



KLINIK UND POLIKLINIK FÜR FRAUENHEILKUNDE  
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
KLINIKUM RECHTS DER ISAR

# Knochenstoffwechsel bei Frauen in Kinderwunsch-Therapie

Zum Einfluss von FSH, Ovulation und Stimulationsart  
auf den Knochen

Anna Cäcilia Ritzinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung der akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Vanadin R. Seifert-Klauss

2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 17.05.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2019 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	<i>Knochenmetabolismus und Knochenmarker</i>	9
1.2	<i>Hormone und Knochen, Einfluss des weiblichen Zyklus auf den Knochen</i>	10
1.3	<i>Kinderwunsch, Zyklusmodifikation in Kinderwunschbehandlung</i>	12
1.4	<i>Fragestellungen der Studie</i>	13
<b>2</b>	<b>Patientinnen, Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	<i>Patientinnen</i>	14
2.2	<i>Studiendesign</i>	15
2.3	<i>Laboruntersuchungen</i>	15
2.3.1	<i>Hormonanalysen</i>	16
2.3.2	<i>Knochenstoffwechselfparameter</i>	18
2.3.3	<i>Weitere Parameter</i>	18
2.4	<i>Stimulationsprotokolle</i>	19
2.5	<i>Dokumentation und statistische Auswertung</i>	20
2.5.1	<i>Repeated Measures Modell</i>	20
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1	<i>Basischarakteristika</i>	21
3.2	<i>Knochenstoffwechsel</i>	22
3.2.1	<i>Knochenstoffwechsel-Kollektiv</i>	22
3.2.2	<i>Einfluss zyklischer Hormonveränderungen auf den Knochen</i>	23
3.2.3	<i>Vergleich der ovulatorischen mit der anovulatorischen Gruppe</i>	31
3.2.4	<i>Einfluss von rFSH vs. HMG Stimulation</i>	40
3.3	<i>Erweitertes Kollektiv zum Einfluss von Ovulation auf CTX</i>	45
3.4	<i>Einfluss von Vitamin D auf Befruchtungs- und Geburtenrate</i>	46
3.4.1	<i>Deskriptive Statistik zum Vitamin D-Kollektiv</i>	46
3.4.2	<i>Einfluss von Serum-Vitamin D auf die Geburtenrate nach IVF</i>	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	<i>Diskussion der Methoden</i>	51
4.1.1	<i>Ein- und Ausschlusskriterien</i>	51
4.1.2	<i>Knochenstoffwechselfparameter</i>	52
4.2	<i>Diskussion der Werteverläufe</i>	56
4.2.1	<i>Hormonverläufe während Stimulationstherapie vs. Spontanzyklus</i>	56
4.2.2	<i>Knochenstoffwechselfparameterverläufe während Stimulationstherapie vs. Spontanzyklus</i>	58

4.2.3	Abhängigkeit der Knochenstoffwechselfparameter vom Hormonverlauf.....	60
4.3	Vergleich der Hormone und Knochenstoffwechselfparameter in Abhängigkeit von der Stimulationsart .....	65
4.4	Einfluss von Ovulation auf den Knochen .....	66
4.5	Seitenarm: Einfluss von Vitamin D auf Fertilitäts- und Schwangerschaftsrate.....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>84</b>
7.1	Abbruchgründe und Sonderfälle im Studienkollektiv.....	84
7.2	Einflussparameter auf die Marker des Knochenstoffwechsels.....	84
7.2.1	Statistische Herangehensweise in der multiplen Regressionsanalyse.....	84
7.2.2	Auswertung.....	86
7.3	Korrelationen der Knochenstoffwechselfparameter untereinander .....	88
7.4	CTX-Auswertung mit ausschließlich Vormittagsfällen .....	90
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>91</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign am Beispiel des langen Stimulationsprotokolls. Beim kurzen Protokoll entfällt der erste Schritt der Downregulation.....	15
Abbildung 2: Consort-Diagramm zum Patientenkollektiv; Abbruchgründe: finanziell, persönlich, beruflich, Zyklusstörungen, fehlende Proben (näheres s. Appendix 7.1) .....	22
Abbildung 3: Hormone und Knochenstoffwechselfparameter im zyklischen Verlauf. T1=Lutealphase des vorangehenden Zyklus, T2=Stimulationsbeginn, T3=Follikelpunktion, T4=Lutealphase des Stimulationszyklus. N zu den einzelnen Zeitpunkten s. Tab. 2 .....	27
Abbildung 4: Verlauf von Estradiol (pg/ml) und Osteocalcin (ng/ml) im Vergleich. Zeitpunkt 1=Lutealphase des vorangehenden Zyklus, Zeitpunkt 2=Stimulationsbeginn, Zeitpunkt 3=Follikelpunktion, Zeitpunkt 4=Lutealphase des Stimulationszyklus .....	30
Abbildung 5: Verlauf von FSH (mIU/ml) und CTX (ng/ml) im Vergleich. Zeitpunkt 1=Lutealphase des vorangehenden Zyklus, Zeitpunkt 2=Stimulationsbeginn, Zeitpunkt 3=Follikelpunktion, Zeitpunkt 4=Lutealphase des Stimulationszyklus .....	31

Abbildung 6: Vergleich der TRACP-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus .....	35
Abbildung 7: Vergleich der CTX-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus .....	36
Abbildung 8: Vergleich der Osteocalcin-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus .....	36
Abbildung 9: Vergleich der BAP-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus .....	37
Abbildung 10: Vergleich der Estradiol-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus .....	38
Abbildung 11: Vergleich der FSH-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus .....	39
Abbildung 12: Vergleich der LH-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus .....	39
Abbildung 13: FSH und Estradiol im Serum im Vergleich nach HMG- vs. FSH-Stimulation .....	42
Abbildung 14: BAP und TRACP im Serum im Vergleich nach HMG- vs. FSH-Stimulation. Eine Tendenz zu höheren Werten zu T4 nach FSH-Stimulation ist erkennbar (n.s.) .....	43
Abbildung 15: Vergleich der beiden Stimulationsgruppen (HMG vs. rFSH) bezüglich des Ovulationsstatus im Downregulationszyklus. In beiden Stimulationsgruppen ist eine Tendenz zu höheren Knochenabbauparametern erkennbar, wenn der Downregulationszyklus anovulatorisch war (TRACP in U/l, CTX in ng/ml) .....	45
Abbildung 16: luteale CTX-Werte abhängig vom Ovulationsgeschehen im gleichen Zyklus ...	46

Abbildung 17: Boxplots zum Vergleich des Serum-Vitamin Ds von Patientinnen, deren IVF Zyklus in der Geburt eines lebensfähigen Kindes mündete vs. Patientinnen ohne klinische Schwangerschaft bzw. mit Abort .....	48
Abbildung 18: ROC Kurve zur Testgenauigkeit von Serum-Vitamin D bezüglich des Erfolgs eines IVF Zyklus .....	49
Abbildung 19: Baumdiagramm über mögliche Zusammenhänge zwischen Vitamin D-Wert und Erfolg der Fertilisationstherapie .....	50
Abbildung 20: Streudiagramme zum Zusammenhang zwischen E2 und den Knochenstoffwechselfparametern zu T1. Es werden nur in der multiplen Regression festgestellte signifikante Zusammenhänge dargestellt .....	88
Abbildung 21: Verlauf von CTX, ausschließlich Vormittagsfälle .....	90

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Deskriptive Statistik der Basisparameter zu T1 im Knochenstoffwechsel-Kollektiv23	
Tabelle 2: Durchschnittswert, SD und Median der Hormone und Knochenstoffwechselfparameter von T1 bis T4. Fehlende Werte durch geringere Teilnahme am Zeitpunkt T4 (Durchbruchblutungen/Schwangerschaften) begründet ...	28
Tabelle 3: GENMOD mit SAS: Einfluss von Estradiol auf Osteocalcin mit und ohne Hinzunahme von FSH als potenzieller Confounder .....	29
Tabelle 4: GENMOD mit SAS: Einfluss von FSH auf CTX mit und ohne Hinzunahme von Estradiol als potenzieller Confounder .....	30
Tabelle 5: Deskriptive Statistik. Vergleich der Gruppe mit Ovulation im Vorzyklus (Progesteron zu T1 $\geq 6$ ng/ml; n=32) mit der Gruppe ohne Ovulation im Vorzyklus (Progesteron zu T1 $< 6$ ng/ml; n=13) .....	33
Tabelle 6: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf CTX.....	34
Tabelle 7: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation auf Osteocalcin .....	34
Tabelle 8: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf TRACP .....	34
Tabelle 9: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf BAP .....	35

Tabelle 10: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf E2.....	37
Tabelle 11: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf FSH.....	38
Tabelle 12: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf LH.....	38
Tabelle 13: Knochenstoffwechsel- und Hormonwerte zu T3 und T4 mit HMG vs. rFSH- Stimulation .....	41
Tabelle 14: Deskriptive Statistik der Basisparameter des Vitamin D - Kollektivs zu T1 .....	47
Tabelle 15: Modelle selektiert nach AIC. Fett dargestellt sind Parameter, die entsprechend $p \leq 0,05$ Signifikanz aufwiesen, in Klammern das korrigierte Bestimmtheitsmaß $R^2$ für das jeweilige Modell .....	87
Tabelle 16: Korrelationen der Knochenstoffwechselfparameter untereinander zu T1-T4.....	88
Tabelle 17: generalisiertes Modell mit ausschließlich vormittags abgenommenen Werten, Einfluss von FSH auf CTX.....	90

### Abkürzungsverzeichnis

BAP	Knochenspezifische alkalische Phosphatase
BMD	Bone mineral density=Knochendichte
BMI	Body-Mass-Index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )
BV/TV	Knochenvolumen zu Gesamtvolumen
Ca <sup>++</sup>	Kalzium
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CTX	C-terminales Telopeptid
DPD	Desoxypyridinolin
E2	17 $\beta$ -Estradiol
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immuno-Assay

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HMG	Humanes Menopausengonadotropin)
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IOF	International Osteoporosis Foundation
IVF	In vitro Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.s.	Nicht signifikant
OC	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
PBM	Peak bone mass
p-Wert; p	Signifikanzwert, Irrtumswahrscheinlichkeit
PYD	Pyridinolin
P4	Progesteron
RANK	Receptor Activator of NF-κB

RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic - Kurve
s. Abb.	Siehe Abbildung
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
s.o.	Siehe oben
s. Tab.	Siehe Tabelle
T1	Termin/Zeitpunkt 1=Lutealphase des dem Stimulationszyklus vorangehenden Zyklus
T2	Termin/Zeitpunkt 2=Tag des Stimulationsbeginns
T3	Termin/Zeitpunkt 3=Tag der Eizellentnahme
T4	Termin/Zeitpunkt 4=Lutealphase des Stimulationszyklus
TNF	Tumornekrosefaktor
TRACP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
VDR	Vitamin D-Rezeptor
Vit D/Vitamin D	25 OH Vitamin D=25-Hydroxy-Vitamin D



# 1 Einleitung

## 1.1 Knochenmetabolismus und Knochenmarker

Die WHO zählt die Osteoporose zu den zehn wichtigsten Volkskrankheiten weltweit (Bartl, 2004, p. V) und laut Johnell et al. wiegt die weltweite Last durch Osteoporose mit Blick auf Sterblichkeit und Beeinträchtigung der Lebensqualität quantifiziert in DALYs (disability adjusted life years) schwerer, als beispielsweise die des Kolorektal- oder Mammakarzinoms (Johnell & Kanis, 2006). Deutschland hat EU-weit die höchste Zahl von an Osteoporose Erkrankten, mit über einer Million erkrankten Männern und über 4 Millionen erkrankten Frauen (Hernlund et al., 2013). Forschung zum Knochenstoffwechsel ist daher unbedingt nötig um Prävention und Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankung voranzutreiben.

Die Osteoporose zeichnet sich durch eine verminderte Knochenmasse mit konsekutiv erhöhter Frakturneigung aus (Bartl, 2004, p. 14) und basiert auf einem Ungleichgewicht von Knochenformation und –resorption zu Gunsten des Knochenabbaus (Baron, 2000). Der Umbau des Knochens wird durch Osteoblasten gesteuert, welche über das RANK-, RANKL- und OPG-System die Osteoklasten zur Knochenresorption durch Ausschüttung lysosomaler Enzyme veranlassen. Aus Osteoblasten entstehen wiederum Osteozyten, welche durch Zell-Zell Kontakte und Mechanorezeptoren direkt sowie durch Ausschüttung von Mediatoren indirekt zur Koordination des Knochenmetabolismus beitragen (Baron, 2000; Goldring, 2015). Beim gesunden Menschen sind Knochenauf- und -abbau aneinander gekoppelt, sodass der Knochenresorption, welche nur wenige Tage dauert, eine langsamere aber ebenso ausgeprägte Knochenformation folgt (Baron, 2000). Dies spiegelt sich auch in den sogenannten Knochenstoffwechselfparametern wider; man unterscheidet zwischen Knochenaufbauparametern und Knochenabbauparametern. Als Knochenstoffwechselfparameter gelten im Blut oder Urin messbare, von den Knochenzellen sezernierte Proteine und Enzyme ebenso wie Abbauprodukte des Knochenstoffwechsels (Calvo, Eyre, & Gundberg, 1996). Ihre Gewinnung ist nicht-invasiv und sie geben die Geschehnisse im Knochenmetabolismus unmittelbar wider, weshalb sie für diese klinische Studie zum Knochenstoffwechsel ideal geeignet sind (Seibel, 2006).

Zu den Aufbaumarkern zählen die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) sowie Osteocalcin (OC). BAP bezeichnet die knochenspezifische Isoform des Enzyms alkalische

Phosphatase und wird von Osteoblasten sezerniert. Osteocalcin ist ein kleines, nicht kollagenöses Protein, welches ebenfalls von Osteoblasten ausgeschüttet wird (Hlaing & Compston, 2014).

Die in dieser Studie bestimmten Abbaumarker sind das C-terminale Telopeptid, welches aus während des Knochenabbaus zersetztem Kollagen freigesetzt wird, sowie die Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b, ein von Osteoklasten sezerniertes lysosomales Enzym (Hlaing & Compston, 2014).

Im klinischen Alltag dienen die Knochenstoffwechselmarker unter anderem zum Therapie-Monitoring bei Osteoporose-Therapie sowie in Zusammenschau mit der Knochendichte (BMD) als Prädiktoren für das Frakturrisiko. So kommt es unter antiresorptiver Therapie mit Bisphosphonaten oder Östrogen zu einer Reduktion aller Knochenstoffwechselfparameter. Diese beobachtete Senkung des Knochenumsatzes korreliert mit einer Senkung des Frakturrisikos (Seibel, 2006).

Der Knochenstoffwechsel wird von unterschiedlichsten externen und internen Faktoren beeinflusst. Ein Verständnis des Zusammenspiels dieser Faktoren ist essentiell um Risikogruppen zu erkennen oder neue Therapien für Erkrankungen des Knochens zu generieren.

## **1.2 Hormone und Knochen, Einfluss des weiblichen Zyklus auf den Knochen**

Dass die Hormone des weiblichen Zyklus den Knochenstoffwechsel beeinflussen, wird in verschiedenen Lebensphasen der Frau deutlich. So kommt es während der Schwangerschaft und Laktation zu einem Verlust an maternaler Knochenmasse mit dem Ziel der Bereitstellung von Kalzium für das Kind (Kovacs, 2001). Als Antrieb für die während der Laktation erhöhte Knochenresorption wird unter anderem das in dieser Phase erniedrigte Östrogen angenommen (VanHouten & Wysolmerski, 2003). Auch postmenopausal äußert sich der verminderte Östrogen-Spiegel im Verlust von Knochendichte (Al-Safi, McAvery, & Santoro, 2000). Als Grund für den stark erhöhten Knochenumsatz perimenopausal wird der Anstieg von FSH (Seifert-Klauss et al., 2012; Sun et al., 2006; Zhu et al., 2012), aber auch der Abfall von Progesteron diskutiert (Seifert-Klauss & Prior, 2010). Des Weiteren unterliegen verschiedene Knochenstoffwechselfparameter zyklischen Veränderungen während des Menstruationszyklus, ein zusätzlicher Hinweis für den hormonellen Einfluss auf den

Knochenumsatz (Chiu et al., 1999; Gass, Kagan, Kohles, & Martens, 2008; Gorai, Chaki, Nakayama, & Minaguchi, 1995; Lee et al., 2012; Mozzanega et al., 2013; Nielsen, Brixen, Bouillon, & Mosekilde, 1990; Schlemmer et al., 1993; Zittermann et al., 2000).

Seit Fuller Albright und Reifstein (1946) ist der protektive Effekt von Östrogen auf den Knochen bekannt (Reifstein & Albright, 2011). Neben einem direkten Einfluss auf Osteoblasten (Eriksen et al., 1988) scheint Östrogen besonders durch Hemmung der Knochenresorption zu wirken. So beschrieben Nakamura et al. eine Östrogen-abhängige Apoptose-Induktion von Osteoklasten in weiblichen Mäusen durch direkte Stimulation des Osteoklasten-stämmigen Rezeptors  $Er\alpha$  (Nakamura et al., 2007). Zudem hemmt Östrogen laut Srivastava et al. das RANK/RANKL-System, welches Knochenformation und -resorption aneinander koppelt. So führte Östrogen zu einer herabgesetzten Aktivierung des Osteoklasten-ständigen Rezeptors RANK, welcher normalerweise durch das von Osteoblasten ausgeschüttete Zytokin RANKL stimuliert wird, und bewirkte hierdurch eine verminderte Differenzierung der Osteoklasten (Srivastava et al., 2001). Auch scheint die Ausschüttung von Osteoprotegerin durch Östrogen stimuliert zu werden, was wiederum eine verminderte Osteoklastenbildung zur Folge hat (Hofbauer et al., 1999). Ebenso wurde unter Östrogen eine reduzierte Ausschüttung von TNF (Tumornekrosefaktor) aus T-Zellen beobachtet, woraus eine verminderte Osteoklastenformation resultierte (Roggia et al., 2001).

Doch die Tatsache, dass es perimenopausal trotz normwertiger bis erhöhter Östrogen-Spiegel zu erheblichem Knochenverlust kommt, führte zu der Überlegung, dass hier weitere hormonelle Faktoren eine maßgebliche Rolle spielen könnten (Seifert-Klauss et al., 2006).

Sun et al. beschrieben 2006, dass hypogonadale FSH-Rezeptor-Null-Mäuse keinen Knochendichteverlust erlitten. In dieser Studie wurde zudem gezeigt, dass FSH die Osteoklastenbildung durch Aktivierung eines Osteoklasten-ständigen FSH-Rezeptors stimuliert (Sun et al., 2006). Somit stellt sich die Frage, ob die perimenopausal hohen FSH-Werte für den in diesem Zeitraum stark erhöhten Knochenumsatz verantwortlich sind.

Zu der Thematik, ob auch LH einen Einfluss auf den Knochen haben könnte, liegen bisher wenige Studien vor und bezüglich der Richtung des Einflusses herrscht Inkonsistenz. So steigt LH wie beschrieben in der späten Perimenopause (Prior, 1998), welche zwar mit verminderter Knochendichte einhergeht, jedoch nicht in die Phase des höchsten

Knochenumsatzes zu fallen scheint (Seifert-Klauss et al., 2006). Yarram et al. wiederum beschrieben eine signifikante Reduktion der Knochendichte bei Mäusen mit fehlendem LH-Rezeptor. Auch konnte er LH-Rezeptoren auf Osteoblasten nachweisen, welche jedoch entweder nur in geringer Zahl vorhanden oder aber funktionslos waren. Er führte die Knochendichtereduktion der LH-Rezeptor-Null Mäuse auf den aus der mangelnden LH-Stimulation resultierenden Steroidhormonmangel zurück und postulierte daher einen lediglich indirekten positiven Effekt von LH auf den Knochen (Yarram et al., 2003).

Kürzlich wurden zudem Unterschiede im Knochenstoffwechsel zwischen ovulatorischen und anovulatorischen Zyklen gefunden. So zeigte die Auswertung von 176 Zyklen prämenopausaler Frauen zwischen 40 und 50 Jahren, dass in ovulatorischen Zyklen eine geringere Knochenresorption zu verzeichnen ist als in anovulatorischen Zyklen (Niethammer, Körner, Schmidmayr, Luppä, & Seifert-Klauss, 2015).

### **1.3 Kinderwunsch, Zyklusmodifikation in Kinderwunschbehandlung**

Die Zahl der Zyklen mit assistierter Fertilisation nimmt stetig zu. So verdoppelte sich die Zahl der in Europa registrierten Zyklen innerhalb von 10 Jahren auf annähernd 550 000 Zyklen im Jahr 2010 (Kupka et al., 2014). Laut aktuellen Ergebnissen scheint die Kinderwunschtherapie in gewissen Fällen noch immer mit einem erhöhten postpartum Morbiditätsrisiko (insbesondere bezüglich Bluttransfusionen, disseminierter intravasaler Gerinnung, akutem Nierenversagen, Hysterektomie) für die Mutter verbunden zu sein (Martin et al., 2016). Der Einfluss der Therapie auf den Knochenstoffwechsel wurde noch nicht evaluiert.

