erhöhte Permeabilität von Kapillaren und Venolen induzieren. Dieser Effekt wird unter anderem durch die schnelle Fenestrierung von zuvor geschlossenen Epithelien erreicht (Roberts und Palade, 1995). In den Leukozyten und Thrombozyten von Krebspatienten konnten erhöhte VEGF-Konzentrationen nachgewiesen werden, was zu der Vermutung führt, dass VEGF auch bei der Angiogenese von Malignomen und bei Metastasierung eine bedeutsame Rolle spielt (Salven et al., 1999).

NO spielt sowohl als intra- und interzellulärer Signalvermittler als auch als zytotoxisches Effektmolekül eine wichtige Rolle (Knowles und Moncada, 1994). So wird NO beispielsweise während immunologischen Abwehrreaktionen vermehrt aus Makrophagen freigesetzt (Moncada et al., 1991). In seiner Funktion als Signalvermittler wirkt NO über

eine Aktivierung der Guanylatzyklase und daraus resultierend über eine Erhöhung von cGMP in der Zielzelle (Moncada, 1991). NO ist schon seit langem als Vasodilatator bekannt; es vermittelt die Relaxierung der glatten Muskelzellen in Gefäßen wohl über eine Aktivierung der Guanylatzyklase (Gruetter et al., 1979). Außerdem moduliert NO die Angiogenese (Zische et al., 1994) und verhindert die Adhäsion von Thrombozyten am Endothel (Radomski et al., 1987). Auch im Reproduktionstrakt wird NO exprimiert: Die höchsten Konzentrationen von NO konnten in der Mitte des weiblichen Menstruationszyklus gemessen werden; anscheinend ist NO in die spontane Ovulation involviert (Ekerhovd et al., 2001). Für die Reproduktivität des Mannes ist NO ebenfalls von großer Bedeutung: NO gilt als Mediator der männlichen Erektion (Burnett et al., 1992)

#### ***2.4 Einfluss von Parametern der assistierten Reproduktion auf die Zytokin-konzentration***

Die Bedeutung der Zytokine als eventuelle prognostische Parameter für den Verlauf von Programmen der assistierten Reproduktion wird in der Wissenschaft immer häufiger diskutiert. Gerade in der Follikelflüssigkeit, die die Mikroumgebung der Eizelle darstellt, stellen Zytokine wahrscheinlich eine Schlüsselrolle im Wachstum und der Entwicklung der Oozyte dar (Vujsic und Zidovec, 2005). Auf diese Weise nehmen sie Einfluss auf Prozesse, die sich auf Entstehung und Verlauf einer Schwangerschaft auswirken. Die Konzentrationen verschiedener Zytokine in periovulatorischer Follikelflüssigkeit weisen darauf hin, dass auch die Ovulation von diesen Zytokinen moduliert wird (Büscher et al., 1999). Auch für die Implantation der Eizelle in den Uterus sind Zytokine von großer Bedeutung (Chard, 1995). Vor allem die Hypothese, dass gewisse Zytokine notwendig sind, um das Endometrium auf die Einnistung der befruchteten Eizelle vorzubereiten (Sharkey, 1998), stellt einen interessanten Ansatz für die Reproduktionsforschung dar.

Die Relevanz von LIF gerade für Vorgänge in der Reproduktionsphysiologie wurde in vielen Untersuchungen nachgewiesen. Stewart et al. (1992) erkannten, dass Eizellen von Mäusen zwar befruchtet werden konnten, aber ihre Implantation in Abwesenheit von LIF nicht möglich war. Weitere Forschungsergebnisse unterstützen die Hypothese, dass LIF für die embryonale Implantation von Bedeutung ist (Cullinan et al., 1996). Durch die Zugabe von

rekombinantem LIF in das Medium von befruchteten Eizellen, die zuvor von Mäusen entnommen worden waren, konnten Fry et al. (1992) die Implantationsrate der Embryonen erhöhen. Auch für die männliche Fertilität spielt LIF eventuell eine Rolle: In einer Untersuchung von Attar et al. (2003) konnte LIF die Motilität von Spermien *in vitro* steigern und ihre Überlebenszeit verlängern.

LIF scheint an der Pathogenese bestimmter Erkrankungen, die Ursache einer Sterilität sein können, beteiligt zu sein. So injizierten Illera et al. (2000) Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen in den Uterus von gesunden Mäusen. Das Resultat war ein Abfall der LIF-Expression im Endometrium der Maus. In der Follikelflüssigkeit von Frauen, die an dem Syndrom der Polyzystischen Ovarien (PCO-Syndrom) litten, waren die LIF-Konzentrationen signifikant erniedrigt im Vergleich zu Patientinnen mit anderen Sterilitätsursachen (Lédée-Bataille et al., 2001).

Arici et al. (1997) wiesen einen Anstieg von LIF in der Follikelflüssigkeit von Frauen nach, nachdem ihnen exogenes HCG verabreicht worden war. Sie vermuteten, dass LIF regulatorisch in die Östrogensynthese der Follikelzellen involviert sei. Papageorgiou et al. (2002) wiesen nach, dass erhöhte Estradiolwerte während einer IVF-Behandlung die Anzahl und die Qualität der entnommenen Eizellen steigerten. Die erhöhten Serumestradiolwerte waren mit einer Steigerung der Schwangerschaftsrate einhergegangen, dies allerdings nicht mit statistischer Signifikanz. Anscheinend hat LIF somit über die Steroidhormonsynthese Einfluss auf die Entwicklung der Eizelle.

VEGF scheint vor allem in Vorgängen der Reproduktionsphysiologie, die mit einer hohen Vaskularisationsrate einhergehen, von großer Bedeutung zu sein. Charnock-Jones et al. (1993) berichteten über zyklusabhängig schwankende VEGF-Spiegel in Endometriumzellen. Auch in Zellen des Corpus Luteum, Thekazellen und Granulosazellen konnten VEGF-Konzentrationen gemessen werden, die mit der Follikelreife variierten. Diese Daten führten zu der Annahme, dass die VEGF-Produktion über die Steroidhormone reguliert wird (Shweiki et al., 1993). Moncayo et al. (1998) vermuteten, dass auch Gonadotropine Einfluss auf die Synthese von VEGF im Follikel nehmen würden. In einer Studie von



Manau et al. (2000) korrelierten die VEGF-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit dementsprechend positiv mit der Menge von zuvor verabreichtem FSH.

VEGF konnte bereits bei Patientinnen unter IVF-Behandlungen in Follikelflüssigkeit in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (Lee et al., 1997). Friedman et al. (1998) stellten bei einer Studie im Rahmen eines IVF-Programmes fest, dass in der Follikelflüssigkeit derjenigen Patientinnen, bei denen die Behandlung nicht in einer Schwangerschaft resultierte, höhere VEGF-Spiegel nachweisbar waren als bei den Frauen, bei denen eine Schwangerschaft festgestellt werden konnte. VEGF beeinflusst also anscheinend Prozesse, die mit der Entstehung einer Schwangerschaft zusammenhängen, maßgeblich.

Auch versuchte man, ein bestimmtes Profil von VEGF im Follikel als charakteristischen Marker für verschiedene Sterilitätsursachen zu finden. Erhöhte Konzentrationen von VEGF konnten Agrawal et al. (1998) im Serum von PCO-Patientinnen verglichen mit Daten einer Kontrollgruppe nachweisen. Erniedrigte folliculäre VEGF-Konzentrationen fanden Garrido et al. (2000) dagegen bei Patientinnen mit Endometriose.

Friedman et al. (1998) versuchten, die Konzentration von VEGF in Follikelflüssigkeit mit dem Alter der Patientinnen, die sich einer ovariellen Stimulation unterzogen hatten, in Bezug zu setzen. Dabei stellten sie höhere VEGF-Spiegel in der Gruppe der Frauen älter als 38 Jahre im Vergleich zu den jüngeren Patientinnen fest. Durch diese Ergebnisse konnten erhöhte VEGF-Spiegel in Follikelflüssigkeit mit reduziertem Reproduktionspotenzial von Frauen in Zusammenhanggebracht werden. Manau et al. (2000) stellten ebenfalls eine positive Korrelation zwischen VEGF im Follikel und dem Alter der Patientinnen einer IVF-Behandlung fest.

Van Voorhis et al. (1994) beschrieben den Nachweis von NO in menschlichen Granulosazellen, das dort inhibitorisch auf die ovarielle Steroidhormonsynthese wirkte und somit indirekt auch die Reifung und Entwicklung der Eizelle beeinflusste. Barroso et al. (1998) postulierten, dass hohe NO-Konzentrationen sich negativ auf die Entwicklung von Embryonen in vitro wie auch auf die Einnistung des Embryos in vivo auswirken. NO könnte

also eine Rolle in den Prozessen, die zu der Entstehung und Erhaltung einer Schwangerschaft führen, spielen.

Anteby et al (1996) berichten über eine positive Korrelation von follikulärem Nitrat beziehungsweise Nitrit und der im Follikel gemessenen Konzentration von Östradiol. Sie vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Synthese von Steroidhormonen mit der Produktion von NO im Follikel.

Auch spielt NO wahrscheinlich in der Entstehung von Krankheiten, die mit Unfruchtbarkeit assoziiert sind, eine Rolle. So waren die NO-Spiegel in einer Studie von Lee et al. (2000) in den Follikelflüssigkeiten von Frauen, die an Endometriose litten, signifikant höher als in denen von gesunden Frauen.

## ***2.5 Fragestellung***

In der vorliegenden Arbeit sollen die im Folgenden näher beschriebenen Zytokine in Follikelflüssigkeits- und Serumproben nachgewiesen und auf einen eventuellen Zusammenhang mit verschiedenen Parametern der assistierten Reproduktion untersucht werden.

Die Follikelflüssigkeit sowie das Serum von Patientinnen, die sich zuvor im Rahmen eines IVF(In Vitro Fertilisation)- bzw. ICSI (Intracytoplasmatic Sperm Injection)- Programmes einer Follikelstimulation unterzogen hatten, wurden auf das Vorhandensein von Leukamia Inhibitory Factor (LIF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Stickstoffmonoxid (NO; Nitric Oxide) untersucht. Über den Vergleich der Konzentrationen dieser Faktoren in Serum und in Follikelflüssigkeit sollte man Rückschlüsse auf den möglichen Produktionsort derselben ziehen können.

Weiteres Ziel der Untersuchung war es nun, zu prüfen, ob zwischen den jeweils gemessenen Konzentrationen von LIF, VEGF und NO und den verschiedenen angewandten Stimulationsprotokollen (Behandlung mit HMG= Human Menopausal Gonadotropine, FSH= Follikelstimulierendes Hormon oder mit einer Kombination aus HMG und FSH) ein Zusammenhang bestand.

Daneben wurde die Beziehung zwischen den Konzentrationen von LIF, VEGF und NO und den unterschiedlichen Sterilitätsursachen untersucht. Eine bestimmte Zytokinkonstellation könnte mit einer bestimmten Erkrankung in Zusammenhang treten und somit als diagnostischer Marker dienen.

Darüberhinaus wurde versucht, die festgestellten Konzentrationen von LIF, VEGF und NO bezüglich des Ergebnisses (Schwangerschaft oder Keine Schwangerschaft) der assistierten Reproduktionsmaßnahme miteinander zu vergleichen, um so eventuell einen prognostischen Faktor für das Erfolgen einer Schwangerschaft zu finden.

Letztendlich wurde ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patientinnen und den jeweils gemessenen Konzentrationen an LIF, VEGF und NO gesucht, um so eine Änderung der Reproduktivität mit dem Alter der Frauen wiederzuspiegeln.



### ***3.1 Patientinnenkollektiv und Gruppeneinteilung***

#### **3.1.1 Patientinnen**

Es wurden insgesamt 75 Follikelflüssigkeits- und 75 Serumproben von Patientinnen untersucht, die im Rahmen einer assistierten Reproduktionsmaßnahme in der Homburger Universitätsfrauenklinik behandelt wurden. 24 Frauen nahmen an dem IVF-Programm teil, 51 wurden mittels ICSI behandelt. Die Patientinnen waren zwischen 22 und 42 Jahre alt ( $34 \pm 4,7$  Jahre). Alter, angewandtes Stimulationsprotokoll und Sterilitätsdiagnose entstammen der Patientenkartei der gynäkologischen Ambulanz der Universitätsfrauenklinik. Die Daten über die Anzahlen gewonnener, fertilisierter und geteilter Oozyten stammen aus der Dokumentation des IVF/ICSI-Labors.

#### **3.1.2 Einteilung der Patientinnen**

Aufgrund verschiedener Gesichtspunkte konnten die Patientinnen in insgesamt fünf unabhängigen Kategorien in Gruppen zusammengefasst werden. Diese umfassen das angewandte Stimulationsprotokoll, den Erfolg der Reproduktionsmaßnahme, die Sterilitätsätiologie, das Alter der Patientinnen und Anzahl der entnommenen Oozyten.

##### ***3.1.2.1 Stimulationsprotokoll***

Das Patientengut wurde anhand des Stimulationsprotokolls in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe (1) bestand aus 40 Patientinnen, deren Follikelreifung mit FSH ((follikelstimulierendes Hormon), Gonal F s.c. (rekombinantes FSH) Serono, Unterschleißheim, Deutschland oder Fertinorm s.c. (hochgereinigtes FSH), Serono, Unterschleißheim, Deutschland oder Puregon s.c. (rekombinantes FSH), Organon, Oberschleißheim, Deutschland) stimuliert wurde. In der zweiten Gruppe (2) wurde 10 Patientinnen HMG ((Humanes Menopausengonadotropin) Menogon i. m., Ferring, Kiel, Deutschland oder Humegon i. m., Organon, Oberschleißheim, Deutschland) zur Stimulation appliziert. Gruppe 3 besteht aus 25 Patientinnen, die mit einer Kombination aus HMG abends und FSH morgens behandelt wurden. Bei allen Patientinnen wurde die Ovulation mit 10000

I.E. HCG (Humanes Choriogonadotropin, Choragon i. m., Ferring, Kiel, Deutschland) ausgelöst.

### ***3.1.2.2 Schwangerschaft***

Eine weitere Einteilung der Patientinnen erfolgte nach dem Ergebnis der durchgeführten Reproduktionsmaßnahme. 19 Frauen wurden nach Behandlung schwanger und bildeten Gruppe A. Bei 56 Patientinnen konnte nach erfolgter Behandlung keine Schwangerschaft nachgewiesen werden; diese Frauen wurden Gruppe B zugeteilt.

Zur Bestimmung der Schwangerschaft erfolgte 12 Tage nach erfolgreichem Embryotransfer eine  $\beta$ -HCG-Messung im Serum. Eventuelle später stattgefundenen Aborte wurden bei der Einteilung der Patientinnen in die beiden Gruppen nicht berücksichtigt.

### ***3.1.2.3 Sterilität***

Aufgrund der Ätiologie der Sterilität erfolgte eine Einteilung der Patientinnen in drei verschiedene Gruppen. Gruppe I umfasste 17 Patientinnen, bei denen eine tubare Sterilitätsursache diagnostiziert wurde, Gruppe II 15 Patientinnen mit Endometriose, der Gruppe III wurden insgesamt 43 Patientinnen zugeteilt, bei denen die Kinderlosigkeit durch andrologisch bedingter Sterilität des Partners verursacht war.

## ***3.2 Vorbereitung der Patientinnen (Ovarielle Stimulation)***

Bei den Patientinnen dieser Studie wurde das weitgehend etablierte sogenannte lange Protokoll zur Follikelstimulation angewandt. Hierbei wird zunächst der hypothalamisch-hypophysär-ovarielle Regelkreis durch eine 14-tägige intramuskuläre Gabe von GnRH-Analoga unterbrochen. GnRH-Rezeptoragonisten führen zunächst zu einer vermehrten hypophysären FSH- (Follikelstimulierendes Hormon) und LH- (Luteinisierendes Hormon) Ausschüttung. Bei längerer Anwendung kommt es jedoch zur Downregulation der GnRH-Rezeptordichte und folglich zu einer Verminderung der FSH- und LH-Sekretion. Die Hypophyse wird durch die GnRH-Analoga desensitiviert, was eine gezielte exogene HMG- bzw. FSH-Applikation ermöglicht.

Alle Patientinnen erhielten am 20.-23. Zyklustag des letzten Spontanzyklus eine GnRH-Einlage (Zoladex, Zeneca, Plankstadt, Deutschland, oder Decapeptyl, Ferring, Kiel, Deutschland). Kontrolluntersuchungen der Ovarien mittels Sonographie zur Beurteilung eventuell entstandener Zysten und eine FSH- und Östradiolmessung im Serum erfolgten 14 Tage nach Applikation der Einlage. Bei FSH-Konzentrationen  $< 2\text{mU/ml}$  und Östradiolwerten  $< 30$  bis  $50\text{ pg/ml}$  wurde 4 Tage später mit der Gonadotropinstimulation begonnen. In der Regel wurde etwa am 6. Tag der Stimulation eine sonographische Follikulometrie durchgeführt, erneut das Östradiol im Serum bestimmt und die weitere Dosierung festgelegt. Waren sowohl eine ausreichende Anzahl von Follikeln sowie ein Leitfollikel  $> 18\text{ mm}$  vorhanden und lag der Östradiolspiegel  $> 250\text{ pg pro Follikel}$  ( $> 16\text{ mm}$ ), wurden am gleichen Abend  $10000\text{ I.E. HCG}$  (Human Chorionic Gonadotropine, Choragon i. m., Ferring, Kiel, Deutschland) zur Ovulationsauslösung verabreicht. Die Follikelpunktion zur Gewinnung der Eizellen erfolgte 36 Stunden nach der HCG-Gabe. Bis zum eventuellen Schwangerschaftsnachweis 12 Tage nach Punktion erhielten die Patientinnen zwei Mal täglich  $150\text{ mg}$  Progesteron in Form einer Vaginalkapsel. Der Schwangerschaftsnachweis erfolgte 12 Tage nach durchgeführtem Embryonentransfer durch den Nachweis eines  $\beta$ -HCG- Anstiegs im Serum der Patientinnen. Die Schwangerschaft wurde im Falle eines positiven Testergebnisses durch eine vaginale Sonographie bestätigt.

### ***3.3 Materialgewinnung***

#### **3.3.1 Follikelflüssigkeit (FF)**

Die aspirierten Asservate der einzelnen Follikel einer Patientin wurden gepoolt, um die ovarielle Gesamtproduktion zu beurteilen, was nach Friedman (1997) mittlerweile als etablierte Methode gilt. Die so erhaltene Follikelflüssigkeit wurde bei  $3000$  Umdrehungen pro Minute für  $10$  Minuten zentrifugiert und nach Abtragung des Zellüberstands bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur endgültigen Messung aufbewahrt. Es wurden nur klare, optisch blutfreie FF verwendet.

#### **3.3.2 Serum (S)**

Die venöse Blutentnahme erfolgte morgens nach  $12$ -stündiger Fastenperiode. Die Serumproben wurden innerhalb  $30$  Minuten nach Blutentnahme für  $10$  Minuten zentrifugiert

(3000 U/min.), um eine mögliche VEGF-Konzentrationserhöhung durch Blutplättchen bei der Blutgerinnung zu minimieren (Banks et al., 1998). Bis zur endgültigen Messung wurden die Proben bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.3.3 Sperma- Beurteilung und Präparation**

Um die Chance auf eine erfolgreiche Befruchtung zu erhöhen, muss eine bestmögliche Spermienqualität gewährleistet sein. Zu diesem Zweck fand eine Beurteilung und darauffolgende Präparation der Spermien statt. Das Ejakulat (entnommen nach drei- bis viertägiger sexueller Abstinenz) wurde auf Verflüssigungszeit, pH-Wert, Leukozytengehalt, Dichte sowie auf Motilität und Morphologie der Spermien untersucht. Zusätzlich wurde der Eosin-Test zur Unterscheidung zwischen unbeweglichen und toten Spermien, der hypoosmotische Schwellungstest (HOS-Test) sowie der Mar-Test (Mixed Antiglobulin Reaction Test) zum Nachweis von Spermienoberflächenantikörpern durchgeführt.

Die Spermapräparation durch verschiedene gängige Methoden (Swim-up, Percoll, Filtration mit Glaswolle etc.) hat zum Ziel, die reifen, morphologisch unauffälligen und beweglichen Spermazellen von den amorphen, bewegungsarmen Spermien zu trennen und so letztendlich eine gute Spermienqualität zu gewährleisten (Hammadeh et al., 1997).

## ***3.4 Assistierte Reproduktionstechniken***

### **3.4.1 In-vitro Fertilisation (IVF)**

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Methode, bei der die menschliche Eizelle außerhalb des Mutterleibes befruchtet und anschließend wieder in den lebenden Organismus eingesetzt wird. Dazu wurde zunächst unter operativen Bedingungen mit Hilfe der Vaginalsonographie (Siemens Sono Line Prima mit Vaginalsonde und Punktionsnadel) der Follikel punktiert. Durch Aspiration konnten sowohl Eizellen als auch die sie umgebende Flüssigkeit (Follikelflüssigkeit) entnommen werden. Die Eizellen wurden direkt nach Entnahme von ihrem natürlichen Umgebungsmedium getrennt und in ein physiologisches



Nährmedium (Ham's F10 mit Humanalbumin) überführt und bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung aufbewahrt. Im Labor wurde dem Nährmedium zusätzlich 10% Patientenserum zugeführt (Ham's F + 10% Patientenserum, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung). Die so gelagerten Oozyten wurden mit präpariertem Sperma (s.u.) inkubiert und nach 17-18 Stunden auf eine erfolgte Zellteilung hin überprüft. Der Embryotransfer (ET) erfolgte im Vierzellstadium ca. 48 Stunden nach Punktion

### 3.4.2 Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

Die für die ICSI benötigten Eizellen wurden unter denselben operativen Bedingungen entnommen, wie sie für die IVF herrschten. Im Labor folgte jedoch vor Zugabe des Patientenserums die Trennung der Kumuluszellen von der Eizelle mittels einer hyaluronidasehaltigen Lösung (80 IU/ml). Nach Waschung und Einbettung im eigentlichen Nährmedium (Ham's F + 10% Patientenserum, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde der Reifegrad der Oozyten mikroskopisch beurteilt. In Eizellen, die im Metaphase-II-Stadium vorlagen, wurden mit einem Interphase-Differenzialmikroskop die vorher präparierten Spermien (s.o.) injiziert. Nach erfolgreicher Injektion und wiederholter Waschung der Eizellen in Kulturmedium wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Begasung für 18 bis 24 Stunden inkubiert. Befanden sich die Zellen nach der Inkubationszeit im Vorkernstadium und war ein zweites Polkörperchen als Reifeparameter vorhanden, wurde die gesetzlich maximale Anzahl von drei befruchteten Zellen bis zu einer Gesamtzeit von ca. 48 Stunden (nach Punktion) weiterinkubiert. Die überschüssigen befruchteten Oozyten wurden gemäß Embryonenschutzgesetz entweder eingefroren oder ihre Kultur wurde abgebrochen. Die so erhaltenen Embryonen (zwei bis vier Blastomere) wurden etwa 48 Stunden nach Punktion in den Mutterleib transferiert (Hammadeh et al., 1996).

### 3.4.3 Wahl der Befruchtungsmethode

Der Kinderwunsch und somit die Einwilligung der Paare zur assistierten Fertilisation ist die formale Grundlage für alle weiteren Maßnahmen. Die oben erläuterte Spermienbeurteilung stellt einen wichtigen Faktor zur Findung der optimalen Reproduktionsassistenz-Methode dar.

Ist das Spermogramm normal (Ejakulatvolumen  $> 2\text{ml}$ ; pH 7,2-7,4; Spermienkonzentration  $> 20 \cdot 10^6/\text{ml}$ ; Gesamtspermienzahl im Ejakulat  $> 40 \cdot 10^6$ ; Motilität  $> 50\%$  progressiv;  $> 25\%$  linear beweglich; Morphologie  $> 30\%$  normal (WHO-Richtlinien 1992), Eosin-Test  $> 75\%$  vitale Zellen, HOS-Test  $> 60\%$  geschwollen, Leukozyten  $< 10^6/\text{ml}$ , Mar-Test  $< 10\%$  anhaftende Partikel), wird zunächst eine intrauterine Insemination (IUI) versucht, da sie ein schonendes Verfahren darstellt. Bleibt nach 4 bis 6 Versuchen die gewünschte Schwangerschaft aus, wird einmalig eine IVF durchgeführt, bei weiterem Ausbleiben einer Schwangerschaft wird eventuell eine ICSI vorgenommen.

Liegt eine tubare Sterilität der Frau vor, schreitet man direkt zur in-vitro Fertilisation. Bei männlicher (andrologischer) Subfertilität hängt die Reproduktionsmethode vom Schweregrad (Grad I-III) der Störung ab (Hammadeh et al., 1999):

- **Grad I:** leichte Störung ( $10\text{-}20 \cdot 10^6$  Spermien/ml, Motilität 30-40 %, normale Morphologie 16-20%): 6-mal IUI, einmalig IVF, dann ICSI.
- **Grad II:** mittlere Störung ( $5\text{-}10 \cdot 10^6$  Spermien/ml, Motilität 20-30 %, normale Morphologie 10-16%): 3-mal IUI, einmalig IVF, dann ICSI.
- **Grad III:** schwere Störung ( $0\text{-}5 \cdot 10^6$  Spermien/ml, Motilität 0-20 %, normale Morphologie 0-10%): ICSI und je nach Fertilitätsstörung eine eventuelle Hoden- bzw. Nebenhodenbiopsie

### ***3.5 Messung von LIF, VEGF und NO in Follikelflüssigkeit und Serum***

#### **3.5.1 Untersuchungsmethode**

LIF, VEGF und NO Konzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum wurden mit Hilfe von im Handel erhältlichen Kits (R&D Systems, Minneapolis, USA - Quantikine Human LIF Immunoassay, Quantikine Human VEGF Immunoassay, Total Nitric Oxide Assay) im enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) (VEGF und LIF) bzw. mittels Griess Reaktion (NO) gemessen. Die Follikelflüssigkeit wurde nach Entnahme zentrifugiert (10 Minuten bei 3000 U/min), der Überstand abpipettiert und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Messung gelagert.

Die Serumproben wurden nach Entnahme innerhalb von 30 Minuten zentrifugiert (s.o.) und bis zur Messung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Es wurden Doppelmessungen von jedem Parameter durchgeführt und der Mittelwert aus beiden Werten gebildet.

### 3.5.2 ELISA: Prinzip der Technik

Bei den Assays zur Messung von LIF und VEGF wurde die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay Methode verwendet. Ein monoklonaler Antikörper für den entsprechenden Parameter wurde an die Oberfläche einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gebunden. Standards bekannter Konzentration von LIF und VEGF und die Proben wurden auf die Platte aufgetragen. Waren die zu bestimmenden Zytokine vorhanden, bildeten sie mit den immobilisierten Antikörpern auf der Platte Immunkomplexe. Nach entsprechender Inkubation und nachdem alle ungebundenen Substanzen ausgewaschen wurden, kam ein für LIF bzw. VEGF spezifischer, polyklonaler an ein Enzym gebundener Antikörper hinzu. Diese Konjugat-Lösung hatte sich an alle vorhandenen LIF- bzw. VEGF-Moleküle gebunden. Nach erneuter Inkubation und Waschung, die durchgeführt wurde, um ungebundene enzymbeladene Antikörper zu eliminieren, wurde eine Substratlösung aufgetragen. Alle LIF- bzw. VEGF-Moleküle, die sich während des Inkubierens sowohl an den auf der Mikrotiterplatte verankerten Antikörper als auch den polyklonalen, Meerrettich-gekoppelten, freien Antikörper gebunden hatten, reagierten mit der Substratlösung. Daraufhin lief eine Farbreaktion proportional zu der ursprünglich gebundenen LIF- bzw. VEGF-Konzentration ab. Diese Farbreaktion wurde gestoppt und der Farbumschlag photometrisch bei 450 nm bestimmt.

### 3.5.3 Bestimmung von LIF mittels ELISA

96 Loch Mikrotiterplatte mit spezifischem Antikörper gegen LIF beschichtet

- + 50  $\mu\text{l}$  Assay-Verdüner RD1D pro Vertiefung (pro V.) der Platte
- + 200  $\mu\text{l}$  Standard\* oder Probe pro V.
- Platte abdecken und 2 Stunden Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3 Waschgänge mit Waschpuffer
- + 200  $\mu\text{l}$  Konjugat-Lösung (polyklonaler LIF Antikörper an Meerrettich) pro V.
- 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur

- 3 Waschgänge mit Waschpuffer
- + 200 µl Substrat-Lösung (jeweils gleiche Anteile Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) pro V.
- 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, lichtgeschützt
- + 50 µl Stopp-Lösung (2 N Schwefelsäure) pro V.
- Messung der optischen Dichte bei 450 nm innerhalb 30 Minuten ( $\lambda$  Korrektur bei 540 nm)
- \* Standardverdünnungsreihe von 0 bis 2000 pg/ml aus rekombinantem hLIF

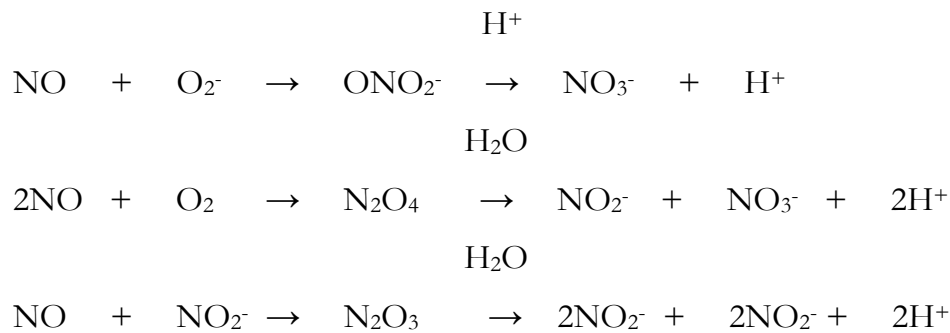
#### 3.5.4 Bestimmung von VEGF mittels ELISA

- 96-Loch-Mikrotiterplatte mit spezifischem Antikörper gegen VEGF beschichtet
- + 100 µl Assay-Verdünner RD1W pro Vertiefung (pro V.) der Platte
  - + 100 µl Standard\* oder Probe pro V.
  - Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur
  - 3 Waschgänge mit Waschpuffer
  - + 200 µl Konjugat-Lösung (polyklonaler Antikörper gegen VEGF an Meerrettich) pro V.
  - Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur
  - 3 Waschgänge mit Waschpuffer
  - + 200 µl Substrat-Lösung (jeweils gleiche Anteile Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) pro V.
  - Inkubation für 25 Minuten bei Raumtemperatur
  - + 50 µl Stopp-Lösung (2 N Schwefelsäure) pro V.
  - Messung der optischen Dichte bei 450 nm innerhalb 30 Minuten ( $\lambda$  Korrektur bei 540 nm)
  - \* Standardverdünnungsreihe von 0 bis 2000 pg/ml aus rekombinantem hVEGF165

#### 3.5.5 Bestimmung von NO mittels Griess-Reaktion

Stickstoffmonoxid (NO), eine äußerst flüchtige Substanz im menschlichen Organismus, wird zum größten Teil zu Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oxidiert, was eine quantitative Bestimmung der NO-Produktion mit Hilfe dieser Anionen ermöglicht. Wurde NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu

$\text{NO}_2^-$  konvertiert, kann die spektrophotometrische Messung von  $\text{NO}_2$  mit Hilfe der Griess- Reaktion durchgeführt werden.



$\text{NO}$  wurde durch Messung der Gesamtkonzentration von Nitrat und Nitrit in der Probe bestimmt. Bei dem hier verwendeten Assay von R&D Systems (Total Nitric Oxide Assay) wurde die Umwandlung von Nitrat zu Nitrit mit Hilfe des Enzyms Nitratreduktase erreicht. Dieser Umwandlungsreaktion folgte eine farbabhängige Messung von Nitrit als ein Azofarbstoff-Produkt der Griess-Reaktion. Die Griess-Reaktion läuft in zwei Diazotierungsschritten ab, wobei aus azidifiziertem  $\text{NO}_2^-$  ein nitrosatierendes Zwischenprodukt entsteht, welches wiederum mit Sulfanilsäure reagiert und das Diazonium-Ion hervorbringt. Dieses Ion wurde dann mit N-(1-naphthyl)-ethylendiamin gekoppelt, um das chromophore Azoderivat zu formen, welches Licht bei 540 nm absorbiert.

Detailliertes Assayprotokoll für  $\text{NO}$ :

- 96-Loch Mikrotiterplatte
- + entweder 50  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer in die Nullstandard-Vertiefung  
oder 50  $\mu\text{l}$  Nitratstandard\* oder Probe# in die jeweilige Vertiefung  
oder 200  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer in die übrigen (leeren)Vertiefungen
- + 25  $\mu\text{l}$  NADH in alle Standard- und Proben-Vertiefungen (hier pro V.)
- + 25  $\mu\text{l}$  Nitratreduktase pro V.
- Inkubation für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius
- + 50  $\mu\text{l}$  Griess Reagenz I (Sulfanilamid in 2N Hydrochloresäure) pro V.
- + 50  $\mu\text{l}$  Griess Reagenz II (N-(1-naphthyl)-ethylendiamin in 2N Hydrochloresäure) pro V.
- Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 540 nm

\* Standardverdünnungsreihe von 0 bis 100  $\mu\text{mol/l}$

# die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Reaktionspuffer verdünnt.

### **3.5.6 ELISA: Auswertung**

Alle Werte wurden doppelt bestimmt; der Mittelwert wurde gebildet und die optische Dichte des Nullstandards wurde abgezogen. Die Extinktionen der Standardreihen wurden gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen, um eine Standardkurve zu erstellen. Die gemessenen Extinktionen der Proben wurden mit der Standardkurve verglichen und die Parameterkonzentration bestimmt. Pro Kit wurde jeweils eine Standardkurve erstellt.