Für eine In vitro Fertilisationstherapie (IVF) werden die Ovarien medikamentös stimuliert. Im langen Stimulationsprotokoll wird in der Lutealphase des dem Stimulationszyklus vorangehenden Zyklus zunächst mit GnRH Analoga-Gabe begonnen. Nach einem initialen flare-up Effekt mit kurzfristiger Aktivierung der Hypophyse und vermehrter Ausschüttung von LH und FSH wird schließlich nach 10-14 Tagen durch Downregulation („Herabregulierung“) der Rezeptorexpression in der Hypophyse eine Hypogonadotropie erreicht. Mit Beginn der Periodenblutung und Hypogonadotropie wird daraufhin in der frühen Follikelphase des Stimulationszyklus mit der Gabe von rFSH allein oder in Kombination mit LH (als sogenanntes HMG=humanes Menopausengonadotropin) begonnen. Dies führt zu einer zunehmenden Follikelreifung bei gleichzeitiger Suppression der Ovulation durch die GnRH Analoga-Gabe und die dadurch induzierte LH-Downregulation. Nach

Erreichen mehrerer Follikel mit einer Größe von ca. 17-20 mm, wird die finale Eizellreifung und die Ovulation durch Gabe von HCG (humanes Choriongonadotropin) induziert. Etwa 36 Stunden nach HCG-Gabe werden schließlich die Follikel zur Eizellentnahme punktiert und die entnommenen Eizellen im Rahmen der In vitro Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) künstlich befruchtet. Anschließend werden ein bis zwei Embryonen nach drei (8-Zell Stadium) bis fünf (Blastozystenstadium) Tagen in den Uterus der Patientin transferiert (Embryotransfer), weitere Embryonen kryokonserviert (eingefroren) (Diedrich & Ludwig, 2013).

Die durch die Fertilisationstherapie geschaffene, künstliche Zyklussituation mit supprimiertem LH, kontrolliert verabreichtem rFSH und konsekutiv sehr hohem Estradiol, ermöglichte unter quasi-experimentellen Bedingungen eine gezielte Beobachtung des Knochenstoffwechsels zu Knotenpunkten des Zyklusgeschehens (Follikelphase, perioovulatorisch, Lutealphase).

Aus diese Weise sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

#### **1.4 Fragestellungen der Studie**

- 1) Welchen Einfluss haben die im Rahmen der Fertilisationstherapie verabreichten Hormone und die hierdurch entstehenden zyklischen Serum-Hormonschwankungen auf den Knochenstoffwechselmetabolismus?
- 2) Haben Anovulationen im Vorzyklus einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus im Folgezyklus? Ist dieser Einfluss unabhängig vom Hormonverlauf im Folgezyklus?
- 3) Hat die Stimulationsart (LH/FSH versus rFSH) einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel?
- 4) Welche Folgen hat die Fertilisationstherapie kurzfristig für den Knochenmetabolismus?

## 2 Patientinnen, Material und Methoden

### 2.1 Patientinnen

Insgesamt 95 Patientinnen wurden zwischen September 2012 und Februar 2013 in der Praxis für Reproduktionsmedizin von Prof. Berg und Dr. Lesoine rekrutiert, welche als akademische Lehrpraxis der Technischen Universität München eng mit dem Klinikum Rechts der Isar zusammenarbeitet. 106 Zyklen wurden im Rahmen der Studie beobachtet.

Einschlusskriterien waren

- FSH bei T1 (Lutealphase des vorangehenden Zyklus) <20 mIU/ml
- Alter zwischen 30 und 45 Jahren

Ausschlusskriterien waren

- Schwere Vorerkrankungen, die eigenständig oder durch ihre Therapie den Knochenstoffwechsel beeinflussen (Anorexia nervosa, Bulimia nervosa, Epilepsie, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, große Operationen am Darm, Organtransplantationen, schwere endokrinologische Störungen der Schilddrüse und Nebennieren)
- Einnahme von den Knochenstoffwechsel wesentlich beeinflussenden Medikamenten in den letzten 3 Monaten (systemische Glukokortikoide, Heparin, Vitamin K-Antagonisten)

Akzeptiert wurde eine stabil euthyreote Schilddrüsenfunktion bei Schilddrüsenvorerkrankung, Z.n. Appendektomie sowie therapeutische Verwendung von topischen Glukokortikoiden und geringfügiger Nikotinkonsum

Alle Patientinnen, die die Einschlusskriterien für die Studie erfüllten, wurden durch einen für die Studie konzipierten Flyer informiert. Bei Interesse an einer Teilnahme erhielten die jeweiligen Frauen ein Aufklärungsschreiben und unterschrieben nach Aufklärung durch den behandelnden Arzt und Beantwortung aller aufkommenden Fragen eine Einverständniserklärung. Alle Daten wurden pseudonymisiert erhoben und die Teilnehmerinnen aufsteigend nummeriert. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der TU München geprüft und positiv votiert.

Zu Beginn der Teilnahme wurden folgende anamnestische Daten erhoben:

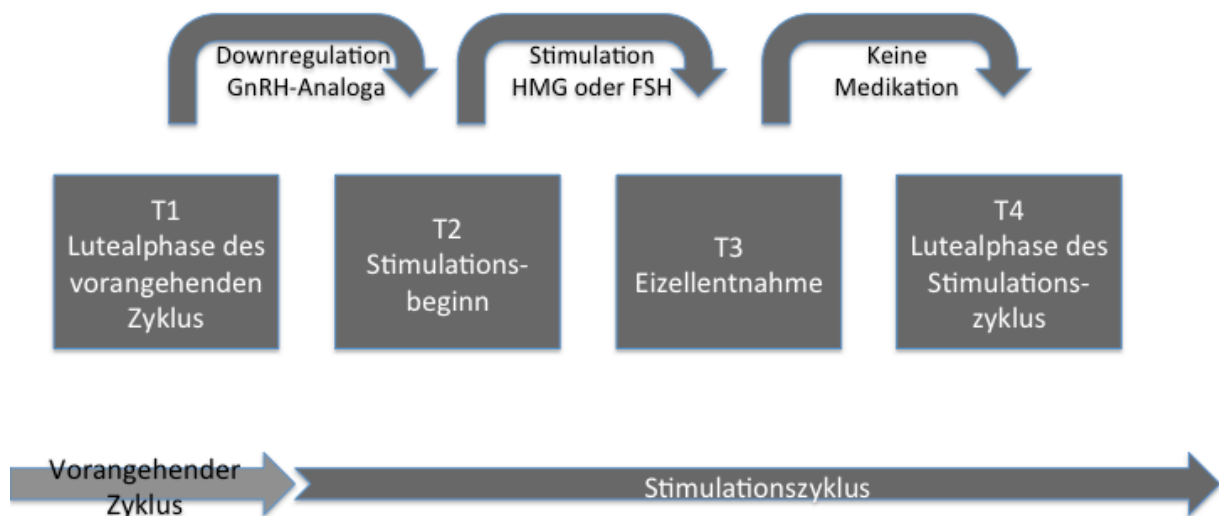
- Alter, Größe, Gewicht

- Vorerkrankungen, insbesondere Knochenbrüche, Darmerkrankungen, endokrinologische Erkrankungen
- Familienanamnese bezüglich Osteoporose
- Medikamentenanamnese
- Zyklusanamnese
- Fragen zu Lebensgewohnheiten (Nikotin-, Milch-, Kaffeekonsum)

## 2.2 Studiendesign

Jeder Patientin wurde an drei bis vier Terminen Blut entnommen.

- Termin 1 (=T1): Lutealphase des dem Stimulationszyklus vorangehenden Zyklus
- Termin 2 (=T2): Tag des Stimulationsbeginns
- Termin 3 (=T3): Tag der Eizellentnahme
- Termin 4 (=T4): Lutealphase des Stimulationszyklus



**Abbildung 1: Studiendesign am Beispiel des langen Stimulationsprotokolls. Beim kurzen Protokoll entfällt der erste Schritt der Downregulation**

## 2.3 Laboruntersuchungen

Zu allen vier Terminen wurden Knochenstoffwechselfparameter sowie Geschlechtshormone bestimmt. Es wurden sowohl zwei Knochenaufbauparameter, Osteocalcin (OC) und knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP), als auch zwei Knochenabbauparameter, C-

terminales Telopeptid (CTX) und Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRACP) zu jedem Termin gemessen. Zudem zu jedem Zeitpunkt die Hormone follikelstimulierendes Hormon (FSH), luteinisierendes Hormon (LH) und 17 $\beta$ -Estradiol (E2). An T1 und T4, die beide in der Lutealphase lagen, wurde zusätzlich der Progesteron-Wert gemessen. Ebenso wurden zu T1 jeweils 25-Hydroxy-Vitamin D (Vitamin D) und das Serumkalzium bestimmt, um diese für den Knochen relevanten Parameter bei der späteren Auswertung berücksichtigen zu können.

Alle Parameter wurden aus dem Blutserum bestimmt. Das Blut wurde vormittags entnommen, um keine Wertschwankungen durch zirkadiane Rhythmen zu erhalten, welche insbesondere bei CTX im relevanten Maße auftreten (Calvo et al., 1996, p. 342; Seibel, 2005, p. 14). Die Blutproben wurden innerhalb einer halben Stunde nach Entnahme zentrifugiert und anschließend die nötigen Hormonwerte direkt vor Ort im Labor der Praxis für Reproduktionsmedizin bestimmt. Das übrige Serum wurde zu vier bis fünf Proben von mindestens 50  $\mu$ l aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden alle ein bis zwei Wochen wärmeisoliert und lichtgeschützt in das Institut für klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Ruland) transportiert und dort ausgewertet.

### **2.3.1 Hormonanalysen**

- Follikelstimulierendes Hormon (FSH):

Die Messung erfolgte mit dem Immulite 2000 FSH, ein Festphasen-, Zweiphasen-Chemilumineszenz-, Immunometrischer Assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Messbereich bis 170 mIU/ml bzw. 8,9 ng/ml, analytische Sensitivität 0,1 mIU/ml, Referenzwerte bei Frauen zwischen 16 und 44 Jahren prämenopausal: Follikelphase 2,8-11,3 mIU/ml, Follikelphase 2.-3. Tag 3,0-14,4 mIU/ml, Mittelzyklus 5,8-21 mIU/ml, Lutealphase 1,2-9,0 mIU/ml, Referenzwerte postmenopausal ohne hormonelle Ersatztherapie: 21,7-153 mIU/ml, Probenaufbewahrung vor Analyse bei 2 bis  $8^{\circ}\text{C}$  bis zu sieben Tage, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zu zwei Monate).

- Luteinisierendes Hormon (LH):

Dieses wurde mit dem Immulite 2000 LH gemessen, ebenso ein Festphasen-, Zweiphasen-Chemilumineszenz-, Immunometrischer Assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Messbereich bis 200 mIU/ml, analytische Sensitivität 0,05 mIU/ml, Referenzwerte



Follikelphase 1,1-11,6 mIU/ml, Mittelzyklus 17-77 mIU/ml, Lutealphase NN (nicht nachweisbar) -14,7 mIU/ml, Perimenstruell +/-8 Tage NN-12,0 mIU/ml, Probenaufbewahrung vor Analyse bei 2 bis 8°C bis zu zwei Wochen, bei -20°C bis zu zwei Monate)

- 17 $\beta$ -Estradiol (E2):

Das verwendete Messsystem war der Immulite 2000 Estradiol, ein Festphasen-enzymmarkierter kompetitiver Chemilumineszenz-Immunoassay (Siemens Healthcare Diagnostics, Messbereich 20-2000 pg/ml, analytische Sensitivität 15 pg/ml, Referenzwerte: Follikelphase NN-160 pg/ml, Follikelphase 2.-3. Tag NN-84 pg/ml, Perioovulation +/-3 Tage 34-400 pg/ml, Lutealphase 27-246 pg/ml, Probenaufbewahrung vor Analyse bei 2 bis 8°C bis zu zwei Tage, bei -20°C bis zu zwei Monate)

- Progesteron (P4):

Die Messung wurde mit dem Immulite 2000 Progesteron durchgeführt, ein kompetitiver Festphasen-, Chemilumineszenz-Immunoassay (Siemens Healthcare Diagnostics, Messbereich 0,2 - 40 ng/ml, analytische Sensitivität 0,1 ng/ml, Referenzwerte: Follikelphase NN - 1,13 ng/ml, Follikel-Mittelphase 5. - 11. Tag NN - 0,98 ng/ml, Mittelzyklus 0,48 - 1,72 ng/ml, Lutealphase 0,95 - 21 ng/ml, Luteal-Mittelphase 7. - 8. Tag der Lutealphase 6,0 - 24 ng/ml, Probenaufbewahrung vor Analyse bei 2 bis 8°C bis zu sieben Tage, bei - 20°C bis zu drei Monate)

- Humanes Choriongonadotropin (HCG):

Die Messung erfolgte mit dem Immulite 2000 HCG, ein Festphasen-, sequenzieller Zweischnitt-, Chemilumineszenz-, Immunometrischer Assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Messbereich bis 5000 mIU/ml, analytische Sensitivität 0,4 mIU/ml, Referenzwerte: SSW 1,3-2 (post conceptionem, pc): 16-156 mIU/ml, SSW 2-3 pc: 101-4870 mIU/ml, SSW 3-4 pc: 1110-31500 mIU/ml, SSW 6-7 pc: 27300-233000 mIU/ml, SSW 21-39 pc: 2700-78100 mIU/ml, Probenlagerung vor Analyse bei 2 bis 8°C bis zu sieben Tage, bei -20°C bis zu zwei Monate)

### **2.3.2 Knochenstoffwechselfparameter**

- Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP):

Die Bestimmung von BAP erfolgte mit einem Festphasen-Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) (Firma DiaSorin, Messbereich 1,5-120 µg/l, Referenzbereich Frauen prämenopausal: 3-19 µg/l, postmenopausal 6-26 µg/l, Probenaufbewahrung vor Analyse: drei Tage bei 2 bis 8°C, ein Monat bei -20°C)

- Osteocalcin (OC):

Die Messung erfolgte mit einem Elektrochemilumineszenz-Immuno-Assay (ECLIA) (Firma Roche, Messbereich 0,500-300 ng/ml, Referenzbereich Frauen prämenopausal 11-43 ng/ml, Frauen postmenopausal 15-46 ng/ml, Probenaufbewahrung vor der Analyse bei 2 bis 8°C bis zu drei Tage, bei -20°C bis zu drei Monate)

- C-terminales Telopeptid (CTX):

Zur Messung verwendet wurde eine Elektrochemilumineszenz-Immuno-Assay (ECLIA) (Firma Roche, Messbereich 0,01-6,00 ng/ml, Referenzbereich bei prämenopausalen Frauen <0,57 ng/ml, postmenopausal <1,00 ng/ml, zirkadianer Rhythmus, daher Probenabnahme immer unter gleichen Bedingungen empfohlen, Probenaufbewahrung vor Analyse: maximal acht Stunden bei 4 bis 8°C, maximal drei Monate bei -20°C.

- Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRACP):

TRACP wurde mittels eines ELISA-Tests (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) gemessen (Firma Dynex, Messbereich 0,5-15 U/l, Referenzbereich prämenopausaler Frauen 2,6-5,4 U/l, postmenopausaler Frauen 1,5-4,3 U/l, Probenaufbewahrung vor Analyse bei 4°C zwei Tage, bei -20°C zwei Monate)

### **2.3.3 Weitere Parameter**

- Kalzium (Ca<sup>++</sup>)

Kalzium wurde in einem photometrischen Test mit NM-BAPTA bestimmt (Firma Roche, Messbereich 0,2-5,0 mmol/l, Referenzbereich 2,2-2,65 mmol/l, Probenaufbewahrung vor Analyse: bei 4 bis 8°C bis zu drei Wochen, bei -20°C bis zu acht Monate)

- 25 OH Vitamin D=25-Hydroxy-Vitamin D (Vit D):

Das Vitamin wurde durch einen direkten, kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) bestimmt (Firma DiaSorin, Messbereich 4-150 ng/ml, Referenzbereich 30-100ng/ml, Mangel <5 ng/ml, Intoxikation >150 ng/ml; Probenaufbewahrung vor Analyse: bei 2 bis 8°C bis zu fünf Tage, bei –20°C bis zu zwei Monate)

## **2.4 Stimulationsprotokolle**

Im Rahmen der Kinderwunschbehandlung erhielten die Patientinnen entweder ein langes (long) oder ein kurzes (short) Therapie-Protokoll. Patientinnen im langen Protokoll erhielten ab der Lutealphase des dem Stimulationszyklus vorangehenden Zyklus eine Downregulation mit GnRH-Analoga (s. Abb. 1). Zum Einsatz kamen Metrelef (Hersteller: Ferring Arzneimittel GmbH, Wirkstoff: Buserelinacetat, Benzalkoniumchlorid, Darreichungsform: Nasenspray), Synarela (Hersteller: Pharmacia GmbH (Pfizer), Wirkstoff: Nafarelinacetat, Benzalkoniumchlorid, Darreichungsform: Nasenspray) und Decapeptyl (Hersteller: Ferring Arzneimittel GmbH, Wirkstoff: Triptorelinacetat, Darreichungsform: Injektionslösung). Patientinnen im kurzen Protokoll erhielten keine Downregulation im Vorzyklus, sondern stiegen direkt in den Stimulationszyklus ein. Zur Stimulation der Follikelreifung wurden entweder HMG (humanes Menopausengonadotropin), welches aus einer Mischung aus FSH und LH besteht, oder aber rekombinantes FSH alleine genutzt. Eingesetzt wurde hauptsächlich das HMG enthaltende Produkt Menogon (Hersteller: Ferring Arzneimittel GmbH, Wirkstoff: HMG entsprechend 75 I.E. FSH und 75 I.E. LH, Darreichungsform: Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung), in seltenen Fällen Menopur (Hersteller: Emra-Med Arzneimittel GmbH, Wirkstoff: HMG, Darreichungsform: Infusionsflasche) und Merional (Hersteller: IBSA, Wirkstoff: HMG, Darreichungsform: Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung). Außerdem verwendet wurde das rFSH-enthaltende Produkt Puregon (Hersteller: Merck Sharp & Dohme Limited, Wirkstoff: Follitropin beta, Darreichungsform: Injektionslösung). Zur Auslösung des Eisprungs wurden Decapeptyl (s.o.), Predalon (Hersteller: MSD, Wirkstoff: humanes Choriongonadotropin, Darreichungsform: Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung), Ovitrelle (Hersteller: Merck Serono Europe Limited, Wirkstoff: rekombinantes humanes Choriongonadotropin, Darreichungsform: Injektionslösung) oder Brevactid (Hersteller: Ferring Arzneimittel GmbH, Wirkstoff: humanes Choriongonadotropin Darreichungsform: Injektionslösung) verwendet.

## **2.5 Dokumentation und statistische Auswertung**

Zur Pseudonymisierung wurde jeder Patientin aufsteigend eine Nummer zugeteilt. Die Dokumentation und Auswertung von Daten, die im Rahmen der Fertilitätstherapie erhoben wurden, erfolgte über die Programme RecDate Filemaker Pro 5.4 Cv6 (Serono Pharma GmbH Unterschleißheim) und MEDISTAR 4.0 (CompuGroup Medical Deutschland AG). Alle Daten wurden zunächst pseudonymisiert in eine Microsoft Excel Datei der Version 2011 übertragen. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit SPSS 21 und 22 sowie mit SAS Version 9.3 und 9.4 und dem Statistikprogramm R der Version 3.1.1, teilweise in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der TU München, sowie mit Unterstützung durch den unabhängigen Statistiker Bernhard Ulm (usbbs) und M. Sc. Statistics Rainer Probst.

Als statistische Tests wurden je nach Erfordernis t-Tests für verbundene und unverbundene Stichproben verwendet, die Ergebnisse wurden unter anderem mit Hilfe von Boxplots, ROC-Kurven und Baumdiagrammen dargestellt. Um Werteverläufe im Vergleich zweier Gruppen visualisieren zu können, wurde das Programm SAS genutzt. Dies bot sich unter anderem zum Vergleich der Zeitverläufe der ovulatorischen und anovulatorischen Gruppe sowie zum Vergleich der Zeitverläufe von Hormonen und Knochenstoffwechselfparametern an. Das Programm berechnete die Mittelwerte der Parameter zu den Zeitpunkten T1 bis T4 und trug sie in einem kartesischen Koordinatensystem auf.

### **2.5.1 Repeated Measures Modell**

Um nicht nur Werte zu einzelnen Zeitpunkten vergleichen zu können, sondern beispielsweise auch zu zeigen, welchen Einfluss der Ovulationsstatus im Vorzyklus auf den gesamten Werteverlauf hat, reichte das klassische multiple Regressionsmodell nicht aus. Intraindividuelle Korrelationen, also Korrelationen der Beobachtungen eines Subjekts, würden die Ergebnisse verzerren und mussten daher in der Regressionsanalyse berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit lagen longitudinale Daten vor und es musste davon ausgegangen werden, dass die bis zu vier Beobachtungen einer Patientin miteinander korreliert sind. Daher war die Erweiterung der linearen Regression um einen Repeated Measures (wiederholte Messungen) Ansatz nötig. Dies funktionierte durch das Hinzufügen eines patienten-

individuellen Effekts sowie der Spezifizierung der Kovarianzmatrix für die Messungen einer Person. Vereinfacht erklärt wird ein Modell für jeden Patienten geschätzt und aus den Ergebnissen aller Patienten anschließend der gesamte Effekt berechnet. Allgemein ist zu empfehlen, die Zeit als Kovariable ins Modell mit aufzunehmen, um mögliche Entwicklungen, die nicht von den anderen Einflussgrößen, sondern durch den Zeitverlauf selbst entstanden sind, korrekt zu modellieren. Daher wurde die Zeit in den Berechnungen dieser Studie als Kovariable berücksichtigt.

Auch zur Modellierung des Einflusses des zyklischen Verlaufs der Hormone auf die Knochenstoffwechselfparameter wurde das Repeated Measures Modell verwendet. Um Confounding zwischen FSH und Estradiol bestmöglich zu vermeiden, wurde das Modell je einmal mit beiden Hormonen und einmal mit jedem Hormon allein berechnet.

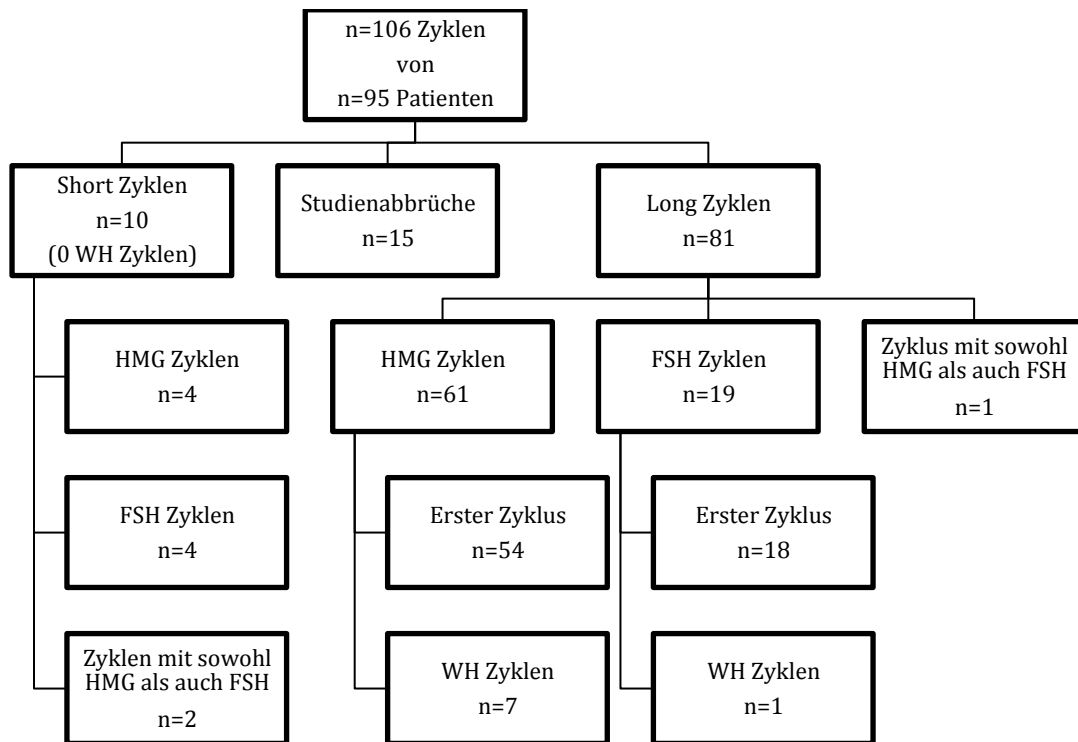
In den Statistik Softwares R und SAS lässt sich dieses Repeated Measures Modell durch verschiedene Funktionsaufrufe schätzen. Im Zuge dieser Arbeit wurde es mit der Prozedur GENMOD in SAS durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Basischarakteristika**

Insgesamt wurden 106 Zyklen von 95 Patientinnen in die Studie aufgenommen. Davon wurden 15 Zyklen vor Erreichen der Eizellentnahme abgebrochen (s. Abb. 2). Gründe für Zyklusabbrüche waren Zyklusunregelmäßigkeiten, die eine Stimulation verhinderten, versäumte Termine, Erfüllen eines Ausschlusskriteriums und private Gründe der Patientinnen. In zwei Zyklen wurde der Stimulationsbeginn mehrmals verschoben, diese wurden lediglich in den Berechnungen zu Vitamin D und Schwangerschaft einbezogen.

Berechnungen den Knochenstoffwechsel betreffend wurden mit einem Kollektiv von n=71 Patientinnen durchgeführt. In diesem Kollektiv wurden ausschließlich Zyklen im langen Protokoll eingeschlossen und jeweils nur der erste IVF-Zyklus einer Patientin.



**Abbildung 2: Consort-Diagramm zum Patientenkollektiv; Abbruchgründe: finanziell, persönlich, beruflich, Zyklusstörungen, fehlende Proben (näheres s. Appendix 7.1)**

## 3.2 Knochenstoffwechsel

### 3.2.1 Knochenstoffwechsel-Kollektiv

Die 71 Patientinnen im Knochenstoffwechsel-Kollektiv waren zum Zeitpunkt T1 (also zu Beginn der Down-Regulation) durchschnittlich 38 +/- 3 Jahre alt und hatten einen mittleren BMI von 23 +/- 4 kg/m<sup>2</sup>. Der Vitamin D-Mittelwert zu T1 betrug 20 +/- 9 ng/ml war also niedrig. In 40 Fällen wiesen die Patientinnen einen Wert von unter 20 ng/ml auf. Der Mittelwert von Kalzium zu T1 lag bei 2,42 mmol/l (Median: 2,42, SD: 0,09), wobei eine Patientin ein Kalzium von 2,71 mmol/l und somit leicht oberhalb des Referenzwerts aufwies (Nr. 25) und eine Studienteilnehmerin einen leicht erniedrigten Wert von 2,11 mmol/l (Nr. 77) zeigte.

**Tabelle 1: Deskriptive Statistik der Basisparameter zu T1 im Knochenstoffwechsel-Kollektiv**

	N	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	Standardabweichung
<b>Alter bei T1 (Jahre)</b>	71	30	45	38	37,82	3,36
<b>Vitamin D (ng/ml)</b>	71	5	47	18	19,56	9,05
<b>Kalzium (mmol/l)</b>	71	2,11	2,71	2,42	2,42	0,09
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	71	18,65	42,52	21,67	22,92	4,43

### **3.2.2 Einfluss zyklischer Hormonveränderungen auf den Knochen**

#### **3.2.2.1 Hormon- und Knochenstoffwechselfparameter im zyklischen Verlauf**

Um den Verlauf der Hormon- und Knochenstoffwechselfparameter von T1 (Downregulationsbeginn in der Lutealphase des Vorzyklus) über T2 (Start der Stimulation in der Follikelphase des Stimulationszyklus) und T3 (Eizellentnahme) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) zu analysieren und einen visuellen Vergleich der Verläufe zu erhalten, wurden sie zunächst in Form von Boxplots dargestellt.

Hierbei fiel auf, dass FSH und Estradiol von T2 zu T4 einen ähnlichen Verlauf aufwiesen – einen steilen Anstieg von T2 zu T3 und darauf folgend ein starker Abfall von T3 zu T4. Die Mediane von FSH lagen im entsprechenden Referenzbereich, während Estradiol zu T3 Mediane von 1138,5 pg/ml erreichte (Referenzbereich Estradiol periovulatorisch 34-400 pg/ml). Der t-Test zwischen verbundenen Stichproben ergab, dass sämtliche Veränderungen von Estradiol und FSH zwischen den einzelnen Zeitpunkten signifikant waren, bis auf das Delta zwischen T1 FSH und T2 FSH.

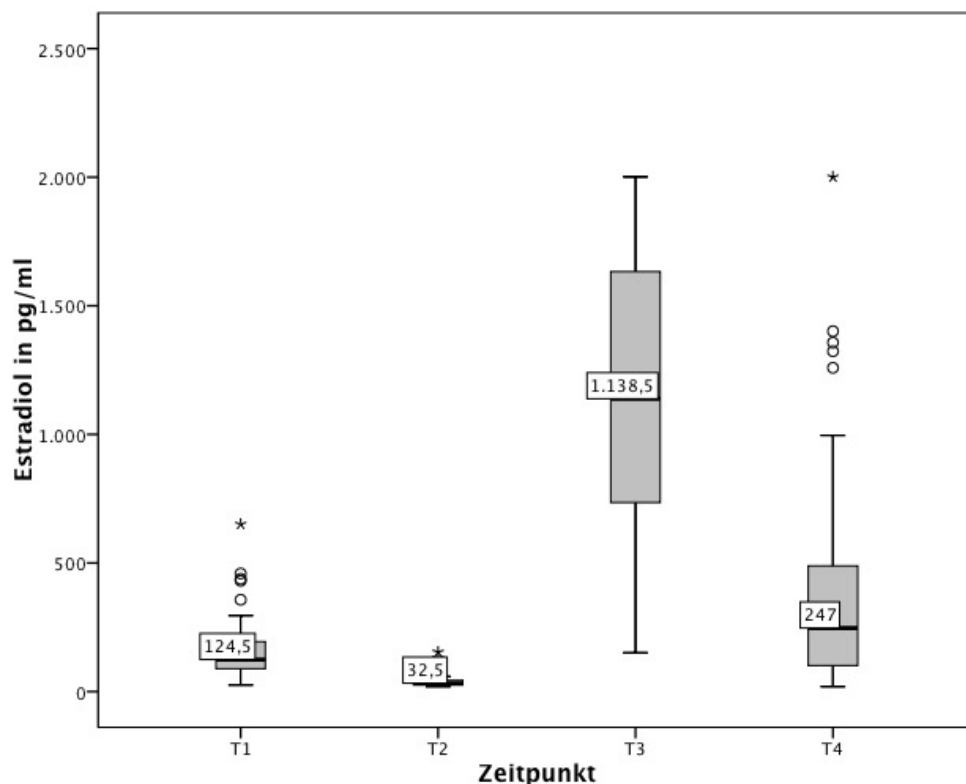
LH hingegen sank im Verlauf des Fertilisationszyklus von medianen Werten bei 5 mIU/ml zu T1 auf unter 1 mIU/ml zu T3 ab und veränderte sich von T3 zu T4 nicht mehr signifikant. Somit war der physiologisch auftretende periovulatorische LH-Peak (Referenzwert LH Mittelzyklus 17-77 mIU/ml), der demnach zu T3 zu erwarten gewesen wäre, nicht zu verzeichnen.

Bei Betrachtung der Verläufe der Knochenstoffwechselfparameter zeigte sich bei den Parametern BAP, OC und TRACP ein tendenzieller Abfall der Werte von T1 über T2 zu T3.

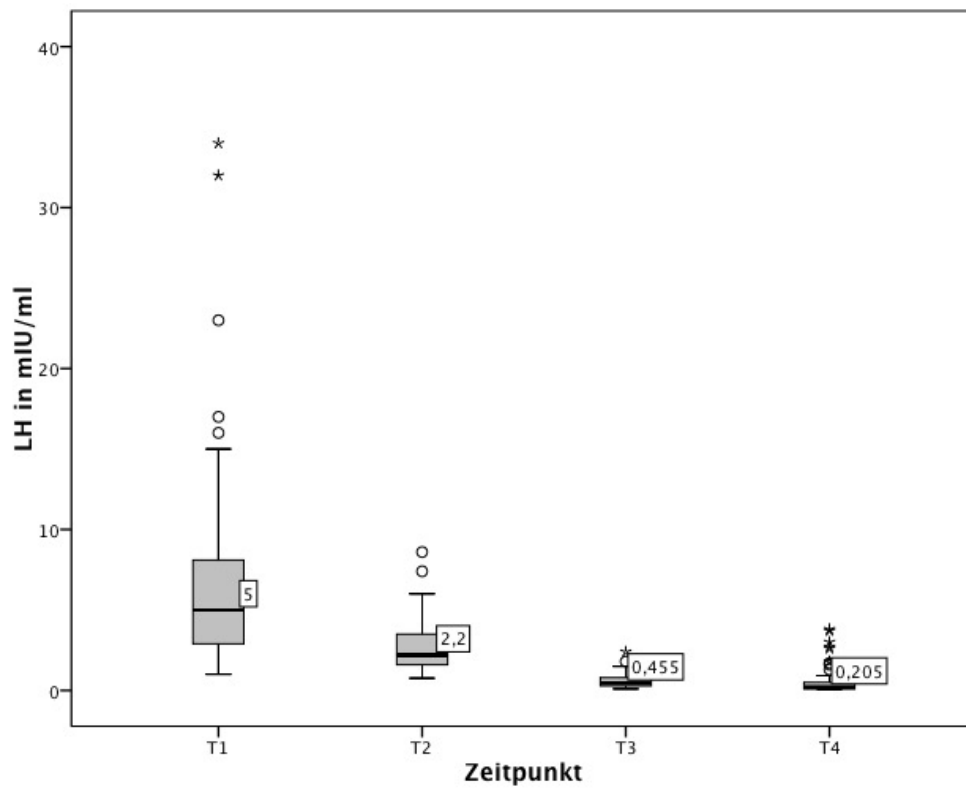
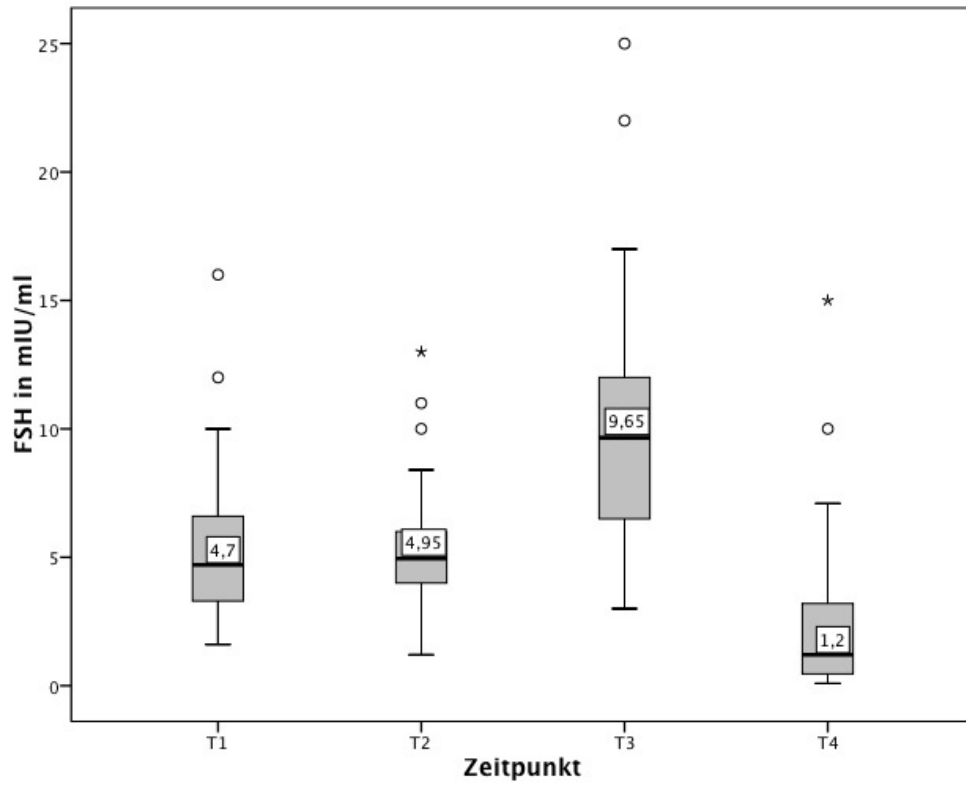
BAP und OC jedoch stiegen von T3 zu T4 erneut an, während TRACP stagnierte. CTX hingegen stieg von T1 über T2 zu T3 tendenziell an und fiel anschließend von T3 zu T4 wieder.

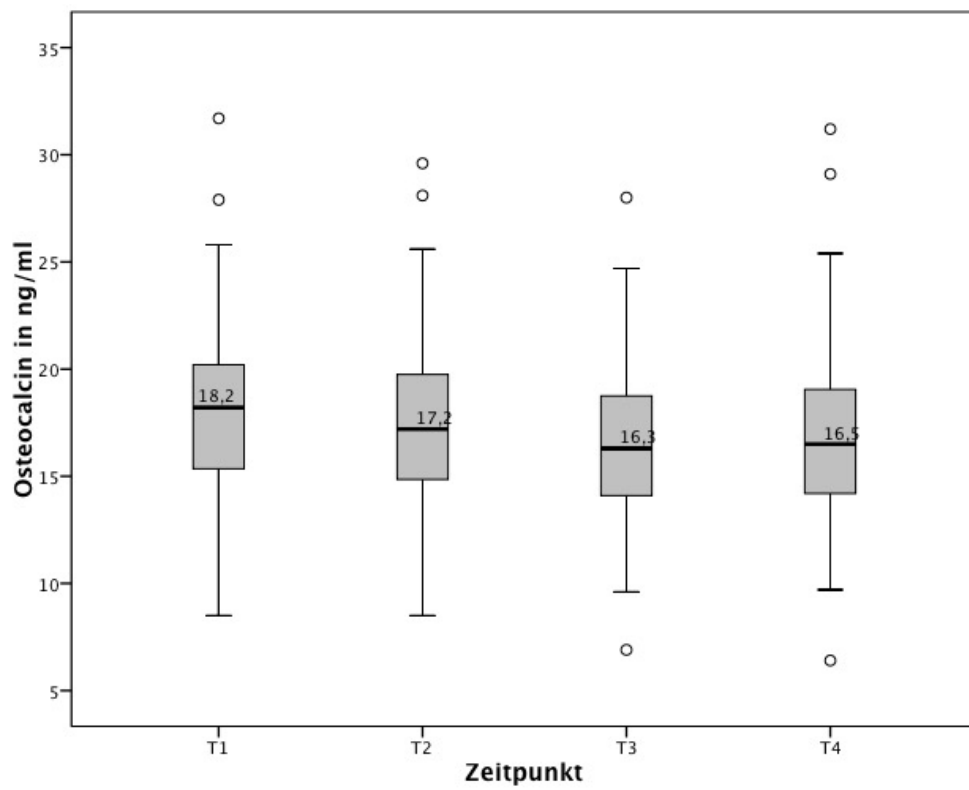
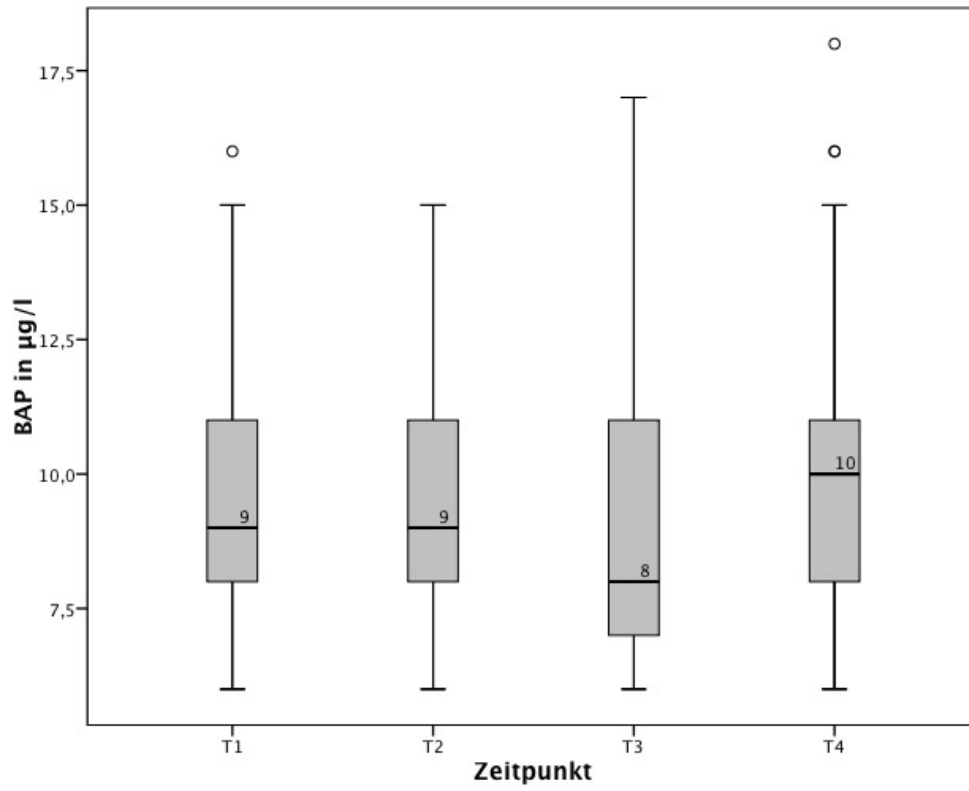
Besonders fiel auf, dass die Knochenaufbauparameter BAP und OC einen inversen Verlauf zu FSH und Estradiol aufwiesen, während der Knochenabbauparameter CTX dem Verlauf von FSH und Estradiol folgte. TRACP zeigte ein Mischbild, der Verlauf entsprach jedoch eher dem der Knochenaufbauparameter.