## ***3.6 Statistische Auswertung***

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS für Windows eingesetzt.

### **3.6.1 Statistische Tests**

Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung untersucht (Kolmogorov-Smirnov-Test). Dabei wurde die eine Normalverteilung angenommen, wenn 68% der Werte innerhalb einer Standardabweichung (SD) lagen, 95% innerhalb 2 SD und 99,7% der Daten innerhalb von 3 SD. Es erfolgte eine Varianzanalyse der Daten mittels einfaktorieller ANOVA. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, erfolgte die Auswertung mittels nicht-parametrischer Tests (Kruskal-Wallis Test zum Vergleich mehrerer Variablen, Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von zwei Variablen und T-Test für unverbundene Stichproben). P-Werte kleiner 0,05 galten als statistisch signifikant.

### **3.6.2 Grafiken**

Die grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mittels Histogrammen, Punktwolken und Boxplots. Letztere wurden zur Darstellung der verschiedenen Zytokine in Abhängigkeit von Alter, Stimulationsprotokoll, Diagnose, Schwangerschaft und gewonnener Oozytenzahl verwendet. Dabei markieren die Kastengrenzen und Teilungslinien das 25% Quartil, das 50%-Quartil (Median) und das 75%-Quartil. Die 1,5 Interquartilsspannbreite

wurde von den an den Kasten grenzenden Linien markiert. Ausreißer außerhalb dieser 1,5 Interquantilspannbreite sind durch Punkte bzw. Kreise dargestellt.

### **3.6.3 Korrelationen**

Zur Berechnung statistisch signifikanter Korrelationen wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient verwendet. Eine statistisch relevante Korrelation lag dann vor, wenn der Betrag des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) größer 0,7 war.



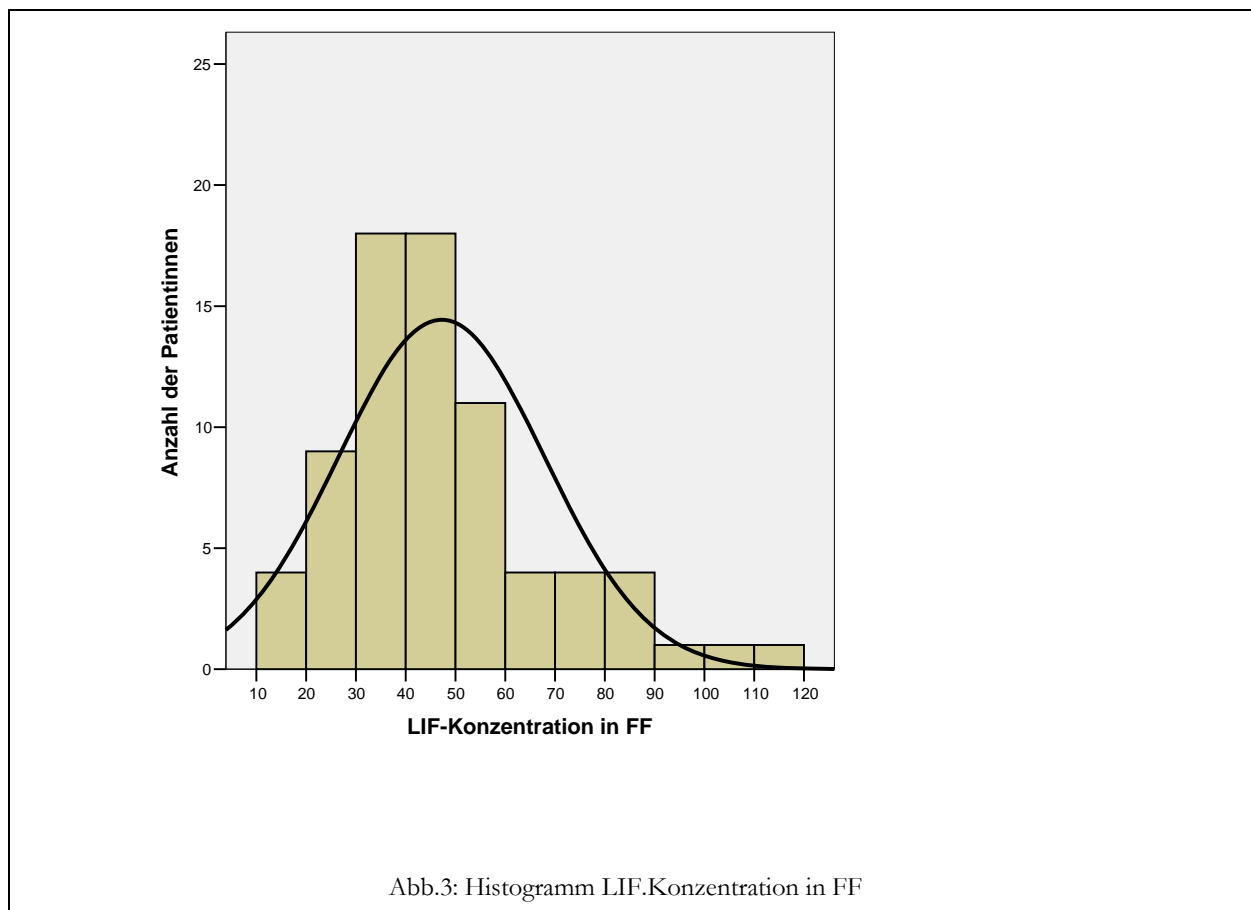


### 4.1 LIF, VEGF und NO in Follikelflüssigkeit (FF)

Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Stickstoffmonoxid (NO) konnten in allen 75 untersuchten Follikelflüssigkeiten nachgewiesen werden.

#### 4.1.1 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) in FF

Die gemessenen LIF-Werte lagen zwischen 12,4 pg/ml und 115,0 pg/ml, der Mittelwert betrug  $47,2 \text{ pg/ml} \pm 20,7 \text{ pg/ml}$ . 50 % der Werte lagen zwischen 31,8 pg/ml und 53,5 pg/ml. Der Median lag bei 43,5 pg/ml. Abbildung 3 zeigt, dass die Daten normalverteilt sind.



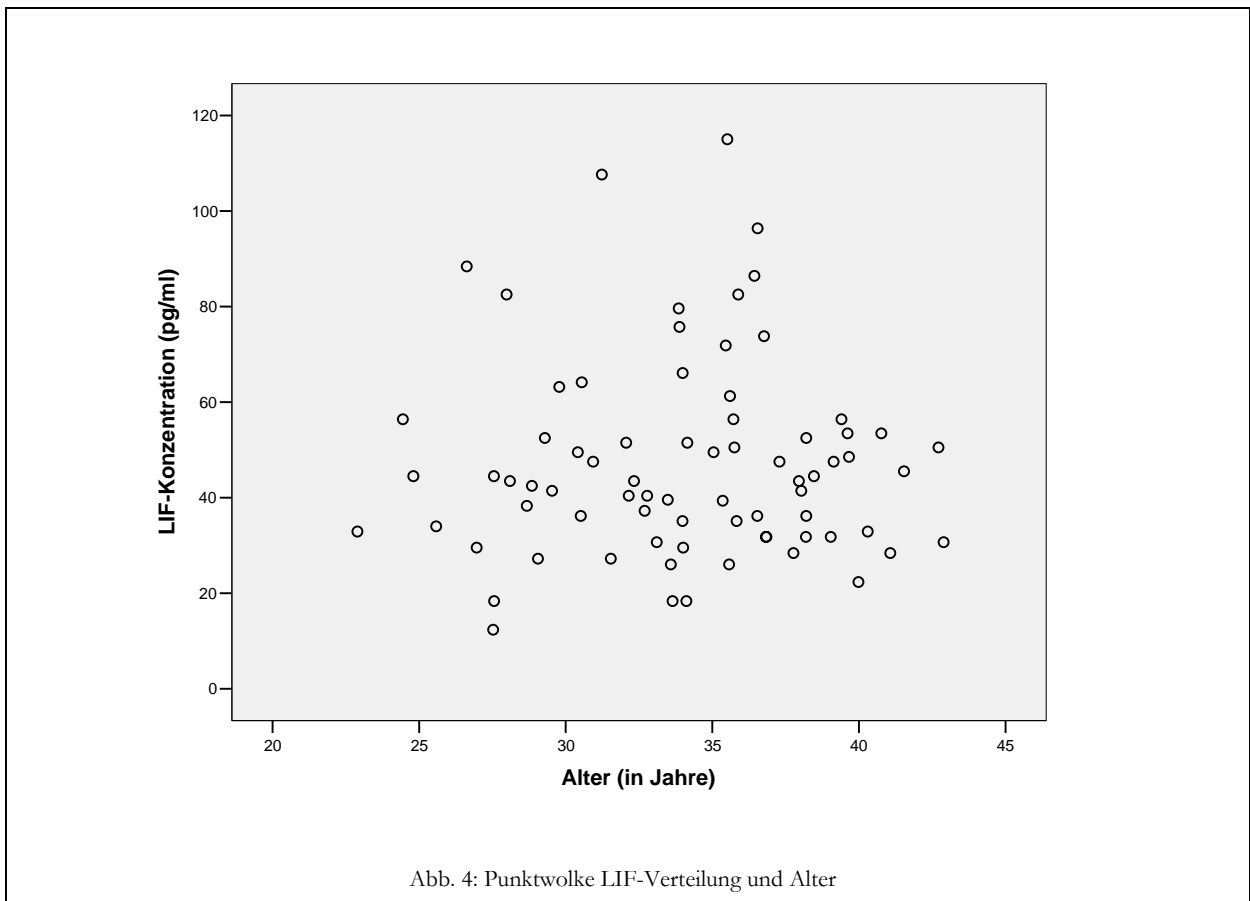
Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die berechneten statistischen Maßzahlen:

Tabelle 1:LIF in Follikelflüssigkeit

n=75	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Perzentile		
					25%	50%=Median	75%
LIF- Konzentration (pg/ml)	12,4	115,0	47,2	20,7	31,8	43,5	53,5

#### 4.1.2 LIF-Konzentration (FF) und Alter

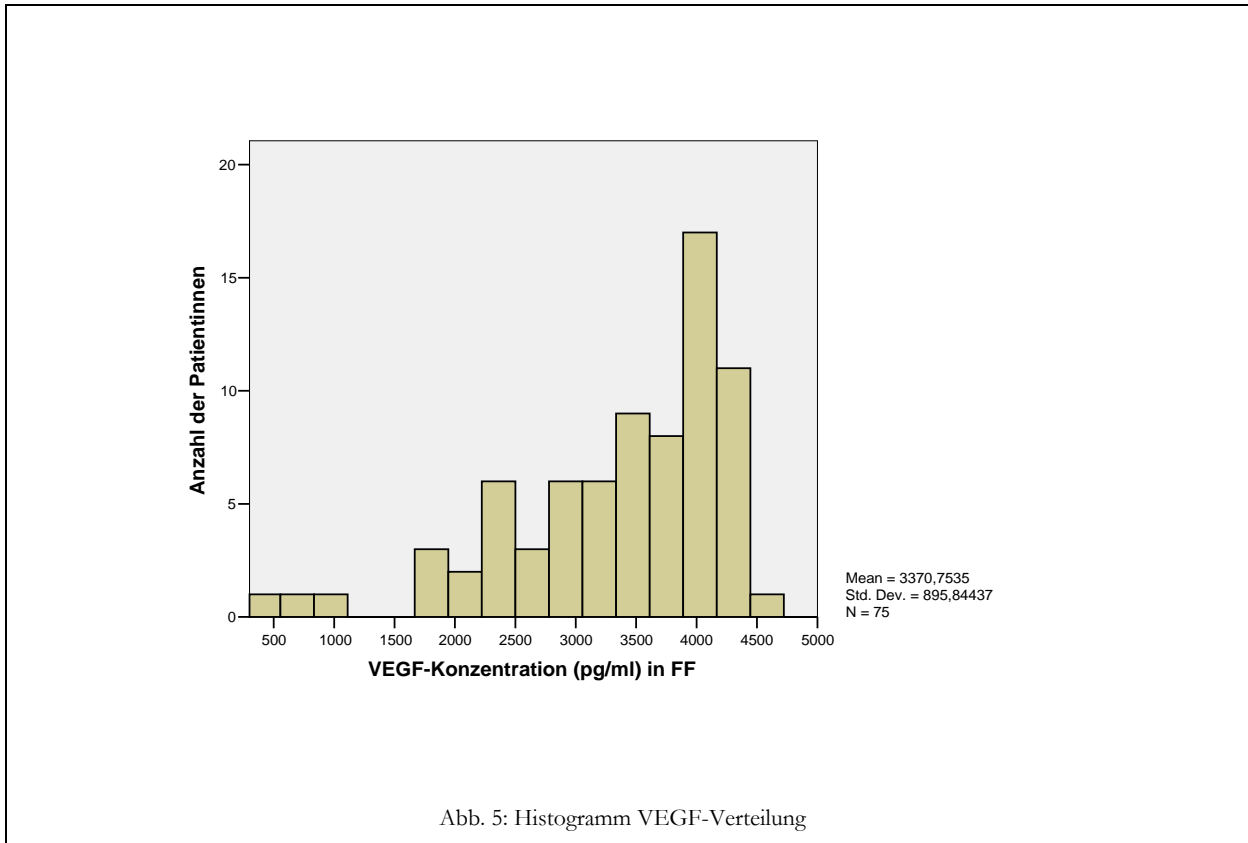
Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Alter der Patientinnen und der LIF-Konzentration in der FF bestand. Es wurde keine statistisch signifikante Korrelation gefunden (Korrelationskoeffizient  $r=0,017$ ,  $p=0,88$ ).



#### 4.1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in FF

VEGF wurde in allen untersuchten Follikelflüssigkeiten nachgewiesen. Die meisten Werte lagen zwischen 1727,4 pg/ml und 4505,7 pg/ml (bis auf 3 deutlich niedrigere Werte, s.

Abb.5), 50 % der gemessenen Konzentrationen lagen zwischen 2895,2 pg/ml und 4097,7 pg/ml. Der Mittelwert betrug  $3370,6 \pm 895,8$  pg/ml, der Median lag bei 3610,9 pg/ml. Auch die VEGF-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit sind nicht normalverteilt.



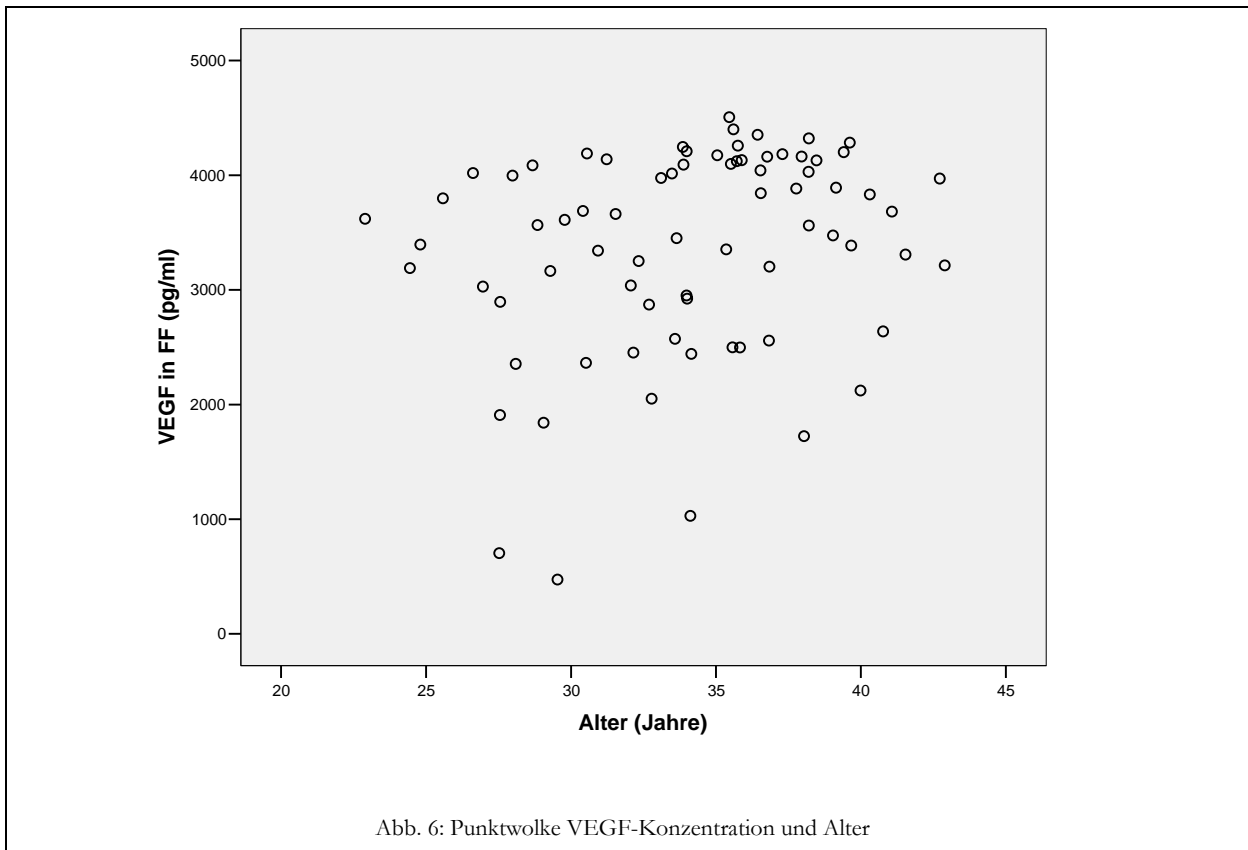
Die berechneten statistischen Maßzahlen werden in Tabelle 2 dargestellt:

Tab. 2: VEGF in Follikelflüssigkeit

n=75	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Perzentile		
					25%	50%=Median	75%
VEGF- Konzentration (pg/ml)	473,1	4505,7	3370,8	895,8	2895,2	3610,9	4097,7

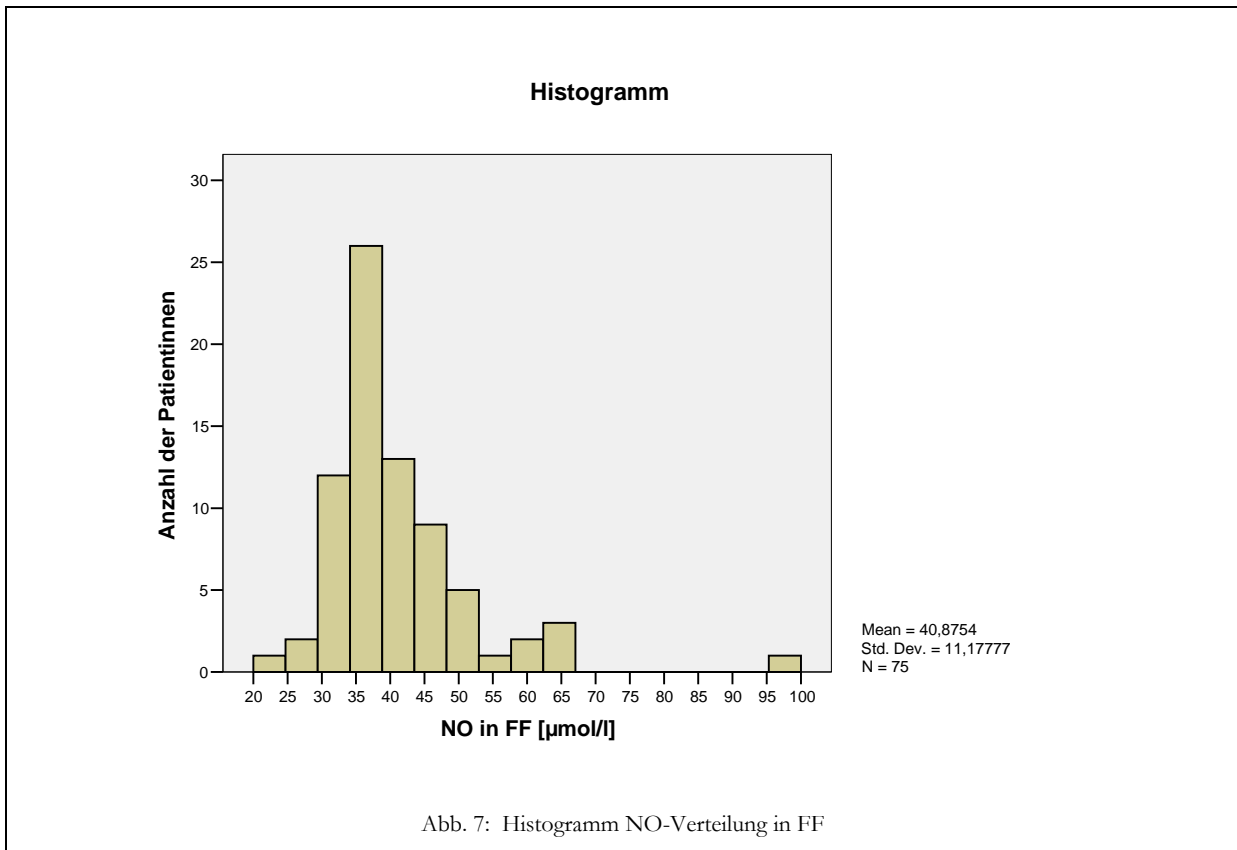
#### 4.1.4 VEGF-Konzentration (FF) und Alter

Es wurde untersucht, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration in Follikelflüssigkeit und dem Alter der Patientinnen bestand. Eine statistisch relevante Korrelation konnte nicht festgestellt werden. (Korrelationskoeffizient  $r=0,259$ ;  $p=0,052$ )



#### 4.1.5 Stickstoffmonoxid (NO) in FF

NO wurde in allen 75 Follikelflüssigkeiten nachgewiesen. Der Mittelwert betrug  $40,9 \mu\text{mol/l} \pm 11,2 \mu\text{mol/l}$ , der Median  $38,5 \mu\text{mol/l}$ . 50% der Werte lagen zwischen  $34,5 \mu\text{mol/l}$  und  $44,8 \mu\text{mol/l}$ . Bis auf einen Extremwert (Ausreißer s. Abb. 7) lagen alle Werte zwischen  $22,4 \mu\text{mol/l}$  und  $65,9 \mu\text{mol/l}$ . Für NO in FF lag keine Normalverteilung vor.



In Tabelle 3 sind die maßgeblichen statistischen Maßzahlen dargestellt. Der Ausreißer wurde bei den statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt.

Tab. 3: NO in Follikelflüssigkeit

n=74	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Perzentile		
					25%	50%=Median	75%
NO- Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ )	22,4	65,9	40,9	11,2	34,5	38,5	44,8

#### 4.1.6 NO-Konzentration (FF) und Alter

Auch bei Stickstoffmonoxid wurde überprüft, ob ein statistischer Zusammenhang zum Alter der Patientinnen bestand. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden. (Korrelationskoeffizient  $r=0,024$ ;  $p=0,84$ ).

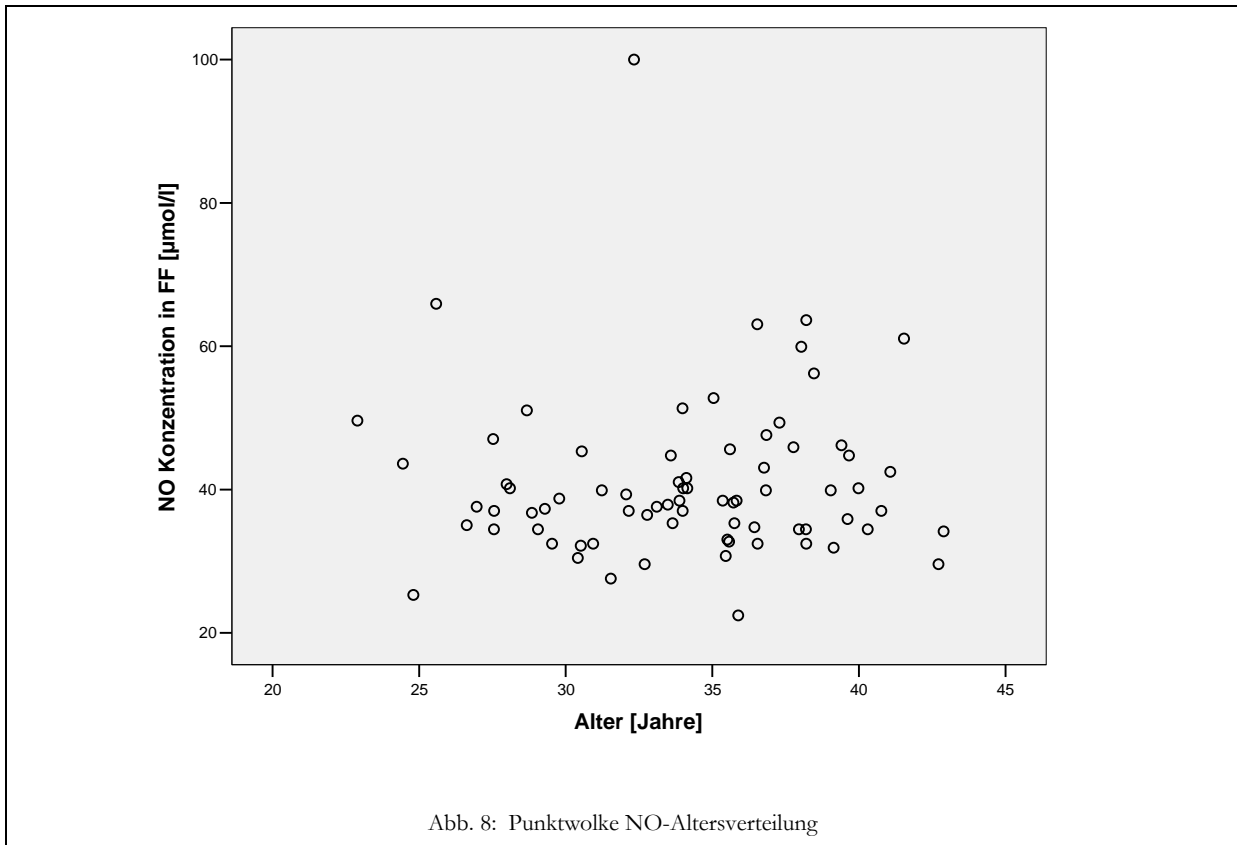


Abb. 8 zeigt, dass kein Zusammenhang zum Alter besteht.

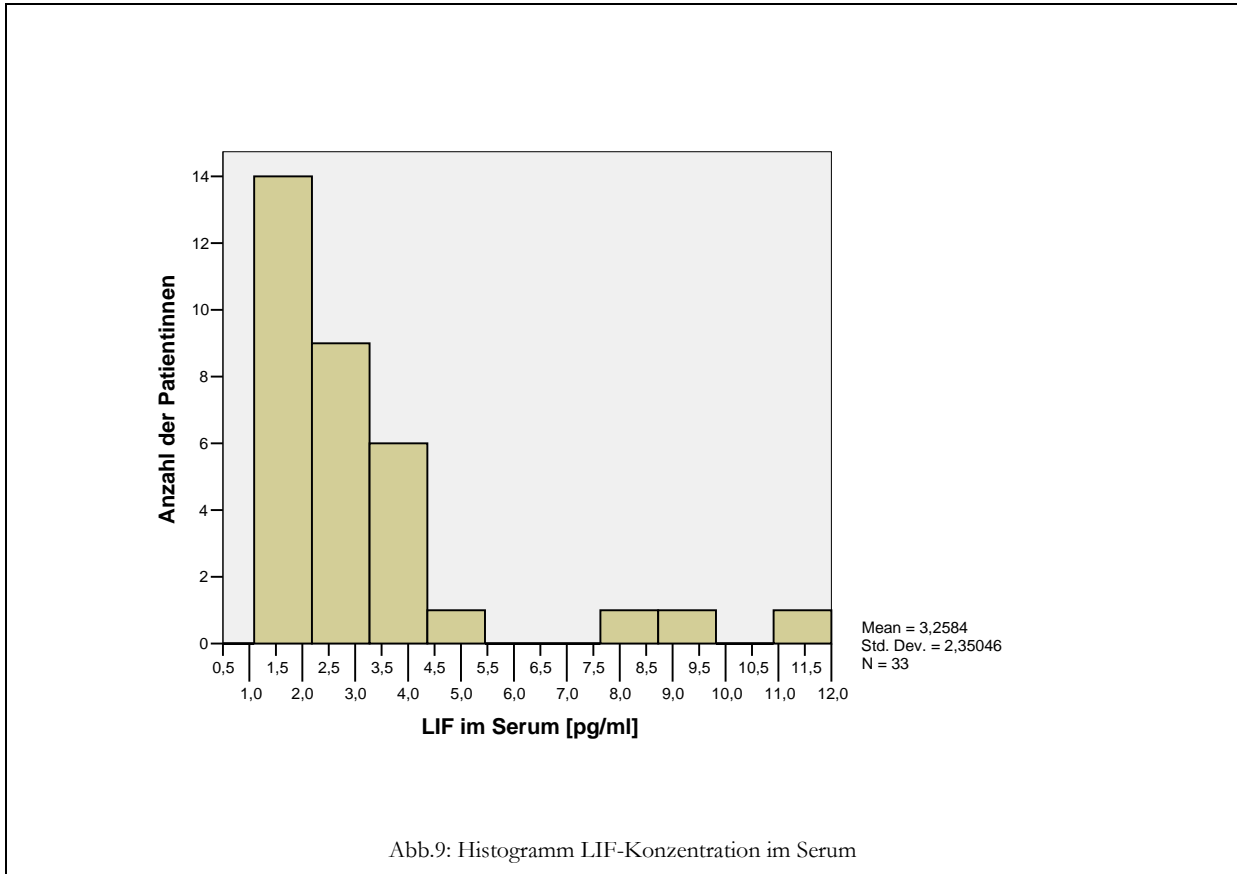
#### 4.2 LIF, VEGF und NO im Serum (S)

Leukaemia inhibitory factor (LIF) wurde in 33 Patientenseren gefunden, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Stickstoffmonoxid (NO) in allen 75 untersuchten Serumproben der IVF/ICSI-Patientinnen.

##### 4.2.1 LIF im Serum

LIF konnte in 33 von 75 Fällen im Serum der Patientinnen nachgewiesen werden. Der Mittelwert betrug  $3,3 \text{ pg/ml} \pm 2,4 \text{ pg/ml}$ , der Median lag bei  $2,9 \text{ pg/ml}$ . 50% der Werte

lagen zwischen 1,6 pg/ml und 4,1 pg/ml. Abgesehen von 3 Ausreißern (Abb. 9) lagen alle Werte zwischen 1,6 pg/ml und 5,2 pg/ml. Bei den gemessenen LIF-Konzentrationen im Serum lag keine Normalverteilung vor.



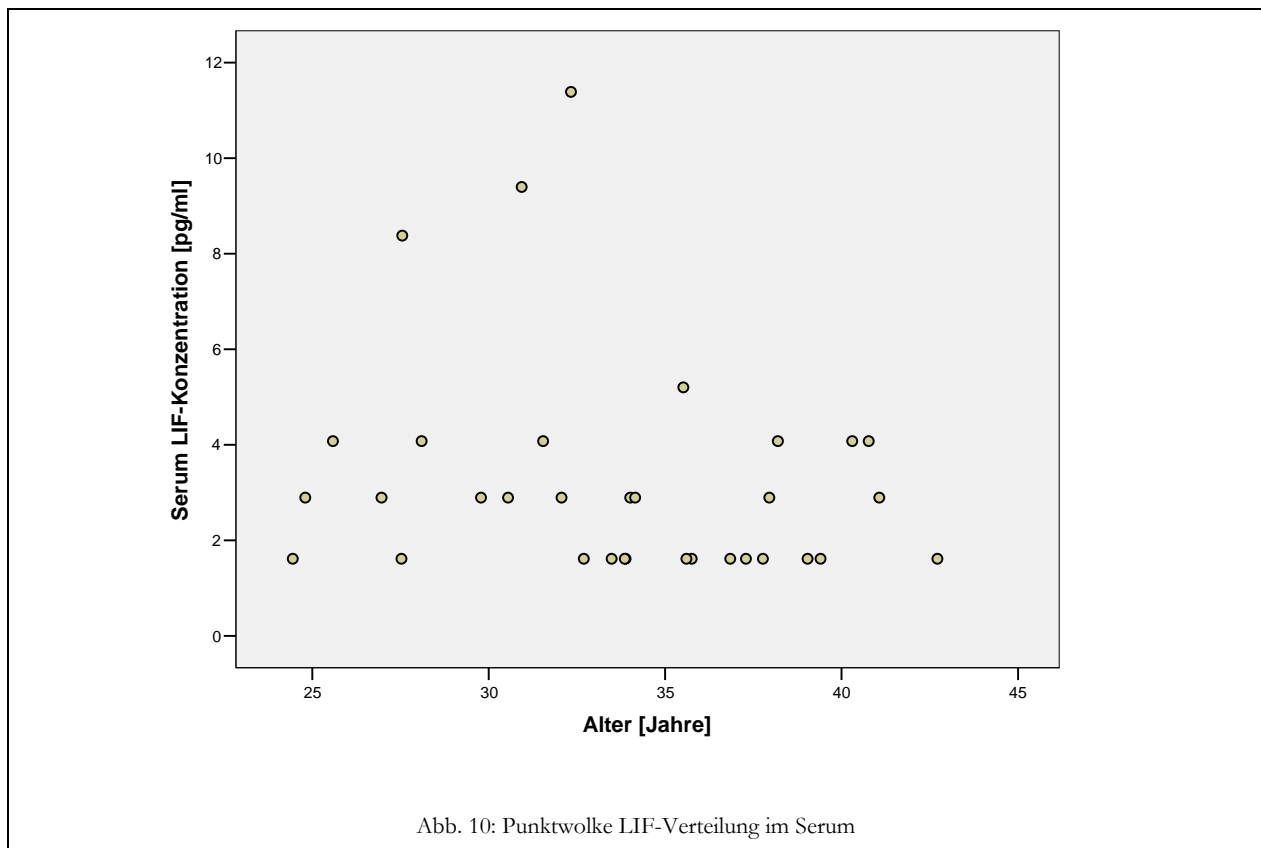
Die nachfolgende Tabelle zeigt die errechneten Daten im Überblick.