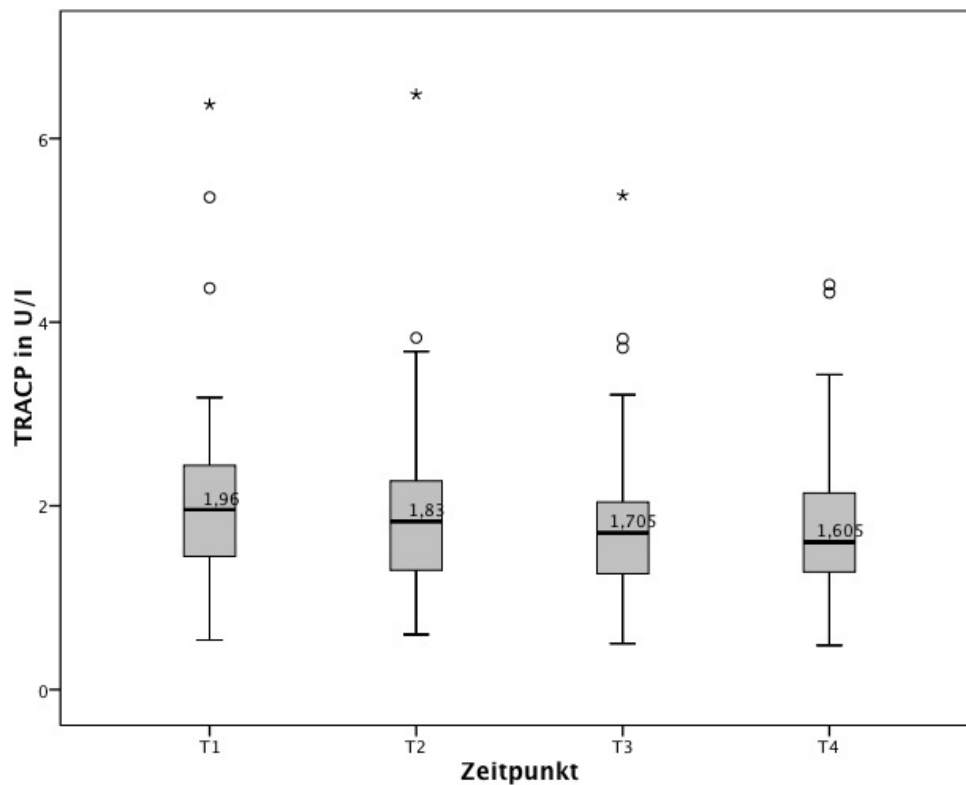
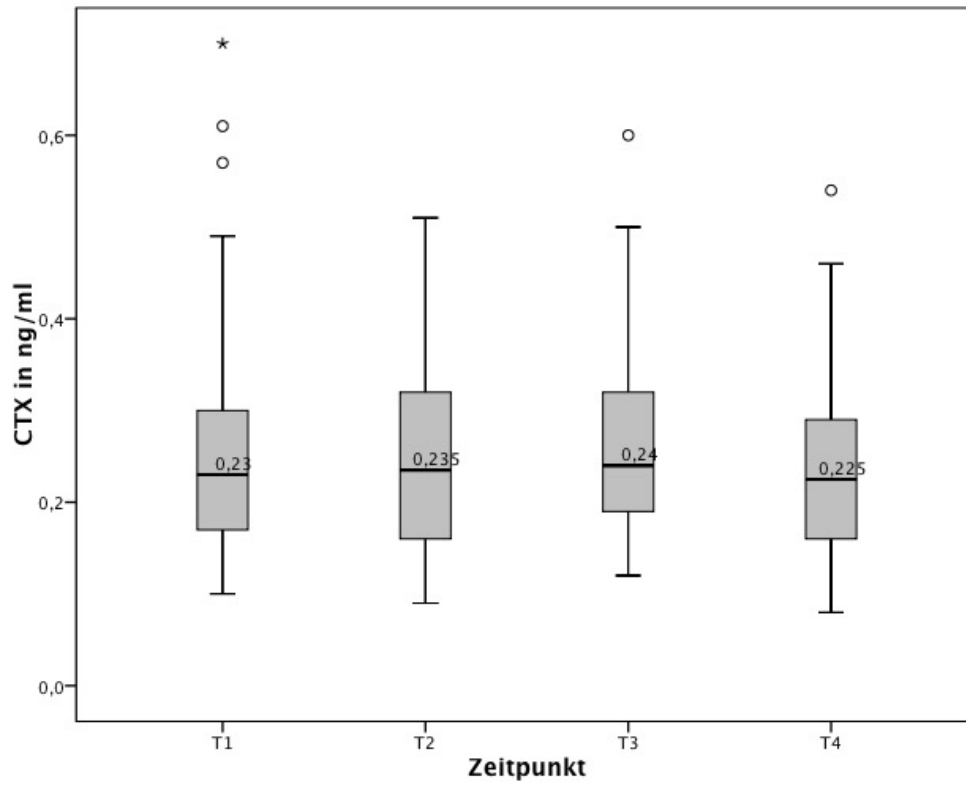
Im t-Test für verbundene Stichproben zeigte sich bei BAP ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten T2/T4 ( $p=0,041$ ) und T3/T4 ( $p=0,002$ ). Osteocalcin wies signifikante Unterschiede auf bei T1/T3 ( $p=0,000$ ), T1/T4 ( $p=0,006$ ), T2/T3 ( $p=0,001$ ) und T2/T4 ( $p=0,042$ ). Die Unterschiede zwischen den einzelnen CTX-Durchschnittswerten im Verlauf des Fertilisationszyklus waren nicht signifikant, jedoch gab es mit einem  $p$  von 0,052 bei T3/T4 einen Hinweis auf Signifikanz. TRACP zeigte signifikante Unterschiede zwischen T1/T2 ( $p=0,002$ ), T1/T3 ( $p=0,000$ ), T1/T4 ( $p=0,000$ ) und T2/T3 ( $p=0,044$ ) sowie einen Hinweis auf signifikant unterschiedliche Werte zwischen T2/T4 ( $p=0,064$ ).











**Abbildung 3: Hormone und Knochenstoffwechselfparameter im zyklischen Verlauf. T1=Lutealphase des vorangehenden Zyklus, T2=Stimulationsbeginn, T3=Follikelpunkt, T4=Lutealphase des Stimulationszyklus. N zu den einzelnen Zeitpunkten s. Tab. 2**

**Tabelle 2: Durchschnittswert, SD und Median der Hormone und Knochenstoffwechselfparameter von T1 bis T4. Fehlende Werte durch geringere Teilnahme am Zeitpunkt T4 (Durchbruchblutungen/Schwangerschaften) begründet**

	N		Mittelwert	Median	SD
	Gültig	Fehlend			
<b>T1 BAP (µg/l)</b>	71	0	9,75	9,00	2,68
<b>T1 Osteocalcin (ng/ml)</b>	70	1	18,50	18,15	4,59
<b>T1 CTX (ng/ml)</b>	71	0	0,26	0,23	0,12
<b>T1 TRACP (U/l)</b>	71	0	2,09	1,97	0,92
<b>T1 FSH (mIU/ml)</b>	71	0	5,64	4,90	2,89
<b>T1 LH (mIU/ml)</b>	71	0	7,45	5,70	7,26
<b>T1 E2 (pg/ml)</b>	71	0	156,49	125,00	111,58
<b>T1 Progesteron (ng/ml)</b>	71	0	6,64	5,50	5,26
<b>T2 BAP</b>	71	0	9,63	9,00	2,39
<b>T2 Osteocalcin</b>	71	0	17,93	17,20	4,47
<b>T2 CTX</b>	71	0	0,26	0,25	0,11
<b>T2 TRACP</b>	71	0	1,94	1,91	0,85
<b>T2 FSH</b>	71	0	5,07	4,90	2,22
<b>T2 LH</b>	71	0	2,54	1,90	1,57
<b>T2 E2</b>	71	0	40,67	33,00	31,05
<b>T3 BAP</b>	70	1	9,50	9,00	2,74
<b>T3 Osteocalcin</b>	69	2	16,61	16,30	3,96
<b>T3 CTX</b>	71	0	0,28	0,26	0,11
<b>T3 TRACP</b>	71	0	1,83	1,77	0,80
<b>T3 FSH</b>	71	0	9,92	9,50	4,68
<b>T3 LH</b>	71	0	0,56	0,46	0,42
<b>T3 E2</b>	71	0	1149,82	1160,00	567,13
<b>T4 BAP</b>	58	13	9,95	10,00	2,88
<b>T4 Osteocalcin</b>	58	13	16,71	16,35	4,51
<b>T4 CTX</b>	58	13	0,24	0,23	0,10
<b>T4 TRACP</b>	58	13	1,79	1,61	0,80
<b>T4 FSH</b>	58	13	2,23	1,20	2,69
<b>T4 LH</b>	58	13	0,58	0,21	0,90
<b>T4 E2</b>	58	13	389,76	247,00	419,85
<b>T4 Progesteron</b>	58	13	12,79	10,50	10,08

### 3.2.2.2 Einfluss der Hormone auf den Verlauf der Knochenstoffwechselfparameter

Angesichts der auffälligen Ähnlichkeiten der Zeitverläufe von Hormon- und Knochenstoffwechselfparametern wurde der Einfluss der Hormone FSH und E2 auf die Knochenstoffwechselfparameter im zeitlichen Verlauf mittels Repeated Measures genauer analysiert. Hierbei bestätigten sich die visuell erkennbaren Zusammenhänge auch rechnerisch. Zunächst wurde der Einfluss von FSH und Estradiol gemeinsam auf die Knochenstoffwechselfparameter modelliert und anschließend, um Confounding bestmöglich zu vermeiden, nochmals der Einfluss der Hormone einzeln.

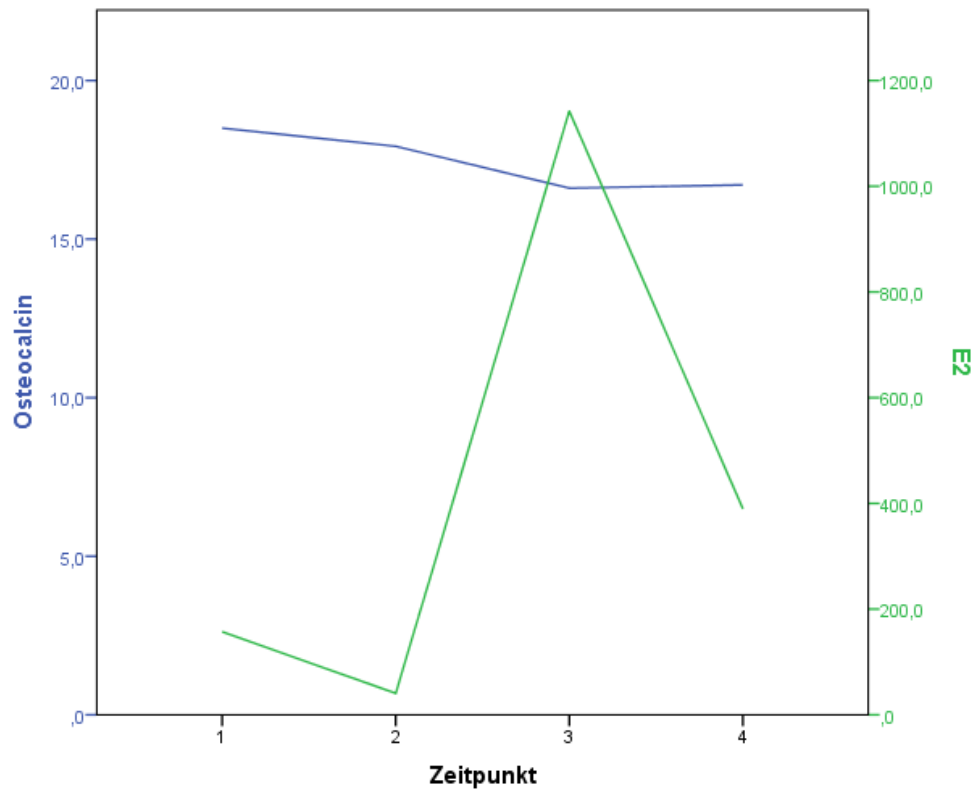
Das Modell zeigte, dass der Einfluss von Estradiol auf Osteocalcin im Zeitverlauf signifikant negativ war. Signifikanz bestand sowohl mit Hinzunahme von FSH ( $p=0,0276$ ), als auch bei alleiniger Betrachtung des Estradiol-Einflusses auf Osteocalcin ( $p=0,0166$ ) (s. Tab. 3).

**Tabelle 3: GENMOD mit SAS: Einfluss von Estradiol auf Osteocalcin mit und ohne Hinzunahme von FSH als potenzieller Confounder**

Schätzer des Effekts von E2 (und FSH) auf OC					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
<b>FSH</b>	-0,0936	0,1197	-0,3281	0,1410	0,4344
<b>E2</b>	<b>-0,0009</b>	0,0004	-0,0017	-0,0001	<b>0,0276</b>
<b>Faktor Zeit</b>	-0,0370	0,4425	-0,9043	0,8304	0,9334

Schätzer des Effekts von E2 auf OC					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
<b>E2</b>	<b>-0,0012</b>	0,0005	-0,0021	-0,0002	<b>0,0166</b>
<b>Faktor Zeit</b>	0,0503	0,5386	-1,0054	1,1060	0,9256

Ein Hinweis darauf war bei Betrachtung der Boxplots bereits durch den inversen Verlauf der beiden Parameter aufgefallen (s. Abb. 3). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Mittelwerte der beiden Parameter zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nochmals in einem gemeinsamen Diagramm dargestellt (s. Abb. 4).



**Abbildung 4: Verlauf von Estradiol (pg/ml) und Osteocalcin (ng/ml) im Vergleich. Zeitpunkt 1=Lutealphase des vorangehenden Zyklus, Zeitpunkt 2=Stimulationsbeginn, Zeitpunkt 3=Follikelpunkt, Zeitpunkt 4=Lutealphase des Stimulationszyklus**

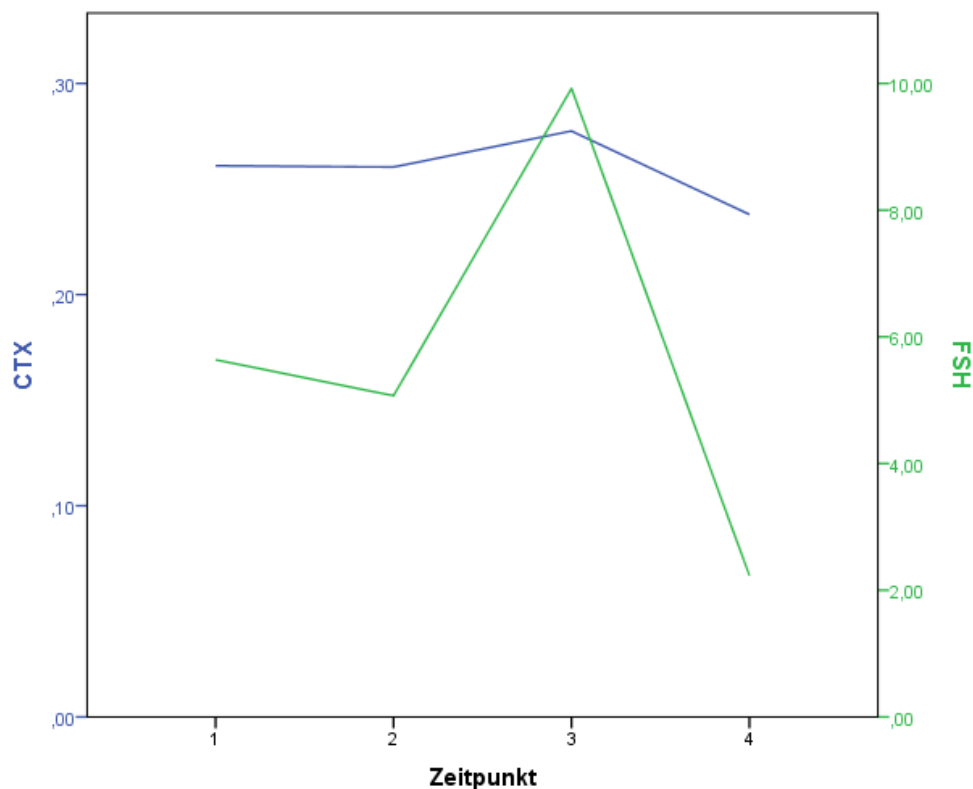
FSH hingegen nahm im Zeitverlauf hoch signifikant positiven Einfluss auf den Parameter CTX: im Modell mit Estradiol zusammen  $p=0,0002$ , im Modell ohne Estradiol  $p=0,0001$  (s. Tab. 4).

**Tabelle 4: GENMOD mit SAS: Einfluss von FSH auf CTX mit und ohne Hinzunahme von Estradiol als potenzieller Confounder**

Schätzer des Effekts von FSH (und E2) auf CTX					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
<b>FSH</b>	<b>0,0047</b>	0,0013	0,0022	0,0071	<b>0,0002</b>
<b>E2</b>	-0,0000	0,0000	-0,0000	0,0000	0,2779
<b>Faktor Zeit</b>	0,0011	0,0055	-0,0097	0,0119	0,8446

Schätzer des Effekts von FSH auf CTX					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95%		p-Wert
			Konfidenzgrenzen		
FSH	0,0041	0,0011	0,0020	0,0063	0,0001
Faktor Zeit	-0,0011	0,0043	-0,0096	0,0074	0,7994

Auch dieser Zusammenhang konnte bildlich dargestellt werden (s. Abb. 5).



**Abbildung 5: Verlauf von FSH (mIU/ml) und CTX (ng/ml) im Vergleich. Zeitpunkt 1=Lutealphase des vorangehenden Zyklus, Zeitpunkt 2=Stimulationsbeginn, Zeitpunkt 3=Follikelpunktion, Zeitpunkt 4=Lutealphase des Stimulationszyklus**

### 3.2.3 Vergleich der ovulatorischen mit der anovulatorischen Gruppe

Um den Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf den Knochen zu modellieren, wurde das Knochenstoffwechsel-Kollektiv in eine ovulatorische und eine anovulatorische Gruppe geteilt. Zur ovulatorischen Gruppe gezählt wurden Frauen, deren Progesteron-Wert zu T1, also in der Lutealphase des dem Stimulationszyklus vorangehenden Zyklus,  $\geq 6$  ng/ml war.

Entsprechend zählte zur anovulatorischen Gruppe, wer ein Progesteron  $<6$  ng/ml in der Lutealphase des Vorzyklus aufwies.

Um den Ovulationsstatus des Vorzyklus anhand des Progesteron-Werts der Lutealphase bestimmen zu können, musste sichergestellt sein, dass die Patientin zum Zeitpunkt der Blutabnahme zu T1 bereits in der Lutealphase war. Hierzu wurden die in der Praxis im Rahmen der Fertilisationsbehandlung erhobenen Informationen herangezogen, die aus Laborparametern, Zyklusbeobachtung, Ultraschalluntersuchungen und der eventuellen Auslösung des Eisprungs im Downregulationszyklus (also dem der Stimulation vorangehenden Zyklus) bestanden. Zudem wurden nur Patientinnen in dieses Kollektiv aufgenommen, die sich zu T1 mindestens am Zyklustag 17 befanden, da erst zu diesem Zeitpunkt mit einem ausreichenden postovulatorischen Anstieg von Progesteron zu rechnen ist. So ergab sich ein Kollektiv von 45 Patientinnen. Zur Gruppe der ovulatorischen Zyklen wurden 32 Frauen gerechnet, zur Gruppe ohne Ovulation im Vorzyklus gehörten 13 Frauen.

Die beiden Gruppen unterschieden sich weder bezüglich Alter, BMI, Vitamin D, noch hinsichtlich Kalzium signifikant voneinander.



**Tabelle 5: Deskriptive Statistik. Vergleich der Gruppe mit Ovulation im Vorzyklus (Progesteron zu T1  $\geq$ 6 ng/ml; n=32) mit der Gruppe ohne Ovulation im Vorzyklus (Progesteron zu T1  $<$ 6 ng/ml; n=13)**

Ovulationsgeschehen im Vorzyklus			Alter bei T1 (Jahre)	Vitamin D (ng/ml)	Kalzium (mmol/L)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
Anovulatorischer Vorzyklus	N	Gültig	13	13	13	13
		Fehlend	0	0	0	0
	Mittelwert		37,69	20,92	2,44	22,61
	Median		38,00	19,00	2,42	22,06
	Standardabweichung		3,04	11,39	0,07	3,2
	Minimum		32	9	2,29	19,72
	Maximum		42	47	2,56	32,01
Ovulatorischer Vorzyklus	N	Gültig	32	32	32	32
		Fehlend	0	0	0	0
	Mittelwert		38,31	18,84	2,42	21,86
	Median		38,00	17,00	2,41	21,45
	Standardabweichung		3,38	7,64	0,09	2,79
	Minimum		30	5	2,26	18,82
	Maximum		45	32	2,63	30,80

Die Mittelwerte von OC, CTX und TRACP der anovulatorischen Gruppe waren überwiegend höher als die der ovulatorischen Gruppe (s. Abb. 6-8).

Im t-Test für unabhängige Stichproben zeigte sich für CTX ein signifikant höherer Mittelwert in der anovulatorischen Gruppe zum Zeitpunkt T4 ( $p=0,012$ ) und ein Hinweis auf signifikant höhere Mittelwerte ebenfalls in der anovulatorischen Gruppe zu den Zeitpunkten T1 ( $p=0,064$ ) und T3 ( $p=0,067$ ). Osteocalcin war zu T2 in der anovulatorischen Gruppe im Mittel signifikant höher als in der ovulatorischen Gruppe ( $p=0,005$ ) und der Durchschnitt von TRACP zu T4 zeigte sich ebenso tendenziell höher in der anovulatorischen Gruppe ( $p=0,062$ ).

Somit war ein möglicher Einfluss des Ovulationsgeschehens im Vorzyklus auf den Verlauf der Knochenstoffwechsellparameter bis in den Folgezyklus hinein zu beobachten.

Dieser mögliche Zusammenhang wurde mit Hilfe von Repeated Measures modelliert, dabei hatte eine erfolgte Ovulation im Vorzyklus hoch signifikant negativen Einfluss auf den weiteren Verlauf von CTX ( $p=0,003$ ) sowie einen signifikant negativen Einfluss auf den weiteren Verlauf von Osteocalcin ( $p=0,0129$ ). Für TRACP ergab sich lediglich eine Tendenz zu einem ebenfalls negativen Einfluss einer im Vorzyklus stattgehabten Ovulation auf den Verlauf dieses Parameters ( $p=0,1264$ ). BAP zeigte sich unbeeinflusst (s. Abb. 6-9 und Tab. 6-9).

**Tabelle 6: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf CTX**

Schätzer des Effekts von Ovulation auf CTX					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
Ovulation	<b>-0,0675</b>	0,0227	-0,1120	-0,0230	<b>0,0030</b>
Faktor Zeit	0,0009	0,0062	-0,0112	0,0130	0,8851

**Tabelle 7: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation auf Osteocalcin**

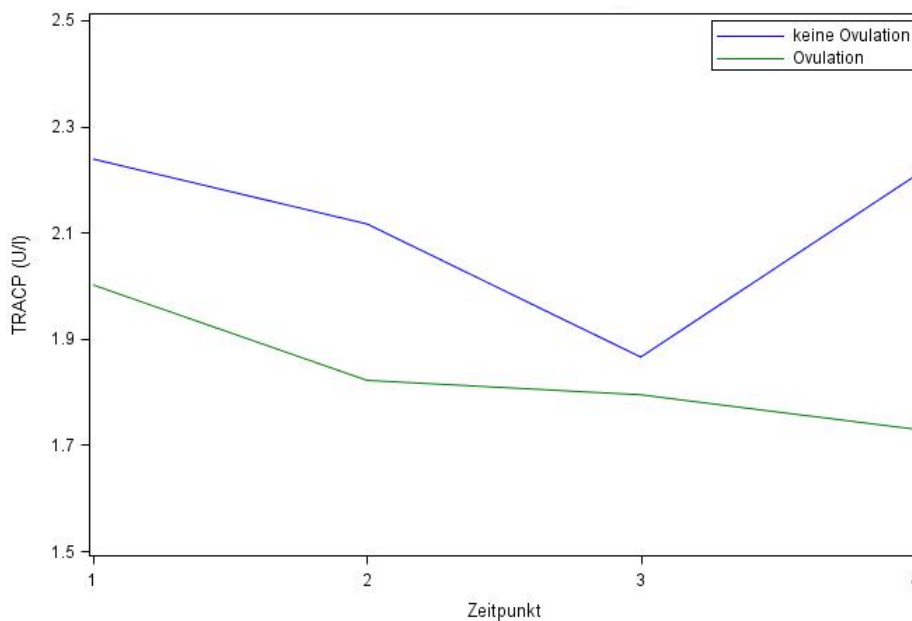
Schätzer des Effekts von Ovulation auf Osteocalcin					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
Ovulation	<b>-2,9690</b>	1,1946	-5,3104	-0,6277	<b>0,0129</b>
Faktor Zeit	-0,8629	0,1796	-1,2150	-0,5109	<0,0001

**Tabelle 8: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf TRACP**

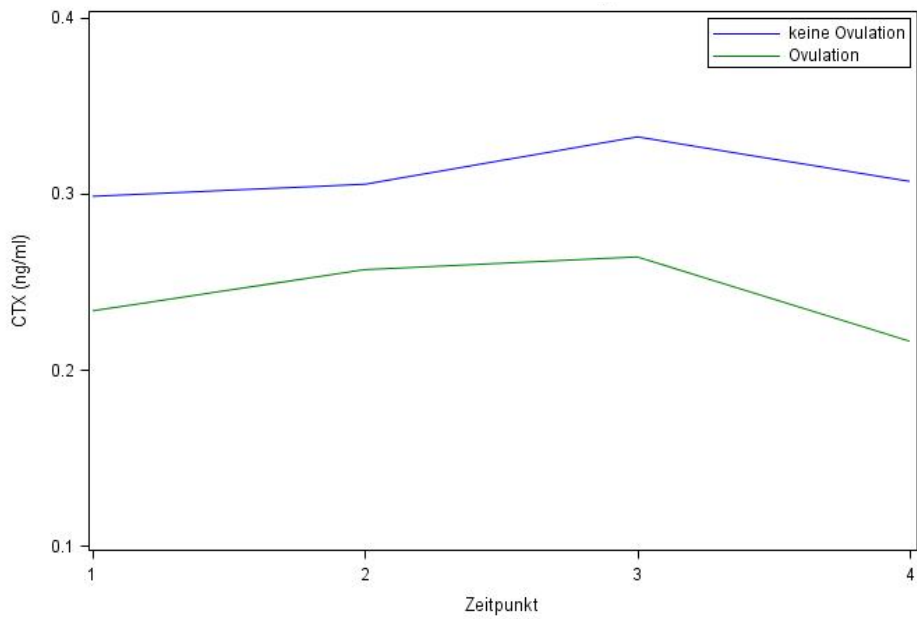
Schätzer des Effekts von Ovulation auf TRACP					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
Ovulation	<b>-0,2361</b>	0,1545	-0,5389	0,0667	<b>0,1264</b>
Faktor Zeit	-0,0804	0,0198	-0,1193	-0,0416	<0,0001

**Tabelle 9: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf BAP**

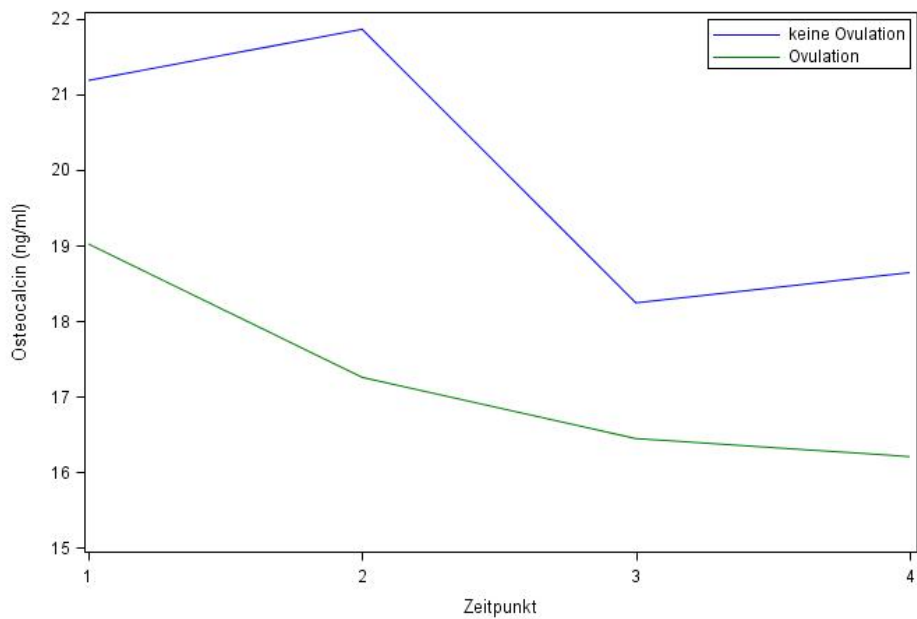
Schätzer des Effekts von Ovulation auf BAP					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
Ovulation	<b>0,2082</b>	0,8486	-1,4549	1,8714	<b>0,8061</b>
Faktor Zeit	0,0272	0,0839	-0,1372	0,1916	0,7459



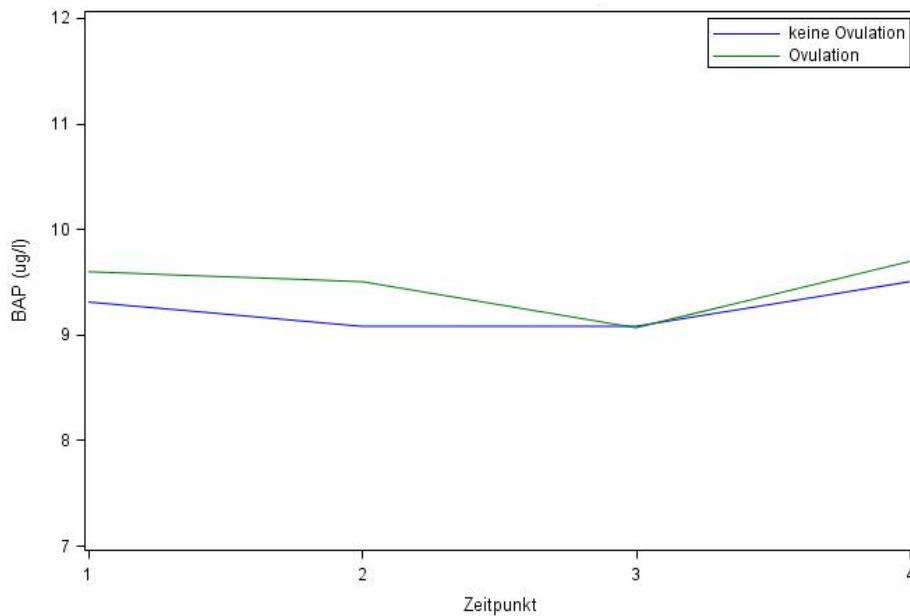
**Abbildung 6: Vergleich der TRACP-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus**



**Abbildung 7: Vergleich der CTX-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus**



**Abbildung 8: Vergleich der Osteocalcin-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus**



**Abbildung 9: Vergleich der BAP-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus**

Ein Einfluss des Ovulationsgeschehens im Vorzyklus zeigte sich jedoch nicht in den weiteren Verläufen der Hormone Estradiol, FSH und LH im Stimulationszyklus, was auch rechnerisch bestätigt wurde (s. Abb. 10-12 und Tab. 10-12). Progesteron war lediglich zu T1 und T4 abgenommen worden. Während dieses zu T1 als Unterscheidungskriterium ovulatorischer Zyklen von anovulatorischen Zyklen diente, wies es zu T4 keine signifikanten Unterschiede im t-Test mehr auf.

**Tabelle 10: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf E2**

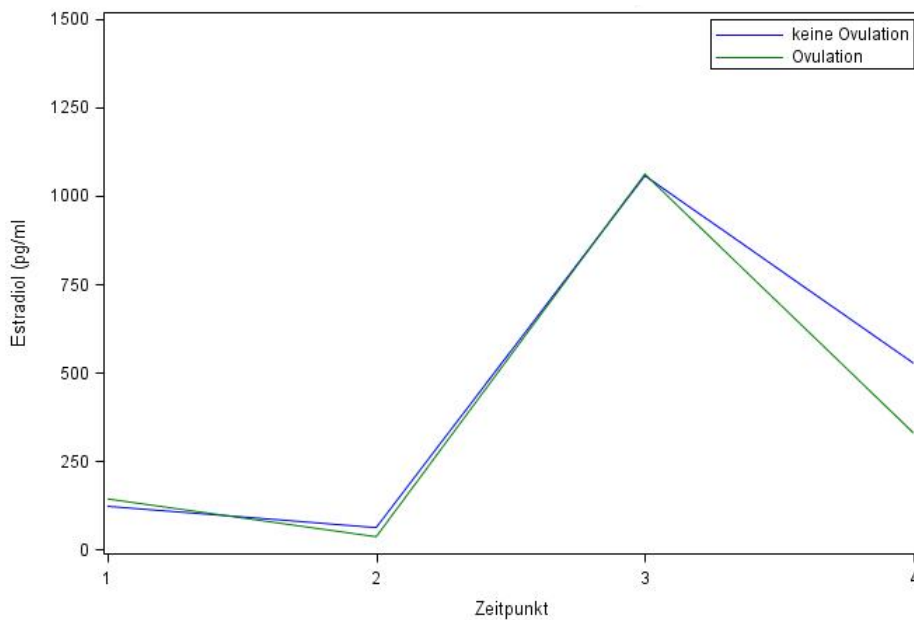
Schätzer des Effekts von Ovulation auf E2					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
<b>Ovulation</b>	<b>-58,7231</b>	57,5018	-171,424	53,9783	<b>0,3071</b>
<b>Faktor Zeit</b>	192,6889	22,6416	148,3122	237,0656	<0,0001

**Tabelle 11: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf FSH**

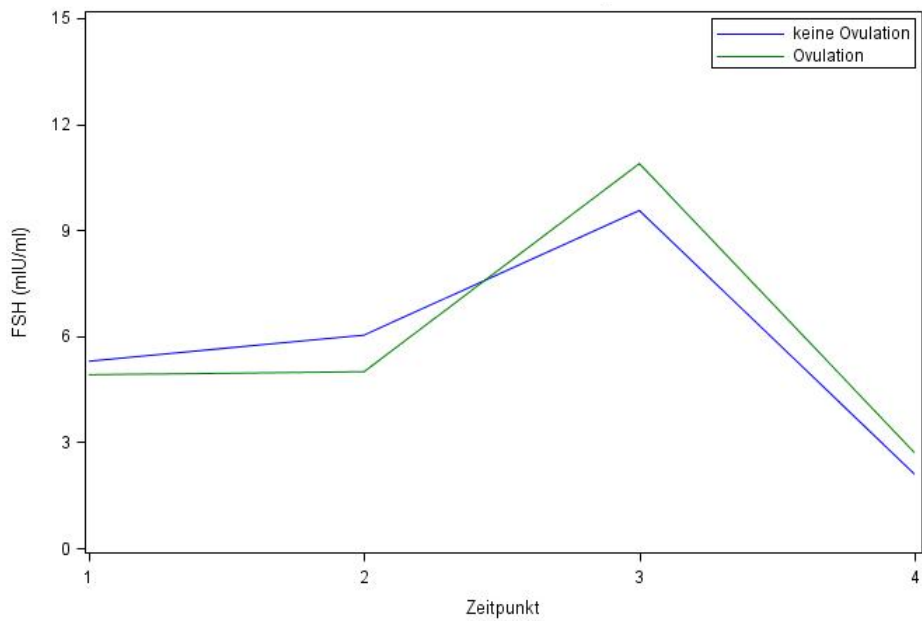
Schätzer des Effekts von Ovulation auf FSH					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
Ovulation	<b>0,0801</b>	0,7124	-1,3161	1,4763	<b>0,9105</b>
Faktor Zeit	-0,0527	0,1619	-0,3699	0,2646	0,7448

**Tabelle 12: GENMOD mit SAS: Einfluss von Ovulation im Vorzyklus auf LH**

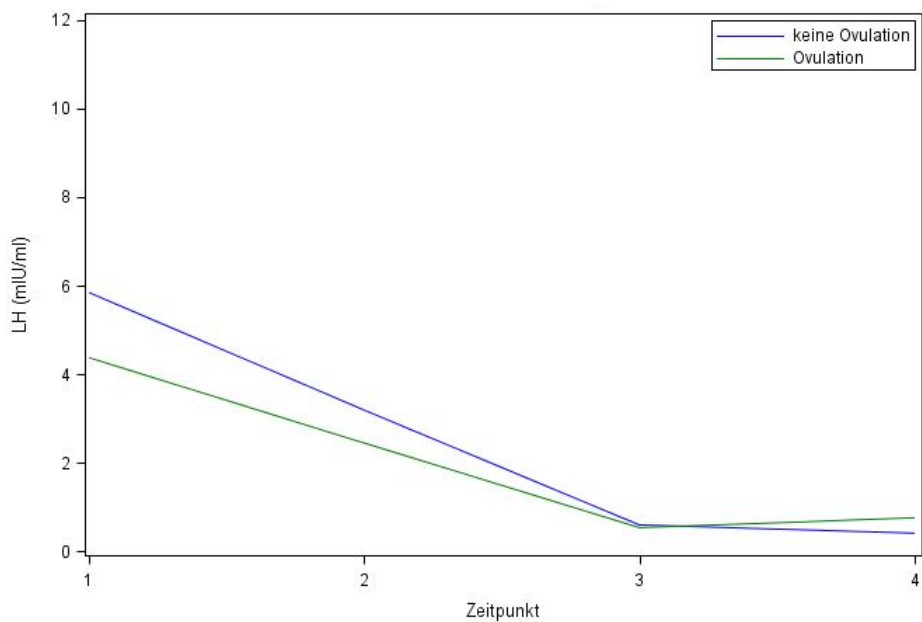
Schätzer des Effekts von Ovulation auf LH					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
Ovulation	<b>-0,5215</b>	0,3338	-1,1758	0,1328	<b>0,1182</b>
Faktor Zeit	-1,4985	0,1286	-1,7506	-1,2464	<0,0001



**Abbildung 10: Vergleich der Estradiol-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus**



**Abbildung 11: Vergleich der FSH-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus**



**Abbildung 12: Vergleich der LH-Mittelwert-Verläufe von T1 (Lutealphase des Vorzyklus) bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus) abhängig vom Ovulationsgeschehen im Vorzyklus**

### 3.2.4 Einfluss von rFSH vs. HMG Stimulation

Zur Klärung der Frage, ob die Stimulationsart Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat, wurde das Knochenstoffwechsel-Kollektiv (n=71) entsprechend geteilt. 54 Patientinnen (76%) erhielten HMG zur Stimulation, während 17 Patientinnen (24%) mit rFSH stimulierten. Da zu T4 einige Werte fehlten, lagen die Gruppengrößen zu diesem Messzeitpunkt bei n=45 für HMG-Stimulation und n=13 für rFSH-Stimulation.

Im Anschluss an die Stimulation zeigte der Vergleich der Knochenstoffwechselfparameter dieser Gruppen jeweils zu den Zeitpunkten T3 und T4 im t-Test keine signifikanten Unterschiede. Zu T3 ließ sich überdies auch keine Tendenz der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich rFSH- versus HMG-Stimulation feststellen. Die Mittelwerte von BAP und CTX waren in der HMG-Gruppe höher, während OC und TRACP in der rFSH-Gruppe höher waren. Zu T4 jedoch ließen sich tendenziell höhere Mittelwerte bei BAP, OC und TRACP sowie im Median insgesamt tendenziell höhere Knochenstoffwechselfparameter feststellen, wenn rFSH alleine verabreicht worden war (n.s.) (s. Tab. 13).

Patientinnen unter rFSH allein hatten zu T3 durchschnittlich niedrigere FSH-Werte ( $p=0,000$ ), zu T4 dagegen höhere ( $p=0,044$ ). Auch LH war zu T4 tendenziell höher, wenn rFSH allein verabreicht worden war ( $p=0,058$ ). Estradiol dagegen war zum Zeitpunkt T4 in der rFSH-Gruppe signifikant niedriger ( $p=0,012$ ) (s. Tab. 13 und Abb. 13). Zusammenfassend also bei Gabe von rFSH alleine zu T3 niedrigeres Serum-FSH und gleich hohe Knochenstoffwechselfparameter sowie gleich hohes Serum-LH und Serum-Estradiol im Vergleich zur HMG-Gruppe. Zu T4 unter rFSH alleine höheres Serum-FSH und -LH, niedrigeres Serum-Estradiol und tendenziell höhere Knochenstoffwechselfparameter. CTX zeigte sich immer in der Gruppe höher, in welcher auch Serum-FSH höher war.