Tab. 4: LIF im Serum

n=33	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Perzentile		
					25%	50%=Median	75%
LIF- Konzentration (pg/ml)	1,6	11,3	3,3	2,4	1,7	2,9	4,1

#### 4.2.2 LIF-Konzentration (S) und Alter

Es wurde kontrolliert, ob zwischen dem Alter der Patientinnen und der gemessenen LIF-Konzentration im Serum ein statistischer Zusammenhang besteht. Eine statistisch signifikante Korrelation konnte nicht festgestellt werden. (Korrelationskoeffizient  $r=-0,213$ ;  $p=0,24$ ).

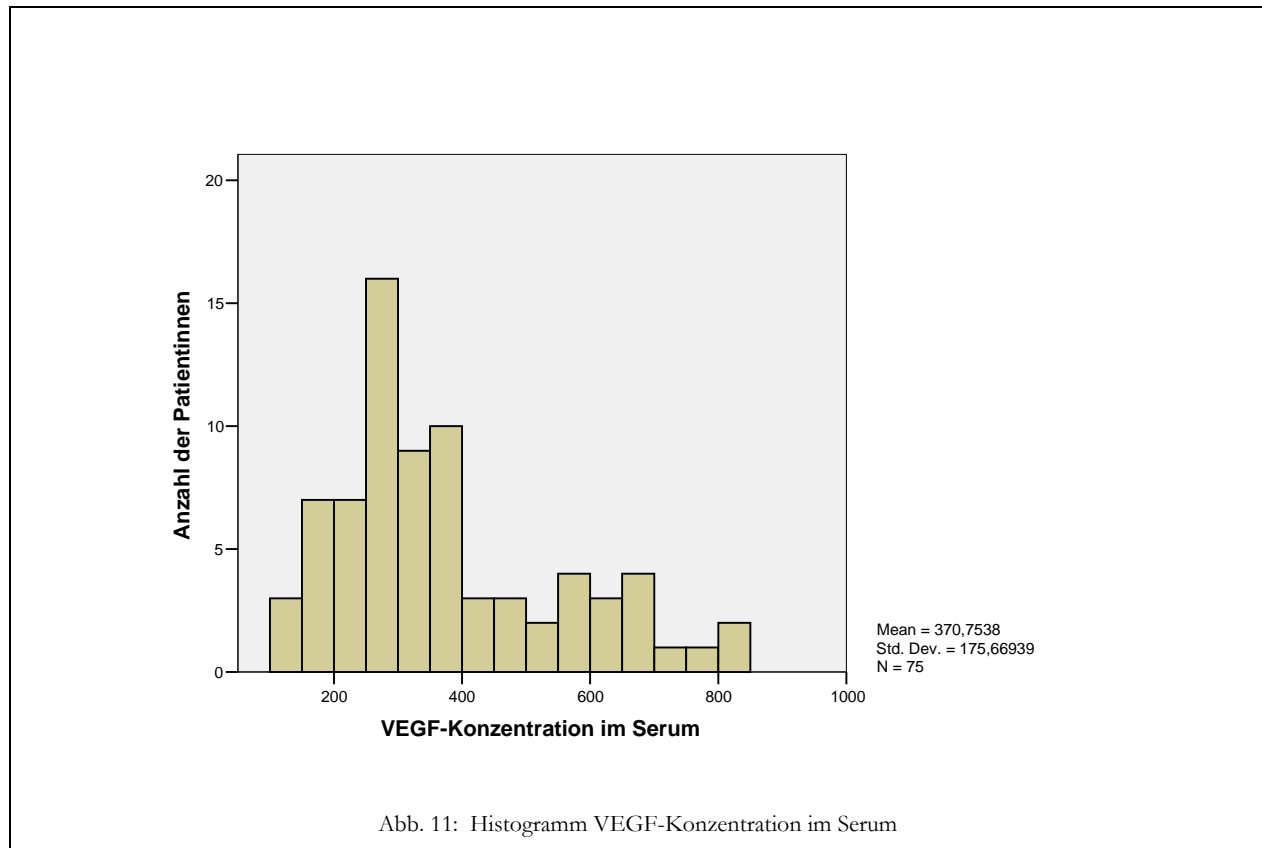


Es ist zu erkennen, dass kein statistischer Zusammenhang mit dem Alter besteht.

#### 4.2.3 VEGF im Serum

VEGF konnte in allen untersuchten Serumproben nachgewiesen werden. Der Mittelwert der VEGF-Konzentrationen lag bei  $370,8 \text{ pg/ml} \pm 175,7 \text{ pg/ml}$ , der Median bei  $330,3 \text{ pg/ml}$ . 50% der Werte lagen zwischen  $253,9 \text{ pg/ml}$  und  $461,8 \text{ pg/ml}$ .





Im Folgenden sind die errechneten statistischen Maßzahlen tabellarisch dargestellt.

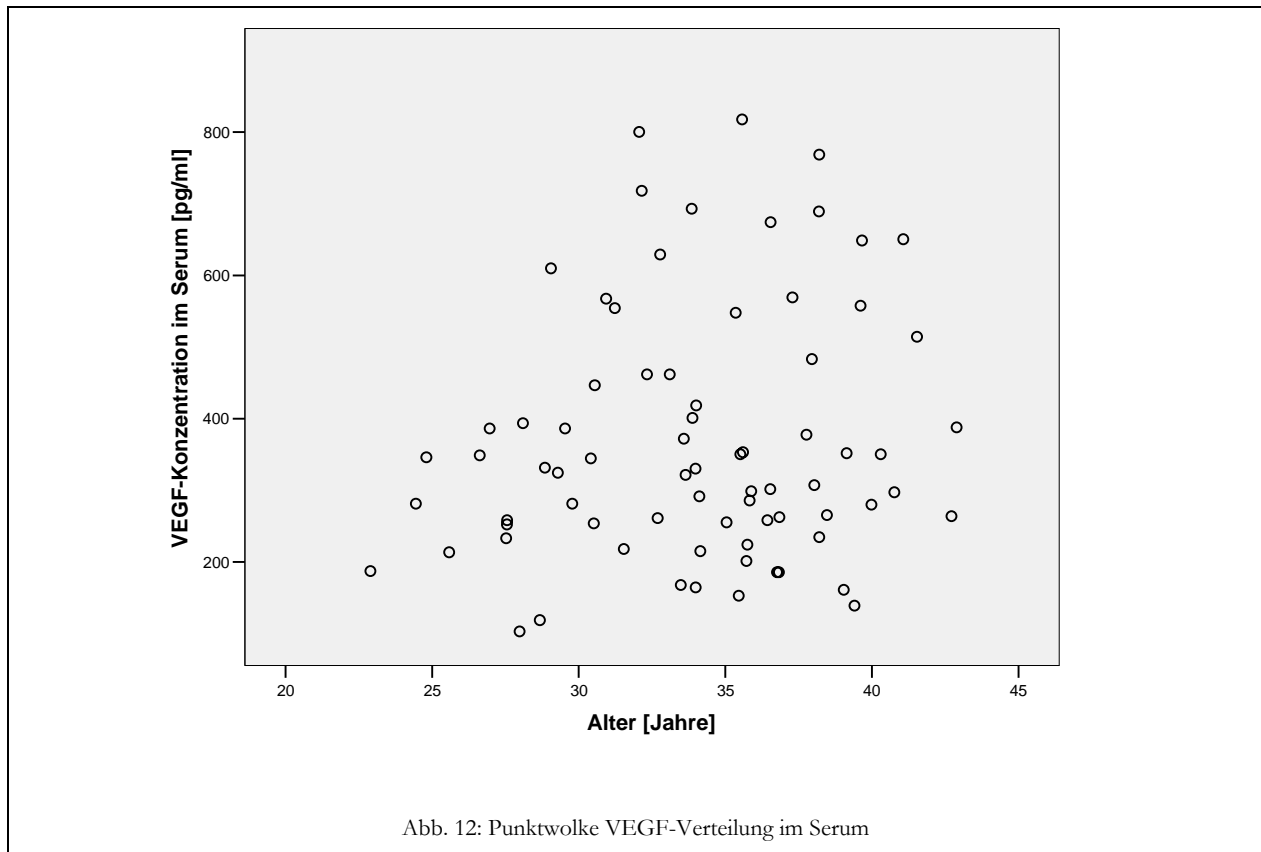
Tab. 5: VEGF im Serum

n=75	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Perzentile		
					25%	50%=Median	75%
VEGF- Konzentration (pg/ml)	103,2	817,6	370,8	175,7	253,9	330,3	461,8

#### 4.2.4 VEGF-Konzentration (S) und Alter

Es wurde kontrolliert, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen Alter der Patientinnen und der gemessenen VEGF-Konzentration im Serum besteht.

Es ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient  $r=0,118$ ;  $p=0,32$ ).



Es ist zu sehen, dass kein statistischer Zusammenhang mit dem Alter besteht.

#### 4.2.5 Stickstoffmonoxid (NO) im Serum

NO konnte in allen 75 Serumproben nachgewiesen werden. Der Mittelwert der gemessenen Konzentrationen betrug  $36,7 \mu\text{mol/l} \pm 17,1 \mu\text{mol/l}$ . Der Median lag bei  $31,6 \mu\text{mol/l}$ , 50 % der Werte lagen im Bereich zwischen  $24,3 \mu\text{mol/l}$  und  $43,1 \mu\text{mol/l}$ .

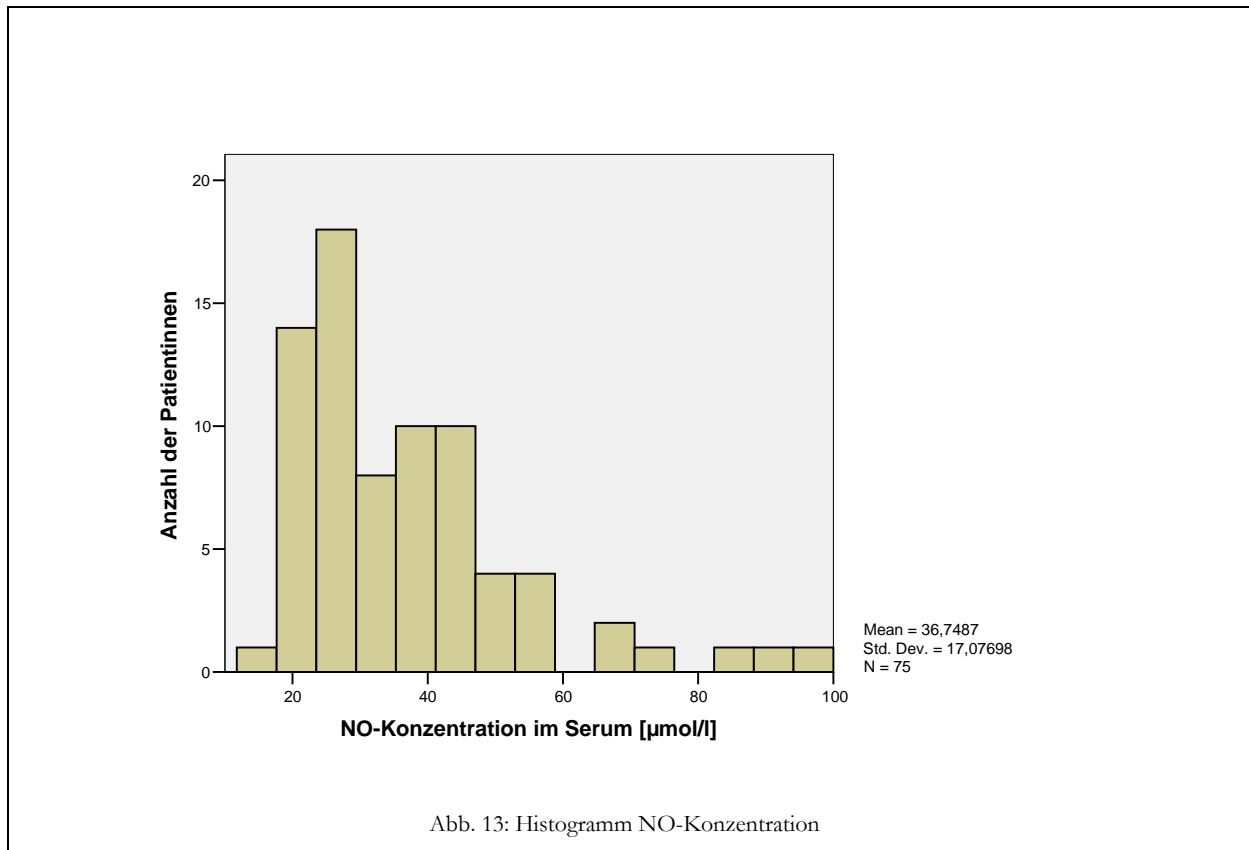


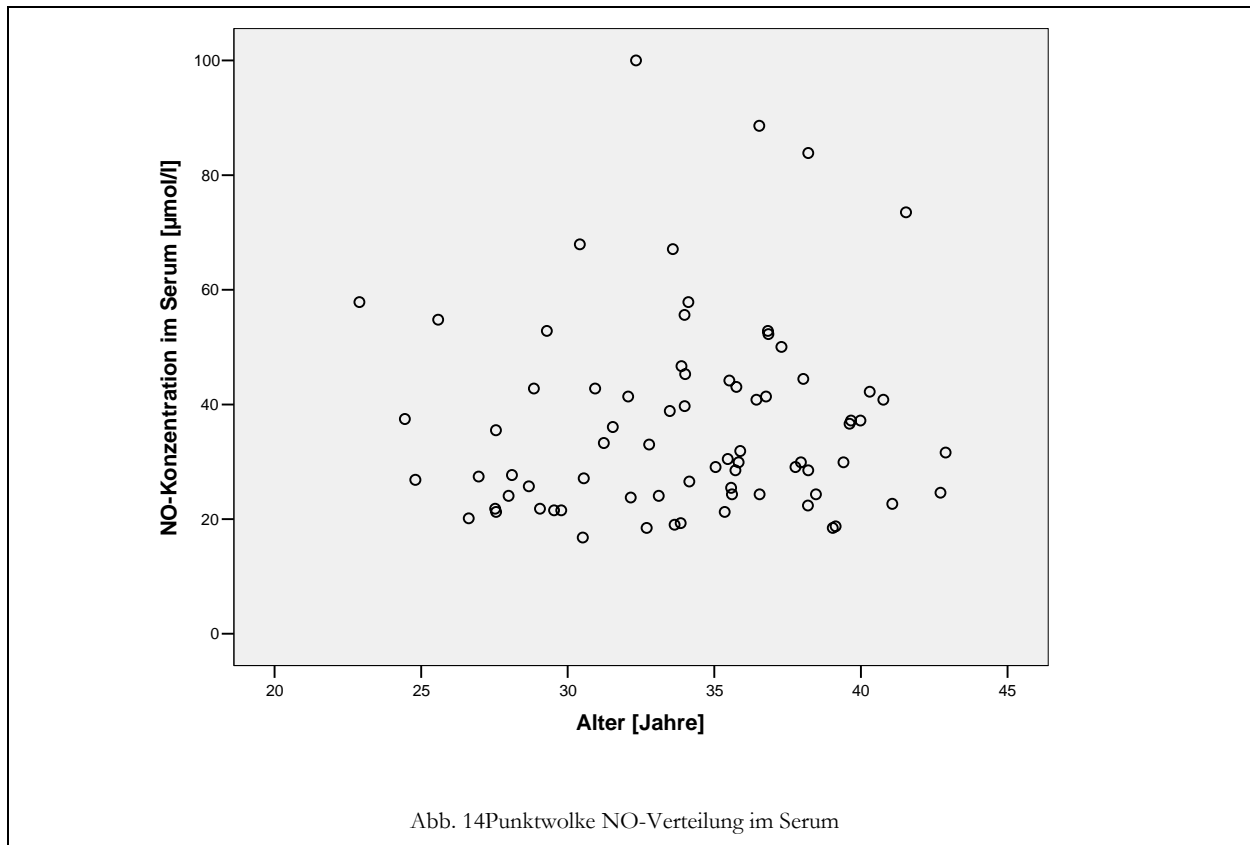
Tabelle 6 fasst die errechneten Statistiken zusammen.

Tab. 6: NO im Serum

n=75	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Perzentile		
					25%	50%=Median	75%
NO- Konzentration (µmol/l)	16,8	100	36,7	17,1	24,3	31,6	43,1

#### 4.2.6 NO-Konzentration (S) und Alter

Die Untersuchung über einen statistischen Zusammenhang zwischen der NO-Konzentration im Serum und dem Alter der Patientinnen ergab keine statistisch relevante Korrelation (Korrelationskoeffizient  $r=0,108$ ;  $p=0,35$ ).



Es ist zu erkennen, dass kein Zusammenhang mit dem Alter besteht.

### ***4.3 Untersuchung des Einflusses der LIF-, VEGF- und NO-Konzentration auf das Eintreten einer Schwangerschaft***

Ein Ziel dieser Studie bestand darin, eine mögliche Abhängigkeit zwischen LIF-, VEGF- oder NO-Konzentration in präovulatorischer Follikelflüssigkeit oder im Serum und dem Eintreten einer Schwangerschaft festzustellen. Diesbezüglich wurde das Patientenkollektiv in Gruppe A (Schwanger, n=19) und Gruppe B (Nicht-Schwanger, n=56) eingeteilt. Im folgenden Kapitel werden die gewonnenen Ergebnisse dargestellt.

#### **4.3.1 Einfluss der LIF-, VEGF- und NO-Konzentration in der Follikelflüssigkeit auf das Eintreten einer Schwangerschaft**

Zunächst werden die Ergebnisse der Zytokinkonzentrationen in Follikelflüssigkeit im Vergleich mit dem Erfolg der Behandlung (Schwanger oder Nicht-Schwanger) dargestellt.

#### 4.3.1.1 LIF-Konzentration in FF und Schwangerschaft

Die gemessenen Daten zeigen, daß die LIF-Konzentration in den Follikelflüssigkeiten von Patientinnen, die schwanger wurden, höher war (Median 47,5 pg/ml) als bei Patientinnen, bei denen keine Schwangerschaft eingetreten war (Median 40,9 pg/ml).

Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand nicht ( $p=0,367$ ).

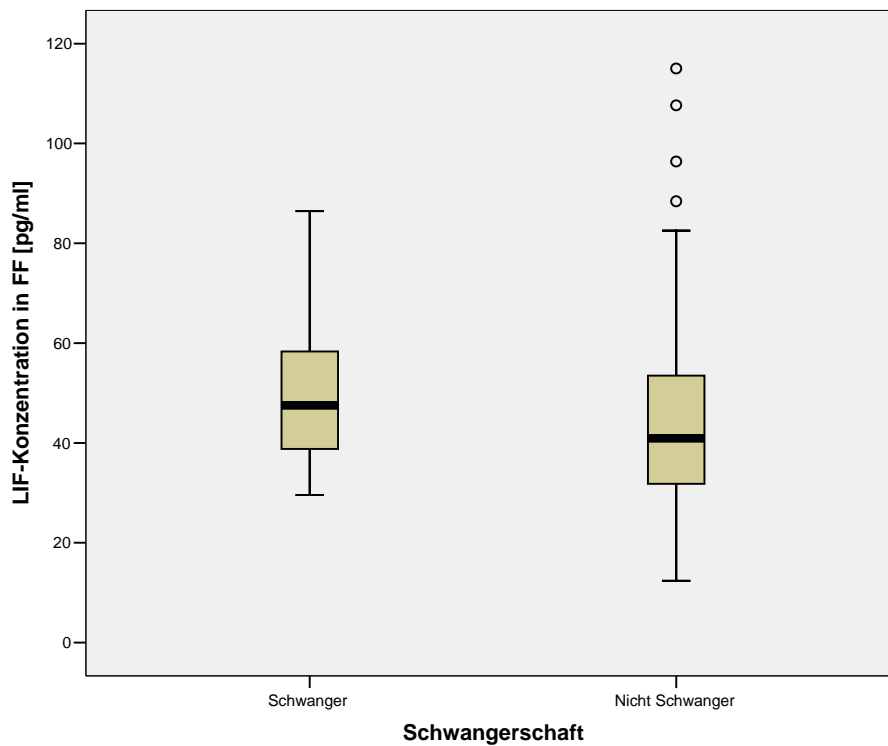


Abb. 15: Boxplot LIF-Konzentration in FF / Schwangerschaft

Die folgende Tabelle enthält die errechneten Daten im Überblick:

Tab. 7: Zusammenhang zwischen LIF-Konzentrationen in FF und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

LIF-Konzentration in FF [pg/ml]	n=7 5	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe A (schwanger)	19	29,6	86,5	50,9	17,3	36,2	47,5	64,2
Gruppe B (nicht schw.)	56	12,4	115,0	45,9	21,8	31,8	40,9	53,5

#### **4.3.1.2 VEGF-Konzentration in FF und Schwangerschaft**

Die VEGF-Konzentrationen in den FFs der schwanger gewordenen Patientinnen lagen niedriger (Median 3564,9 pg/ml), als bei den Patientinnen, die nicht schwanger geworden waren (Median 3615,2 pg/ml). Die beobachteten Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant ( $p=0,97$ ).

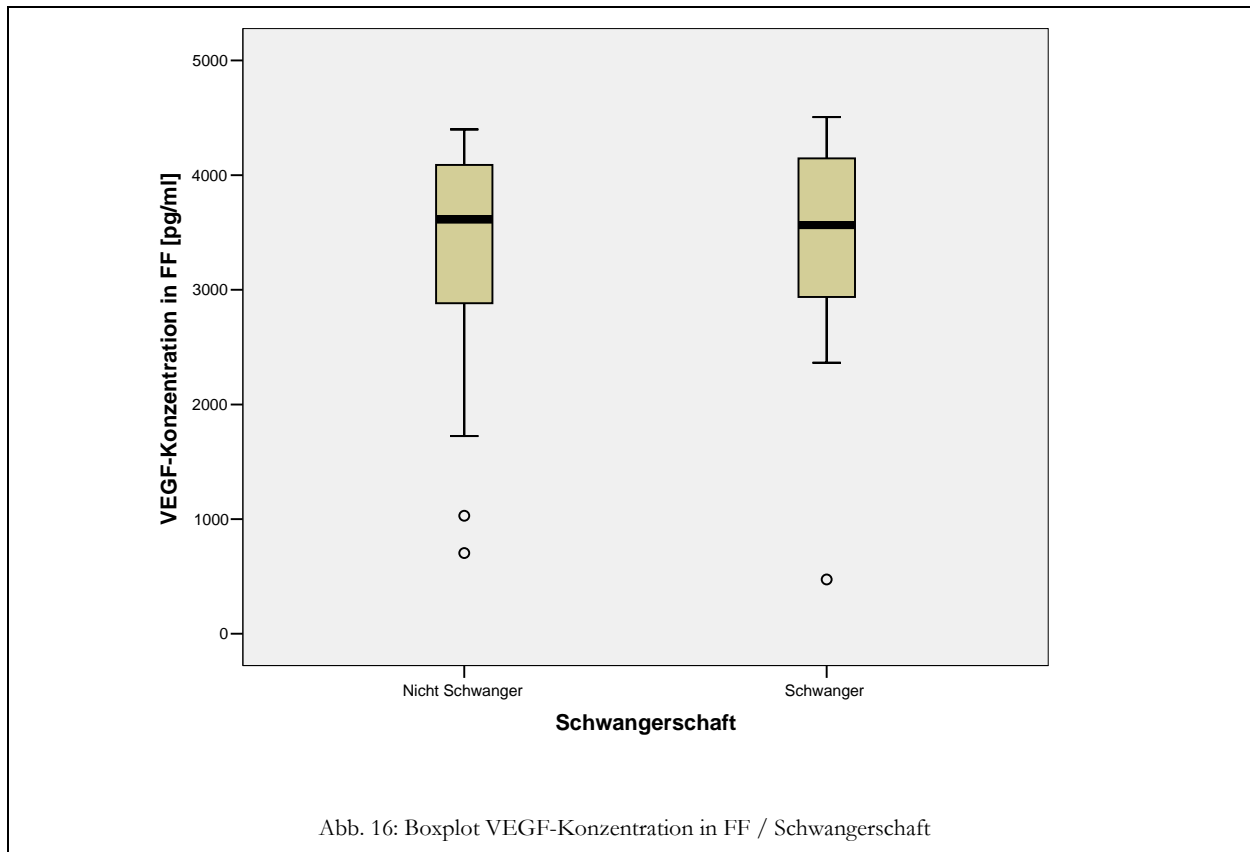


Tabelle 8 zeigt die relevanten statistischen Maßzahlen der beiden Gruppen im Überblick:

Tab.8: Zusammenhang zwischen VEGF-Konzentrationen in FF und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

VEGF-Konzentration in FF [pg/ml]	n=7 5	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe A (schwanger)	19	473,4	4505,7	3378,5	984,6	2923,8	3564,9	4161,3
Gruppe B (nicht schw.)	56	704,3	4399,1	3368,1	873,2	2877,3	3615,2	4090,7

#### 4.3.1.3 NO-Konzentration in FF und Schwangerschaft

Die gemessenen Konzentrationen von Stickstoffmonoxid in der Schwangeren-Gruppe (Median 39,3  $\mu\text{mol/l}$ ) unterschieden sich kaum von denen der Nicht-Schwangeren-Gruppe (Median 38,3  $\mu\text{mol/l}$ ). Auch weitere statistische Untersuchungen ließen keine Zusammenhänge der NO-Konzentration mit einer erfolgten oder nicht erfolgten Schwangerschaft erkennen ( $p=0,501$ ).

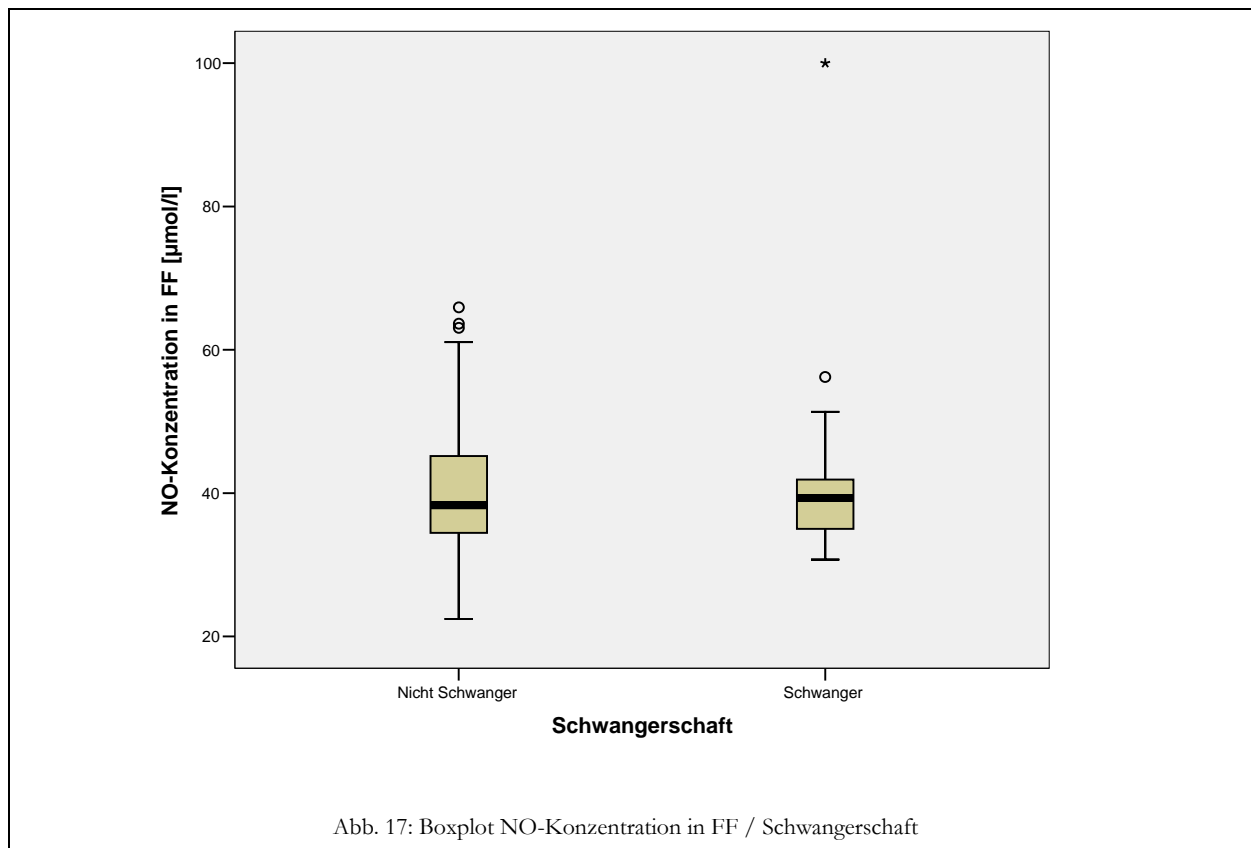




Tabelle 9 stellt die erhobenen statistischen Maßzahlen im Überblick dar.

Tab.9: Zusammenhang zwischen NO-Konzentrationen in FF und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

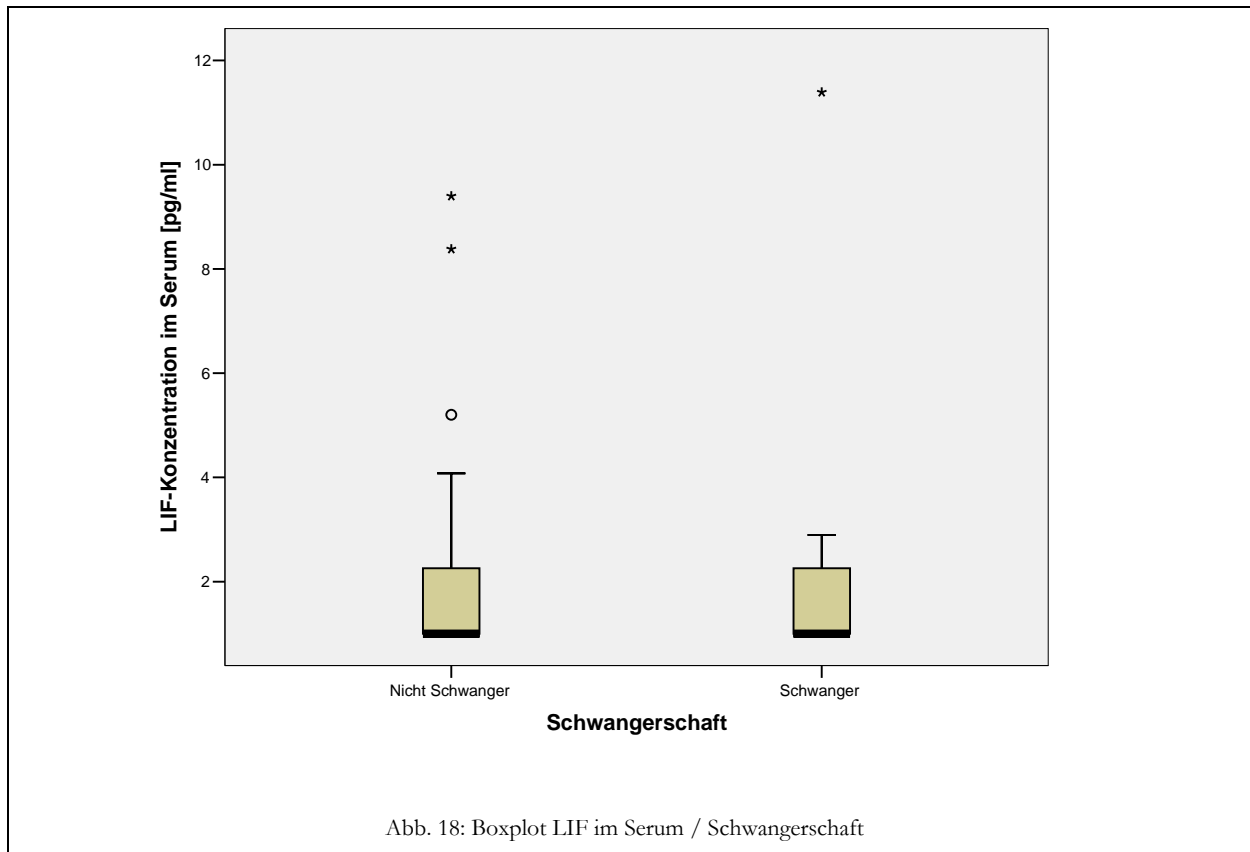
NO-Konzentration in FF [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Mini-mum	Maxi-mum	Mittel-wert	Standard-abweichung	Perzentile		
						25%	50% =Median	75%
Gruppe A (schwanger)	19	30,74	100	42,4	15,4	34,7	39,3	43,0
Gruppe B (nicht schw.)	56	22,4	65,9	40,4	9,5	34,5	38,3	45,4

#### 4.3.2 Einfluss der LIF-, VEGF- und NO-Konzentration im Serum auf Eintreten einer Schwangerschaft

Im folgenden Kapitel wurden die Zytokinkonzentrationen im Serum hinsichtlich des Ergebnisses der IVF/ICSI-Behandlung (Schwanger/Nicht-Schwanger) verglichen.