**Tabelle 13: Knochenstoffwechsel- und Hormonwerte zu T3 und T4 mit HMG vs. rFSH-Stimulation**

Parameter	HMG vs. rFSH	Anzahl n	Mittelwert	Median	SD
BAP T3 (µg/l)	HMG	54	9,52	9,00	2,92
	rFSH	16	9,44	9,00	2,13
OC T3 (ng/ml)	HMG	53	16,44	16,00	3,71
	rFSH	16	17,15	17,00	4,80
CTX T3 (ng/ml)	HMG	54	0,28	0,27	0,11
	rFSH	17	0,26	0,22	0,11
TRACP T3 (U/l)	HMG	54	1,76	1,67	0,80
	rFSH	17	2,08	2,00	0,78
E2 T3 (pg/ml)	HMG	54	1177,50	1178	555,44
	rFSH	17	1061,88	948	611,89
FSH T3 (mIU/ml)	HMG	54	10,99	10,25	4,59
	rFSH	17	6,54	6,50	3,15
LH T3 (mIU/ml)	HMG	54	0,59	0,50	0,34
	rFSH	17	0,49	0,24	0,61
BAP T4 (µg/l)	HMG	45	9,87	9,00	2,93
	rFSH	13	10,23	11,00	2,80
OC T4 (ng/ml)	HMG	45	16,22	16,20	4,29
	rFSH	13	18,39	17,20	5,04
CTX T4 (ng/ml)	HMG	45	0,24	0,22	0,10
	rFSH	13	0,24	0,24	0,11
TRACP T4 (U/l)	HMG	45	1,71	1,54	0,77
	rFSH	13	2,08	1,63	0,90
E2 T4 (pg/ml)	HMG	45	447,49	296,00	441,70
	rFSH	13	189,92	103,00	257,25
FSH T4 (mIU/ml)	HMG	45	1,62	0,93	1,62
	rFSH	13	4,34	2,70	4,30
LH T4 (mIU/ml)	HMG	45	0,44	0,16	0,80
	rFSH	13	1,09	0,50	1,08
Prog T4 (ng/ml)	HMG	45	12,53	11,00	8,86
	rFSH	13	13,68	8,90	13,92

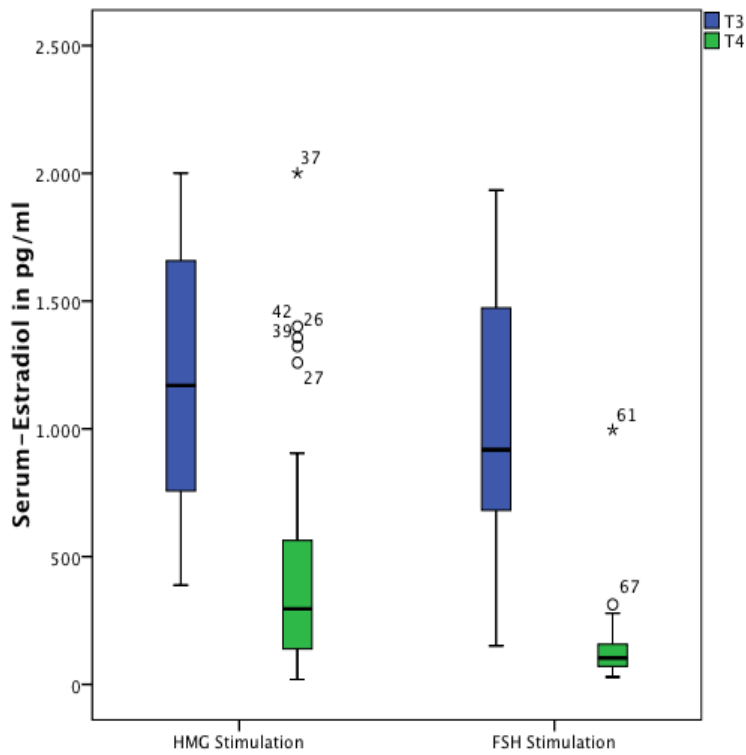
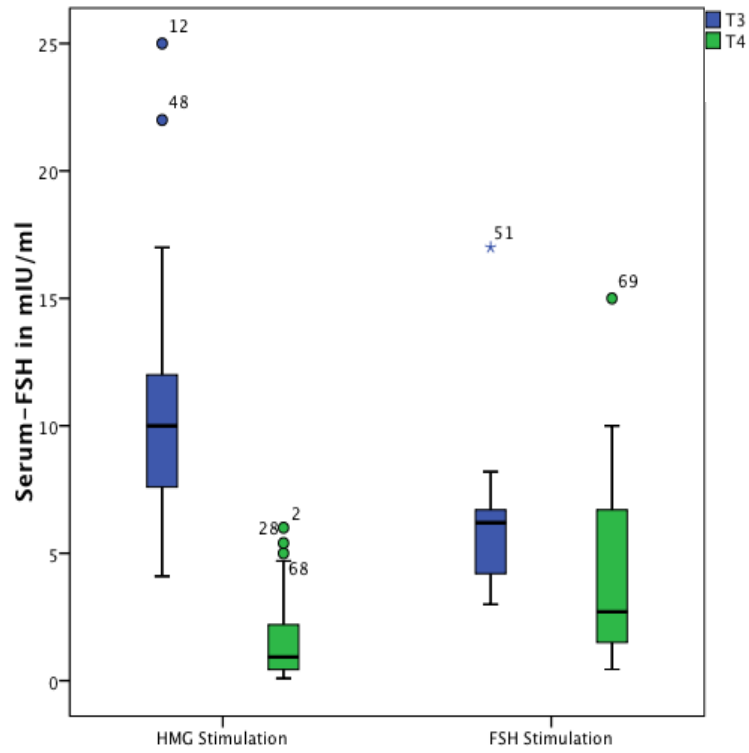


Abbildung 13: FSH und Estradiol im Serum im Vergleich nach HMG- vs. FSH-Stimulation

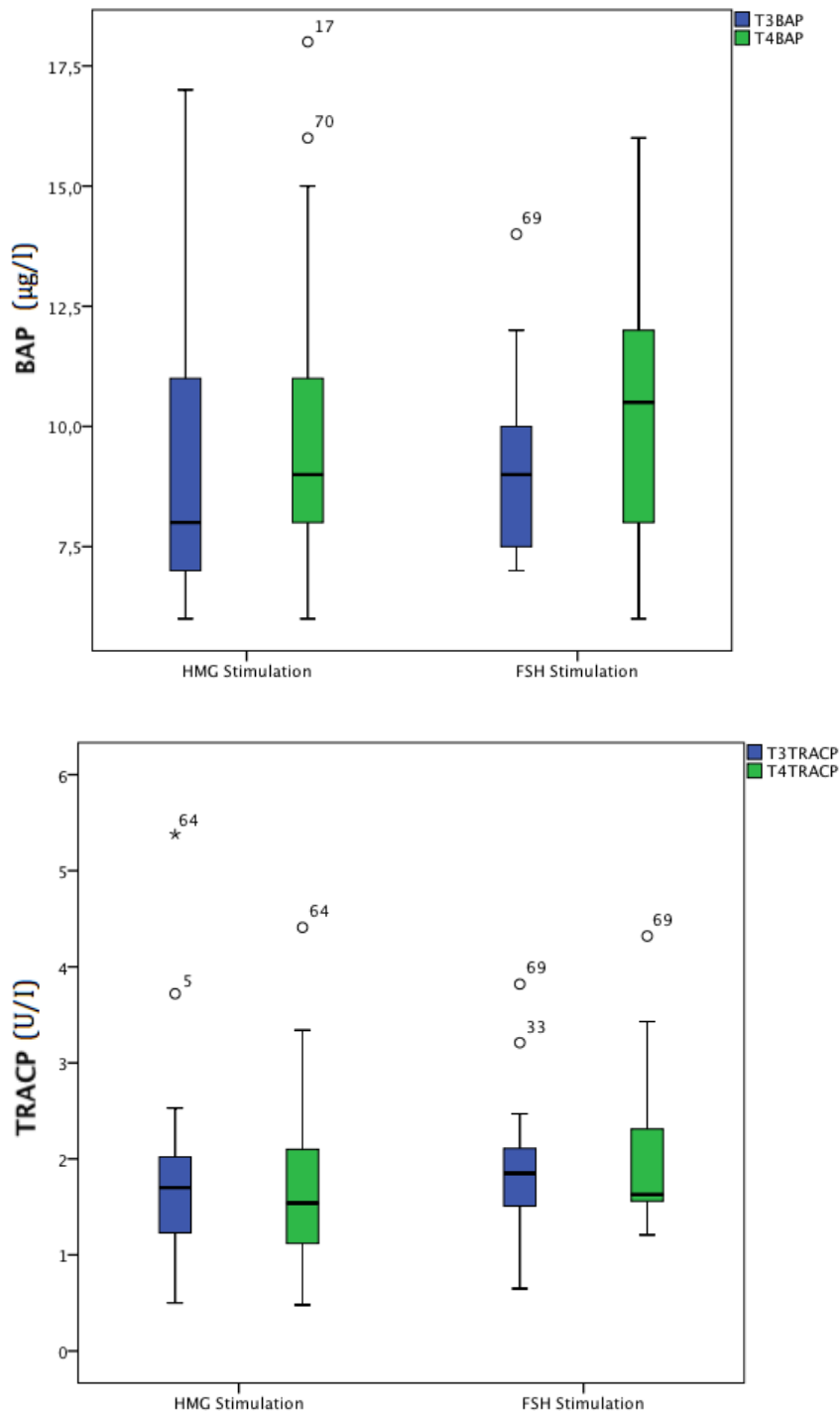
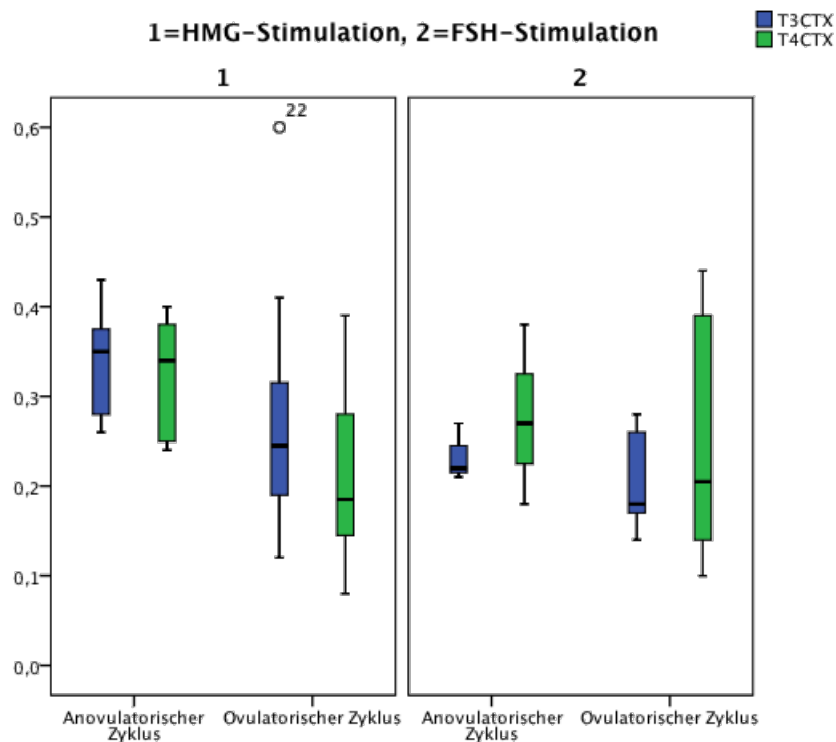
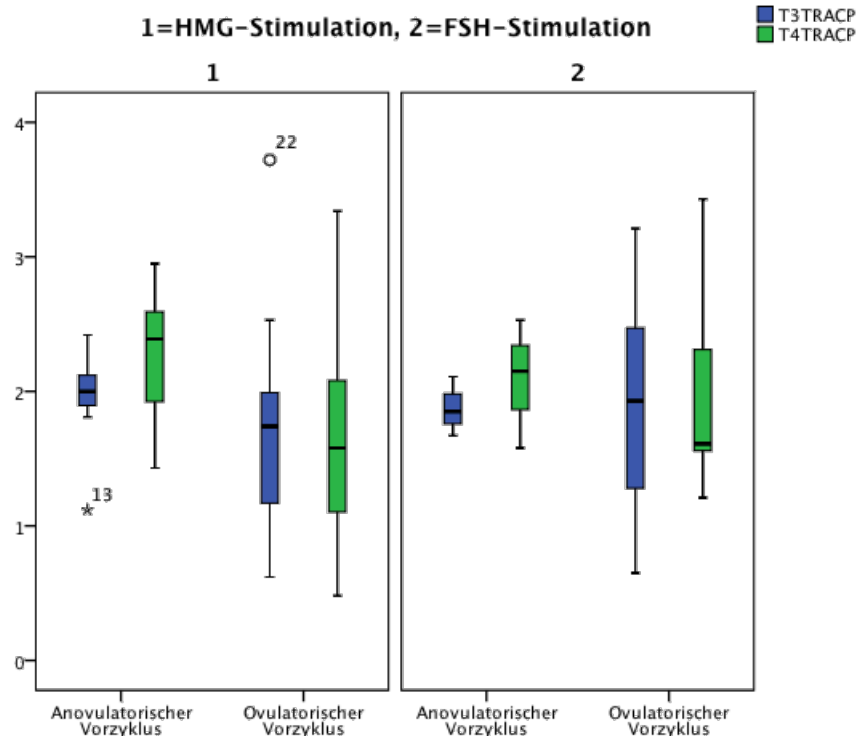


Abbildung 14: BAP und TRACP im Serum im Vergleich nach HMG- vs. FSH-Stimulation. Eine Tendenz zu höheren Werten zu T4 nach FSH-Stimulation ist erkennbar (n.s.)

Um zudem den Einfluss der Ovulation im Vorzyklus auf den Knochen getrennt nach Stimulationsart zu untersuchen, wurde das oben beschriebene Ovulationsstatus-Kollektiv in eine rFSH- und eine HMG-Gruppe unterteilt.

Von 34 mit HMG stimulierten Patientinnen hatten 25 eine Ovulation im Downregulationszyklus und somit 73,5%. Unter den 11 mit rFSH stimulierten Patientinnen hatten 7, also 63,6% eine Ovulation im Downregulationszyklus. In der Gruppe mit HMG-Stimulation ergab der t-Test erneut signifikant höhere Werte für T3 CTX ( $p=0,013$ ) und T4 CTX ( $p=0,004$ ) sowie für T4 TRACP ( $p=0,05$ ), wenn keine Ovulation im Vorzyklus stattgefunden hatte. In der Gruppe mit rFSH-Stimulation zeigten sich in dieser Hinsicht keine signifikanten Unterschiede, jedoch war in den Boxplots weiterhin eine Tendenz zu höheren Werten in anovulatorischen Zyklen zu erkennen (s. Abb. 15). BAP und Osteocalcin zeigten in beiden Stimulationsgruppen keine signifikant unterschiedlichen Werte abhängig davon, ob eine Ovulation im Vorzyklus stattgefunden hatte oder nicht.





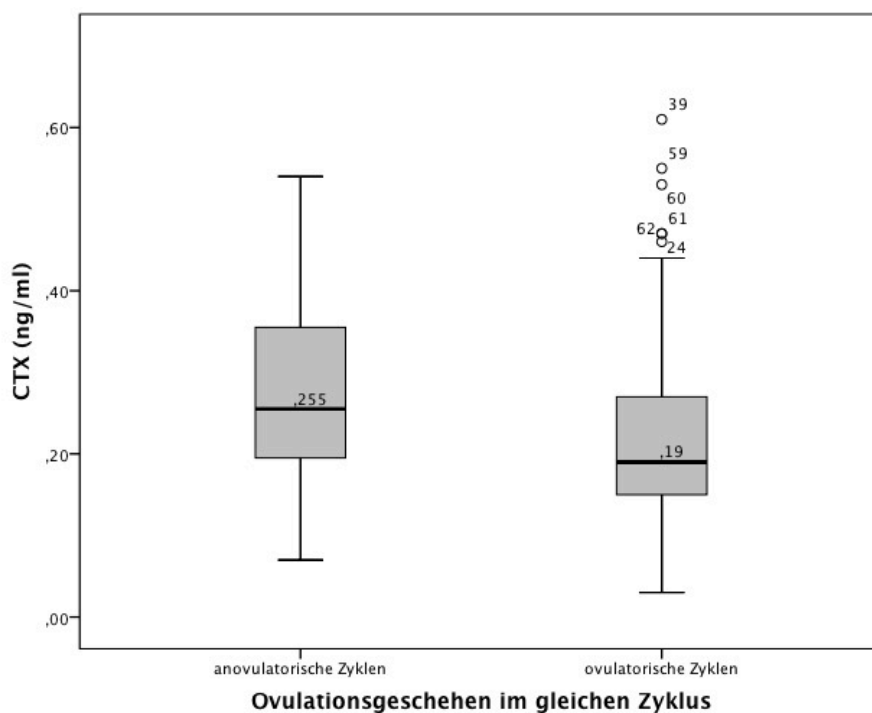
**Abbildung 15: Vergleich der beiden Stimulationsgruppen (HMG vs. rFSH) bezüglich des Ovulationsstatus im Downregulationszyklus. In beiden Stimulationsgruppen ist eine Tendenz zu höheren Knochenabbauparametern erkennbar, wenn der Downregulationszyklus anovulatorisch war (TRACP in U/l, CTX in ng/ml)**

### 3.3 Erweitertes Kollektiv zum Einfluss von Ovulation auf CTX

Durch Hinzunahme weiterer Daten, welche im Rahmen einer Studie zum Einfluss von Steroid- und Peptidhormonen auf den Knochenstoffwechsel gesammelt worden waren, konnte der Einfluss des Ovulationsstatus im gleichen Zyklus auf den Abbaumarker CTX im um 77 Zyklen erweiterten Kollektiv modelliert werden. Diese zusätzlichen Zyklen stammten aus einem Kollektiv von 9 Frauen, welche zwischen 2005 und 2008 in der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar rekrutiert worden waren. Als ovulatorisch galten im hinzugenommenen Kollektiv diejenigen Zyklen, die sowohl eine positive Ovulationsanzeige auf dem Zyklusmonitor als auch ein Progesteron größer-gleich 6 ng/ml aufwiesen, als anovulatorisch, wenn beides nicht zutraf. Zyklen, bei denen nur eines der beiden Ovulationskriterien positiv war, wurden aus den Berechnungen ausgeschlossen. Dieses Kollektiv konnte zu dem weiter oben bereits besprochenen Ovulations-Kollektiv von n=45 Zyklen hinzugenommen werden. Der Einfluss des Ovulationsgeschehens auf CTX im gleichen Zyklus konnte somit im Umfang eines Kollektivs von 28 anovulatorischen und 94 ovulatorischen Zyklen nochmals überprüft werden. Betrachtet wurde hierbei nur CTX zum

Zeitpunkt T1 (Lutealphase des Downregulationszyklus), beziehungsweise in der Lutealphase der hinzugenommenen Zyklen.

Boxplots zeigten auch hier höhere luteale CTX-Werte in anovulatorischen Zyklen (s. Abb. 16). Im t-Test für unabhängige Stichproben erwies sich der mittlere CTX-Wert signifikant höher in anovulatorischen Zyklen als in ovulatorischen Zyklen ( $p=0,019$ ). So betrug der Mittelwert von CTX in ovulatorischen Zyklen 0,2190 ng/ml und in anovulatorischen Zyklen 0,2793 ng/ml. Eine lineare Regressionsanalyse bestätigte die Vermutung, dass eine stattgefundene Ovulation im gleichen Zyklus zu niedrigeren CTX-Werten führt ( $p=0,019$ ). Abhängig vom Ovulationsgeschehen veränderte sich dieser Knochenstoffwechselfparameter somit sowohl im gleichen als auch im Folgezyklus (s. Kapitel 3.2.3).



**Abbildung 16: luteale CTX-Werte abhängig vom Ovulationsgeschehen im gleichen Zyklus**

### 3.4 Einfluss von Vitamin D auf Befruchtungs- und Geburtenrate

#### 3.4.1 Deskriptive Statistik zum Vitamin D-Kollektiv

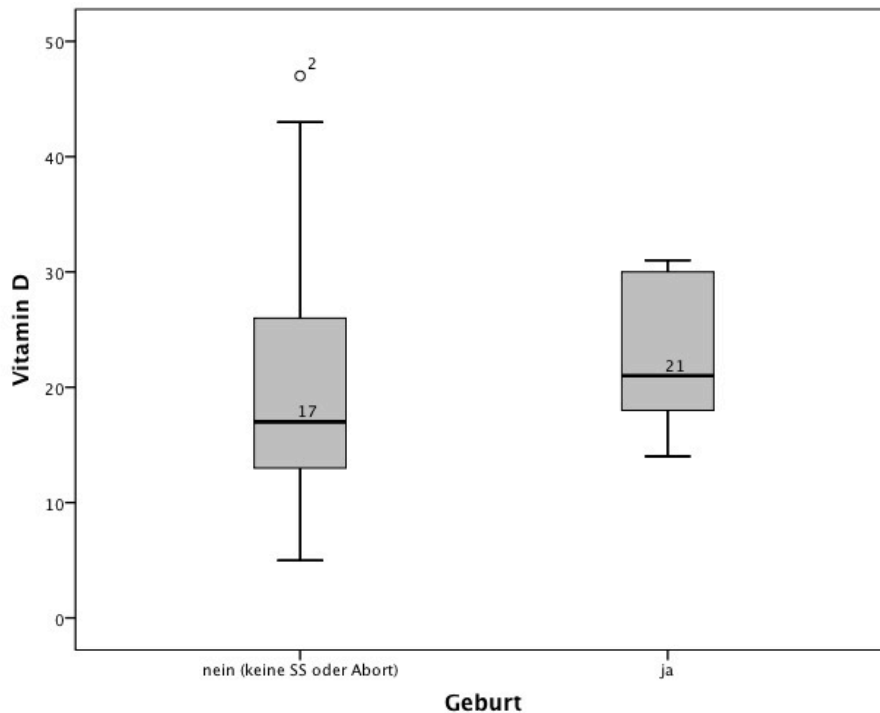
In einem Seitenarm der Studie wurde der mögliche Einfluss von Vitamin D auf den Erfolg der in vitro Fertilisation modelliert. Es wurde ein Kollektiv von 83 Frauen untersucht, hierbei wurden sowohl lange als auch kurze Stimulationsprotokolle mit einbezogen sowie die genannten Zyklen mit Zyklusunregelmäßigkeiten, nicht jedoch die Wiederholer-Zyklen, da

hier keine Vitamin D-Bestimmung stattgefunden hatte. Das Durchschnittsalter zu T1 lag bei 38 Jahren und zu T1 wiesen die Studienteilnehmerinnen einen mittleren BMI von 23 kg/m<sup>2</sup> sowie ein mittleres Kalzium von 2,41 mmol/L auf, welches außer im Falle von Nr. 77 (Kalzium=2,11 mmol/L) und von Nr. 25 (Kalzium=2,71 mmol/L) im Normbereich lag. In 48 Fällen zeigte sich ein Vitamin D-Wert von unter 20 ng/ml zu T1, im Durchschnitt lag dieser bei 20 ng/ml.

**Tabelle 14: Deskriptive Statistik der Basisparameter des Vitamin D - Kollektivs zu T1**

	N	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
<b>Alter bei T1 (Jahre)</b>	83	30	45	38	37,60	3,37
<b>Vitamin D (ng/ml)</b>	83	5	47	18	19,64	9,14
<b>Kalzium (mmol/l)</b>	83	2,11	2,71	2,42	2,41	0,09
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	83	18,65	42,52	21,67	22,96	4,22

Dass zwischen Vitamin D und dem Erfolg der in vitro Fertilisation ein Zusammenhang bestehen könnte, zeigte sich unter anderem im Boxplot-Diagramm (s. Abb. 17). Verglichen wurden die durchschnittlichen Vitamin D-Werte der Frauen, deren in vitro Fertilisation in der Geburt eines lebensfähigen Kindes mündete, mit Frauen, die einen Abort erlitten, oder gar nicht klinisch schwanger wurden. Eine klinische Schwangerschaft wurde definiert als der sonographische Nachweis einer Fruchthöhle wenige Wochen nach Embryotransfer. Die Boxplots zeigten die deutliche Tendenz, dass Frauen mit erfolgter Geburt initial höhere Vitamin D-Werte aufwiesen als Patientinnen die nicht schwanger geworden waren oder einen Abort erlitten hatten.