##### 4.3.2.1 Serum LIF-Konzentration und Schwangerschaft

Die LIF-Werte in Gruppe A (Schwanger) lagen höher ( $4,1 \pm 3,6$  pg/ml) als in Gruppe B (Nicht-Schwangere) ( $3,1 \pm 2,0$  pg/ml). Allerdings sind die beobachteten Unterschiede nicht statistisch signifikant ( $p=0,341$ ).



Die relevanten Maßzahlen im Überblick:

Tab. 10: Zusammenhang zwischen LIF-Konzentrationen im Serum und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

LIF-Konzentration in S [pg/ml]	n=33	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50% =Median	75%
Gruppe A (schwanger)	6	1,6	11,4	4,1	3,6	2,6	2,9	5,0
Gruppe B (nicht schw.)	27	1,6	9,4	3,1	2,0	1,6	2,9	4,1

#### 4.3.2.2 VEGF in Serum und Schwangerschaft

Die Serumkonzentrationen von VEGF waren in der Gruppe der Schwangeren niedriger (Median 324,6 pg/ml), als die in der Nicht-Schwangeren-Gruppe (Median 345,4 pg/ml). Die beobachteten Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant ( $p=0,183$ ).

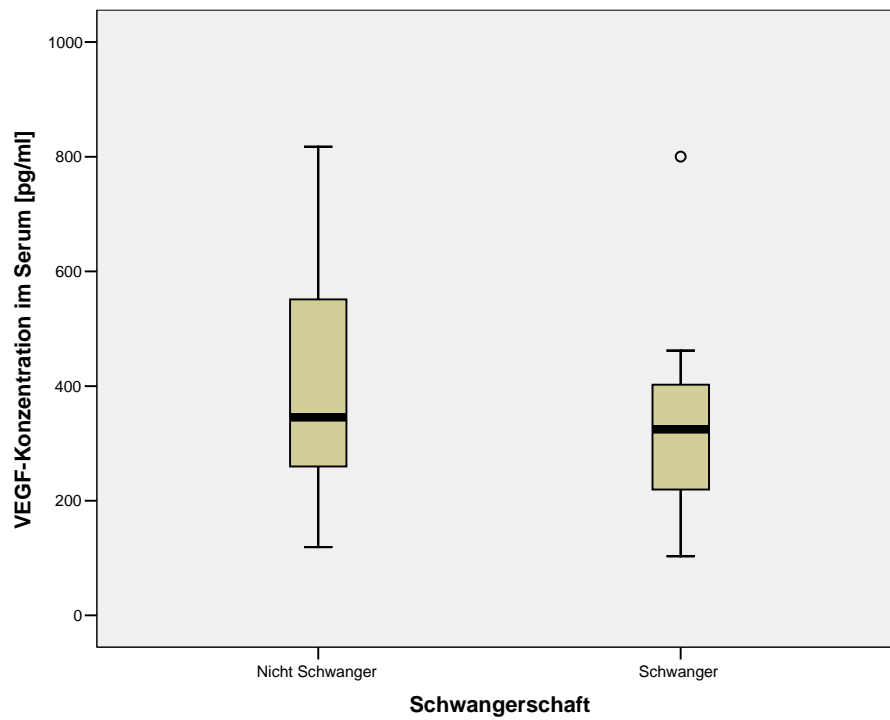


Abb. 19: Boxplot VEGF im Serum und Schwangerschaft

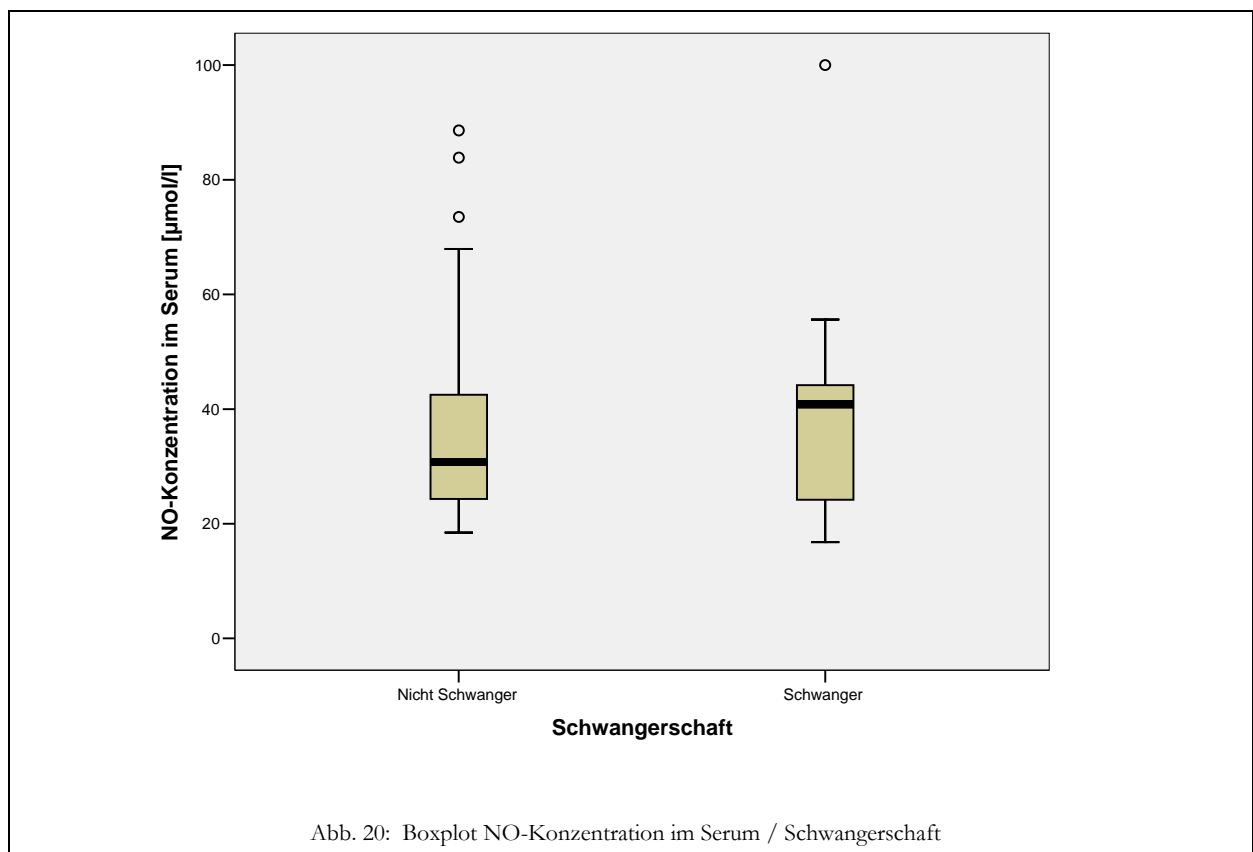
In der folgenden Tabelle sind die erhobenen Statistiken zusammengefasst:

Tab. 11: Zusammenhang zwischen VEGF-Konzentrationen im Serum und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

VEGF-Konzentration in S[pg/ml]	n=75	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50% =Median	75%
Gruppe A (schwanger)	19	103,2	800,2	324,2	157,1	215,2	324,6	418,6
Gruppe B (nicht schw.)	56	118,9	817,6	386,6	180,1	259,0	345,4	552,8

#### 4.3.2.3 NO im Serum und Schwangerschaft

Der Mittelwert der NO-Konzentrationen im Serum von Gruppe A unterschied sich kaum von dem in Gruppe B ( $38,4 \pm 19,3 \mu\text{mol/l}$  zu  $36,2 \pm 16,4 \mu\text{mol/l}$ ). Für NO im Serum konnte zwischen Gruppe A und Gruppe B kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ( $p=0,628$ ).



Im Folgenden ein Überblick über die NO-Konzentrationen im Serum beider Gruppen:

Tab. 12: Zusammenhang zwischen NO-Konzentrationen im Serum und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

NO-Konzentration in S [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n=75	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50% =Median	75%
Gruppe A (schwanger)	19	16,8	100,0	38,4	19,3	24,1	40,8	45,3
Gruppe B (nicht schw.)	56	18,5	88,6	36,2	16,4	24,3	20,8	42,6

#### 4.3.3 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in Follikelflüssigkeit (FF) und Serum (S)

Es wurde untersucht, ob ein statistischer Zusammenhang der Konzentrationen von LIF, VEGF oder NO in präovulatorischer Follikelflüssigkeit und Serum innerhalb der beiden Gruppen Schwanger oder Nicht-Schwanger besteht.

##### 4.3.3.1 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in FF und S in der Schwangeren-Gruppe

Die Konzentration in der präovulatorischen Follikelflüssigkeit von LIF und VEGF waren signifikant höher als die entsprechenden Serumkonzentrationen (siehe Tabelle 13). Für NO konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Follikelflüssigkeit- und Serumkonzentration festgestellt werden.

Tab. 13: Zytokinkonzentrationen in Serum und FF in der Gruppe der schwanger gewordenen Frauen

n=19	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	50,9 $\pm$ 17,3	4,1 $\pm$ 3,6	p<0,001
VEGF [pg/ml]	3378,5 $\pm$ 984,6	324,2 $\pm$ 157,1	p<0,001
NO [ $\mu\text{mol/l}$ ]	42,4 $\pm$ 15,4	38,4 $\pm$ 19,29	p=0,183

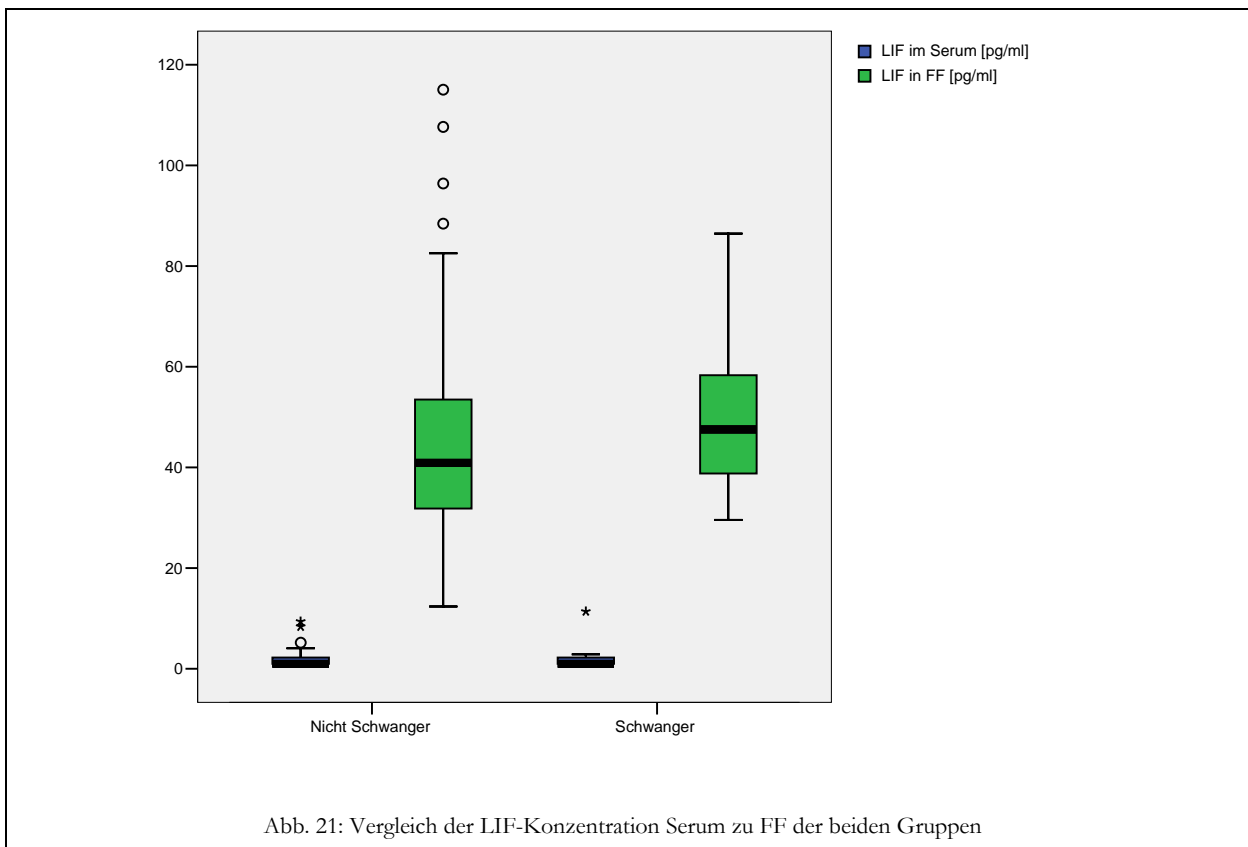
### 4.3.3.2 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in FF und S in der Nicht-Schwangeren-Gruppe

Auch in der Nicht-Schwangeren Gruppe waren die Konzentrationen von LIF und VEGF signifikant höher in der Follikelflüssigkeit als im Serum. Die NO-Konzentration in FF erwies sich ebenfalls als signifikant höher als die im Serum.

Tab.14: Zytokinkonzentrationen in Serum und FF in der Gruppe der nicht schwanger gewordenen Frauen

n=56	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	45,9 ± 21,8	3,1 ± 2,0	p<0,001
VEGF [pg/ml]	3368,1 ± 873,2	386,6 ± 180,1	p<0,001
NO [µmol/l]	40,4 ± 9,5	36,2 ± 16,4	p=0,026

In den folgenden Abbildungen sind die Konzentrationen der einzelnen Parameter im Vergleich zwischen Serum (blau) und Follikelflüssigkeit (grün) aufgetragen.



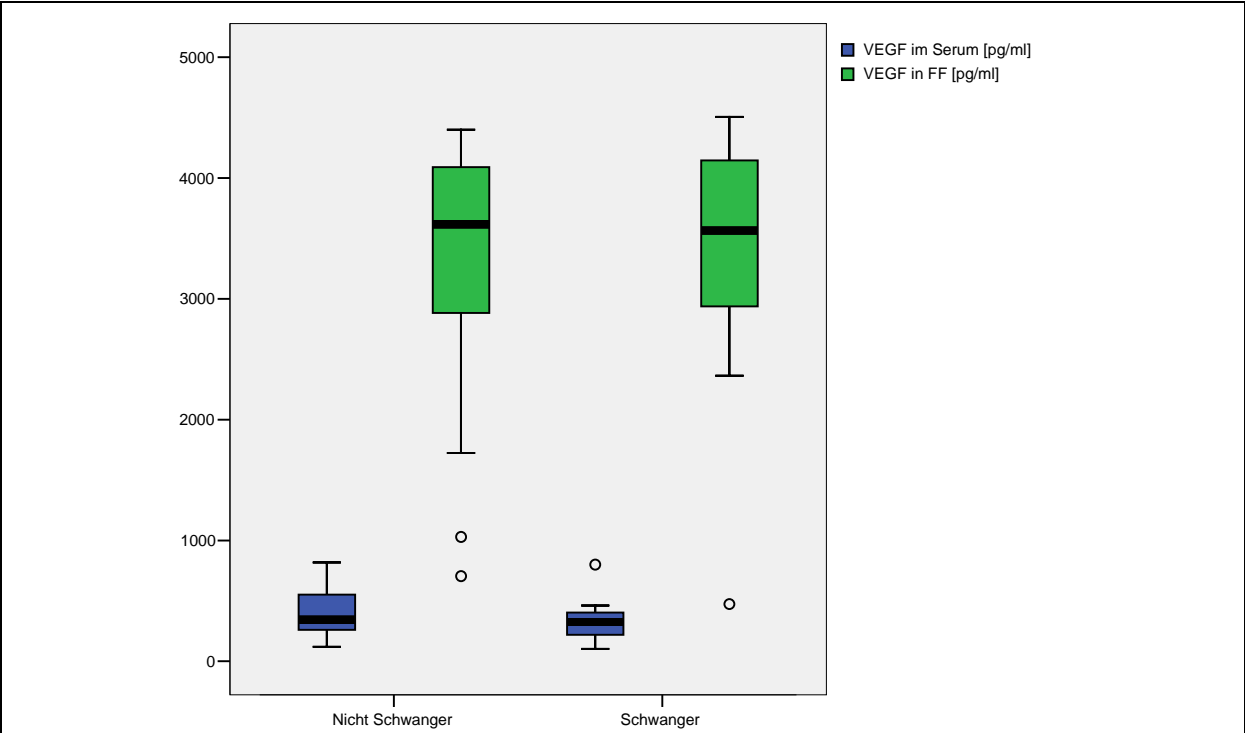


Abb. 22: Vergleich der VEGF-Konzentration Serum zu FF der beiden Gruppen

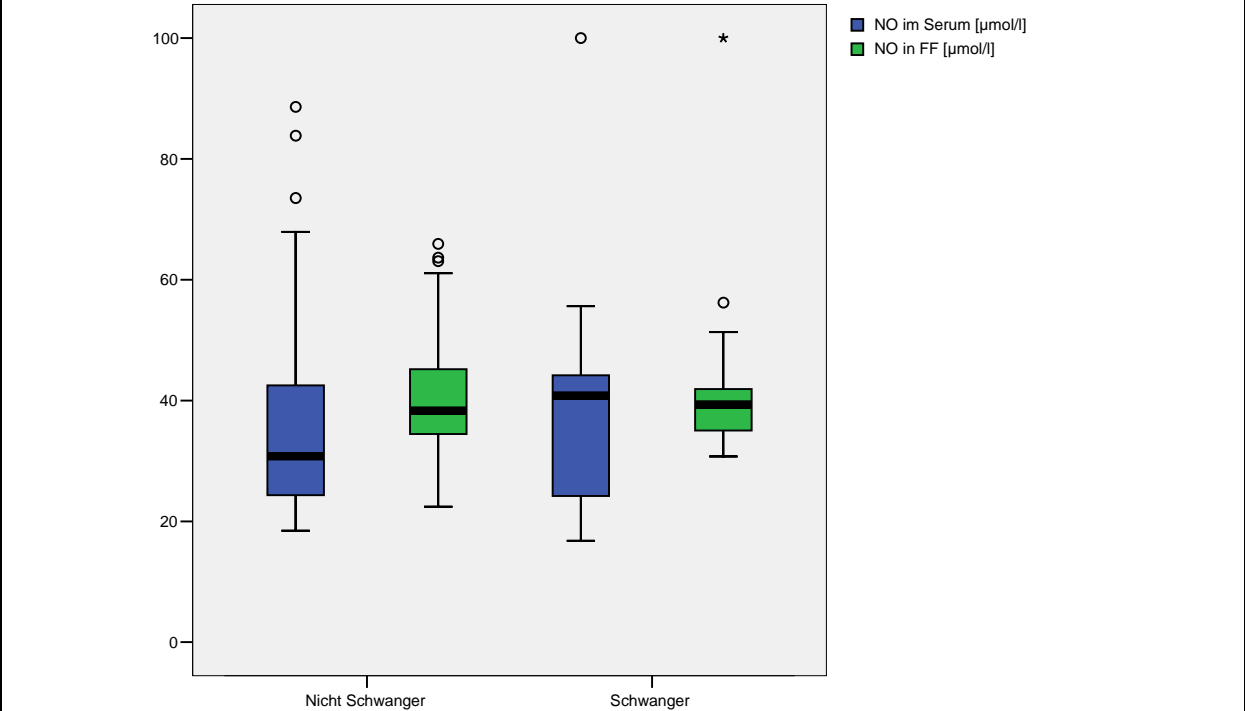


Abb. 23: Vergleich der NO-Konzentration Serum zu FF der beiden Gruppen

#### ***4.4. Untersuchung des Einflusses des Stimulationsprotokolls auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration***

Bei den Patientinnen, die an der IVF/ICSI Prozedur teilnahmen, wurden drei verschiedene Stimulationsprotokolle (FSH, HMG, HMG/FSH) angewandt. Um die Zusammenhänge zu untersuchen, wurden die Patientinnen in Gruppe (1) (FSH), Gruppe (2) (HMG) und Gruppe (3) (HMG/FSH) eingeteilt. Es war ein Ziel dieser Studie festzustellen, ob die verschiedenen Stimulationsprotokolle die LIF-, VEGF- oder NO-Konzentrationen in präovulatorischer FF oder im Serum unterschiedlich beeinflussen. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse kurz beschrieben und anhand von Tabellen und Grafiken (Boxplots) dargestellt.

##### **4.4.1 Untersuchung des Einflusses des Stimulationsprotokolls auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration in präovulatorischer Follikelflüssigkeit**

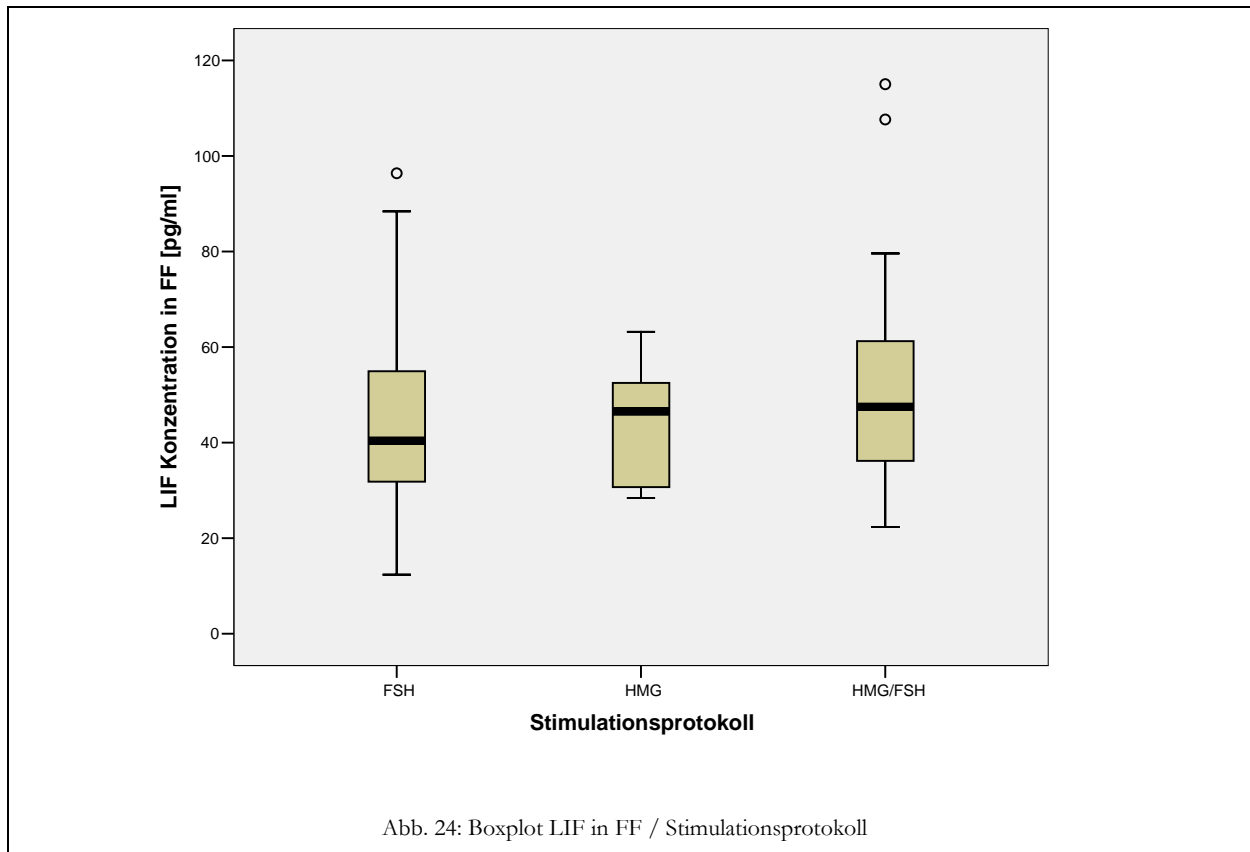
Es wurde untersucht, ob das Stimulationsprotokoll Einfluss auf die Zytokinkonzentrationen in der FF nimmt.

###### ***4.4.1.1 LIF (FF) und Stimulationsprotokoll***

Die LIF-Verteilung in den einzelnen Gruppen ließ keine bedeutsamen Unterschiede erkennen (s. Abb. 24). Der Mittelwert von LIF in Gruppe (1) betrug  $44,9 \pm 20,7$  pg/ml, für Gruppe (2)  $44,6 \pm 11,6$  pg/ml und in Gruppe (3)  $51,9 \pm 23,2$  pg/ml.

Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen ( $p=0,38$ ).





In Tabelle 15 werden die errechneten statistischen Werte der drei Gruppen (1-3) dargestellt:

Tab. 15: Zusammenhang zwischen LIF-Konzentrationen in FF und dem angewandten Stimulationsprotokoll

LIF in FF [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
(1)FSH	40	12,4	96,4	44,9	20,7	31,8	40,4	55,7
(2)HMG	10	28,4	63,2	44,6	11,6	30,7	46,5	52,7
(3) HMG/FSH	25	22,4	115,0	51,9	23,2	36,2	47,5	63,7

#### 4.4.1.2 VEGF (FF) und Stimulationsprotokoll

Die VEGF Werte in den beiden ersten Gruppen ( $3181,6 \pm 946,3$  pg/ml und  $3181,3 \pm 1046,9$  pg/ml) lagen niedriger als in der gemischten Gruppe (3) ( $3749,3 \pm 620,0$  pg/ml).

Der Unterschied erwies sich für Gruppe (1) und (3) als statistisch signifikant ( $p=0,042$ ).

Zwischen den anderen Gruppen gab es keinen signifikanten Zusammenhang (1-2:  $p=0,63$ ; 2-3:  $p=0,22$ ).

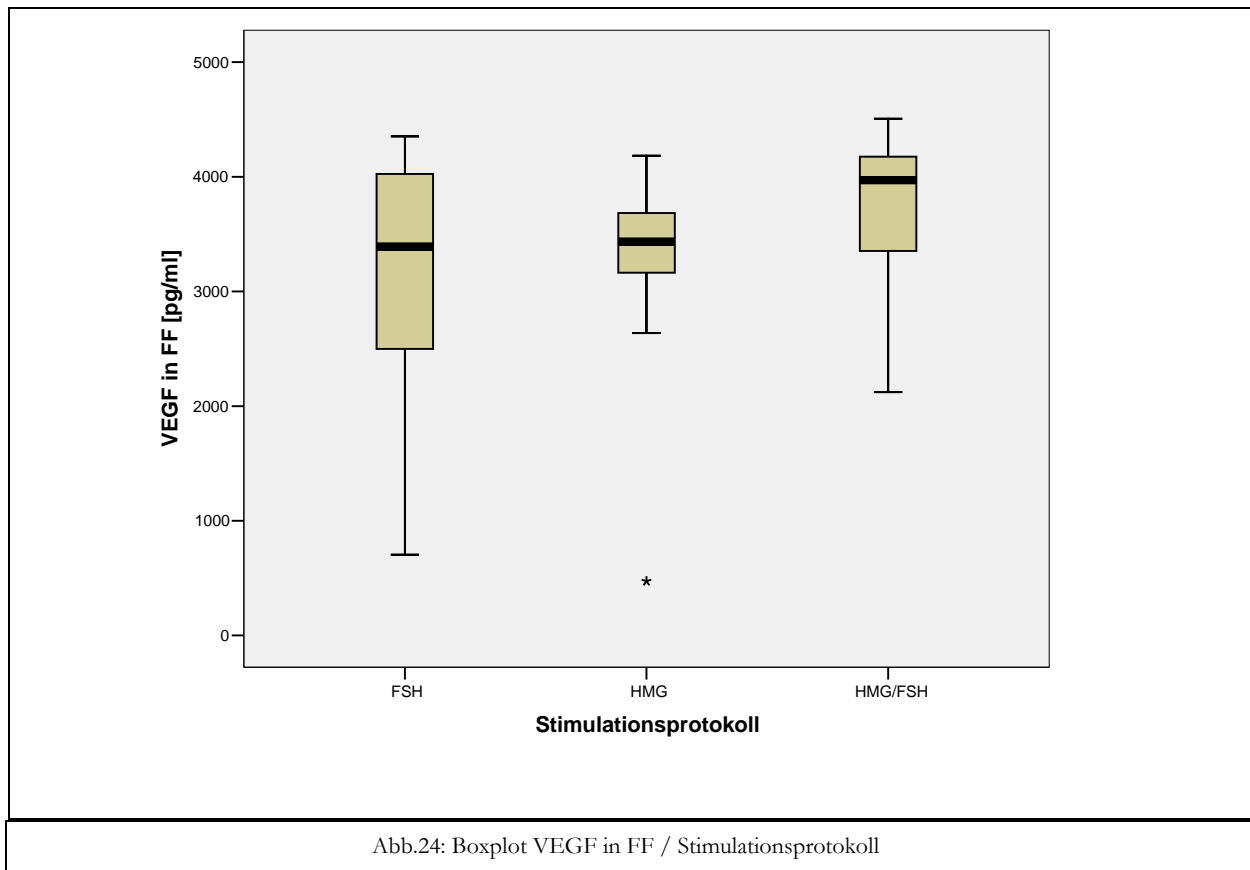


Tabelle 16 zeigt die Statistiken im Überblick:

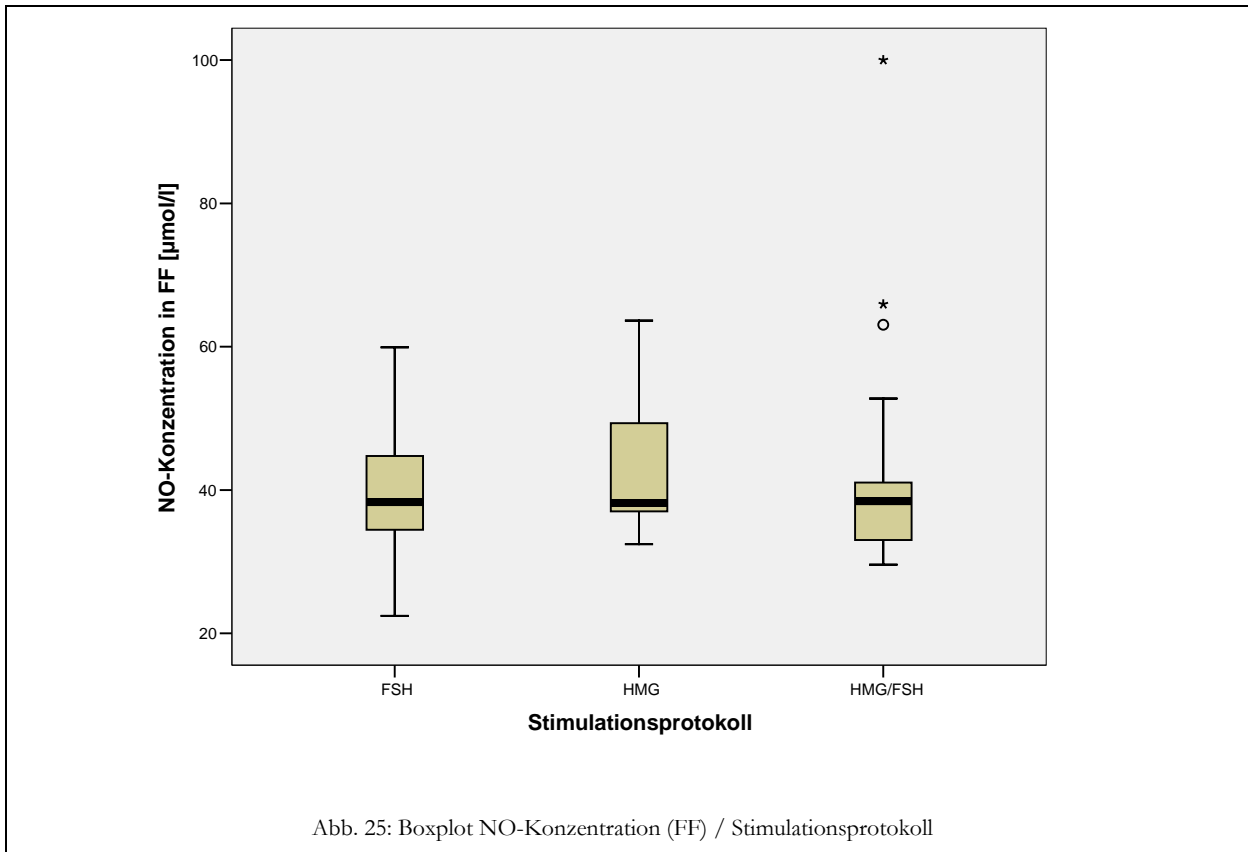
Tab. 16: Zusammenhang zwischen VEGF-Konzentrationen in FF und dem angewandten Stimulationsprotokoll

VEGF in FF [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
(1)FSH*	40	704,3	4352,3	3181,6	946,3	2498,7	3390,5	4026,5
(2)HMG	10	473,4	4381,9	3181,3	1046,9	3032,7	3434,8	3756,4
(3) HMG/FSH	25	2122,4	4505,7	3749,3	620,0	3347,9	3970,7	4191,5

\*Signifikanz zwischen Gruppe (1) und (3)  $p=0,042$ .

#### 4.4.1.3 NO-Konzentration (FF) und Stimulationsprotokoll

Die Mittelwerte der NO-Konzentrationen in FF lagen bei (1)  $39,4 \pm 7,97 \mu\text{mol/l}$ , (2)  $43,4 \pm 11 \mu\text{mol/l}$  und (3)  $42,2 \pm 15,1 \mu\text{mol/l}$ . Es ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p=0,48$ ).



Tab. 17: Zusammenhang zwischen NO-Konzentrationen in FF und dem angewandten Stimulationsprotokoll

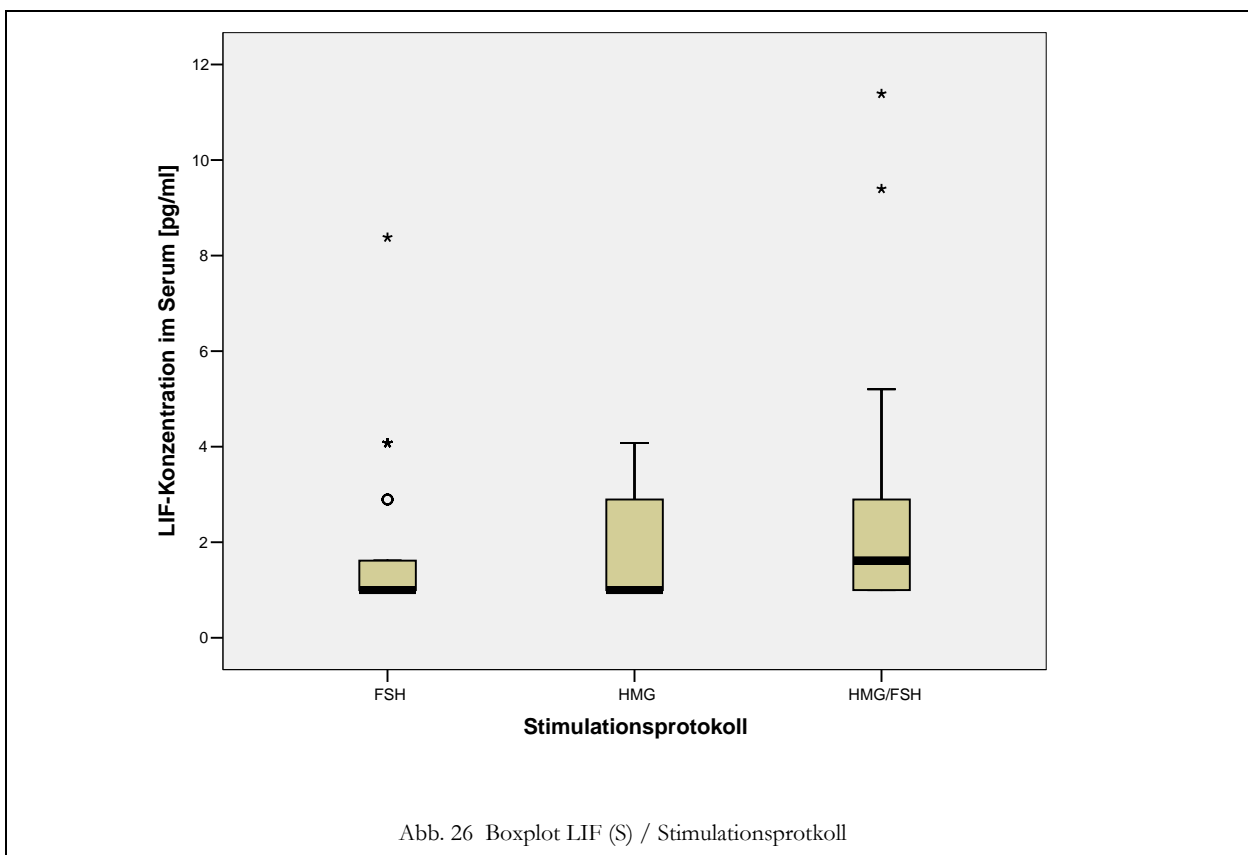
NO in FF [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
(1)FSH	40	22,4	59,9	39,4	7,97	34,5	38,3	44,8
(2)HMG	10	32,5	63,7	43,4	11,0	36,3	38,2	52,3
(3) HMG/FS H	25	23,6	100,0	42,2	15,1	32,7	38,5	43,3

#### 4.4.2 Untersuchung des Einflusses des Stimulationsprotokolls auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration im Serum

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der untersuchten Zusammenhänge zwischen den Zytokinkonzentrationen im Serum in Abhängigkeit vom Stimulationsprotokoll dargestellt.

##### 4.4.2.1 LIF-Konzentration (S) und Stimulationsprotokoll

Die Serum-LIF-Konzentrationen der drei Gruppen betragen (1)  $3,1 \pm 1,8$  pg/ml, (2)  $2,9 \pm 1$  pg/ml und (3)  $3,6 \pm 3,1$  pg/ml. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ( $p=0,36$ ).



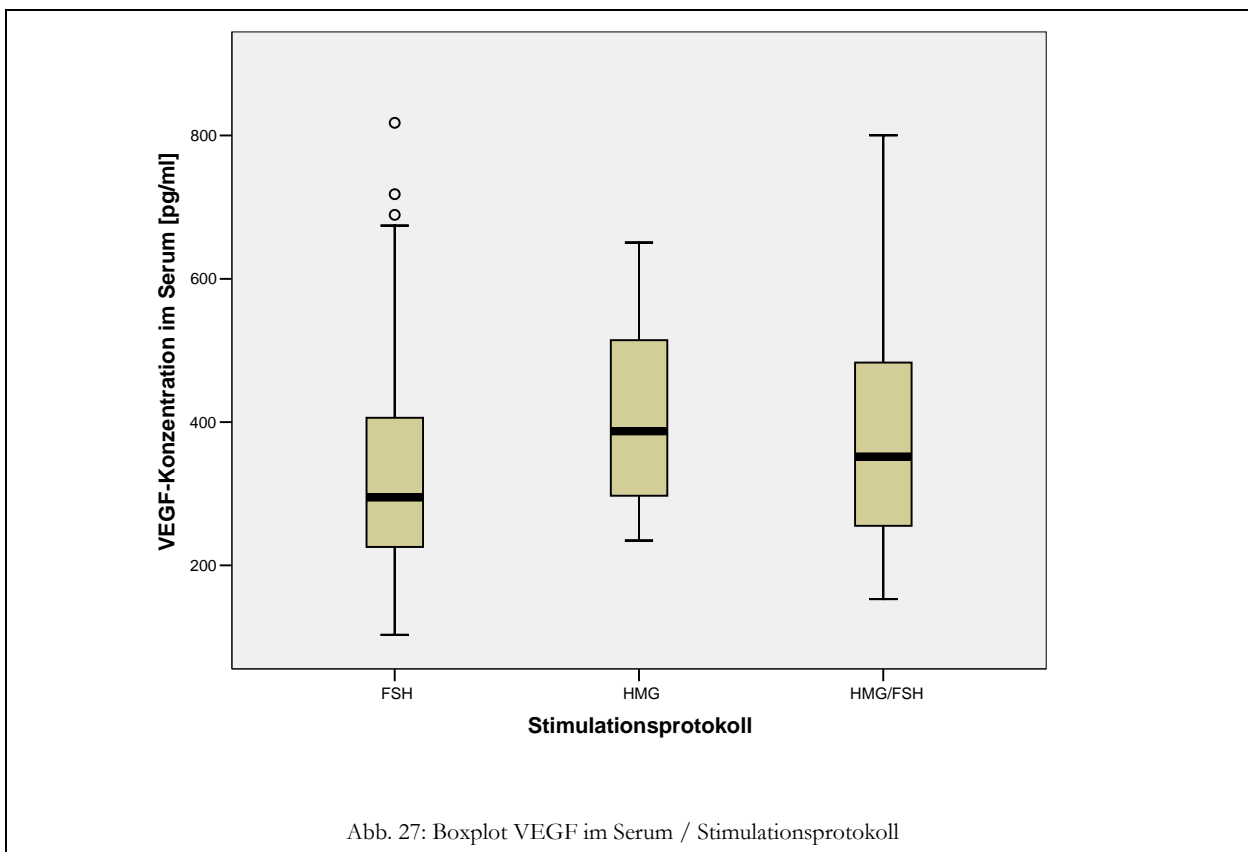
Überblick der statistisch errechneten Maßzahlen in Tabelle 18:

Tab. 18: Zusammenhang zwischen LIF-Konzentrationen im Serum und dem angewandten Stimulationsprotokoll

LIF im S [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
(1)FSH	40	1,6	8,4	3,1	1,8	1,6	2,9	4,1
(2)HMG	10	1,6	4,1	2,9	1,0	1,9	2,9	3,8
(3) HMG/FS H	25	1,6	11,4	3,6	3,1	1,6	2,3	4,4

#### 4.4.2.2 VEGF-Konzentration (S) und Stimulationsprotokoll

Die Mittelwerte der VEGF-Konzentration im Serum lagen in Gruppe (1) bei  $349,9 \pm 181,1$  pg/ml, in Gruppe (2) bei  $410,8 \pm 135,4$  pg/ml und in Gruppe (3) bei  $388,0 \pm 182,4$  pg/ml. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen ( $p=0,52$ ).



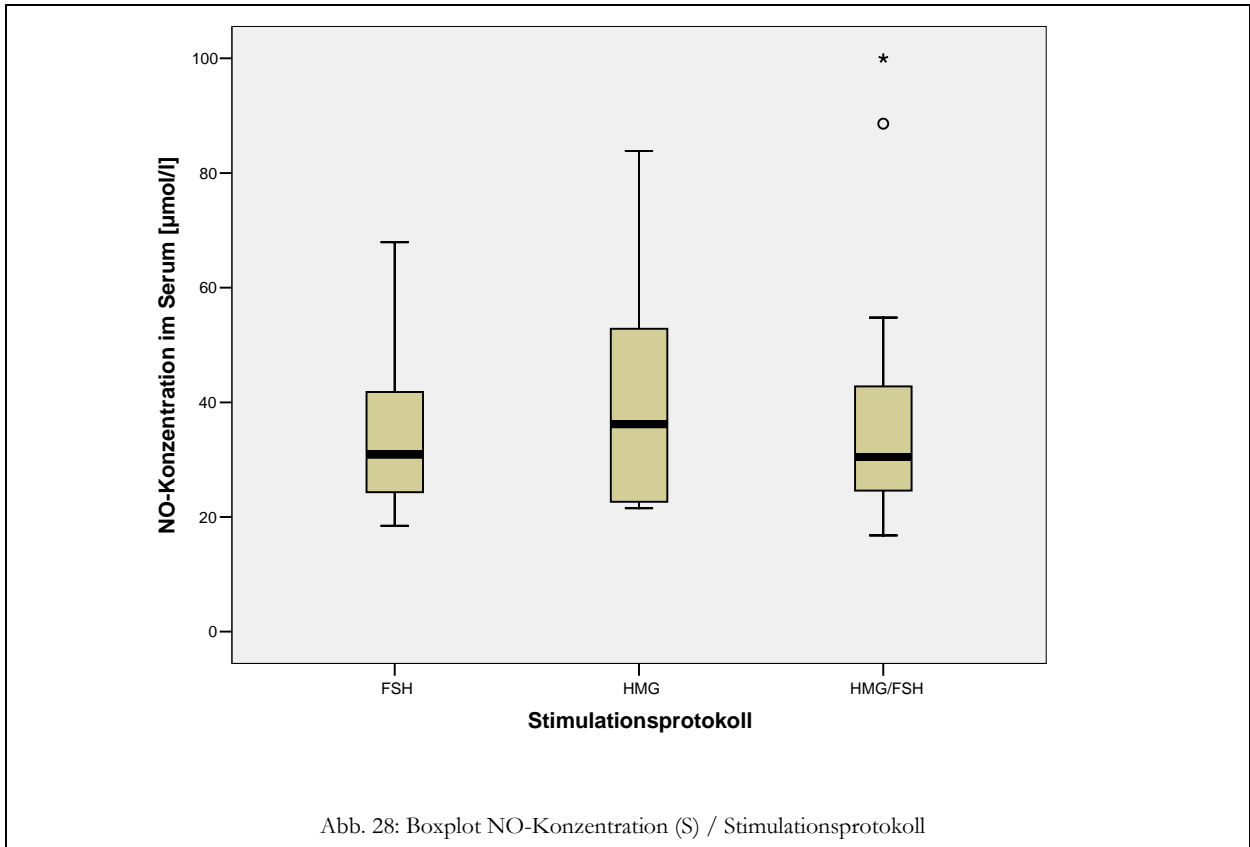
Die folgende Tabelle listet die errechneten Statistiken für die drei Gruppen auf:

Tab. 19: Zusammenhang zwischen VEGF-Konzentrationen im Serum und dem angewandten Stimulationsprotokoll

VEGF im S [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
(1)FSH	40	103,2	817,6	349,9	181,1	222,0	295,2	412,4
(2)HMG	10	234,7	650,5	410,8	135,4	293,4	387,2	528,0
(3)HMG/ FSH	25	153,0	800,2	388,0	182,4	254,6	351,8	515,5

#### 4.4.2.3 NO-Konzentration (S) und Stimulationsprotokoll

Im Serum betragen die NO-Konzentrationen für Gruppe (1)  $35,0 \pm 13,4 \mu\text{mol/l}$ , Gruppe (2)  $42,2 \pm 22,5 \mu\text{mol/l}$  und in Gruppe (3)  $37,3 \pm 20,0 \mu\text{mol/l}$ . Es konnte auch hier kein signifikanter Unterschied erhoben werden ( $p=0,49$ ).



Tab. 20: Zusammenhang zwischen NO-Konzentrationen im Serum und dem angewandten Stimulationsprotokoll

NO im S [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
FSH	40	18,5	83,9	35,0	13,4	24,3	30,9	42,0
HMG	10	21,5	83,9	42,2	22,5	22,4	36,2	58,0
HMG/FS H	25	16,8	100,0	37,3	20,0	24,5	30,5	42,9

#### 4.4.3 Vergleich der Zytokin-Konzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum

Im Folgenden werden die untersuchten Zusammenhänge zwischen Serum- und Follikelflüssigkeits-Konzentrationen von LIF, VEGF und NO in Abhängigkeit vom Stimulationsprotokoll der Patientinnen dargestellt.

##### 4.4.3.1 Ovarielle Stimulation mit FSH

Die Follikelflüssigkeit-Konzentrationen von LIF und VEGF in Gruppe (1) waren signifikant höher als im Serum ( $44,9 \pm 20,7$  pg/ml zu  $1,8 \pm 1,5$  pg/ml und  $3181,5 \pm 946,3$  pg/ml zu  $349,9 \pm 181,1$  pg/ml). Auch für NO zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration in FF als in Serum für die mit FSH-stimulierten Patientinnen ( $39,4 \pm 8,0$   $\mu\text{mol/l}$  zu  $35,0 \pm 13,4$   $\mu\text{mol/l}$ ).

Tab. 21: Zytokinkonzentrationen in der Gruppe der mit FSH stimulierten Frauen

n=40	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	$44,9 \pm 20,7$	$1,8 \pm 1,5$	$p < 0,001$
VEGF [pg/ml]	$3181,5 \pm 946,3$	$349,9 \pm 181,1$	$p < 0,001$
NO [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$39,4 \pm 8,0$	$35,0 \pm 13,4$	$p = 0,050$

#### 4.4.3.2 Ovarielle Stimulation mit HMG

In Gruppe (2) waren die Konzentrationen von LIF und VEGF in Follikelflüssigkeit signifikant höher als im Serum ( $44,6 \pm 11,6$  pg/ml zu  $1,8 \pm 1,1$  pg/ml und  $3181,3 \pm 1046,9$  pg/ml zu  $410,8 \pm 135,4$  pg/ml). Für NO konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Konzentrationen in Serum und Follikelflüssigkeit festgestellt werden.

Tab. 22: Zytokinkonzentrationen in der Gruppe der mit HMG stimulierten Frauen

n=10	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	$44,6 \pm 11,6$	$1,8 \pm 1,1$	$p < 0,001$
VEGF [pg/ml]	$3181,3 \pm 1046,9$	$410,8 \pm 135,4$	$p < 0,001$
NO [ $\mu$ mol/l]	$43,4 \pm 11,0$	$42,2 \pm 22,5$	$p = 0,804$

#### 4.4.3.3 Ovarielle Stimulation mit HMG/FSH

Auch in der dritten Gruppe (3) besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen den Zytokinkonzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum. LIF und VEGF-Konzentrationen erwiesen sich in der FF als signifikant höher als im Serum ( $51,9 \pm 23,2$  pg/ml zu  $2,4 \pm 2,6$  pg/ml und  $3749,3 \pm 620,0$  pg/ml zu  $388,0 \pm 182,4$  pg/ml), für NO gab es keinen statistischen Zusammenhang zwischen den Asservaten.

Tab. 23: Zytokinkonzentrationen in der Gruppe der mit HMG/FSH stimulierten Frauen

n=25	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	$51,9 \pm 23,2$	$2,4 \pm 2,6$	$p < 0,001$
VEGF [pg/ml]	$3749,3 \pm 620,0$	$388,0 \pm 182,4$	$p < 0,001$
NO [ $\mu$ mol/l]	$42,2 \pm 15,1$	$37,3 \pm 20,0$	$p = 0,063$

#### 4.4.3.4 Grafische Darstellung

Die Konzentrationen von LIF, VEGF und NO in FF (grün) und Serum (blau) wurden Anhand der unterschiedlichen Stimulationsprotokolle dargestellt.



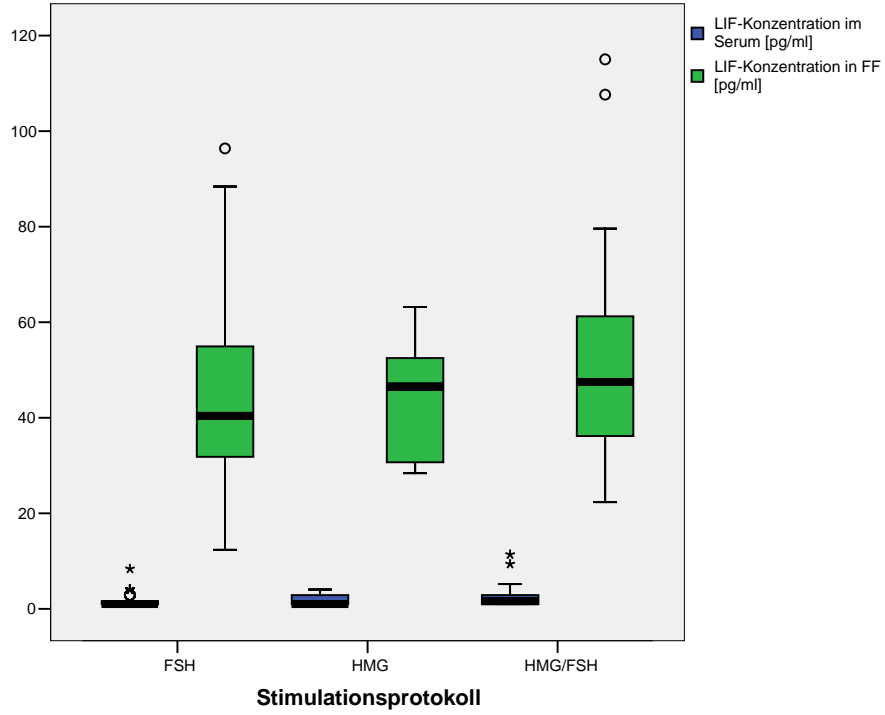


Abb. 29: Boxplot LIF-Konzentrationen in FF in Vgl. zu Serum anhand des Stimulationsprotokolls

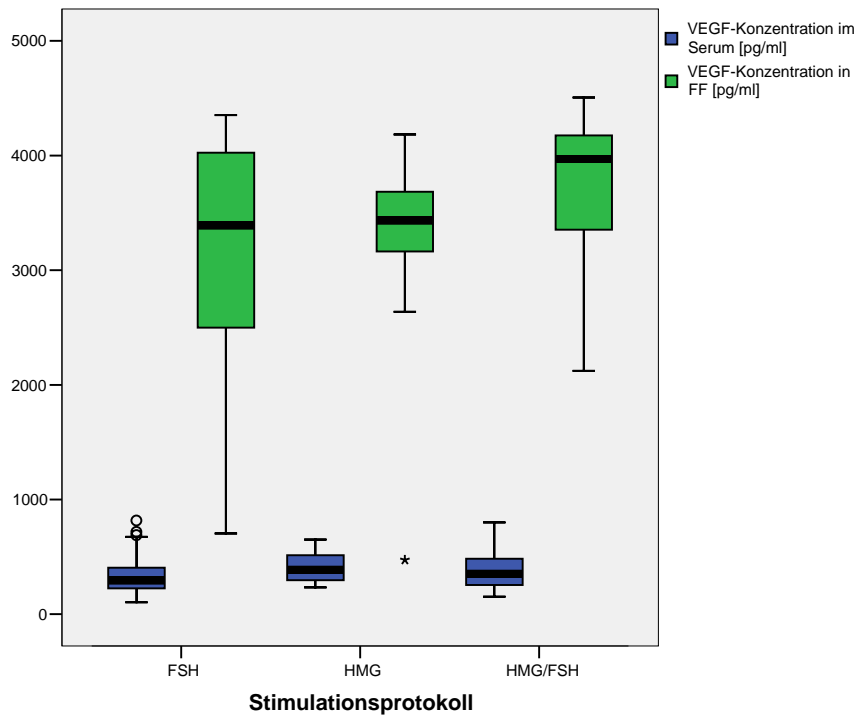
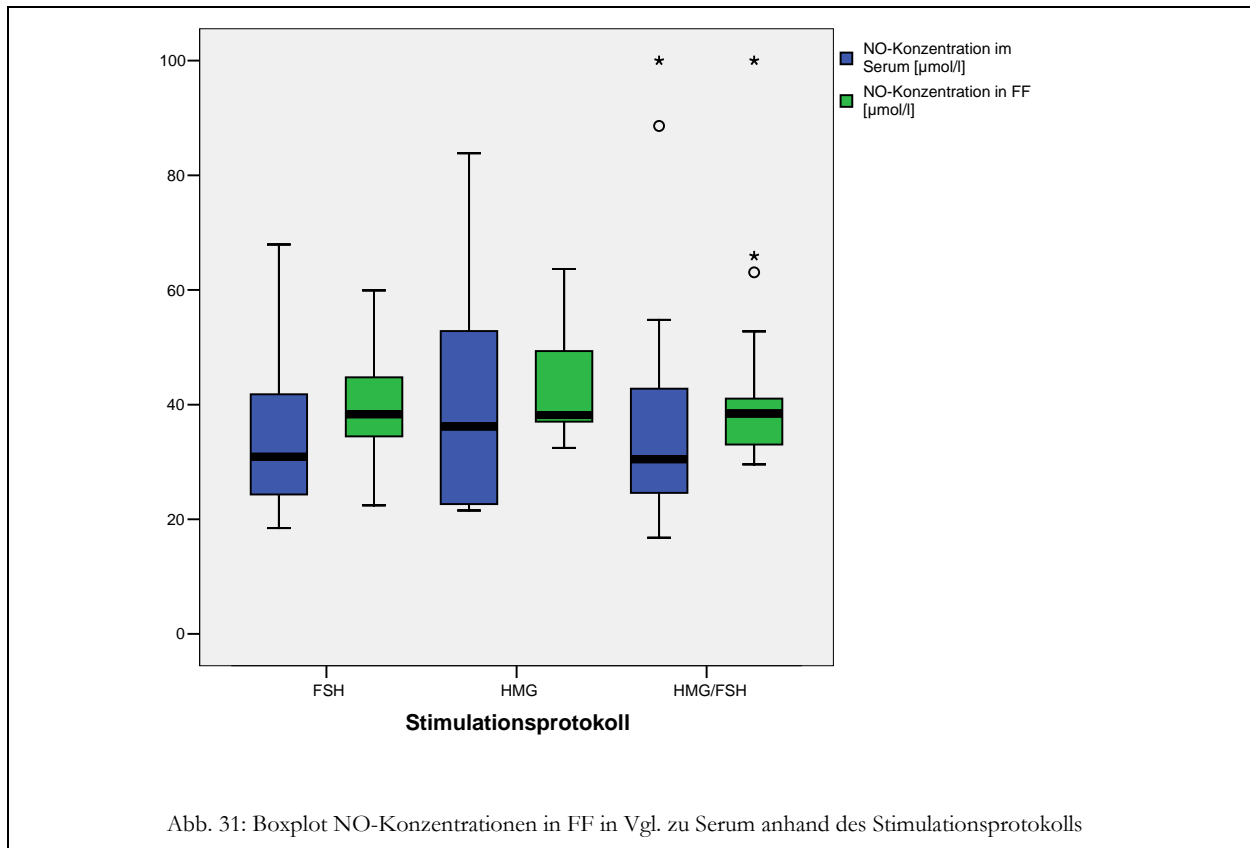


Abb. 30: Boxplot VEGF-Konzentrationen in FF in Vgl. zu Serum anhand des Stimulationsprotokolls



#### ***4.5 Untersuchung des Einflusses der Sterilitätsätiologie auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration***

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Zytokinkonzentrationen (LIF, VEGF und NO) in Serum und Follikelflüssigkeit von den verschiedenen Ursachen der Sterilität beeinflusst wurden.

Gruppe I umfasst die Patientinnen, bei denen eine tubare Sterilität diagnostiziert wurde, Patientinnen mit Endometriose wurden Gruppe II zugeteilt und Fälle von androgen bedingter Sterilität bildeten Gruppe III. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dargestellt (Tabellen und Boxplots).

#### 4.5.1 Untersuchung des Einflusses der Sterilitätsätiologie auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration in präovulatorischer Follikelflüssigkeit

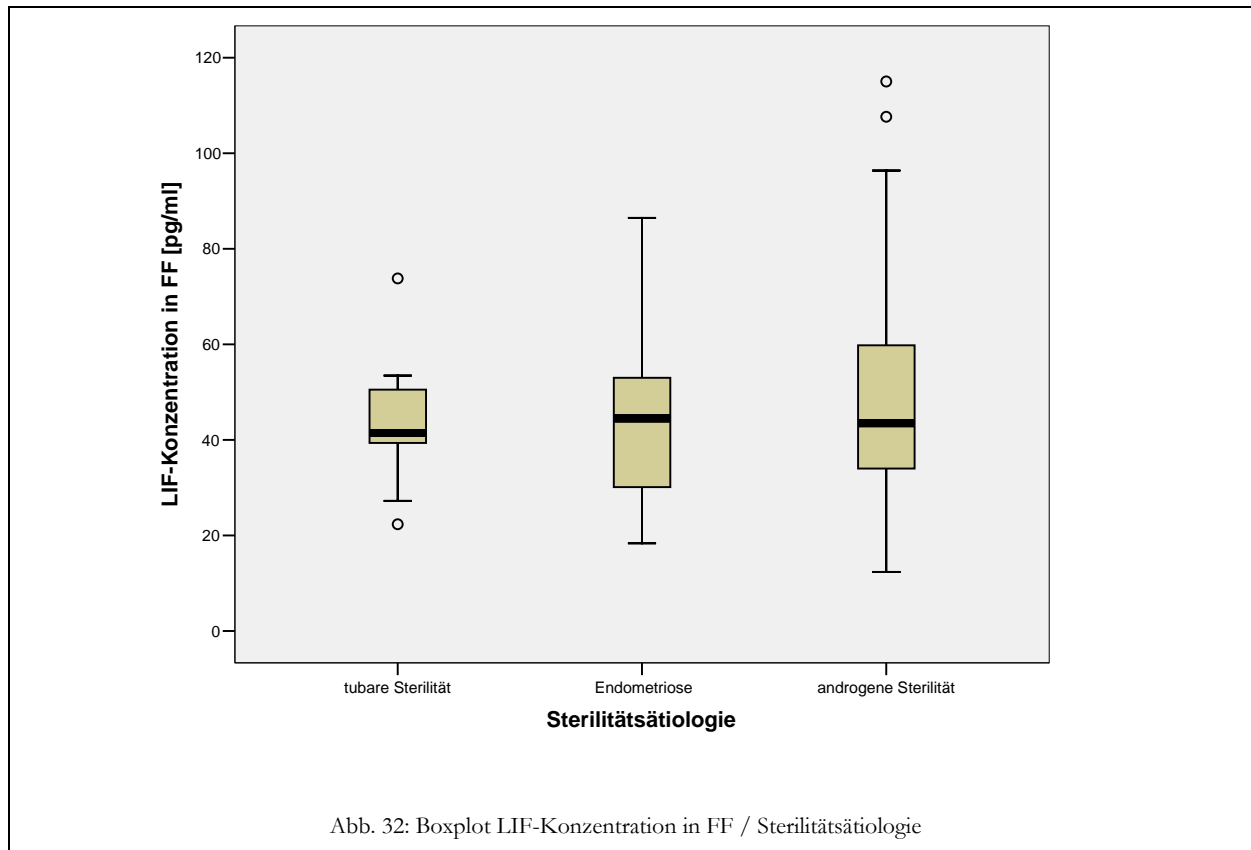
Zunächst wurden die Zytokinkonzentrationen (LIF, VEGF, NO) in präovulatorischer Follikelflüssigkeit in Zusammenhang mit der Ätiologie der Sterilität (tubare Ursache, Endometriose, androgener Faktor) betrachtet.

##### 4.5.1.1 LIF (FF) und Sterilitätsätiologie

Die Mittelwerte der LIF-Konzentrationen in FF in Gruppe I betragen  $43,2 \pm 12,0$  pg/ml, in Gruppe II  $43,6 \pm 18,9$  pg/ml und in Gruppe III  $50,0 \pm 23,7$  pg/ml. Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p=0,74$ ).

Tab. 24: Zusammenhang zwischen LIF-Konzentrationen in FF und der Sterilitätsursache

LIF in FF [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe I (tubare Ster.)	17	22,4	73,8	43,2	12,0	36,1	41,4	50,5
Gruppe II (Endometr.)	15	18,4	86,5	43,6	18,9	29,6	44,5	53,5
Gruppe III (androg.Ster.)	43	12,4	115,03	50,0	23,7	29,6	44,5	53,5

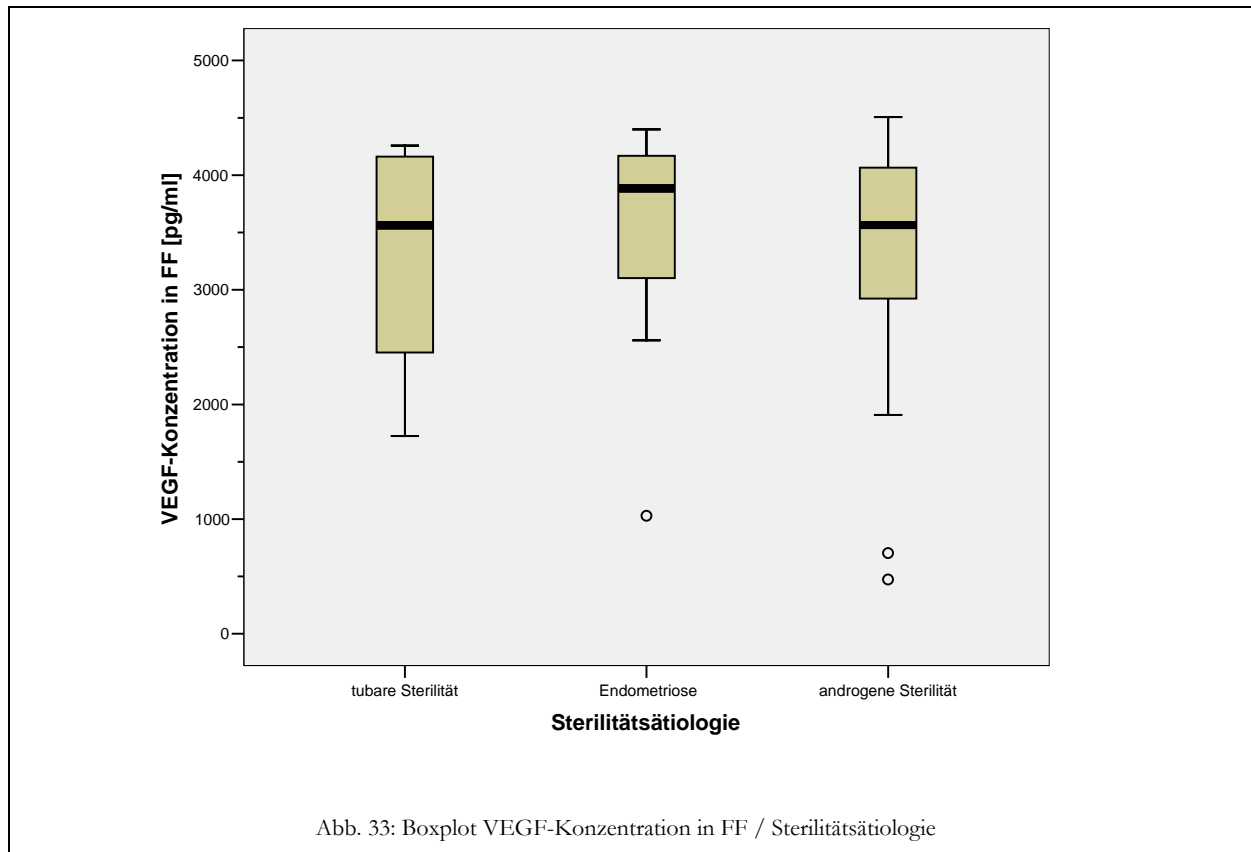


#### 4.5.1.2 VEGF (FF) und Sterilitätsätiologie

Die mittleren VEGF-Konzentrationen in FF der drei Gruppen lagen bei (I)  $3247,8 \pm 931,9$  pg/ml, (II)  $3546,3 \pm 893,4$  pg/ml und (III)  $3358,1 \pm 894,3$  pg/ml. Die Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant ( $p=0,76$ ).