**Abbildung 17: Boxplots zum Vergleich des Serum-Vitamin Ds von Patientinnen, deren IVF Zyklus in der Geburt eines lebensfähigen Kindes mündete vs. Patientinnen ohne klinische Schwangerschaft bzw. mit Abort**

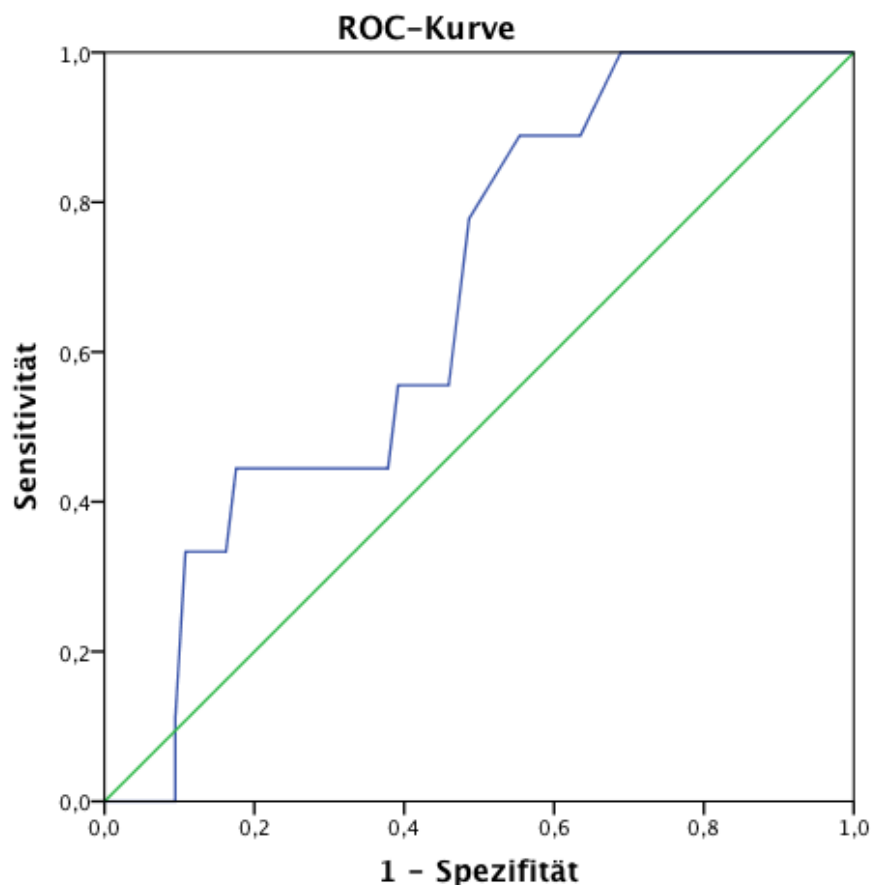
### 3.4.2 Einfluss von Serum-Vitamin D auf die Geburtenrate nach IVF

Aufgrund dieser Beobachtung wurde zunächst der Einfluss von Vitamin D auf den Erfolg der in vitro Fertilisation durch eine multiple Regression modelliert. Unabhängige Faktoren waren Alter, Serum-Kalzium, BMI und Serum-Vitamin D der Patientinnen bei T1, abhängiger Faktor war der Erfolg der IVF-Behandlung (Geburt ja/nein). Hierbei konnten keine signifikanten Regressoren festgestellt werden.

Des Weiteren wurde der potentielle Zusammenhang zwischen Vitamin D und erfolgreicher IVF-Behandlung mit Hilfe einer ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic) modelliert. Diese Kurve ist geeignet zur Überprüfung der Frage, ob man anhand des Vitamin D-Wertes effektiv zwischen Patientinnen, deren IVF-Behandlung erfolgreich war und Patientinnen, deren in vitro Fertilisation nicht zum Erfolg führte, unterscheiden kann. Relevant ist dabei die Fläche unter der Kurve, die möglichst groß werden soll. Laut Janssen und Laatz sprechen Werte über 0,9 für ausgezeichnete, Werte zwischen 0,9 und 0,8 für gute, und Werte zwischen 0,7 und 0,8 für akzeptable Testgenauigkeit (Janssen & Laatz, 2013). Die hierbei errechnete Fläche unter der Kurve ergab einen Wert von 0,669 und erreichte somit nicht die nötige Testgenauigkeit. Dennoch wies dies erneut darauf hin, dass Vitamin D tendenziell



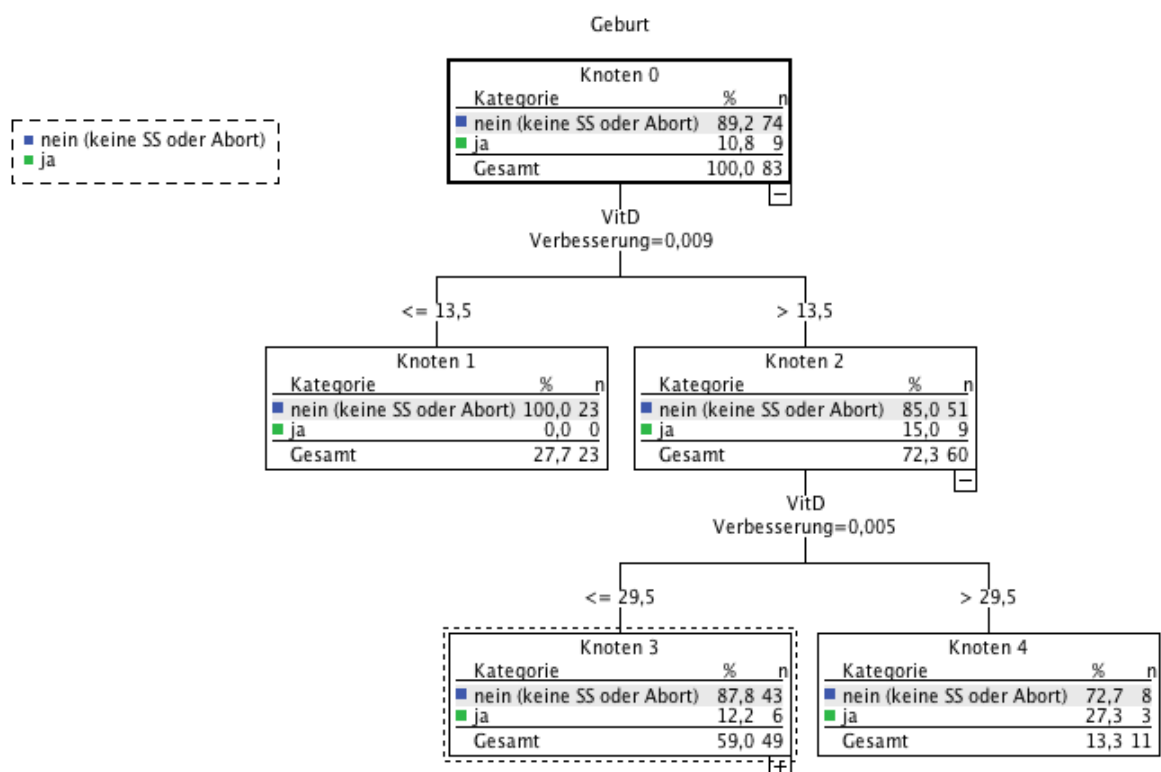
unterschiedliche Werte aufwies in Bezug darauf, ob die in vitro Fertilisation Erfolg hatte oder nicht. Um den Vitamin D-Wert zu finden, der am besten zwischen Patientinnen, die ein Kind zur Welt brachten und Patientinnen, bei denen der Behandlungszyklus nicht zum Erfolg führte unterschied, wurde der sogenannte Youden's J Index bestimmt, welcher sich aus [Sensitivität – (1 – Spezifität)] berechnet. Der Vitamin D-Wert, bei welchem dieser Index am größten ist, diskriminiert am besten zwischen einem erfolgreichen und nicht erfolgreichen IVF-Zyklus (Ruopp, Perkins, Whitcomb, & Schisterman, 2008; Youden, 1950). Der hier gefundene Cut off lag bei einem Vitamin D von 16,5 ng/ml, der mit einer Sensitivität (dass Patientinnen, die durch die Behandlung ein Kind zur Welt bringen auch als solche erkannt werden) von 0,889 und einer Spezifität (dass Patientinnen erkannt werden, aus deren IVF Zyklus keine Geburt resultiert) von 0,446 einherging. Somit konnte durch diesen Cut off zwar eine gute Sensitivität, jedoch eine geringe Spezifität erreicht werden.



**Abbildung 18: ROC Kurve zur Testgenauigkeit von Serum-Vitamin D bezüglich des Erfolgs eines IVF Zyklus**

Zusätzlich zeigte ein Entscheidungsbaum anhand der Endknoten mögliche Zusammenhänge zwischen Vitamin D-Wert und Erfolg der Fertilisationstherapie auf und ließ potentielle Trennwerte erkennen. Hierbei wurde der sogenannte CRT-Algorithmus (Classification and Regression Trees) genutzt, der die Merkmale binär in zwei Teilmengen aufteilt. Als Inhomogenitätsmaß wurde bei Vorliegen von kategorialen abhängigen Variablen das Maß Gini gewählt, welches dann am höchsten ist, wenn alle Fälle in einem Knoten gleichmäßig auf beide Kategorien verteilt sind. Ziel des CRT-Algorithmus ist die Minimierung dieses Inhomogenitätsmaßes (Bühl, 2014, pp. 751-752).

Hier zeigte sich, dass keine Patientin mit Vitamin D-Werten unter 13,5 ng/ml eine Schwangerschaft austrug, während 15% der Patientinnen über 13,5 ng/ml als Resultat des beobachteten IVF-Zyklus ein Kind zur Welt brachten. Eine sehr hohe Geburtenrate von 27,3% hatte das Teilkollektiv mit einem Vitamin D-Wert über 29,5 ng/ml.



**Abbildung 19: Baumdiagramm über mögliche Zusammenhänge zwischen Vitamin D-Wert und Erfolg der Fertilisationstherapie**

## **4 Diskussion**

In dieser prospektiven klinisch-experimentellen Studie wurde der Einfluss weiblicher Geschlechtshormone, insbesondere von FSH, auf den Knochen untersucht. Das spezielle Setting der Kinderwunsch-Behandlung mit rFSH beziehungsweise HMG erbrachte die Möglichkeit, diese Einflüsse unter künstlich beeinflussten und kontrollierten hormonellen Bedingungen zu analysieren. Weiterhin wurde der Einfluss von Ovulation auf den Knochenstoffwechsel untersucht, was durch genaue Bestimmung des Eisprungs im Rahmen der Fertilisationstherapie ermöglicht wurde.

In einem Seitenarm der Studie wurde der Zusammenhang zwischen Vitamin D-Werten und Erfolg der Kinderwunsch-Therapie modelliert.

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

Zahlreiche Risikofaktoren für Osteoporose wie beispielsweise bestimmte gastrointestinale oder endokrinologische Vorerkrankungen, diverse Medikamente sowie Lebensgewohnheiten werden diskutiert oder sind bereits bekannt ("S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.: Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen," 13.11.2014). Um grobe Ausreißer unter den Probandinnen zu vermeiden, wurden in dieser Studie folgende Ausschlusskriterien benannt: Erkrankungen, die zu Malabsorption führen, Anorexie und Bulimie, schwere hormonelle Störungen und die Einnahme von den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Medikamenten wie Antikonvulsiva und systemische Glukokortikoide. Eine medikamentös eingestellte Hypothyreose, kurzzeitige topische Glukokortikoideinnahme <3 Monate sowie eine geringfügige Raucheranamnese wurden toleriert.

Da der Einfluss von FSH auf den Knochen zentrale Fragestellung der Arbeit war, zählten hohe endogene FSH-Ausgangswerte >20 mIU/ml zu den Ausschlusskriterien. Auch kann erhöhtes FSH Hinweis darauf geben, dass die Perimenopause bereits eingetreten ist (siehe auch Referenzwerte FSH) (O'Connor, Holman, & Wood, 2001). Da es bereits in der Perimenopause zu erhöhtem Knochenumsatz kommt, sollten Verzerrungen größtmöglich vermieden

werden, indem potentiell perimenopausale Frauen aus der Studie exkludiert wurden (Seifert-Klauss et al., 2012).

In das Kollektiv aufgenommen wurden zudem nur Frauen zwischen 30 und 45 Jahren. Studien zeigen, dass die peak bone mass (PBM) spätestens in der dritten Lebensdekade erreicht wird (Baxter-Jones, Faulkner, Forwood, Mirwald, & Bailey, 2011). Der mediane Eintritt der Menopause liegt laut einer unter 12.676 Frauen aus Mittel- und Osteuropa durchgeführten Studie von Stepaniak et al. derzeit bei über 50 Jahren (Stepaniak et al., 2013). Die festgelegten Altersgrenzen des untersuchten Kollektivs schlossen somit nur Frauen ein, die sich bezüglich ihres Alters in einer ähnlichen Phase des Knochenstoffwechsels befanden.

#### **4.1.2 Knochenstoffwechselfparameter**

Der Knochen unterliegt einem kontinuierlichen Prozess der Erneuerung. Im gesunden jungen Menschen herrscht eine Balance zwischen Auf- und Abbau des Knochens, ein zyklischer Prozess, der etwa 90 Tage dauert und im Wesentlichen von knochenresorbierenden Zellen, den Osteoklasten, sowie knochenformierenden Zellen, den Osteoblasten bewerkstelligt wird. Der Knochenmetabolismus wird unmittelbar wiedergegeben durch die von Osteoblasten und Osteoklasten sezernierten Proteine beziehungsweise Enzyme sowie durch Abbauprodukte, welche aus der Knochenmatrix freigesetzt werden (Baron, 2000; Calvo et al., 1996). Diese sogenannten Knochenstoffwechselfparameter sind vergleichsweise schnell, einfach und zuverlässig im Serum oder Urin bestimmbar und werden daher häufig im klinischen Alltag zur Diagnostik und Therapieüberwachung metabolischer Knochenerkrankungen genutzt (Seibel, 2006).

Auch diese klinische Studie profitierte von der Tatsache, dass Knochenstoffwechselfparameter einfach zu gewinnen sind und Alternanz im Knochenmetabolismus durch sie direkt abgebildet wird. Schon physiologische Hormonschwankungen während des Menstruationszyklus scheinen Einfluss auf verschiedene Knochenstoffwechselfparameter zu haben (Chiu et al., 1999; Gass et al., 2008; Gorai et al., 1995; Lee et al., 2012; Mozzanega et al., 2013; Nielsen et al., 1990; Schlemmer et al., 1993; Zittermann et al., 2000). Daraus ergab sich der Schluss, dass sich die im Rahmen der Kinderwunsch-Therapie iatrogen herbeigeführten starken Hormonschwankungen

unmittelbar in den Knochenstoffwechselformparameter-Werten widerspiegeln werden. Genutzt wurden je zwei Aufbau- und zwei Abbaumarker. Zu den hier verwendeten Aufbaumarkern gehörten die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) sowie Osteocalcin, als Abbaumarker wurden das C-terminale Telopeptid (CTX) und die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRACP) genutzt.

Die alkalische Phosphatase gehört zu den membrangebundenen Enzymen und existiert in verschiedenen Isoformen in fast jedem Gewebe des Körpers. Eine dieser Isoformen ist die den Knochenaufbau repräsentierende knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP), die von Osteoblasten sezerniert wird. Während des Wachstumsalters dominiert die knochenspezifische alkalische Phosphatase, hingegen herrschen beim erwachsenen Menschen sowohl die Knochen-Isoform als auch die Leber-Isoform zu je fast 50% vor (Calvo et al., 1996; Hlaing & Compston, 2014). Zwar gelten Immunoassays für BAP, wie der in dieser Studie verwendete Festphasen-Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA), als reproduzierbar und präzise, allerdings ist eine Beeinflussung der Werte durch die leberspezifische Isoform nicht vollständig ausgeschlossen (Hlaing & Compston, 2014). Die beschriebene Problematik wurde in dieser Studie weitestgehend umgangen, indem schwere Lebererkrankungen anamnestisch ausgeschlossen wurden. Die Werte für BAP befanden sich bei allen Patientinnen kontinuierlich mit 6-18 µg/l im Normbereich (Norm prämenopausal 3-19 µg/l). BAP gilt als früher Indikator höheren Knochenstoffwechsels (Avbersek-Luznik, Gmeiner Stopar, & Marc, 2007) und scheint laut Pellegrini et al. keinem zirkadianen Rhythmus zu folgen (Pellegrini et al., 2012).

Osteocalcin (OC) ist ein von Osteoblasten sezerniertes Protein, welches geringe Stabilität aufweist und bei Raumtemperatur innerhalb kurzer Zeit zerfällt. Moderne Assays, wie der in dieser Arbeit verwendete, umgehen diese Problematik weitgehend, indem sie auch die Fragmente des Proteins im Serum detektieren. Dennoch sollte langes Stehen bei Raumtemperatur, häufiges Einfrieren und Wiederauftauen sowie durch Blutentnahme verursachte Hämolyse vermieden werden, um mögliche Werteverfälschungen zu vermeiden (Calvo et al., 1996; Hlaing & Compston, 2014; Seibel, 2005). Entsprechende Vorgaben wurden in dieser Studie bestmöglich eingehalten. So wurde das Serum innerhalb von 30 Minuten zentrifugiert, bearbeitet und anschließend bei -20°C eingefroren. Mehrmaliges Auftauen wurde durch einen wärmeisolierten Transport vermieden. Durch Hämolyse

verfälschte Blutproben wurden bezüglich Osteocalcin nicht ausgewertet. Dennoch ergaben sich bei 9 Patientinnen zu mindestens einem Zeitpunkt verminderte OC-Werte bis zu 6,4 ng/ml (Normbereich prämenopausal 11-43 ng/ml). Bei genauerer Betrachtung zeigte sich jedoch, dass 8 der 9 Patientinnen zu mehr als einem Zeitpunkt niedrige Osteocalcin Werte aufwiesen und diese somit im Rahmen der individuellen Baseline zu interpretieren sind. Da Osteocalcin Vitamin K- und Vitamin D-abhängig carboxyliert beziehungsweise synthetisiert wird, wurde die Einnahme von Cumarinen im Vorfeld ausgeschlossen und darauf geachtet, dass der Vitamin D-Wert in den unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufweist (Hlaing & Compston, 2014). Osteocalcin scheint außerdem einer zirkadianen Rhythmik zu folgen, wobei mittags der Nadir erreicht wird (Calvo et al., 1996; Plumelle, Lombard, Nicolay, & Portugal, 2014). Die Veränderung im Tagesverlauf wird jedoch als weniger groß als bei Knochenabbauparametern beschrieben (Hlaing & Compston, 2014). Um Schwankungen durch zirkadiane Rhythmik zu vermeiden, wurden die Laborwerte überwiegend vormittags entnommen.

Das C-terminale Telopeptid (CTX) wird beim Abbau von Kollagen durch Osteoklasten freigesetzt. Dieser Abbaumarker zählt zu den am besten untersuchten und am häufigsten eingesetzten Knochenstoffwechselfparametern (Hlaing & Compston, 2014). Unter anderem aufgrund seiner Spezifität, Stabilität und vorhandener standardisierter Methodik wird CTX von der International Osteoporosis Foundation (IOF) und der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) als Referenzmarker für klinische Studien zum Knochenstoffwechsel empfohlen (Vasikaran et al., 2011). Nachteil des Markers ist die starke zirkadiane Rhythmik, mit einem Zenit in den frühen Morgenstunden (ca. 2-6 Uhr) und einem Nadir am frühen Nachmittag (ca. 12-15 Uhr) (Chubb, 2012; Pellegrini et al., 2012; Seibel, 2005) Problematisch erscheint hier der noch andauernde Abfall des Markers während des Vormittags, dem durch die in dieser Studie zwischen 8 und 11 Uhr entnommenen Blutproben nicht gänzlich Rechnung getragen werden konnte. Selten kam es aufgrund logistischer Unwegsamkeiten zu Nachmittagsabnahmen. Um durch zirkadiane Schwankungen verursachte grobe Ausreißer bei CTX auszuschließen, wurden einige der mit CTX durchgeführten Berechnungen erneut mit einem Kollektiv ohne Nachmittagsfälle durchgeführt. Hierzu wurden 13 Probandinnen ausgeschlossen, bei denen eine oder mehrere Abnahmen später als 12 Uhr mittags erfolgt waren. Es zeigten sich hierbei keine Unterschiede bezüglich signifikanter Parameter im Vergleich zum Gesamtkollektiv (s.

Appendix Kapitel 7.4.). Ein Erklärungsansatz für die Rhythmik des Markers ist seine mögliche Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme. Die Rhythmik scheint bei nicht-nüchternen Menschen verstärkt. Daher werden Nüchternabnahmen empfohlen (Christgau, 2000; Hlaing & Compston, 2014; Qvist, Christgau, Pedersen, Schlemmer, & Christiansen, 2002). Auch dies stellt eine Limitierung der Studie dar, da Nüchternabnahmen im Routine-Setting der Fertilisationstherapie nicht umgesetzt werden konnten. Der Referenzbereich für CTX liegt prämenopausal bei 0,00-0,57 ng/ml. Die gemessenen Werte lagen bei 0,08-0,7 ng/ml, lediglich Nr. 73 (T1 CTX=0,7 ng/ml), Nr. 75 (T2 CTX=0,6 ng/ml) und Nr. 83 (T1 CTX=0,61 ng/ml, T2 CTX=0,6 ng/ml) wiesen zeitweise Werte leicht oberhalb des Referenzbereichs auf.