Tab. 25: Zusammenhang zwischen VEGF-Konzentrationen in FF und der Sterilitätsursache

VEGF in FF [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe I (tubare Ster.)	17	1724,4	4258,0	3247,8	931,9	2287,5	3561,5	4162,2
Gruppe II (Endometr.)	15	1029,3	4399,1	3546,3	893,4	3038,1	3884,0	4208,5
Gruppe III (androg.Ster.)	43	473,4	4505,7	3358,1	894,3	2895,2	3564,9	4086,5

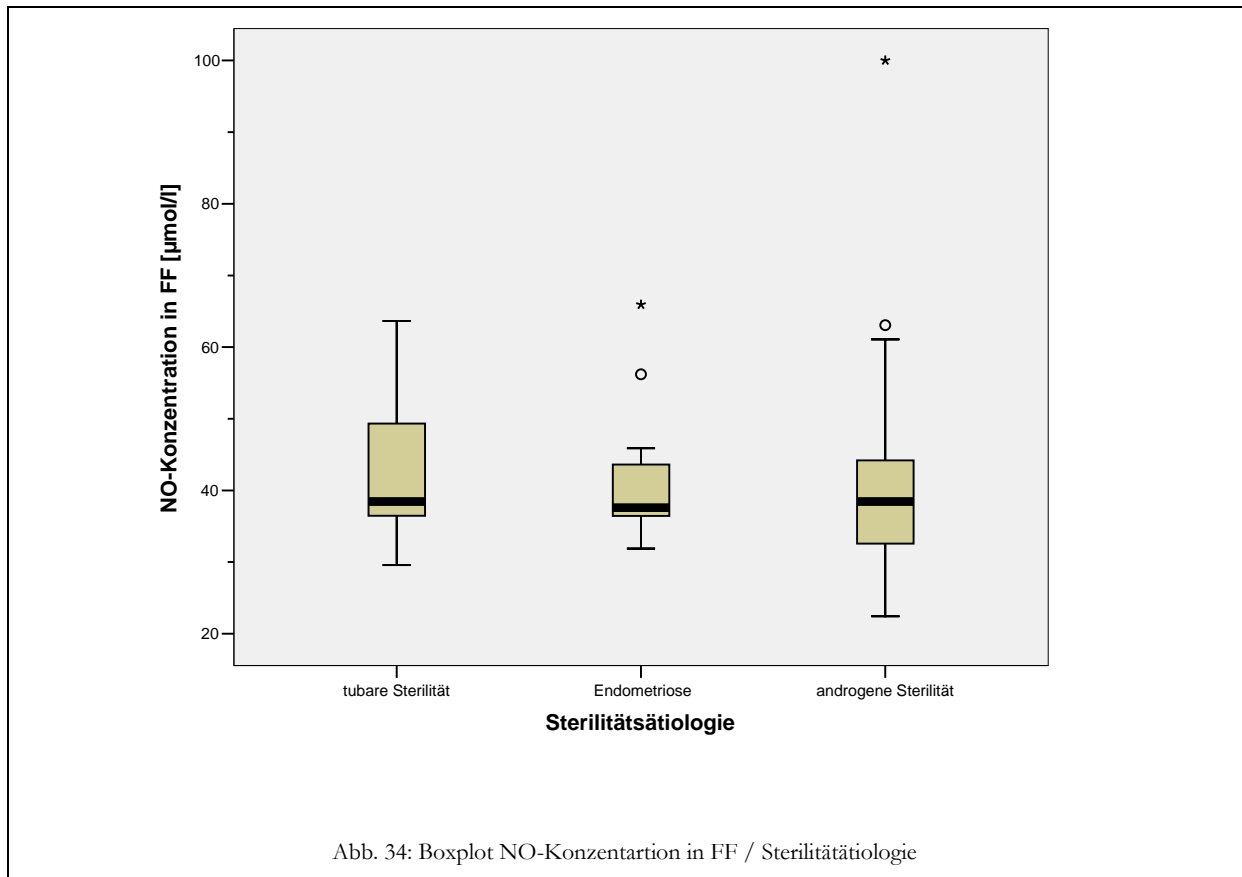


#### 4.5.1.3 NO-Konzentration (FF) und Sterilitätsätiologie

NO in FF war in allen drei Gruppen ähnlich hoch, (I)  $42,3 \pm 9,5 \mu\text{mol/l}$ , (II)  $41,5 \pm 9 \mu\text{mol/l}$  und (III)  $40,1 \pm 12,5 \mu\text{mol/l}$ . Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Gruppen ( $p=0,72$ ).

Tab. 26: Zusammenhang zwischen NO-Konzentrationen in FF und der Sterilitätsursache

NO in FF [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe I (tubare Ster.)	17	29,6	63,7	42,3	9,5	35,9	38,5	49,5
Gruppe II (Endometr.)	15	31,9	65,9	41,5	9,0	35,9	37,6	45,6
Gruppe III (androg.Ster.)	43	22,4	100,0	40,1	12,5	32,5	38,5	44,8



#### 4.5.2 Untersuchung des Einflusses der Sterilitätsätiologie auf die LIF-, VEGF- und NO-Konzentration im Serum

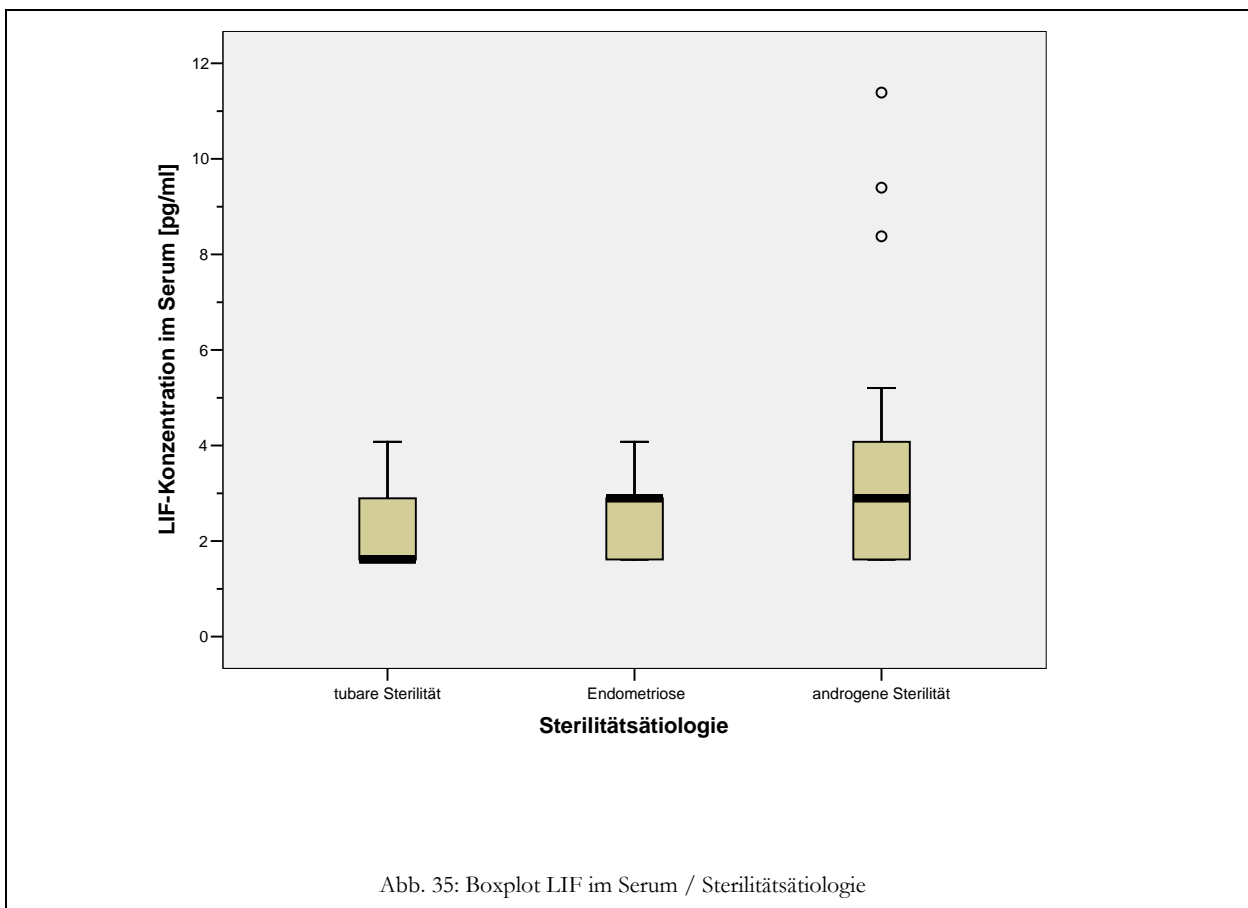
Es folgt die Darstellung der Zusammenhänge zwischen Serumkonzentration von LIF, VEGF und NO in Abhängigkeit von der Sterilitätsursache (tubare Ursache, Endometriose, androgener Faktor).

##### 4.5.2.1 LIF-Konzentration (S) und Sterilitätsätiologie

Die Mittelwerte von LIF im Serum lagen bei (I)  $2,3 \pm 0,98$  pg/ml, (II)  $2,6 \pm 1$  pg/ml und (III)  $3,7 \pm 2,8$  pg/ml. Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied ( $p=0,51$ ).

Tab. 27: Zusammenhang zwischen LIF-Konzentrationen im Serum und der Sterilitätsursache

LIF im S [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe I (tubare Ster.)	7	1,6	4,1	2,3	0,98	1,6	1,6	2,9
Gruppe II (Endometr.)	5	1,6	4,1	2,6	1,0	1,6	2,9	3,5
Gruppe III (androg.Ster.)	21	1,6	11,4	3,7	2,8	1,6	2,9	4,1

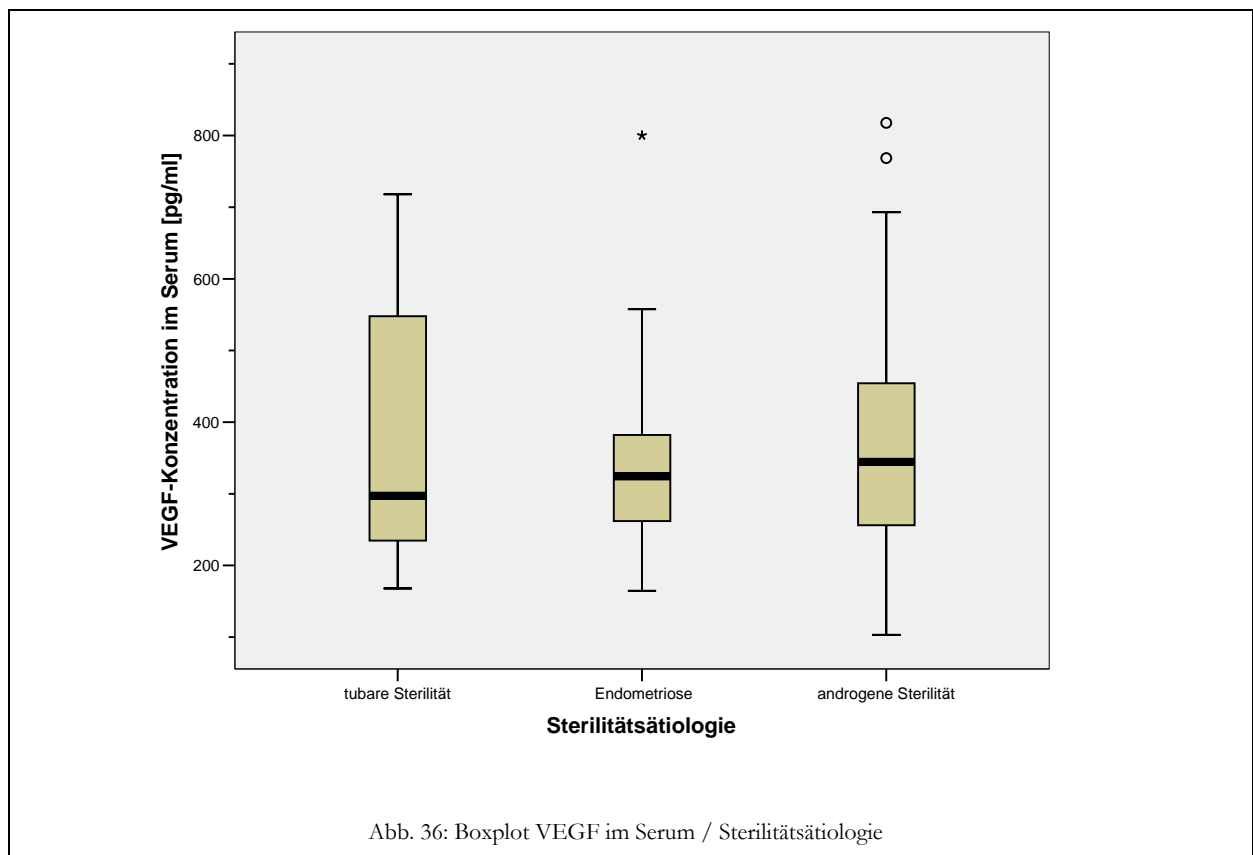


#### 4.5.2.2 VEGF (S) und Sterilitätsätiologie

Die VEGF-Konzentrationen im Serum lagen in Gruppe I bei  $375,3 \pm 180,5$  pg/ml, in Gruppe II bei  $354,3 \pm 160,4$  pg/ml und bei Gruppe III  $374,7 \pm 182,4$  pg/ml. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p=0,58$ ).

Tab. 28 :Zusammenhang zwischen den VEGF-Konzentrationen im Serum und der Sterilitätsursache

VEGF im S [pg/ml]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe I (tubare Ster.)	17	168,0	718,1	375,3	180,5	229,5	297,4	558,5
Gruppe II (Endometr.)	15	164,7	800,2	354,3	160,4	258,3	324,6	386,5
Gruppe III (androg.Ster.)	43	103,2	714,4	374,7	182,4	253,9	344,7	461,8



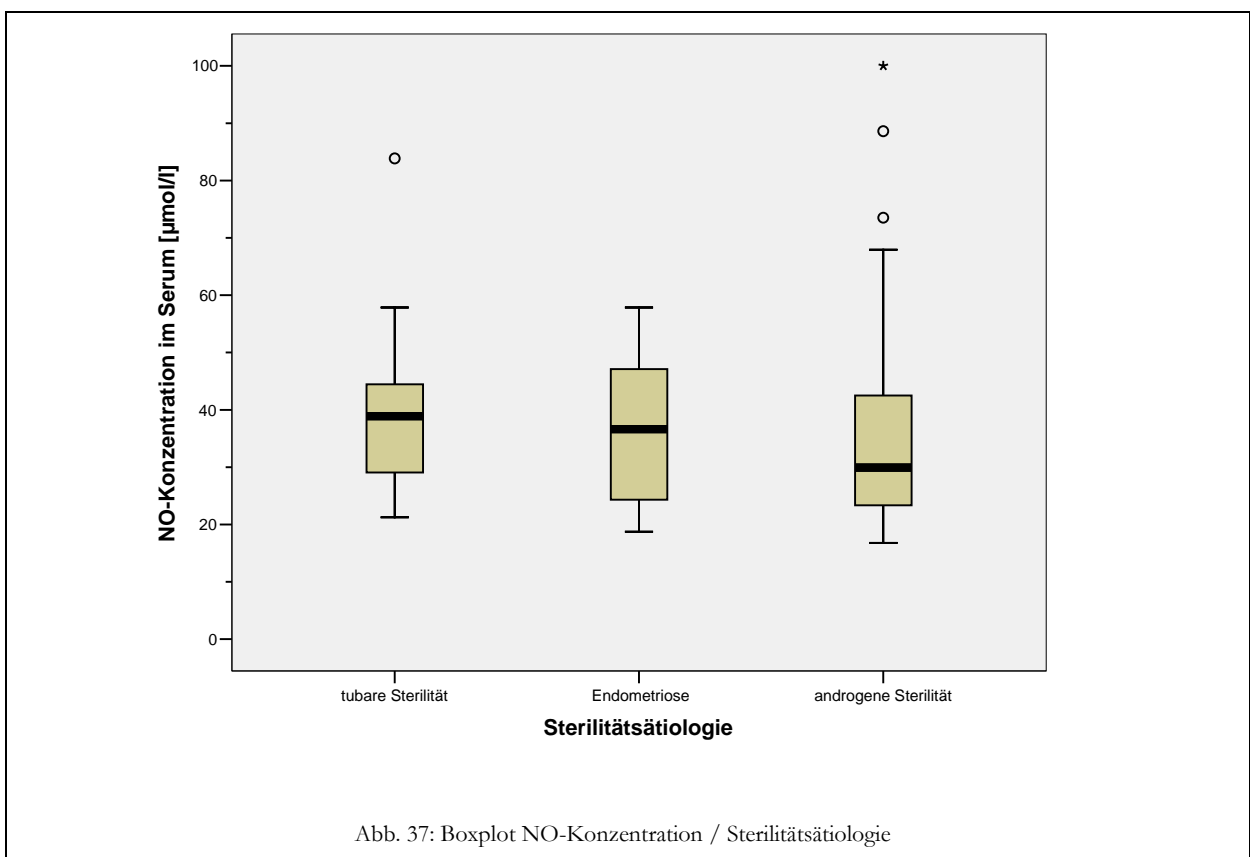


#### 4.5.2.3 NO (S) und Sterilitätsätiologie

Für die NO-Konzentrationen fanden sich in Gruppe I Mittelwerte von  $39,2 \pm 15,5$   $\mu\text{mol/l}$ , in Gruppe II  $36,3 \pm 13,6$   $\mu\text{mol/l}$  und in Gruppe III  $35,9 \pm 18,9$   $\mu\text{mol/l}$ . Ein statistisch signifikanter Zusammenhang wurde nicht festgestellt ( $p=0,89$ ).

Tab. 29: Zusammenhang zwischen NO-Konzentrationen im Serum und der Sterilitätsursache

NO im S [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Perzentile		
						25%	50%=Median	75%
Gruppe I (tubare Ster.)	17	21,3	83,9	39,2	15,5	26,8	38,9	44,9
Gruppe II (Endometr.)	15	18,7	57,9	36,3	13,6	24,3	36,6	52,8
Gruppe III (androg.Ster.)	43	16,8	100,0	35,9	18,9	22,7	29,9	42,8



### 4.5.3 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum

Ein weiteres Ziel dieser Studie war, festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen Serum- und Follikelflüssigkeits-Konzentrationen der Zytokine (LIF, VEGF und NO) innerhalb der einzelnen Gruppen bestand.

#### 4.5.3.1 Tubar bedingte Sterilität

In Gruppe I konnte sowohl für LIF als auch für VEGF eine signifikant höhere Konzentration in präovulatorischer Follikelflüssigkeit als im Serum festgestellt werden ( $43,2 \pm 12,1$  pg/ml zu  $1,6 \pm 0,9$  pg/ml und  $3247,8 \pm 931,9$  pg/ml zu  $375,3 \pm 180,5$  pg/ml). Die NO-Konzentrationen in FF und S waren nicht signifikant zu unterscheiden.

Tab. 30: Zytokinkonzentrationen in der Gruppe der Frauen mit tubarer Sterilität

n=17	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	$43,2 \pm 12,1$	$1,6 \pm 0,9$	$p < 0,001$
VEGF [pg/ml]	$3247,8 \pm 931,9$	$375,3 \pm 180,5$	$p < 0,001$
NO [ $\mu$ mol/l]	$42,3 \pm 9,5$	$39,19 \pm 15,52$	$p = 0,26$

#### 4.5.3.2 Endometriose

Bei den Endometriosepatientinnen erwiesen sich die LIF Konzentrationen in präovulatorischer Follikelflüssigkeit als wesentlich höher als die Serumwerte ( $43,6 \pm 18,9$  pg/ml zu  $1,5 \pm 0,96$  pg/ml). Auch für VEGF konnte eine signifikant höhere Follikelflüssigkeitskonzentration im Vergleich zum Serum nachgewiesen werden ( $3546,3 \pm 893,4$  pg/ml zu  $354,3 \pm 160,5$  pg/ml). Für NO ergab sich kein relevanter Unterschied zwischen FF und Serum ( $41,5 \pm 8,99$  pg/ml zu  $36,3 \pm 13,6$  pg/ml).

Tab. 31: Zytokinkonzentrationen in der Gruppe der Frauen mit Endometriose

n=15	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	$43,6 \pm 18,9$	$1,5 \pm 0,96$	$p < 0,001$
VEGF [pg/ml]	$3546,3 \pm 893,4$	$354,3 \pm 160,5$	$p < 0,001$
NO [ $\mu$ mol/l]	$41,5 \pm 8,99$	$36,3 \pm 13,6$	$p = 0,18$

### 4.5.3.3 Androgen bedingte Sterilität

Auch bei klinisch gesunden Frauen konnten wesentlich höhere LIF- und VEGF-Werte in FF im Vergleich zum Serum ermittelt werden ( $50,0 \pm 23,7$  pg/ml zu  $2,3 \pm 2,4$  pg/ml und  $3358,1 \pm 894,3$  pg/ml zu  $374,8 \pm 182,4$  pg/ml). Für NO fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen FF- und Serumkonzentrationen ( $40,1 \pm 12,5$   $\mu$ mol/l zu  $35,96 \pm 18,9$   $\mu$ mol/l).

Tab. 32: Zytokinkonzentrationen in der Gruppe der androgen bedingten Sterilität

n=43	Konzentration in FF	Konzentration in S	p-Wert
LIF [pg/ml]	$50,0 \pm 23,7$	$2,3 \pm 2,4$	$p < 0,001$
VEGF [pg/ml]	$3358,1 \pm 894,3$	$374,8 \pm 182,4$	$p < 0,001$
NO [ $\mu$ mol/l]	$40,1 \pm 12,5$	$35,96 \pm 18,9$	$p = 0,059$

### 4.5.3.4 Grafische Darstellung

Die folgenden drei Abbildungen stellen die Konzentrationen von LIF, VEGF und NO im Vergleich Serum zu FF anhand der unterschiedlichen Diagnosen (tubare Sterilität, Endometriose, androgen bedingte Sterilität) dar.

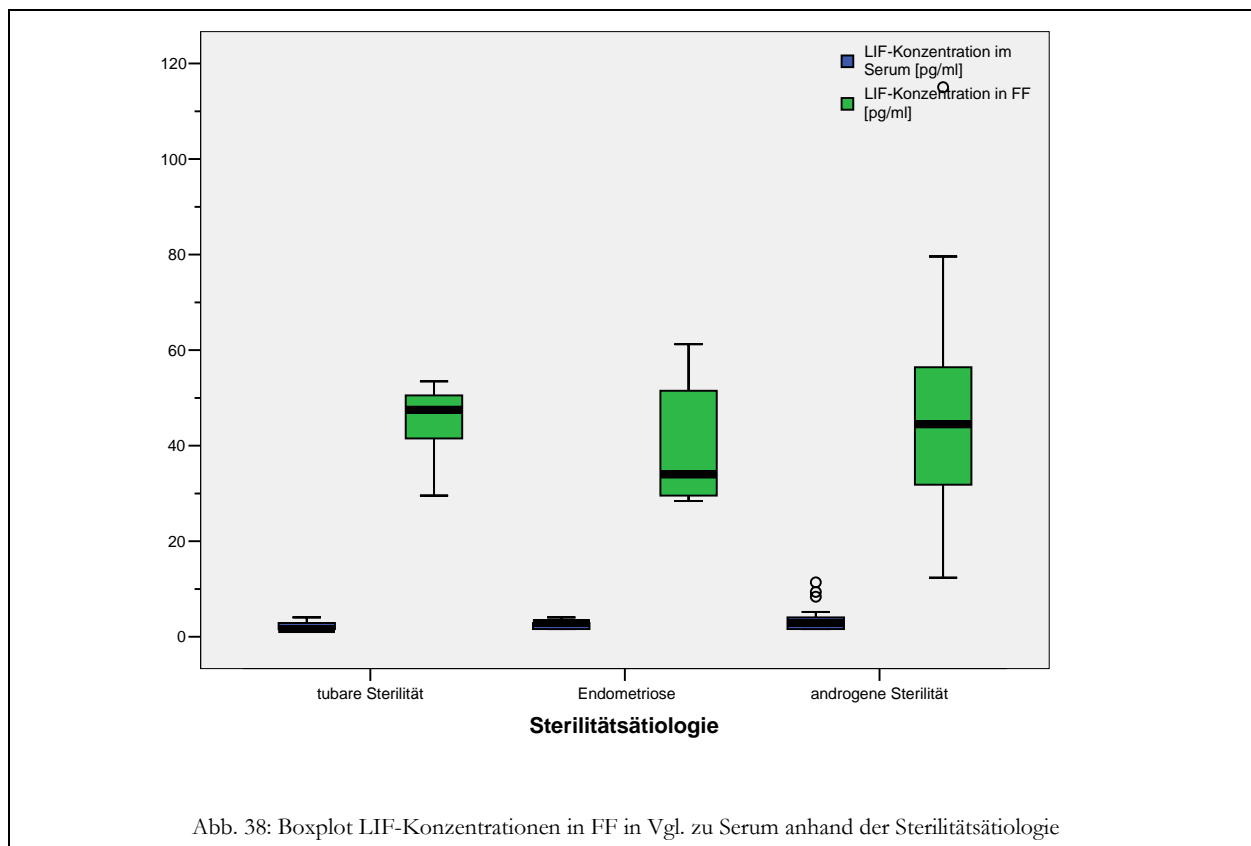
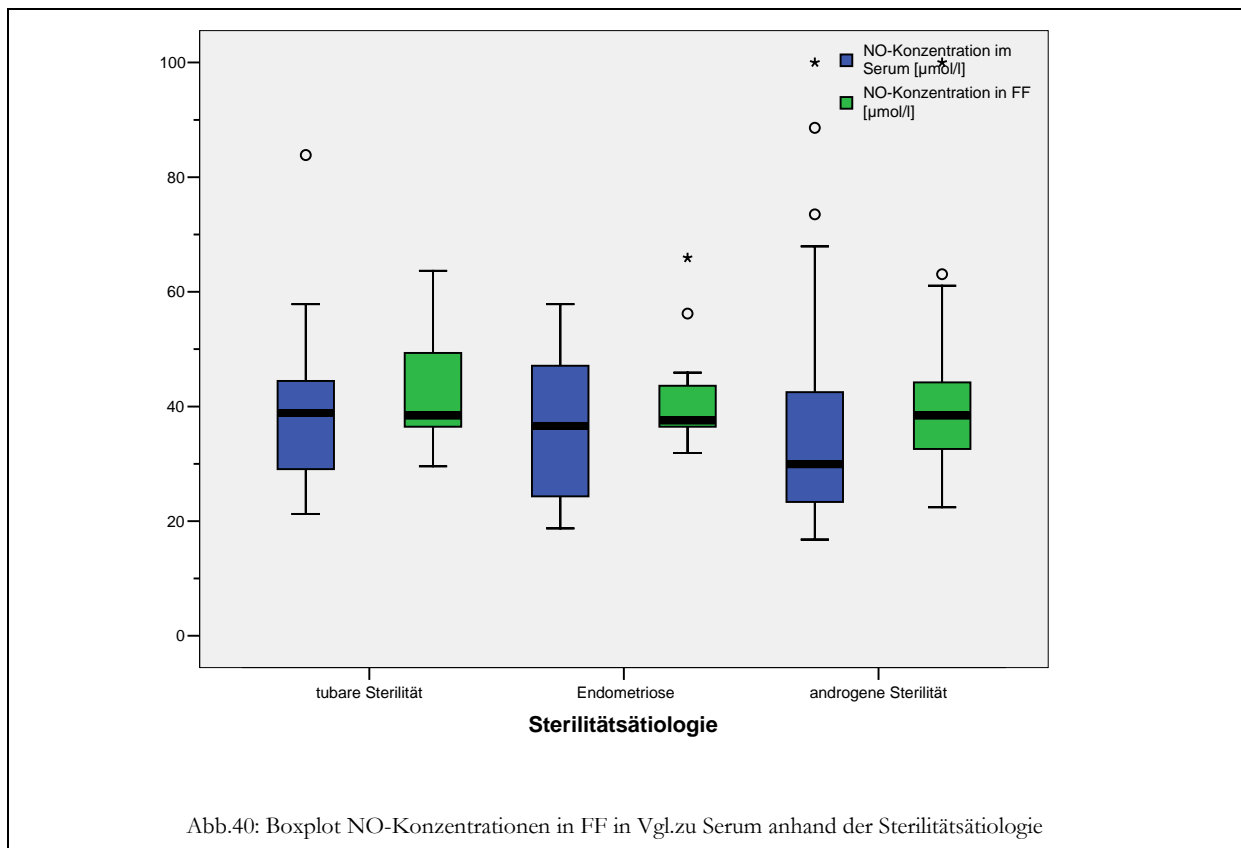
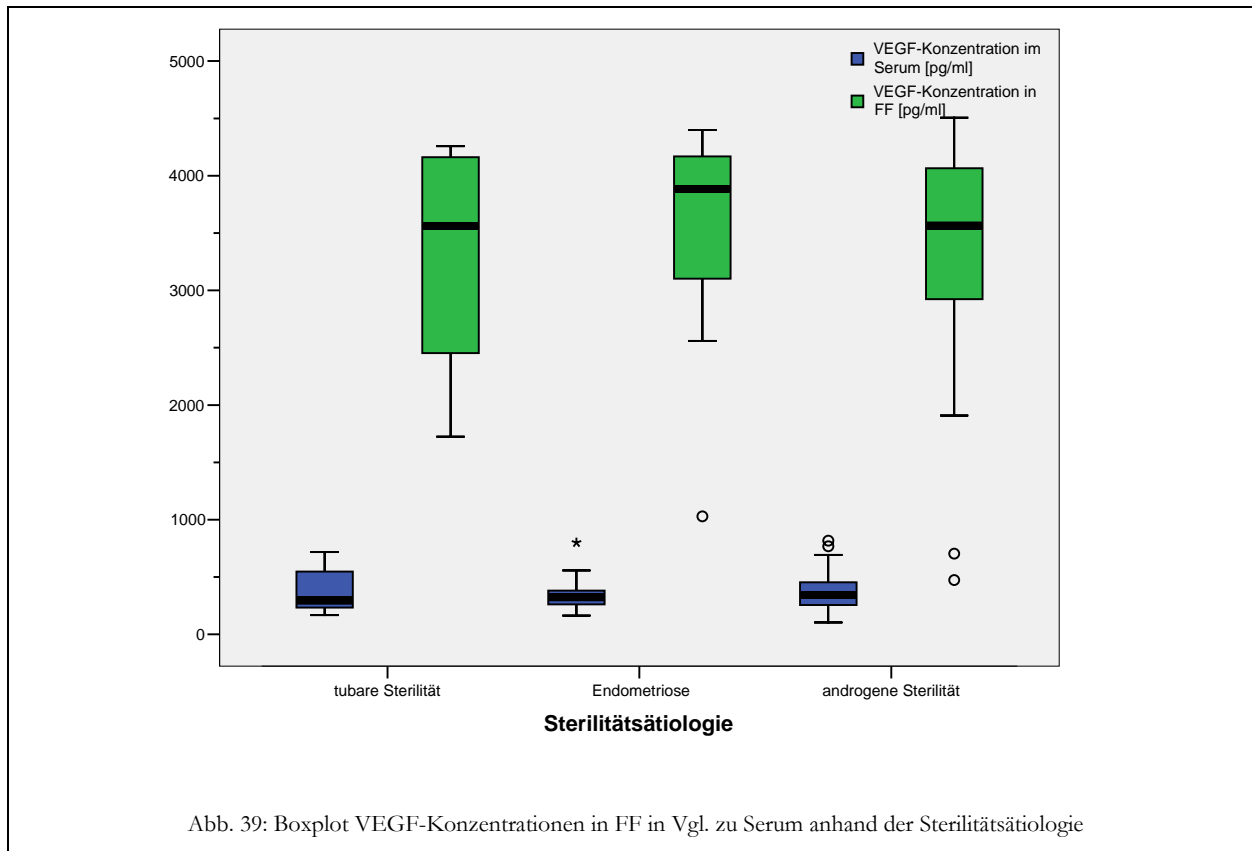


Abb. 38: Boxplot LIF-Konzentrationen in FF in Vgl. zu Serum anhand der Sterilitätsätiologie



## 4.6 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen

### 4.6.1 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen in FF

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Zytokinkonzentrationen in FF untereinander ergab keine relevanten Korrelationen. Tabelle 33 zeigt die gefundenen Korrelationskoeffizienten:

Tab. 33: Korrelationen zwischen den Zytokinkonzentrationen in FF

	<b>LIF</b>	<b>NO</b>
<b>LIF</b>		-0,08
<b>VEGF</b>	0,55	-0,12

### 4.6.2 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen im Serum

Auch im Serum konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen der Zytokine untereinander festgestellt werden. Tabelle 34 zeigt die gefundenen Korrelationskoeffizienten:

Tab. 34: Korrelationen zwischen den Zytokinkonzentrationen im Serum

	<b>LIF</b>	<b>NO</b>
<b>LIF</b>		0,29
<b>VEGF</b>	0,24	-0,08

### 4.6.3 Korrelation zwischen den verschiedenen Zytokinkonzentrationen in FF und Serum

Es wurde ebenfalls untersucht, ob ein statistischer Zusammenhang der Zytokinkonzentrationen in FF mit den Serumkonzentrationen besteht. Jedoch konnte keine relevante Korrelation gefunden werden. Die errechneten Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 35 dargestellt:

Tab. 35: Korrelationen zwischen den Zytokinkonzentrationen in FF und Serum

	<b>LIF(S)</b>	<b>VEGF (S)</b>	<b>NO(S)</b>
<b>LIF(FF)</b>	-0,07	0,55	0,06
<b>VEGF(FF)</b>	-0,31	-0,08	0,01
<b>NO(FF)</b>	-0,28	-0,15	0,35

#### ***4.7 Zusammenhang zwischen Stimulationsart und weiteren IVF/ICSI-Parametern***

Es wurde untersucht, ob die verschiedenen Stimulationsprotokolle einen unterschiedlichen Einfluss auf die betrachteten Parameter hatten. Die bisherige Darstellung der Ergebnisse erfolgte unabhängig von der Reproduktionstechnik (IVF oder ICSI), da kein Einfluss dieser auf die Zytokinkonzentration besteht. Aufgrund der unterschiedlichen Berechnung der Fertilisationsraten (siehe unten) für IVF und ICSI wurden diese getrennt betrachtet.

Tab. 36: Zusammenhang zwischen klinischen Parametern der Reproduktionsmaßnahme und Stimulationsprotokoll

	FSH (G.1) (n= 40)	HMG (G.II) (n= 10)	FSH/HM G (G.III) (n= 25)	Gesamt (n=75)	Signifikanz (Kruskall Wallis)
Alter der Patientinnen	33,1 ± 4,6	36,3 ± 5,4	34,6 ± 4,1	34,0 ± 4,7	0,103
Gewonnene Oozyten	6,9 ± 4,6	5,9 ± 3,7	5,3 ± 4,2	6,2 ± 4,4	0,33
Fertilisierte Oozyten	4,3 ± 3,2	3,2 ± 1,9	3,1 ± 3,0	3,7 ± 3	0,29
Fertilisationsrate IVF	0,78 ± 0,19 (n=8)	0,52 ± 0,5 (n=3)	0,69±0,33 (n=13)	0,70±0,33 (n=24)	0,53
Fertilisationsrate ICSI	0,63 ± 0,28 (n=32)	0,74 ± 0,29 (n=7)	0,51± 0,35 (n=12)	0,62 ± 0,3 (n=51)	0,26
Geteilte Oozyten	2,0 ± 0,8	1,8 ± 0,9	1,6 ± 0,9	1,8 ± 0,9	0,2
Teilungsrate	0,63 ± 0,29	0,66 ± 0,28	0,68 ± 0,3	0,65±0,29	0,82
Schwangerschaften	9	3	7	19	
Schwangerschaftsrate	0,23	0,30	0,28	0,25	0,21*

Angaben in MW ± SD

\*Chi-Quadrat Test

#### ***4.8 Korrelation zwischen Zytokinen in FF und weiteren IVF/ICSI-***

##### ***Parametern***

Im Folgenden werden Daten über die Anzahl gewonnener, fertilisierter und geteilter Oozyten, sowie Fertilisations- und Teilungsrate dargestellt, um Zusammenhänge der Zytokin-konzentrationen in präovulatorischer Follikelflüssigkeit mit der Oozytenqualität zu erörtern. Es wurden keine relevanten Korrelationen gefunden. Die folgende Tabelle zeigt die errechneten Korrelationskoeffizienten im Überblick.

Tab. 37: Korrelationen zwischen Zytokinkonzentrationen in FF und verschiedenen IVF/ICSI-Parametern

	LIF (FF)	VEGF (FF)	NO (FF)
Gewonnene Oozyten	0,056	-0,162	-0,046
Fertilisierte Oozyten	-0,020	-0,209	-0,094
Fertilisationsrate IVF	0,206	0,147	-0,012
Fertilisationsrate ICSI	-0,218	-0,155	-0,102
Geteilte Oozyten	-0,104	-0,071	-0,10
Teilungsrate	-0,067	0,251	0,031

#### ***4.9 Korrelation zwischen Zytokinen im Serum und weiteren IVF/ICSI-***

##### ***Parametern***

Auch die Serumkonzentrationen von LIF, VEGF und NO wurden mit den oben erwähnten Daten mit Bedeutung bezüglich Oozytenqualität verglichen. Es wurden keine statistisch signifikanten Korrelationen zu den Zytokinkonzentrationen gefunden. In der Tabelle sind die errechneten Ergebnisse dargestellt.

Tab. 38: Korrelationen zwischen Zytokinkonzentrationen im Serum und verschiedenen IVF/ICSI-Parameter

	LIF (S)	VEGF (S)	NO (S)
Gewonnene Oozyten	0,087	0,068	0,110
Fertilisierte Oozyten	0,267	0,094	0,188
Fertilisationsrate IVF	0,115	-0,079	0,376
Fertilisationsrate ICSI	0,414	0,132	0,030
Geteilte Oozyten	0,311	0,035	0,232
Teilungsrate	-0,069	-0,135	-0,083

#### ***4.10 Zusammenhang zwischen dem Eintritt einer Schwangerschaft und weiteren IVF/ICSI-Parametern***

Es wurde ebenfalls untersucht, ob ein statistisch relevanter Einfluss der bereits erwähnten Parameter auf den Erfolg der Reproduktionsmaßnahme bestand.

Tab. 39: Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahmen und verschiedenen IVF-/ICSI- Parametern

	schwanger	nicht schwanger	Gesamt	<i>p-Wert</i>
Anzahl der Patientinnen	19	56	75	
Alter der Patientinnen	33,4 ± 3,4	34,2 ± 5,0	34 ± 4,7	0,54
Gewonnene Oozyten	5,2 ± 3,9	6,6 ± 4,5	6,2 ± 4,4	0,22
Fertilisierte Oozyten	3,2 ± 1,4	3,9 ± 3,4	3,7 ± 3	0,34
Fertilisationsrate IVF	1,0 (n=5)	0,62 ± 0,3 (n=19)	0,70 ± 0,33 (n=24)	0,018#
Fertilisationsrate ICSI	0,66 ± 0,22 (n=14)	0,6 ± 0,33 (n=37)	0,62 ± 0,3 (n=51)	0,56
Geteilte Oozyten	1,95 ± 0,6	1,75 ± 0,9	1,8 ± 0,9	0,39
Teilungsrate	0,71 ± 0,26	0,62 ± 0,3	0,65 ± 0,29	0,27



Der Unterschied ( $p=0,018$ ) bezüglich Fertilisationsrate (IVF), nicht aber im Hinblick auf Teilungsrate ist nicht erklärbar. Ansonsten wurde kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden.

#### ***4.11 Zusammenhang zwischen Sterilitätsätiologie und weiteren IVF/ICSI-Parametern***

Auch zwischen den unterschiedlichen Diagnosen und den untersuchten IVF/ICSI-Parametern besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Tab. 40: Zusammenhang zwischen Sterilitätsursache und verschiedenen IVF-/ICSI-Parametern

	Tubare Sterilität (GI) n=17	Endometriose (GII) n=15	Androgen bedingte Sterilität (GIII) n=43	Gesamt n=75	Signifikanz (p-Wert)
Alter der Patientinnen	35,4 ± 4,7	34,2 ± 4,3	33,4 ± 4,8	34 ± 4,7	0,31
Gewonnene Oozyten	8,0 ± 5,3	5,0 ± 3,6	5,98 ± 4,1	6,2 ± 4,4	0,13
Fertilisierte Oozyten	4,7 ± 3,7	3,7 ± 3,1	3,4 ± 2,7	3,7 ± 3	0,29
Fertilisationsrate IVF	0,64 ± 0,29 (n=10)	0,81 ± 0,31 (n=10)	0,60 ± 0,45 (n=4)	0,70 ± 0,33 (n=24)	0,42
Fertilisationsrate ICSI	0,59 ± 0,23 (n=7)	0,77 ± 0,24 (n=5)	0,60 ± 0,32 (n=39)	0,62 ± 0,3 (n=51)	0,49
Geteilte Oozyten	2,0 ± 0,8	1,9 ± 0,9	1,7 ± 0,9	1,8 ± 0,9	0,33
Teilungsrate	0,60 ± 0,31	0,69 ± 0,29	0,65 ± 0,28	0,65 ± 0,29	0,73
Schwangerschaften	3	7	9	19	
Schwangerschaftsrate (%)	17,6	46,7	20,9	25,3	0,19*

\* Chi-Quadrat

Definition der prozentualen Raten:

Fertilisationsrate (ICSI) = fertilisierte Oozyten / injizierte Oozyten

Fertilisationsrate (IVF) = fertilisierte Oozyten / gewonnene Oozyten

Teilungsrate = geteilte Oozyten / fertilisierte Oozyten

Schwangerschaftsrate = Schwangere pro Gruppe / Anzahl der Gruppenmitglieder



### ***5.1 Nachweis von LIF, VEGF und NO in Follikelflüssigkeit und Serum***

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die präovulatorische Follikelflüssigkeit und das Serum von 75 Patientinnen, die sich einer Behandlung zur In-vitro- Fertilisation unterzogen, auf das Vorhandensein von LIF, VEGF und NO untersucht, um Rückschlüsse auf den Ort der Synthese dieser Faktoren ziehen zu können.

#### **5.1.1 Nachweis von Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) und Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen**

Bei allen 75 Patientinnen konnte LIF in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. Dieses Resultat stimmt überein mit dem von Arici et al. (1997), die LIF ebenfalls in der Follikelflüssigkeit von Frauen, die sich im Rahmen einer In- Vitro- Fertilisation einer ovariellen Stimulation unterzogen, nachweisen konnten. Sie postulierten, dass LIF einen Einfluss auf die frühen Prozesse der Reproduktion nehmen und ein wichtiger Modulator der ovariellen Funktionen sein könnte. Auch den Arbeitsgruppen um Ozornek et al. (1999) und Lédée-Bataille et al. (2001) gelang der Nachweis von LIF in Follikelflüssigkeit. Zellen des menschlichen Ovars sind offensichtlich in der Lage, LIF zu produzieren (Loukides et al., 1990). So beobachteten Arici et al. (1997), dass LIF- mRNA von Granulosazellen exprimiert wird. Aber auch Makrophagen und Monozyten, die 5 -15% des ovariellen Gewebes ausmachen (Loukides et al., 1990), könnten eine potentielle Quelle für LIF in Ovar darstellen (Arici et al., 1997).

Coskun et al. (1998) demonstrierten, dass die LIF- Konzentrationen in Follikeln in der Zeit vor dem Eisprung deutlich höher waren als die in unreifen Follikeln. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass die LIF-Produktion im Follikel während der Reifung der Eizelle unterschiedlich reguliert wird.

Bei der vorliegenden Arbeit konnten bei 33 von 75 Patientinnen LIF im Serum nachgewiesen werden. Die Serumkonzentrationen ( $3,3 \text{ pg/ml} \pm 2,4 \text{ pg/ml}$ ) lagen statistisch signifikant unter denen von LIF in der Follikelflüssigkeit ( $47,2 \text{ pg/ml} \pm 20,7 \text{ pg/ml}$ ). Diese Konzentrationsunterschiede zwischen LIF im Serum und LIF in der Follikelflüssigkeit lassen darauf schließen, dass das menschliche Ovar einen bedeutsamen Produktionsort für den

Faktor darstellt. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem von Arici et al. (1997), die ebenfalls im Serum deutlich geringere LIF-Spiegel als in Follikelflüssigkeit nachweisen konnten. Die Verfälschung der Messergebnisse des LIF-Spiegels in Follikelflüssigkeit durch eventuelle Kontamination mit Blut bei der Aspiration der Flüssigkeit kann durch die niedrigen Konzentrationen von LIF im Serum weitgehend ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Frauen und der LIF- Konzentration erkannt werden ( $p=0,88$ ).

### **5.1.2 Nachweis von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen**

In allen Follikelflüssigkeiten und Seren, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, konnte das Vorhandensein von VEGF bestätigt werden. Ravindranath et al. (1992) gelang es bereits, mRNA von VEGF im menschlichen Ovar nachzuweisen. Es wird vermutet, dass die Aufgabe von VEGF dort unter anderem darin besteht, die Angiogenese und somit das Wachstum des dominanten Follikels zu fördern (Berisha et al., 2000). So wäre VEGF in die Selektion des Follikels, der das höchste Potenzial der Teilung und der Implantation nach einer Befruchtung besitzt, involviert. Auch bei der Implantation der befruchteten Eizelle scheint VEGF eine Rolle zu spielen (Hyder et al., 1999).

VEGF wird im Ovar sowohl von Thekazellen als auch von Granulosazellen produziert (Kamat et al., 1995). Auch ortsständige Makrophagen im ovariellen Gewebe sind in der Lage, VEGF aktiv in die Follikelflüssigkeit zu sezernieren (Balasch et al., 2004).

Die VEGF-Spiegel in der Follikelflüssigkeit der Patientinnen in der vorliegenden Studie waren alle signifikant höher ( $3370,6 \pm 895,8$  pg/ml) als die im Serum ( $370,8$  pg/ml  $\pm 175,7$  pg/ml) gemessenen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen vorausgegangener Arbeiten überein, in denen ebenfalls hohe Konzentrationsunterschieden zwischen VEGF in Follikelflüssigkeit und im Serum gemessen wurden (Moncayo et al., 1998; Balasch et al., 2004). Die Resultate bestätigen die Hypothese, dass VEGF lokal im menschlichen Ovar produziert wird.

Friedman et al. (1997) stellten fest, dass in der Follikelflüssigkeit von Frauen im fortgeschrittenen Alter höhere VEGF- Konzentrationen zu finden waren als in den Follikelflüs-

sigkeiten von deutlich jüngeren Patientinnen. Manau et al. (2000) konnten ebenfalls eine positive Korrelation zwischen dem Alter der Frauen und der VEGF- Konzentration in der untersuchten Follikelflüssigkeit nachweisen. VEGF wird als Reaktion auf eine Hypoxie vermehrt produziert (Marti et al., 1998). Friedmann et al. (1997) schlussfolgerten, dass die erhöhten VEGF-Spiegel durch eine verminderte Sauerstoffversorgung der Follikel der älteren Frauen zustande gekommen waren. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse einer Studie von Kim et al (2004), in der keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Patientinnen und der VEGF- Konzentration in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Van Blerkom et al. (1997) untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffgehalt der Follikel und der Qualität der entnommenen Eizellen. Sie stellten eine erhöhte Rate an Abnormitäten an den Chromosomen der Eizellen fest, die sich unter sauerstoffarmen Bedingungen entwickelt hatten. Inwiefern die folliculäre VEGF- Konzentrationen mit der Vaskularisation, der Sauerstoffversorgung und den daraus entstehenden Abnormitäten der Eizellen zusammenhängt, muss in weiteren Studien abgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Alter der teilnehmenden Patientinnen und der VEGF- Konzentration im Serum und der Follikelflüssigkeit gesucht. Die VEGF- Werte in der Follikelflüssigkeit waren mit fortgeschrittenem Alter der Frauen etwas erhöht, es konnte allerdings keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden ( $p=0,052$ ).

### **5.1.3 Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) und Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen**

NO war in den Follikelflüssigkeiten aller an der vorliegenden Studie teilnehmenden Patientinnen vorhanden. In früheren Arbeiten wurden von Kim et al. (2004) und Manau et al. (2000) ebenfalls NO in Follikelflüssigkeit nachgewiesen. Van Vooris et al. (1994) zeigten bereits, dass NO von Granulosazellen produziert wird. Die Synthese des Faktors steigt dort vermutlich proportional zu der Entwicklung der Eizelle an (Rosselli et al., 1994).

Die Serumproben der Patientinnen der vorliegenden Studie wurden ebenfalls auf das Vorhandensein von NO untersucht. Bei allen Frauen konnte NO im Serum nachgewiesen werden. Nur in der Gruppe der nicht schwanger gewordenen Frauen lagen die NO- Kon-

zentrationen im Serum mit statistischer Signifikanz unter denen in der Follikelflüssigkeit. In den Seren der schwanger gewordenen Frauen konnten nur leicht erniedrigte NO- Spiegel im Vergleich zu denen in der Follikelflüssigkeit gemessen werden. In einer Studie von Manau et al. (2000) lagen die Konzentrationen von NO im Serum der Teilnehmerinnen auch nur wenig unter denen von NO in der untersuchten Follikelflüssigkeit. Die hohe Instabilität und die extrem kurze Halbwertszeit von NO erschweren die Bestimmung des genauen Ortes der Synthese des nachgewiesenen NO.

Auch mit dem Alter der Frauen konnte hinsichtlich der NO-Konzentration kein Zusammenhang festgestellt werden ( $p=0,84$ ), was den Ergebnissen vorausgegangener Arbeiten entspricht (Kim et al., 2004; Manau et al., 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass die NO-Konzentration in der Follikelflüssigkeit nicht das Alter der Frauen und somit eine eventuelle Hypoxie der Follikel widerspiegelt.

Weder im Serum noch in der Follikelflüssigkeit zeigten die untersuchten Zytokine Korrelationen untereinander (s. Tab 33; 34) Die Produktion der Faktoren wird demnach vermutlich nicht durch gegenseitige Regulationsmechanismen beeinflusst.

## ***5.2 Zusammenhang zwischen Sterilitätsursache und der Konzentration der Faktoren in der Follikelflüssigkeit/ im Serum***

Ein weiteres Ziel der dieser Untersuchung war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Ätiologie der Kinderlosigkeit der teilnehmenden Patientinnen und den jeweiligen Konzentrationen von LIF, VEGF und NO in deren Follikelflüssigkeit beziehungsweise Serum zu erkennen. Dazu wurde das Patientenkollektiv je nach Sterilitätsursache in drei Gruppen eingeteilt; Frauen mit tubarer Sterilität wurden Gruppe I zugeordnet, Endometriose- Patientinnen der Gruppe II und die Frauen, bei denen die Kinderlosigkeit durch männliche Infertilität kam, bildeten Gruppe III.

Die tubare Sterilität ist meist durch den Verschluss einer oder beider Eileiter charakterisiert, wobei die häufigste Ursache dafür in einer vorausgegangenen Entzündung der Tuben liegt (Mardh, 2004).

Bei der Endometriose handelt es sich um eine Erkrankung, die relativ häufig Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter betrifft. So konnte die Diagnose der Endometriose in einer Untersuchung an Frauen, die über Jahre hinweg ungewollt kinderlos geblieben waren, bei über der Hälfte der Patientinnen gestellt werden (Iwabe et al., 2002). Die Endometriose ist gekennzeichnet durch das Wachstum von Gebärmutter Schleimhaut außerhalb des Uterus (Lima et al., 2006). Im fortgeschrittenem Stadium verursachen die Endometrioseherde wohl Vernarbungen der anatomischen Strukturen im weiblichen Becken und führen beispielsweise über eine verminderte Beweglichkeit der Eileiter zur Sterilität (Witz et al., 2002). Inwiefern die Endometriose im frühen Stadium allerdings zur Unfruchtbarkeit führen kann, wird kontrovers diskutiert. Es wird vermutet, dass die Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen Faktoren, beispielsweise Zytokine, enthält, die letztendlich zur Unfruchtbarkeit führen könnten (Syrop et al., 1987).

Es ist bekannt, dass LIF im Endometrium der Frau exprimiert wird und dort wahrscheinlich eine bedeutsame Rolle während der embryonalen Implantation spielt (Cullinan et al., 1996). Gerade der Vorgang der Implantation scheint besonders häufig bei Patientinnen mit Endometriose gestört zu sein, da die Implantationsraten bei diesen Frauen deutlich erniedrigt sind (Arici et al., 1996). Hambartsoumian et al. (1998) stellten bereits fest, dass LIF im Endometrium von unfruchtbaren Frauen in geringeren Mengen vorhanden ist als bei gesunden Frauen. Diese Tatsachen lassen vermuten, dass LIF an der Sterilität bei Endometriose-Patientinnen eventuell über eine Verminderung der Rezeptivität des Uterus beteiligt ist. Diese These wird gestützt von Ergebnissen von Illera et al. (2000), die bei Mäusen, denen Peritonealflüssigkeit von Frauen mit pelviner Endometriose injiziert wurde, eine Herabsetzung der Implantationsrate beobachten konnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der LIF-Konzentration in der Follikelflüssigkeit oder im Serum und der Sterilitätsursache gesehen werden (vgl. Tabelle 24 und 27). Das lässt darauf schließen, dass LIF weder an der Pathogenese der tubaren Sterilität noch an der Endometriose beteiligt ist. Ähnliche Ergebnisse erhielten Mikolajczyk et al. (2006), die die Gebärmutterflüssigkeit von infertilen Endometriose-Patientinnen mit der von gesunden fruchtbaren Frauen verglichen. Auch sie konnten keine



signifikanten Konzentrationsunterschiede von LIF zwischen den beiden Gruppen feststellen.

Akute Endometriose ist durch eine vermehrte Vaskularisation des extrauterinen Herdes und seiner Umgebung charakterisiert (Nisolle et al., 1993). VEGF wurde im menschlichen Endometrium nachgewiesen und ist dort sowohl in die physiologische als auch in die pathologische Angiogenese involviert (Charnock- Jones et al., 1993). Der Faktor könnte somit eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression der Endometriose spielen.

In der vorliegenden Studie wurden die VEGF- Konzentrationen der Frauen, die hinsichtlich verschiedener Sterilitätsursachen in Gruppen eingeteilt wurden, im Serum und in der Follikelflüssigkeit verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten von Frauen mit Endometriose, tubarer Sterilität oder ohne erkennbare Sterilitätsursache beobachtet werden (vgl. Tabelle 25 und 28). Auch in einer Untersuchung von Gagné et al. (2003) unterschieden sich die VEGF- Konzentrationen im Serum von betroffenen Frauen nicht signifikant von denen ohne Endometriose. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Garrido et al. (2000), die verminderte VEGF-Spiegel in der Follikelflüssigkeit von Endometriose- Patientinnen nachweisen konnten. In der Peritonealflüssigkeit der Frauen konnten sie jedoch deutlich höhere Konzentrationen des Faktors als bei gesunden Frauen feststellen. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch eine Untersuchung von McLaren et al. (1996), bei der ebenfalls erhöhte VEGF- Werte in Peritonealflüssigkeit gemessen werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der NO- Konzentration in der Follikelflüssigkeit oder im Serum und der Sterilitätsursache beobachtet werden (vgl. Tabelle 26 und 29). Auch die Arbeitsgruppe von Kim et al. (2004) konnte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den follikulären NO-Konzentrationen von Frauen mit tubarer Sterilität und Frauen ohne erkennbare Infertilitätsursache nachweisen. In Kontrast dazu stehen die Ergebnisse einer Studie von Lee et al. (2000), denen es gelang, deutlich erhöhte NO-Spiegel in der Follikelflüssigkeit von Endometriose- Patientinnen nachzuweisen. Sie mutmaßten, dass die NO-Produktion im Follikel und folglich auch die Qualität der Eizelle von Infertilität verursachenden Erkrankungen beeinflusst wird. Osborn et al. (2002) berichteten von signifikant erhöhten NO- Konzentrationen in der Peritonealflüs-

sigkeit von an Endometriose leidenden Frauen. Auch im Endometrium selbst konnten bei erkrankten Frauen höhere NO- Werte gemessen werden als bei gesunden (Wu et al., 2003). Zu diesen hohen NO- Konzentrationen tragen eventuell auch peritoneale Makrophagen bei, die in Frauen mit Endometriose eine gesteigerte Aktivität aufweisen (Halme et al., 1983).

In der vorliegenden Untersuchung wurden schließlich die Sterilitätsursachen mit den jeweiligen Fertilisationsraten beziehungsweise den Schwangerschaftsraten in Verbindung gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieser Parameter zwischen den verschiedenen Gruppen erkannt werden (vgl. Tabelle 40). Daraus lässt sich folgern, dass die Sterilitätsätiologie keine Auswirkung auf das Ergebnis der assistierten Reproduktionsmaßnahme nimmt. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Al- Azemi et al. (2000), die zwar eine herabgesetzte Stimulationsfähigkeit des Ovars bei Endometriose- Patientinnen feststellten, aber von unverändert hohen Schwangerschaftsraten im Vergleich zu Frauen mit tubarer Sterilität berichteten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Barnhart et al. (2002), die in ihrer Studie deutlich verminderte Schwangerschaftsraten bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu Frauen mit tubarer Sterilität beobachteten. Sowohl die Fertilisationsrate als auch die Implantationsrate waren deutlich verringert. Auch Omland et al. (2005) berichteten von erfolgreicherer IVF- Behandlungen bei Frauen, die ohne erkennbare Ursache kinderlos geblieben waren, als bei Patientinnen mit diagnostizierter Endometriose oder tubarer Sterilität.

Inwiefern die Sterilitätsursache als Prognoseparameter für den Erfolg einer IVF/ICSI- Behandlung genutzt werden kann, bleibt in weiteren Studien abzuklären.

### ***5.3 Zusammenhang zwischen dem Stimulationsprotokoll und der Konzentration der Faktoren in der Follikelflüssigkeit/ im Serum***

Die herkömmlichen Protokolle zur ovariellen Stimulation zielen darauf ab, das Wachstum zahlreicher Follikel zu fördern und somit für den späteren Transfer in den Uterus mehrere befruchtete Eizellen zur Verfügung zu stellen (Templeton et al., 1998). Während dieser hormonellen Behandlung unterliegt die Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit gewissen Schwankungen, da die einzelnen Zellen des Follikels auf die angewandten Hormone jeweils

individuell mit der Sekretion von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen reagieren (Mendoza et al., 2002). Demzufolge ist es möglich, dass die Konzentrationen gewisser Zytokine im präovulatorischem Follikel je nach verwendetem Stimulationsprotokoll variieren. Obwohl Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) starken regulatorischen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung von Follikeln und Eizellen nehmen, sind ihre Wirkungsmechanismen abhängig von anderen Faktoren im Ovar, wie zum Beispiel von Zytokinen (Richards et al., 2002). Auch Steroidhormone, die lokal im Ovar produziert werden, sind in die Follikulogenese involviert (Billig et al., 1993). In diesem Zusammenhang wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, die zum Ziel hatten, mögliche Interaktionen zwischen Gonadotropinen, Zytokinen und Steroidhormonen zu erkennen und zu interpretieren (Büscher et al., 1999; Mendoza et al., 1999).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Einflüsse der angewandten hormonellen Stimulationsverfahren im Rahmen einer IVF/ ICSI auf die Konzentrationen von LIF, VEGF und NO in Follikelflüssigkeit beziehungsweise im Serum untersucht. Dabei wurden die Patientinnen in drei Gruppen eingeteilt; in einer Gruppe wurden die Patientinnen mit FSH stimuliert (Gruppe I), in einer mit HMG, (Gruppe II) und in der dritten mit einer Kombination aus FSH und HMG (Gruppe III).

Betrachtet man die Konzentrationen von LIF im Serum und in der Follikelflüssigkeit in den verschiedenen Stimulationsgruppen, so kann man keine bemerkenswerten Unterschiede erkennen.(vgl. Tabelle 18 und 15) Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Hormone, die im Rahmen der Behandlung zur künstlichen Fertilisation verabreicht werden, keinerlei Einfluss auf die Produktion von LIF nehmen. Im menschlichen Endometrium wird LIF zyklusabhängig exprimiert, die höchsten Konzentrationen konnten in der progesterondominierten Sekretionsphase gemessen werden (Arici et al., 1995). Im Unterschied dazu konnten Habartsoumian et al. (1998) nachweisen, dass die Gabe von Progesteron in vivo als auch in vitro die Produktion von LIF in Endometriumzellen herabsetzte. Allerdings wurden in dieser Studie ausnahmslos Frauen untersucht, bei denen die Ovarien eigenständig keine Hormone produzieren konnten. Somit kommt die Vermutung auf, dass bei fertilen Frauen noch andere Faktoren die LIF- Produktion im Endometrium beeinflussen. Arici et al. (1997) zeigten in einer Untersuchung, dass die Gabe von HCG die Konzentratio-

nen von LIF in Follikelflüssigkeit signifikant erhöhte. Dieser Fakt wurde als Hinweis darauf gedeutet, dass LIF in die Abläufe, die den Eisprung vorbereiten und auslösen, integriert ist.

Betrachtet man die Konzentrationen von VEGF in Follikelflüssigkeit, so erkennt man signifikante Unterschiede zwischen den drei Stimulationsgruppen (vgl. Tabelle 16). Die höchsten VEGF-Spiegel wurden bei den Frauen, die mit einer Kombination aus FSH und HMG behandelt worden waren, gemessen. Dabei resultiert ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der mit FSH und der mit FSH/ HMG behandelten Frauen ( $p=0,042$ ). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass FSH und HMG in ihrer Kombination synergistisch wirken und die größten Auswirkungen auf die lokale Produktion von LIF im Follikel haben. Im Serum der Patientinnen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der LIF- Werte zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die VEGF- Produktion nach FSH/ HMG- Gabe vor allem im Follikel relativ ansteigt. Diese Ergebnisse stehen teilweise im Einklang mit denen der Arbeitsgruppe um Artini et al. (1998). In dieser Studie konnte eine positive Korrelation zwischen den VEGF-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit und der Menge an zuvor verabreichtem FSH nachgewiesen werden. Die VEGF-Spiegel im Plasma stiegen nach der Gabe von hCG statistisch signifikant an. Artini et al. (1998) folgerten daraus, dass FSH eine wichtige Rolle in der hCG- abhängigen VEGF- Produktion innehat. Die Auswirkungen von HMG auf die Synthese von VEGF wurden in dieser Studie nicht untersucht. Der Zusammenhang zwischen der VEGF- Konzentration in Follikelflüssigkeit und der Menge an verabreichtem FSH im Rahmen einer künstlichen Fertilisation konnte in einer Studie von Manau et al. (2002) bestätigt werden. Licht et al. (2001) zeigten, dass die VEGF- Konzentrationen nach der Gabe von Gonadotropinen auch im Serum der Patientinnen anstiegen.

Die VEGF- Produktion in Granulosazellen ist demzufolge reguliert von Gonadotropinen und steigt nach Gabe von FSH (Agrawal et al., 2002). Auch das Luteinisierende Hormon LH und das Humane Chorion- Gonadotropin sind in der Lage, die VEGF- Produktion im Follikel im gleichen Maße wie durch FSH ansteigen zu lassen (Christenson und Stouffer, 1997).

Auch die NO- Konzentrationen wurden in der vorliegenden Arbeit bezüglich der angewandten Hormonbehandlung verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Stimulationsgruppen erkannt werden (vgl. Tabelle 17 und 20). Die verschiedenen hormonellen Behandlungen zeigten also keine Unterschiede in ihrer Auswirkung auf die NO- Konzentrationen im Follikel oder im Serum. Dies führt zu der Frage, inwieweit die Produktion von NO vor allem im weiblichen Reproduktionstrakt über Gonadotropine geregelt wird. Hattori et al.(2000) vermuteten, dass die Produktion von NO in der Eizelle über FSH inhibiert werden könnte. Manau et al. (2000) zeigten in einer Untersuchung, dass die NO-Spiegel in Follikelflüssigkeit nicht mit der Höhe der vor der Follikelentnahme verabreichten FSH- Menge korrelierten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer Studie von Takesue et al. (2001), in der nachgewiesen werden konnte, dass NO in Granulosazellen nach FSH- Gabe vermehrt ausgeschüttet wird. Diese Tatsache steht im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Studie, bei der lediglich in der Gruppe der mit FSH behandelten Frauen eine signifikant höhere Konzentration von NO in der Follikelflüssigkeit als im Serum nachgewiesen werden konnte. Dies könnte als Hinweis auf die FSH- abhängige NO- Produktion der menschlichen Granulosazelle ausgelegt werden. Allerdings berichteten Ekerhovd et al. (2001), dass die NO- Konzentrationen durch die Zufuhr von exogenem FSH auch im Blutplasma deutlich anstiegen.

#### ***5.4 Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme und der Konzentration der Faktoren in der Follikelflüssigkeit/ im Serum***

Die Follikelflüssigkeit stellt die nächste Umgebung für die Eizelle dar und stellt Faktoren für ihre Entwicklung und ihren Wachstum bereit. Somit beeinflussen die Inhaltstoffe der Follikelflüssigkeit und ihre Zusammensetzung auch indirekt die Befruchtung der Eizelle und die frühe Entwicklung des Embryos (Vujisic et al., 2005).

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es somit, zu überprüfen, ob LIF, VEGF oder NO einen Einfluss auf die Fertilität der Patientinnen nehmen und somit als Prognoseparameter für eine IVF/ ICSI dienen können. Dazu wurden die teilnehmenden Frauen in zwei Gruppen A = Schwanger und B = Nicht-Schwanger eingeteilt und die jeweiligen untersuchten

Faktoren in der Follikelflüssigkeit beziehungsweise im Serum mit dem Ergebnis der assistierten Reproduktionsmaßnahme in Zusammenhang gesetzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den LIF-Konzentrationen im Serum ( $p=0,341$ ) beziehungsweise in der Follikelflüssigkeit ( $p=0,367$ ) der Patientinnen und dem Ergebnis der durchgeführten Reproduktionsmaßnahme festgestellt werden. Allerdings wiesen die Frauen, bei denen die Behandlung in einer Schwangerschaft resultierte, etwas höhere LIF- Spiegel auf als diese, die nicht schwanger wurden. Die höheren Konzentrationen konnten sowohl in der Follikelflüssigkeit als auch im Serum der Frauen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen denen bereits durchgeführter Studien, wo ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den LIF-Konzentrationen in den Follikelflüssigkeit von Frauen die schwanger geworden waren und den LIF- Konzentrationen der nicht schwanger gewordenen Frauen festgestellt werden konnte (Ozornek et al., 1999). Auch zwischen den LIF- Spiegeln im Serum und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme konnte bei Thum et al. (2006) keine signifikante Korrelation erkannt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass LIF im Serum und in der präovulatorischen Follikelflüssigkeit von Frauen nicht als Prognoseparameter für den Erfolg einer IVF oder ICSI genutzt werden kann. Ein anderes Ergebnis hinsichtlich der Verwendung von LIF als prognostischer Marker konnte allerdings erzielt werden, indem man die LIF- Konzentrationen im Uterussektret infertiler Frauen untersuchte: Lédée- Bataille et al. (2002) stellten fest, dass die Spiegel des Wachstumsfaktors im Uterus der Frauen, die nach einer assistierten Reproduktionsmaßnahme schwanger wurden, deutlich niedriger waren als die LIF- Spiegel bei denen, bei denen die Behandlung erfolglos blieb. Arici et al. (1997) beschrieben eine positive Korrelation der LIF- Konzentrationen in Follikelflüssigkeit mit der Qualität der später eingesetzten Embryonen. Hsieh et al. (2005) konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen; sie erkannten keinen Zusammenhang zwischen LIF und der Anzahl oder der Qualität der Eizellen. Auch in der vorliegenden Arbeit sind die Konzentrationen von LIF nicht mit der Anzahl der entnommenen Oozyten assoziiert (s. Tab 38) Es ist bekannt, dass LIF maßgeblich in reproduktive Prozesse eingebunden ist. So zeigten Stewart et al. (1992), dass Mäuse, die kein LIF produzieren konnten, auch nicht in der Lage waren, schwanger zu werden. LIF konnte im Uterus von fertilen Frauen zur voraussichtlichen Implantationszeitpunkt nachgewiesen werden (Laird et al., 1997). Die LIF- Konzent-

rationen im Uterus von unfruchtbaren Frauen waren im Vergleich dazu deutlich erniedrigt (Laird et al., 1997). Die Zugabe von rekombinantem LIF in das Medium von Embryonen vor dem Versuch der Implantation in den Uterus konnte die Rate der resultierenden Schwangerschaften deutlich erhöhen (Fry et al., 1992). LIF gilt folglich als embryotropher Faktor, dem eine Schlüsselrolle bei der Implantation der Eizelle in den Uterus zukommt (Arici et al., 1997).

Auch wenn LIF nicht als Prognoseparameter in der assistierten Reproduktion genutzt werden kann, ist die Bedeutung des Faktors für die menschliche Fortpflanzung gesichert und seine genauen Wirkungsmechanismen werden in weiteren Studien untersucht werden müssen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die VEGF-Spiegel im Serum und der Follikelflüssigkeit mit dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahmen in Zusammenhang gesetzt. Die VEGF-Konzentrationen sowohl in der Follikelflüssigkeit als auch im Serum waren bei den Frauen, bei denen eine Schwangerschaft diagnostiziert werden konnte, erniedrigt. Es konnte allerdings keine statistisch relevante Korrelation erkannt werden ( $p=0,183$ ;  $p=0,97$ ). Dieses Ergebnis entspricht dem von Manau et al. (2000), die ebenfalls weder zwischen den Serum- noch den Follikelflüssigkeitskonzentrationen von VEGF und dem Resultat der künstlichen Befruchtung einen signifikanten Zusammenhang feststellen konnten. Auch die Studien von Kim et al. (2004) und Benifla et al. (2001) stehen im Einklang mit diesen Ergebnissen. Diese Resultate führen zu der Vermutung, dass VEGF nicht im Zusammenhang mit dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme steht und keinen Einfluss auf die Entwicklung der Eizelle, die Befruchtung oder die Implantation nimmt. Im Widerspruch dazu stehen allerdings die Ergebnisse vieler anderer Arbeitsgruppen. So gelang es Friedmann et al. (1997), signifikant erhöhte VEGF-Spiegel in der Follikelflüssigkeit bei den Frauen, bei denen keine klinische Schwangerschaft erfolgte, nachzuweisen. Asamikpoulus et al. (2005) konnten bei einer Studie, bei der sich Frauen wegen Infertilität des Partners einer ICSI- Behandlung unterzogen, ebenfalls signifikant erhöhte VEGF- Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit der nicht schwanger gewordenen Patientinnen messen. Sie postulierten demnach, dass hohe VEGF-Spiegel einen prognostischen Marker für das Nichteintreten einer Schwangerschaft darstellen könnten. Ocal et al. (2004) wiesen auch im Serum signifikant erniedrigte

VEGF- Konzentrationen bei den Frauen nach, bei denen eine IVF- Behandlung in einer Schwangerschaft resultierte. Erhöhte VEGF-Spiegel können bekannterweise Ausdruck einer Hypoxie sein (Shweiki et al., 1992). Auch mit dem Syndrom der ovariellen Hyperstimulation, das mit erhöhten Raten von Fehlgeburten und risikoreichen Mehrlingsschwangerschaften einhergeht (Papanikolaou et al., 2004) scheint VEGF in Zusammenhang zu stehen. Das Syndrom geht mit einer erhöhten Permeabilität der Kapillaren einher, für die teilweise VEGF verantwortlich zu sein scheint (Levin et al., 1998). Ludwig et al. (1999) zeigten, dass das freie VEGF im Serum der Patienten, die später ein OHSS entwickelten, zu bestimmten Zeitpunkten der IVF-/ICSI-Behandlung signifikant erhöht war. In der Follikelflüssigkeit dagegen scheint der Faktor im Falle der Entwicklung eines OHSS erniedrigt zu sein (Pellicer et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnten Artini et al. (2002) keinen Zusammenhang zwischen den VEGF- Konzentrationen in Follikelflüssigkeit und der Entwicklung eines OHSS erkennen.

Die Rolle von VEGF im weiblichen Reproduktionstrakt scheint von großer Bedeutung zu sein. Ob dem Faktor allerdings eine Bedeutung als Prognoseparameter für den Erfolg einer assistierten Reproduktionsmaßnahme zukommen wird, muss in weiteren Studien geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die NO- Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit in Zusammenhang mit den Resultaten des Versuchs, eine Schwangerschaft zu erzeugen, gesetzt. Es konnten jeweils keine erkennbaren Unterschiede zwischen den NO- Werten im Serum ( $p=0,628$ ) und in der Follikelflüssigkeit ( $p=0,501$ ) bei den schwanger und den nicht schwanger gewordenen Frauen gemessen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen vorausgegangener Studien, in denen ebenfalls kein Zusammenhang zwischen NO und dem Ausgang der Reproduktionsmaßnahme nachgewiesen werden konnte (Manau et al., 2000; Kim et al., 2004). Daraus könnte geschlossen werden, dass die NO keine Auswirkungen auf den Verlauf einer IVF/ ICSI- Behandlung hat und eventuell auch keine Rolle in der Entwicklung und dem Wachstum des Follikels spielt. Gegen diese Vermutung sprechen jedoch eine Vielzahl von Untersuchungen, in denen die Bedeutung von NO für die Reproduktionsphysiologie erforscht wurde. Ekerhovd et al. (2001) wiesen erhöhte NO- Konzentrationen im Plasma zum Zeitpunkt des Eisprungs nach und schluss-



folgerten, dass NO in die spontane Ovulation involviert sein könnte. Auch als Modulator der Steroidgenese im Ovar scheint NO eine Rolle zu spielen (Vega et al., 1998). Wie VEGF gilt NO im Ovar als Indikator für eine Hypoxie (Roselli et al., 1998). Barroso et al. (1999) konnten dementsprechend eine negative Korrelation zwischen der NO- Konzentration in der Follikelflüssigkeit und der späteren embryonalen Entwicklung nachweisen. Anteby et al. (1996) stellten in einer Studie fest, dass die NO- Spiegel im Follikel mit der Größe desselben korrelierten. Sie vermuteten, dass NO im Follikel über eine Vasodilatation der ovariellen Gefäße das Wachstum der Eizelle induzieren könnte. In derselben Untersuchung konnte auch eine negative Korrelation zwischen den Parametern des ovariellen Blutflusses und der follikulären NO- Konzentration nachgewiesen werden, was ebenfalls als Hinweis auf eine NO- induzierte Gefäßerweiterung gedeutet wurde. Rosselli et al. (1994) erkannten einen Zusammenhang zwischen der NO- Konzentration im Serum und dem Entwicklungsstand der Follikel. Dies deutet auf eine Rolle von NO in der Follikulogenese hin. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Kim et al (2004), die von einer negativen Korrelation zwischen NO und der Follikelgröße berichteten. In einer weiteren Studie wurde einer Gruppe von Patientinnen L- Arginin, die Vorstufe von NO, oral zugeführt. Die so behandelten Frauen entwickelten zwar mehr Follikel, die zur Entnahme zur Verfügung standen, wiesen aber statistisch signifikant niedrigere Schwangerschaftsraten auf als die Frauen in der mit Placebo behandelten Kontrollgruppe (Battaglia et al., 2002).

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Resultate könnte in der Tatsache liegen, dass es sich bei NO um ein sehr labiles Gas mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden handelt, was die Messung erschwert und verfälschen kann.

Es wurde vermutet, dass NO auch in der Pathogenese des Ovariellen Hyperstimulationsyndroms eine Rolle spielt, indem es über eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität einen vermehrten Flüssigkeitsaustritt in den extravasalen Raum ermöglicht. Allerdings konnten die Arbeitsgruppen von Manau et al. (1998) und von Ekerhovd et al. (2001) keinen Zusammenhang zwischen den NO- Konzentrationen im Plasma und der Entwicklung eines OHSS erkennen. Somit ist es unwahrscheinlich, wenn auch nicht ausgeschlossen, dass NO in die Entstehung eines OHSS involviert ist.

Erwähnenswert ist allerdings die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie nur in der Gruppe der nicht schwanger gewordenen Frauen die follikuläre Konzentration von NO signifikant höher war als die im Serum. Die Relation von ovariellem zu zirkulierendem NO könnte somit einen Parameter darstellen, der die Erfolgssausichten einer assistierten Reproduktionsmaßnahme widerspiegelt.

### ***5.5 Schlussfolgerung***

In der vorliegenden Arbeit konnte in allen untersuchten Follikelflüssigkeits- und Serumproben der Nachweis von LIF, VEGF und NO erbracht werden.

Bei Patientinnen, die mit der Kombination aus FSH und HMG im Rahmen des Stimulationsprotokolles behandelt wurden, zeigten sich statistisch signifikant erhöhte VEGF-Konzentrationen in den Follikelflüssigkeitsproben als bei den Frauen, die ausschließlich FSH erhielten. Dies weist darauf hin, dass LH und FSH synergistisch wirken und so die Syntheserate von VEGF im Follikel steigern.

Zwischen den anderen untersuchten Faktoren und dem Stimulationsprogramm konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Auch auf die untersuchten Parameter der IVF/ICSI-Behandlung hatte die Stimulationsart keine Auswirkungen.

Kein Zusammenhang zeigte sich zwischen der diagnostizierten Sterilitätsursache und den Zytokinkonzentrationen im Serum oder der Follikelflüssigkeit. Auch bezüglich des Ergebnisses der IVF/ICSI-Behandlung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen erkannt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die untersuchten Faktoren weder als prognostische noch als diagnostische Parameter für die assistierte Reproduktionsmedizin genutzt werden können. Die Sterilitätsursache und die weiteren untersuchten klinischen Daten des Fertilisationsprogrammes ließen keine Zusammenhänge erkennen.

Es wurden allerdings tendenzielle Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen hinsichtlich des Ergebnisses der assistierten Fertilisation beobachtet. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Faktoren die Entwicklung der Eizelle, die Implantation und somit das Eintreten einer Schwangerschaft beeinflussen.

Die Komplexität der weiblichen Reproduktionsphysiologie ist seit langem Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Inwiefern Zytokine eine Rolle darin spielen und welche Bedeutung sie für die assistierte Reproduktionsmedizin haben könnten, muss in weiteren Studien endgültig geklärt werden.



**Adashi EY**

Endocrinology of the ovary

*Hum Reprod* 1994; 9(5): 815-827

**Agrawal A, Sldkevicius P, Engmann L, Conway GS, Payne NN, Bekis J, Tan SL, Campbell S, Jacobs HS**

Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries

*Hum Reprod* 1998; 13(3): 651-655

**Agrawal R, Jacobs H, Payne N, Conway G**

Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries

*Fertil Steril* 2002; 78(6): 1164-1169

**Al-Azemi M, Bernal AL, Steele J, Gramsbergen I, Barlow D, Kennedy S**

Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis

*Hum Reprod* 2000; 15(1): 72-75

**Anteby EY, Hurwitz A, Korach O, Revel A, Simon A, Finci-Yeheskel Z, Mayer M, Laufer N**

Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow

*Hum Reprod* 1996; 11(9): 1947-1951

**Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL**

Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium

*J Clin Endocrinol Metabol* 1995; 80: 1908-1915

**Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE**

The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program

*Fertil Steril* 1996; 65(3): 603-607

**Arici A, Oral E, Bahtiyar O, Engin O, Seli E, Jones E.**

Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells

*Hum Reprod* 1997; 12(6): 1233-1239

**Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami J-E, Salvayre R, Bayard F**

Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production

*Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 4108-4113

**Artini PG, Monti M; Fasciani A, Tartaglia ML; D'Ambrogio G, Genazzani AR**

Correlation between the amount of follicle-stimulating hormone administered and plasma and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in women undergoing in vitro fertilization

*Gynecol Endocrinol* 1998; 12(4): 243-247

**Artini PG, Monti M, Fasciani A, Battaglia C, D'Ambrogio G, Genazzani AR**

Vascular endothelial growth factor, interleukin-6 and interleukin-2 in serum and follicular fluid of patients with ovarian hyperstimulation syndrome

*Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 101(2): 169-174

**Asimakopoulus B, Nikolettos D, Papachristou N, Simopoulou M, Al-Hasani S, Diedrich K**

Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and leptin are associated with pregnancy outcome of normal women participating in intracytoplasmic sperm injection cycles

*Physiol Res* 2005; 54: 263-270

**Attar E, Ozsait B, Bulgurcuoglu S, Serdaroglu H, Arici A**

Effect of leukaemia inhibitory factor on long-term sperm motility and survival

*Reprod BioMedicine Online*; 7(1): 71-74

**Auernhammer CJ, Melmed S**

Leukemia-inhibitory factor- Neuroimmune modulator of endocrine function

*Endocrine Rev* 2000; 21(3): 313-345

**Balasz J, Guimerá M, Martinez-Pasarell O, Ros J, Vanrell J, Jiménez W**

Adrenomedullin and vascular endothelial growth factor production by follicular fluid macrophages and granulosa cells

*Hum Reprod* 2004; 19(4): 808-814

**Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ**

Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology

*Br J Cancer* 1998; 77(6): 956-964

**Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C**

Effect of endometriosis on in vitro fertilization

*Fertil Steril* 2002; 78(6): 1350-1351

**Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L, Danforth D, Huey S, Abuhamad A, Oehninger S**

Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluids correlate negatively with embryo quality in IVF patients

*Fertil Steril* 1999; 72(6): 1024-1026

**Battaglia C, Regnani G, Marsella T, Facchinetti F, Volpe A, Venturoli S, Flamigni C**

Adjuvant L-arginine treatment in controlled ovarian hyperstimulation: a double-blind, randomized study

*Hum Reprod* 2002; 17(3): 659-665

**Benifla JL, Bringuier AF, Sifer C, Porcher R, Madelenat P, Feldmann G**

Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF

*Hum Reprod* 2001; 16(7): 1376-1381

**Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R**

Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles

*J endocrinol* 2000; 167: 371-382

**Billig H, Furuta I, Hsueh AJ**

Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis

*Endocrinology* 1993; 133: 2204-2212

**Brännström N, Norman JR**

Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function

*Hum Reprod* 1993; 8: 1762-1775



**Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, Chang TS, Snyder SH**

Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection

*Science* 1992; 257(5068): 401-403

**Büscher U, Chen FCK, Kentenich H, Schmiady H**

Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction?

*Hum Reprod* 1999; 14(1): 162-166

**Chard T**

Cytokines in implantation

*Hum Reprod* 1995; 1: 385-396

**Charnock-Jones Ds, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK**

Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines

*Biol Reprod* 1993; 48: 1120-1128

**Christenson LK; Stouffer RL**

Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/ chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles

*J Clin Endocrinol Metabol* 1997; 82(7): 2135-2143

**Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan Y-C E, Olander JV, Connolly DT, Stern D**

Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration

*J Exp Med* 1990; 172: 1535-1545

**Coskun S, Uzumcu M, Jaroudi K, Hollanders JM, Parhar RS, Al-Sedairy ST**

Presence of leukaemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth

*Am J Reprod Immunol*; 40(1): 13-18

**Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL**

Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation

*Proc Natl Acad Sci* 1996; 93(7): 3115-3120

**Dinarelo CA**

The pathophysiology of the pro-inflammatory cytokines

*Biotherapy* 1990; 2: 189-191

**Ekerhovd E, Enskog A, Caidahl K, Klintland N, Nilsson L, Brännström M, Norström A**

Plasma concentrations of nitrate during the menstrual cycle, ovarian stimulation and ovarian hyperstimulation syndrome

*Hum Reprod* 2001; 16(7): 1334-1339

**Espey LL**

Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction

*Biol Reprod* 1994; 50: 233-238

**Ferrara N, Henzel WJ**

Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells

*Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(2): 851-858

**Ferrara N, Winer J, Henzel WJ**

Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: Identification as leukemia inhibitory factor

*Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 698-702

**Finn CA**

Implantation, menstruation and inflammation

*Biol Rev Camb Philos Soc* 1986; 61(4): 313-328

**Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HHH, Heller M, Murad F**

Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells

*Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 1788-1792

**Friedman CI, Danforth DR, Herbosa-Encarnacion C, Arbogast L, Alak BM, Seifer DB**

Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction

*Fertil Steril* 1997; 68(4): 607-612

**Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA**

Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos

*Biol Reprod* 1992; 46: 470-474

**Gagné D, Pagé M, Robitaille G, Hugo P, Gosselin D**

Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis

*Hum Reprod* 2003; 18(8): 1674-1680

**Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simón C, Pellicer A**

Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis

*Hum Reprod Update* 2000; 6(1): 67-74

**Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC; Kelso A, Metcalf D**

Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF)

*Embo J* 1987; 6(13): 3995-4002

**Geller DA, Billiar TR**

Molecular biology of nitric oxide synthases

*Cancer and Metastasis Rev* 1998; 17: 7-23

**Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J**

Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells

*Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(19): 7311-7315

**Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ**

Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide

*J Immunol* 1993; 151(11): 6329-6337

**Grosset C, Jazwiec B, Taupin JL, Liu H, Richard S, Mahon FX, Reiffers J, Moreau JF, Ripoche J**

In vitro biosynthesis of leukemia inhibitory factor/ human interleukin for DA cells by human endothelial cells: differential regulation by interleukin-1 $\alpha$  and glucocorticoids

*Blood* 1995; 86(10): 3763-3770

**Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L**

Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and carcinogenic nitrosamine

*J Cyclic Nucleotide Res* 1979; 5(3): 211-224

**Habartsoumian E, Taupin JL; Moreau J-F, Frydman R, Chaouat G**

In vivo-administration of progesterone inhibits the secretion of endometrial leukaemia inhibitory factor in vitro

*Mol Hum Reprod* 1998; 4(11): 1039-1044

**Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj MH, Raj S**

Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis

*Am J Obstet Gynecol* 1983; 145(3): 333-337

**Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, K pker D, Diedrich K, Schmidt W**

The effect of chromatin condensation (Aniline Blue Staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection program

*Hum Reprod* 1996; 11: 2468-2471

**Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W**

Sperm count in ejaculates and after sperm selection with discontinuous percoll gradient centrifugation technique, as a prognostic index of IVF outcome

*Gynecol Obstet* 1997; 259: 125-131

**Hammadeh ME, Al-Hasani S, Doerr S, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W and Diedrich K**

Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsie extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome

*Hum Reprod* 1999; 14:363-367

**Hattori M-A, Nishida N, Takesue K, Kato Y, Fujihara N**

FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes

*J Mol Endocrinol* 2000; 24: 65-73

**Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval

*Mol Hum Reprod* 1999; 5(12): 1115-1121

**Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L**

Interleukine-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway

*Biochem J* 1998; 334: 297-314

**Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM**

Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule

*Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(1): 87-94

**Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara**

Dual regulation of vascular endothelial growth factor. Bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms

*J Biol Chemistry* 1992; 267(36): 26031-26037

**Hsieh Y-Y, Chang C-C, Tsai H-D, Lin C-S**

Leukemia inhibitory factor in follicular fluid is not related to the number and quality of embryos as well as implantation and pregnancy rates

*Biochem Genetics* 2005; 43(9;10): 501-506

**Hyder S, Stancel G**

Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins

*Mol Endocrinol* 1999; 13(6): 106-111

**Illera MJ, Juan L, Stewart CL, Cullinan E, Ruman J, Lessey BA**

Effect of peritoneal fluid from women with endometriosis on implantation in the mouse model

*Fertil Steril* 2000; 74(1): 41-48

**Iwabe T, Harada T, Terakawa N**

Role of cytokines in endometriosis-associated infertility

*Gynecol Obstet Invest* 2002; 53: 19-25

**Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N**

Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis

*Endocrinology* 1993; 133(2): 848-859

**Kamat BR, Brown NF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF**

Expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development

*Am J Clin Path* 1995; 146: 157-165

**Kim KY, Oh DS, Jeong JH, Shin BS; Joo BS, Lee KS**

Follicular blood flow is a better predictor of the outcome of in vitro fertilization- embryo transfer than follicular fluid vascular endothelial growth factor and nitric oxide concentrations

*Fertil Steril* 2004; 82(3): 586-592

**Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T**

Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta

*Biol Reprod* 1994; 50: 882-887

**Knowles RG, Moncada S**

Nitric oxide synthases in mammals

*Biochem J* 1994; 298: 249-258

**Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Lee TC, Zhang X**

The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture

*Hum Reprod* 1997; 12(3): 569-574

**Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Taieb J, Moreau JF, Chaouat G**

Follicular fluid concentration of leukaemia inhibitory factor is decreased among women with polycystic ovarian syndrome during assisted reproduction cycles

*Hum Reprod* 2001; 16(10): 2073-2078

**Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin J-L, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G**

Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation

*Hum Reprod* 2002; 17(1): 213-218

**Lee A, Christenson LK, Stouffer RL, Burry KA, Patton PE**

Vascular endothelial growth factor levels in serum and follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization

*Fertil Steril* 1997; 68(2): 305-311

**Lee KS, Joo BS; Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW**

Relationships between concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality

*J Ass Reprod Gen* 2000; 17(4): 222-228

**Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N**

Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen

*Science* 1989; 246(4935): 1306-1309



**Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, Pedram A**

Role of vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome

*J Clin Invest* 1998; 102(11): 1978-1985

**Licht P, Neuwinger L, Fischer O, Siebzehnrübl E, Wildt L**

Peripheral levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) are higher in gonadotropin stimulated as compared to natural ovarian cycles

*Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 345-349

**Lima AP, Moura MD, Rosa e Silva AAM**

Prolactin and cortisol levels in women with endometriosis

*Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1121-1127

**Loukides JA, Loy RA, Edwards R, Honig J, Visintin I, Polan ML**

Human follicular fluid contains tissue macrophages

*J Clin Endocrinol Metabol* 1990; 71: 1363-1367

**Ludwig M, Jelkmann W, Bauer O, Diedrich K**

Prediction of severe ovarian hyperstimulation syndrome by free serum vascular endothelial growth factor concentration on the day of human chorionic gonadotrophin administration

*Hum Reprod* 1999; 14(10): 2437-2441

**Lübbert M, Mantovani L, Lindemann A, Mertelsmann R, Herrmann F**

Expression of leukemia inhibitory factor is regulated in human mesenchymal cells

*Leukemia* 1991; 5(5): 361-365

**Manau D, Balasch J, Jiménez W, Fábregues F, Civico S, Casamitjana R, Creus M, Vanrell J**

Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response

*Hum Reprod* 2000; 15(6): 1295-1299

**Mardh P-A**

Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. Sexually transmitted diseases and urinary tract infections

*Curr Opin Infect Diseases* 2004; 17(1): 49-52

**Marti H, Risau W**

Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors

*Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15809-15814

**McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis

*Hum Reprod* 1996; 11(1): 220-223

**Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J**

Follicular fluid markers of oocyte developmental potential

*Hum Reprod* 2002; 17(4): 1017-1022

**Metcalf D, Nicola NA, Gearing DP**

Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice

*Blood* 1990; 76(1): 50-56

**Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J**

Leukaemia inhibitory factor and interleukin 11 levels in uterine flushings of infertile patients with endometriosis

*Hum Reprod* 2006; 21(12): 3054-3058

**Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A**

Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology

*Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109-142

**Moncayo HE, Penz-Koza A, Marth C, Gastl G, Herold M, Moncayo R**

Vascular endothelial growth factor in serum and in the follicular fluid of patients undergoing hormonal stimulation for in vitro-fertilization

*Hum Reprod* 1998; 13: 3310-3314

**Moqattash S, Lutton JD**

Leukemia cells and the cytokine network: Therapeutic prospects

*Experiment Biol Med* 2004; 229:121-137

**Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM**

The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding

*Structure* 1997; 5(10): 1325-1338

**Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffignal T, Varticovski L, Isner JM**

Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells

*J Biol Chem* 1995; 270(52): 31189-31195

**Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS**

The role of cytokines in both the normal and malignant ovary

*Endocrine-Related Cancer* 1999; 6: 93-107

**Nathan C**

Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells

*FABES* 1992; 6: 3051-3064

**Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors

*FABES* 1999; 13: 9-22

**Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J**

Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis

*Fertil Steril* 1993; 59(3): 681-684

**Norman JE, Cameron IT**

Nitric oxide in the human uterus

*Rev Reprod* 1996; 1: 61-68

**Ocal P, Aydin S, Cepni I, Idil S, Idil M, Uzun H, Benian A**

Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome?

*Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115(2): 194-199

**Omland AK, Fedorcsák P, Storeng R, Dale PO, Åbyholm T, Tanbo T**

Natural cycle IVF in unexplained, endometriosis-associated and tubal factor infertility

*Hum Reprod* 2001; 16(12): 2587-2592

**Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB**

Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility

*Fertil Steril* 2002; 77(1): 46-51

**Ozornek MH, Bielfeld P, Krussel SP, Hirchenhain J, Jeyendran RS, Koldovsky U**

Epidermal growth factor and leukaemia inhibitory factor levels in follicular fluid. Association with in vitro fertilization outcome

*J Reprod Med* 1999; 44(4): 367-369

**Papageorgiou T, Guibert J, Goffinet F, Patrat C, Fulla Y, Janssens Y, Zorn JR**

Percentile curves of serum estradiol levels during controlled ovarian stimulation in 905 cycles stimulated with recombinant FSH show that high estradiol is not detrimental to IVF outcome

*Hum Reprod* 2002; 17(11):2846-2850

**Papanikolaou EG, Tournaye H, Verpoest W, Camus M, Vernaeve V, Van Steirteghem A, Devroey P**

Early and late ovarian hyperstimulation syndrome: early pregnancy outcome and profile  
*Hum Reprod* 2005; 20(3): 636-641

**Patterson PH, Fann MJ**

Further studies of the distribution of CDF/LIF mRNA  
*Ciba Found Symp* 1992; 167: 125-135

**Piccinni MP, Scaletti C, Mavilia C, Lazzeri E, Romagnani P, Natali I, Pellegrini S, Livi C, Romagnani S, Maggi E**

Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T-cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development  
*Eur J Immunol* 2001; 31(8): 2431-2437

**Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C**

The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin 1 beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor  
*Fertil Steril* 1999; 71(3): 482-489

**Radomski MW, Palmer RM, Moncada S**

Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium  
*Lancet* 1987; 2(8567): 1057-1058

**Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips H, Ferrara N, Zeleznik A**

Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary  
*Endocrinology* 1992; 131: 254-260

**Richards JS, Russell DL; Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC**

Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization

*Rec Prog Horm Res* 2002; 57: 195-220

**Roberts WG, Palade GE**

Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor

*Cell J Sci* 1995; 108: 2369-2379

**Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK**

Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release

*Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202(3): 1543-1552

**Salven P, Orpana A, Joensuu H**

Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor

*Clinical Cancer Research* 1999; 5: 487-491

**Schmidt HHW, Seifert R, Böhme E**

Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4

*FEBS Letters* 1989; 244(2): 357-360

**Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK**

Expression of m-RNA for vascular endothelial growth factor in human placenta

*J Reprod Fertil* 1993; 99: 609-615

**Shibuya M**

Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis

*Cell Struct Funct* 2001; 26(1): 25-35

**Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E**

Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis

*J Clin Invest* 1993; 91: 2235-2243

**Simón C, Polan ML**

Cytokines and reproduction

*West J Med* 1994; 160: 425-429

**Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM**

VEGF gene delivery to muscle: Potential role for vasculogenesis in adults

*Mol Cell* 1998; 2: 549-558

**Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ; Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ**

Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor

*Nature* 1992; 359: 76-79

**Syrop CH, Halme J**

Cyclic changes of peritoneal fluid parameters in normal and infertile patients

*Obstet Gynecol* 1987; 69: 416-418

**Takesue K, Hattori M-A, Nishida N, Kato Y, Fujihara N**

Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation

*J Mol Endocrinol* 2001; 26; 259-265

**Templeton A, Morris JK**

Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization

*N Engl J Med* 1998; 339(9): 573-577

**Thum MY, Abdalla HI, Bhaskaran S, Harden EL, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal AS**

The effect of serum concentration of leukaemia inhibitory factor on in vitro fertilization treatment outcome

*Am J Reprod Immunol* 2006; 55(1): 76-80

**Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA**

The human gene for vascular endothelial growth factor

*J of Biol Chemistry* 1991; 266(18): 11947-11954

**Tomida M, Yamamoti-Yamaguchi Y, Hozumi M**

Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells

*J Biol Chem* 1984; 259(17): 10978-10982

**Van Blerkom J, Antczac M, Schrader R**

The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics

*Hum Reprod* 1997; 12(5): 1047-1055

**Van Vooris B, Dunn M, Snyder G, Weiner C**

Nitric oxide: An autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis

*Endocrinology* 1994; 135(5): 1799-1806



**Vega M, Johnson MC, Díaz HA, Urrutia LR, Troncoso JL, Devoto L**

Regulation of human luteal steroidogenesis in vitro by nitric oxide

*Endocrine* 1998; 8(2): 185-19

**Villiger PM, Geng Y, Lotz M**

Induction of cytokine expression by leukemia inhibitory factor

*J Clin Invest* 1993; 91(4): 1575-1581

**Vujisic S, Zidovec S**

Follicular immunology environment and the influence on in vitro fertilization outcome

*Curr Wom Health Rev* 2005; 1(1): 49-60

**Waring P, Wycherley K, Cary D, Nicola N, Metcalf D**

Leukemia Inhibitory Factor levels are elevated in septic shock and various inflammatory body fluids

*J Clin Invest* 1992; 90: 2031-2037

**Witz CA, Burns WN**

Endometriosis and infertility: Is there a cause and effect relationship?

*Gynecol Obstet Invest* 2002; 53: 2-11

**Wu M-Y, Chao K-H, Yang J-H, Lee T-S, Yang Y-S, Ho H-N**

Nitric oxide synthesis is increased in the endometrial tissue of women with endometriosis

*Hum Reprod* 2003; 18(12): 2668-2671

**Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F**

Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P

*J Clin Invest* 1994; 94: 2036-2044



## **Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Dr. ME Hammadeh für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und für das Engagement, mit dem er die Arbeit betreut und gefördert hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Schmidt für die Bereitstellung der Laborräume sowie der Arbeitsmaterialien und der Laborgeräte.

Mein weiterer Dank geht an Frau Dr. Constanze Fischer-Hammadeh für die Überlassung der Patientendaten und für ihre freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Dem Laborteam des IVF-Labors und den Mitarbeiterinnen der gynäkologischen Ambulanz ein Wort des Dankes für die Hilfe bei der Beschaffung der weiteren verwendeten Daten und für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der statistischen Planung und Auswertung der Versuchsergebnisse.

Mein letzter und besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Phase meines Studiums und vor allem während der Entstehung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet hat.



**Lebenslauf****Persönliche Daten:**

Name: Guthörl  
Vorname: Danja  
Geburtsdatum: 08.11.1983  
Geburtsort: Saarbrücken

**Schulbildung:**

1989-1993: Grundschule Uchtelfangen  
1993-2002: Illtal Gymnasium Illingen

**Medizinische Hochschuleausbildung:**

2002-2009: Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in  
Homburg/Saar

März 2005: Physikum

Juni 2009: Staatsexamen