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRACP) ist ein lysosomales Enzym, dessen Isoform TRACP 5b Osteoklasten-spezifisch ist. Der Knochenabbaumarker korreliert gut mit der Knochendichte und spricht schnell, spezifisch und sensitiv auf Bisphosphonat- sowie Hormonersatz-Therapie an (Halleen et al., 2000; Nenonen et al., 2005). Zudem ist er nach Halleen et al. zur Detektion von Knochenerkrankungen wie Osteoporose und Knochenmetastasen geeignet und zeigt keine Veränderung durch Niereninsuffizienz (Halleen et al., 2001). Der Marker weist eine sehr geringe Nahrungsabhängigkeit und zirkadiane Rhythmik und somit eine geringe biologische Variabilität auf (Hannon et al., 2004). Schwachpunkt des Resorptionsmarkers ist seine relative Instabilität mit Werteverlusten durch längere Lagerung, die selbst bei -20°C noch auftreten. Daher ist Stabilität bei einer Lagerung über 2 Monate nur bei Temperaturen von -80°C gewährleistet (Halleen et al., 2000). Aus diesem Grund wurden Auswertungen der Parameter nach über 2 Monaten Lagerungszeit sowie zu lange Lagerungszeiten bei Raum- bzw. Kühlschrank-Temperatur in dieser Studie vermieden. Der Referenzbereich von TRACP für prämenopausale Frauen liegt bei 1,5-4,8 I/U. 23 Patientinnen lagen zu mehr als einem Zeitpunkt mit Werten bis zu 0,48 I/U unterhalb dieses Referenzwertes, was für intraindividuell niedrige Werte spricht. Bei 11 Patientinnen wurden nur einmalig zu niedrige Werte gemessen, davon hatten 8 Patientinnen jedoch auch an weiteren Zeitpunkten eher niedrig-normale Werte (<1,6 I/U). Bei drei Patientinnen (Nr. 27 zu T4, Nr. 1 zu T4, Nr. 17 zu T3) handelte es sich um einmalig niedrig gemessene Werte. Dies könnte auf eine Wertverminderung aufgrund von Lagerungsfehlern hinweisen, jedoch auch darin begründet sein, dass der Abbauparameter im Verlauf eines Stimulationszyklus kontinuierlich fiel und zu T3 und T4 im Gesamtdurchschnitt niedrige Werte beobachtet werden konnten. Patientin Nr. 21 zeigte durchgehend hochnormale

Werte und zu T1 mit 5,36 I/U einen Wert über dem Referenzbereich. Auch Patientin Nr. 16 zeigte durchgehend hohe Werte, welche zweimalig über dem Referenzbereich lagen (T1: 6,37 I/U, T2: 6,48 I/U).

Die Hormonwerte (E2, Progesteron, LH, FSH,  $\beta$ -HCG) wurden unmittelbar im praxiseigenen Labor bestimmt, Vitamin D und Kalzium zu T1 entnommen und lichtgeschützt gelagert und transportiert, sodass auch hier keine Wertverfälschungen zu erwarten sind.

## **4.2 Diskussion der Werteverläufe**

### **4.2.1 Hormonverläufe während Stimulationstherapie vs. Spontanzklus**

Estradiol zeigte im untersuchten Kollektiv einen für IVF typischen, durch die ovarielle Stimulation geprägten Verlauf. Der Abfall der Werte von T1 (E2: 157 pg/ml) bis zum Stimulationsbeginn T2 (E2: 41 pg/ml) lässt sich auf die Downregulation der Gonadotropine mit GnRH mit dadurch verminderter Stimulation der Ovarien und somit geringer Estradiol-Produktion zurückführen. Nach Stimulationsbeginn mit rFSH oder HMG lagen die durchschnittlichen Estradiol-Werte zu T3 bei 1150 pg/ml (SD: 567 pg/ml), im Vergleich zu 200-300 pg/ml in natürlichen Zyklen (Raith-Paula, Frank-Herrmann, Freundl, & Strowitzki, 2013). Nach Follikelpunktion zu T3 sanken die Werte auf durchschnittlich 390 pg/ml (SD: 420 pg/ml) in der Lutealphase des Stimulationszyklus (T4) ab, was ebenfalls deutlich höher ist als in der Lutealphase von natürlichen Zyklen (um 200 pg/ml) (Tavaniotou & Devroey, 2006; Zittermann et al., 2000).

Progesteron wurde zweimal, nämlich in der Lutealphase des Downregulationszyklus zu Beginn der Downregulation (T1) sowie in der Lutealphase des Stimulationszyklus (T4) bestimmt. Die Werte zu T1 (MW: 19. Zyklustag) entsprachen mit durchschnittlich 6,6 ng/ml (SD: 5,3 ng/ml) dem zu erwartenden Wert am selben Zyklustag eines natürlichen Zyklus (Raith-Paula et al., 2013; Tavaniotou & Devroey, 2006). Da Progesteron lediglich zu zwei von vier Zeitpunkten jeweils in der Lutealphase abgenommen wurde, konnte dessen zyklischer Einfluss auf den Knochen nicht modelliert werden. Luteales Progesteron an T1 diente zur Unterscheidung ovulatorischer Zyklen von anovulatorischen Zyklen, denn anovulatorische Zyklen sind fast immer mit niedrigen lutealen Progesteron-Werten verbunden (Petsos, Mamtara, Ratcliffe, & Anderson, 1987). Dieses Vorgehen erforderte eine sichere Bestimmung der Lutealphase, gerade bei Probandinnen mit unregelmäßigen Zyklen wie in



dieser Studie. Für die Analysen zu ovulatorischen versus anovulatorischen Zyklen wurden daher nur die 45 Zyklen herangezogen, die nach o.g. Kriterien die Lutealphase erreicht hatten (s. Kap. 3.2.3).

Lediglich zu T1 entsprach der FSH-Mittelwert von 5,6 mIU/ml (SD: 2,9 mIU/ml) dem erwarteten Mittelwert in einem entsprechenden nicht hormonell behandelten Kollektiv, alle anderen FSH-Werte waren niedriger, als in einem Spontanzyklus (Raith-Paula et al., 2013). Durch die exogene rFSH-Zufuhr wurden von T2 (MW: 5,1 mIU/ml, SD: 2,2 mIU/ml), zu T3 (MW: 9,9 mIU/ml, SD: 4,7 mIU/ml) ansteigende Werte gemessen, anschließend wurde kein rFSH mehr verabreicht, so dass dieses zu T4 (MW: 2,2 mIU/ml, SD: 2,7 mIU/ml) wieder abfiel. Der in normalen Zyklen auftretende steile FSH-Anstieg zwischen Lutealphase (T1) und früher Follikelphase (T2) war durch die Downregulation ab T1 in den Stimulationszyklen nicht zu verzeichnen (Diedrich & Ludwig, 2013; Raith-Paula et al., 2013; Sun et al., 2006).

Westergaard et al. beschrieben in einer Studie zum Vergleich der IVF-Behandlung mit HMG versus rFSH ähnliche Verläufe für LH sowie für FSH während der Follikelphase, wie sie auch in dieser Studie beobachtet werden konnten. Dabei kam es sowohl unter HMG-, als auch unter rFSH-Stimulation zu zwischenzeitlich steigenden Werten von Serum-FSH während der Follikelphase, wohingegen Serum-LH kontinuierlich absank. Grund dafür sahen sie u.a. in der kurzen Halbwertszeit von LH, weshalb die Gabe des in HMG enthaltenen LHs nicht zu einem Anstieg des LHs führte, das zur Stimulation verwendete rFSH hingegen erhöhte FSH-Serumspiegel zur Folge hatte (Westergaard, Erb, Laursen, Rasmussen, & Rex, 1996). Da in unserer Studie nur in 76% der Fälle mit HMG stimuliert wurde, könnte ein möglicher LH-Anstieg zudem aufgrund der Fälle mit reiner rFSH-Stimulation verzerrt worden sein. Der von Duijkers et al. beschriebene LH-Peak nach HCG-Gabe konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden, was sich wiederum mit den Ergebnissen von Tavaniotou et al. deckte. Sowohl FSH als auch LH blieben auch in der Lutealphase niedrig, was auf die verzögerte Erholung der Hypophyse nach Downregulation durch die sehr hohen Steroidhormonkonzentrationen zurückzuführen ist (Duijkers et al., 1993; Tavaniotou & Devroey, 2006).

#### **4.2.2 Knochenstoffwechselfparameterverläufe während Stimulationstherapie vs. Spontanzyklus**

Die Rhythmik von Knochenstoffwechselfparametern während des natürlichen menstruellen Zyklus wurde in verschiedenen Studien untersucht. Bezüglich der Knochenaufbauparameter BAP und Osteocalcin herrscht hierzu Uneinigkeit in der Literatur. In einigen Studien wurde für OC eine Rhythmik beobachtet, jedoch kam jede Studie zu anderen Ergebnissen bezüglich des Verlaufs. So beschrieben Nielsen et al. hohe luteale Werte, während Gorai et al. steigende Werte in der späten Follikelphase und Lee et al. hohe aber sich nicht signifikant von der menstruellen Phase unterscheidende Werte periovulatorisch beschrieb (Gorai et al., 1998; Lee et al., 2012; Nielsen et al., 1990). Gorai et al. beobachteten zudem niedrige BAP-Werte luteal, welche während der Follikelphase bis zur Ovulation anstiegen und anschließend wieder abfielen (Gorai et al., 1998). Einige Studien führten jedoch zu dem Schluss, dass die beiden Aufbauparameter keiner bzw. einer nur geringen zyklischen Veränderung während des Menstruationszyklus unterliegen (Chiu et al., 1999; Gass et al., 2008; Schlemmer et al., 1993). Die bisher einzige Studie, die sich mit dem Knochenstoffwechsel während eines IVF-Zyklus beschäftigte, konnte keine signifikanten Unterschiede von Osteocalcin im Verlauf des Zyklus feststellen (Omodei et al., 2013).

Im Gegensatz dazu fand sich in unserer Studie sowohl für BAP, als auch für OC ein sich deutlich verändernder Verlauf während des IVF-Zyklus. Beide sanken von T1 bis T3 stark ab, wobei der steilste Abfall von T2 bis T3, also im Zeitraum der Stimulation stattfand und stiegen anschließend wieder von T3 zu T4 an, BAP hierbei deutlicher als OC. Die zyklischen Veränderungen von BAP zeigten bis T3 keine Signifikanz. Der Abfall der Werte während der reinen Downregulation von T1 (MW 9,75 µg/l) bis T2 (MW 9,63 µg/l) und weiterandauernd während der Stimulation zwischen T2 (MW 9,63 µg/l) und T3 (MW 9,5 µg/l) war nicht signifikant. Signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen zwischen den Zeitpunkten T2/T4 und T3/T4 mit jeweils höheren Werten zu T4 (MW 9,95 µg/l). Zwischen dem Ausgangsmittelwert zu T1 und Endmittelwert zu T4, jeweils in der Lutealphase, gab es keinen signifikanten Unterschied mehr.

Der Abfall von Osteocalcin von T1 (MW 18,5 ng/ml) bis T3 (MW 16,61 ng/ml) und von T2 (MW 17,93 ng/ml) bis T3 (MW 16,61 ng/ml) wies Signifikanz auf. Der Unterschied im Zeitraum der alleinigen Downregulation zwischen T1 (MW 18,5 ng/ml) und T2 (MW 17,93

ng/ml) erreichte nur knapp keine signifikanten Werte. Nach Stimulation, im Zeitraum T3 (MW 16,61 ng/ml) bis T4 (MW 16,71 ng/ml), veränderten sich die OC-Werte nur wenig, eine Tendenz zu steigenden Werten war erkennbar, jedoch nicht signifikant. Der OC-Endmittelwert zu T4 war weiterhin hoch signifikant niedriger als der Ausgangsmittelwert zu T1 und Osteocalcin lag zu T4 sogar noch signifikant unter dem Mittelwert zu T2.

Also zeigten beide Knochenaufbauparameter signifikante Veränderungen zwischen einzelnen Zeitpunkten und somit eine Rhythmik während des iatrogen beeinflussten Menstruationszyklus. Da laut derzeitiger Studienlage überwiegend davon ausgegangen wird, dass weder OC noch BAP einer Rhythmik während des nativen Menstruationszyklus folgen, könnte rückgeschlossen werden, dass die hier beobachtete Rhythmik in den iatrogenen Veränderungen der hormonellen Parameter im Zuge der IVF-Behandlung begründet liegt. Zu bedenken ist jedoch auch, dass die bisher zur Rhythmik der Knochenstoffwechselfparameter durchgeführten Studien nicht zwischen anovulatorischen und ovulatorischen Zyklen unterschieden. Diesen Aspekt beleuchtete unsere Arbeitsgruppe im Jahr 2015 genauer und zeigte bereits damals zyklische Unterschiede in nativen Menstruationszyklen unter anderem von BAP, abhängig davon, ob eine Ovulation stattgefunden hatte oder nicht. Hierbei zeigte sich, dass in ovulatorischen Zyklen höhere BAP-Werte in der Lutealphase verzeichnet werden können (Niethammer et al., 2015). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen insbesondere angesichts der Tatsache, dass während eines Stimulationszyklus die Ovulation regelhaft iatrogen herbeigeführt wird.

Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Knochenaufbauparametern scheinen Knochenabbauparameter im Allgemeinen und CTX im Besonderen auch im nativen Menstruationszyklus unabhängig vom Ovulationsgeschehen einer Rhythmik zu folgen. So beschrieben Mozzanega et al. einen signifikanten Abfall von CTX zwischen der frühen Follikelphase und späten Lutealphase sowie anschließend einen raschen signifikanten Anstieg von der späten Lutealphase hin zur frühen Follikelphase des folgenden Zyklus (Mozzanega et al., 2013). Gass et al. veröffentlichten einige Jahre zuvor ähnliche Ergebnisse, während Gorai et al. ebenso höhere Werte in der Follikelphase als in der Lutealphase beobachteten, jedoch der Anstieg der Werte bereits in der mittleren Lutealphase begann und die CTX-Werte nicht in der frühen, sondern in der mittleren Follikelphase am höchsten waren (Gass et al., 2008; Gorai et al., 1998). Zur Rhythmik von TRACP während eines nativen

Menstruationszyklus stellten Lee et al. signifikant höhere Werte perioovulatorisch im Vergleich zur Menstruationsphase fest (Lee et al., 2012).

Auch in unserer Studie ließen sich für TRACP im Verlauf des Zyklus Unterschiede feststellen mit einem Peak zu T1 (MW 2,09 U/l, Lutealphase des Downregulationszyklus) und daraufhin kontinuierlich signifikant fallenden Werten über T2 (MW 1,94 U/l, Stimulationsbeginn in Follikelphase) bis T3 (MW 1,83 U/l, Follikelpunktion) mit anschließender annähernder Stagnation bis T4 (MW 1,79 U/l, Lutealphase des Stimulationszyklus). Der Verlauf ähnelte dem des Osteocalcins, mit dem einzigen Unterschied, dass bereits der Abfall von TRACP zwischen T1 und T2 signifikant war, während bei OC nur annähernd signifikant.

Erstaunlicherweise zeigte CTX die geringste Variabilität im zyklischen Verlauf. Bei Betrachtung der Mittelwerte wurde deutlich, dass es zu kaum einer Änderung zwischen T1 (MW 0,26 ng/ml) und T2 (MW 0,26 ng/ml) kam, daraufhin jedoch zu steigenden Werten während der Stimulation von T2 (MW 0,26 ng/ml) bis T3 (MW 0,28 ng/ml) und im Anschluss wieder zu stark fallenden Werten von T3 (MW 0,28 ng/ml) nach T4 (MW 0,24 ng/ml). Beinahe signifikant wurden diese Veränderungen jedoch nur zwischen T3 (MW 0,28 ng/ml) und T4 (MW 0,24 ng/ml). Somit zeigten sich innerhalb des Stimulationszyklus zwar tatsächlich die in nativen Zyklen beschriebenen Unterschiede mit höheren Werten in der Follikelphase und niedrigen in der Lutealphase. Allerdings wies der Verlauf einen Peak perioovulatorisch auf. Zudem konnte der von Mozzanega et al. beschriebene rapide Anstieg von der Lutealphase zur Follikelphase hier zwischen T1 und T2 nicht beobachtet werden (Mozzanega et al., 2013). Grund dafür ist möglicherweise in den durch die Fertilisationsbehandlung veränderten Hormonverläufen zu sehen, worauf im nächsten Punkt näher eingegangen werden soll.

#### **4.2.3 Abhängigkeit der Knochenstoffwechselfparameter vom Hormonverlauf**

Die antiresorptive Wirkung von Estradiol auf den Knochen ist seit langem bekannt und anerkannt. Eine Reduktion der Osteoklasten-Apoptose mit konsekutiv erhöhtem Knochenabbau geht laut Martin-Millan et al. unter anderem auf erniedrigte Östrogen-Spiegel zurück (Martin-Millan et al., 2010). In Zeiten physiologisch verminderter Östrogen-Spiegel, wie während der Laktation und postmenopausal, kommt es zu verstärktem Knochenabbau in hohem Maße. Vanhouten et al. vermuteten hinter dem postmenopausal

gesteigerten Knochenabbau bei niedrigen Östrogen-Werten eine unzweckmäßige Reaktivierung des Mechanismus, der während der Laktationsperiode zur Bereitstellung von Kalzium für den Säugling benötigt wird (VanHouten & Wysolmerski, 2003). Aufgrund seiner Knochen-protectiven Wirkung wird Östrogen unter anderem zur Osteoporose-Therapie eingesetzt (Maeda & Lazaretti-Castro, 2014) und führt hierbei zur Reduktion von Knochenstoffwechselfparametern (Nguyen-Pascal et al., 2005; Seibel, 2006). Somit liegt die Vermutung nahe, dass sich die durch IVF-Therapie im langen Protokoll herbeigeführten ausgeprägten Veränderungen der Estradiol-Spiegel in den Knochenstoffwechselfparametern widerspiegeln. Dies bestätigte sich in unserer Studie bei Betrachtung der Parameter BAP, OC und TRACP von T2 zu T3, ein Zeitraum, in dem es durch Follikelstimulation zu sehr hohen Estradiol-Werten kam (MW zu T3 1150 pg/ml). Besagte Parameter verhielten sich invers zu Estradiol und fielen stark ab. Der Abfall der Mittelwerte erreichte im Falle von TRACP Signifikanz sowie im Falle von OC hohe Signifikanz, ebenso waren die Mittelwerte von Estradiol zwischen T2 und T3 hoch signifikant unterschiedlich. Dass der Abfall der Knochenstoffwechselfparameter durch den Anstieg von Estradiol erklärt werden kann, ließ sich bezüglich Osteocalcin auch statistisch nachvollziehen. So ergab das generalisierte lineare Modell, dass im Verlauf steigendes Estradiol signifikant mit sinkendem Osteocalcin assoziiert war ( $p=0,0166$ ). Der Einfluss von sich zyklisch veränderndem Estradiol auf den Verlauf von BAP und TRACP erreichte im generalisierten linearen Modell zwar keine Signifikanz, jedoch zeigte sich bei ihnen ein dem Osteocalcin sehr ähnlicher Verlauf besonders zwischen T2 und T3, was die Vermutung nahelegt, dass auch hier der Einfluss von Estradiol zum Tragen kam.

Nun stellt sich die Frage, warum die von T1 zu T2 signifikant sinkenden Estradiol-Werte somit nicht auch zu steigenden Knochenstoffwechselfparametern führten. Durch Gabe von GnRH-Analoga ab T1 kam es konsekutiv bis T2 zum erwünschten signifikanten Abfall von Estradiol, woraufhin ein Anstieg der Knochenstoffwechselfparameter zu erwarten gewesen wäre. Yilmaz et al. untersuchten den kurzfristigen Einfluss von GnRH-Analoga bei 46 Frauen im langen Protokoll der IVF-Therapie. Sie führten die ausbleibende Wirkung des sinkenden Estradiols auf die Knochenstoffwechselfparameter zwischen Beginn der Downregulation und Beginn der Stimulation auf den etwa eine Woche andauernden Anstieg der Gonadotropine zurück (Flare-up-Phänomen), der bei Gabe von GnRH-Analoga initial auftritt. Hierdurch kommt es zu einer verzögerten Verminderung von Estradiol, weshalb zu T2 die Wirkung

dieser Verminderung eventuell noch nicht in den Knochenstoffwechselfparametern zu sehen war (Yilmaz, Ozgur, Isikoglu, Sonmez, & Uner, 2004). Zwischen der Follikelpunktion (T3) und der Lutealphase des Stimulationszyklus (T4) kam es bei BAP zu einem signifikanten Anstieg, was wiederum auf den signifikanten Abfall von Estradiol zurückgeführt werden könnte im Sinne der Kopplung zwischen Knochenauf- und abbau. Auch OC und TRACP beendeten den scharfen Abwärtstrend, sobald die Estradiol-Werte wieder sanken. Hier kam es zwar nicht wie bei BAP zu einem signifikanten Anstieg, jedoch zu einer Stagnation mit im Falle von OC leichtem Aufwärtstrend. Zusammenfassend scheinen Osteocalcin, BAP und TRACP in ihrem Verlauf von Estradiol-Schwankungen abhängig zu sein, was im Falle von Osteocalcin auch durch das generalisierte lineare Modell bestätigt werden konnte. Unsere Ergebnisse zeigen erstmals, dass Osteocalcin während eines Stimulationszyklus von Estradiol abhängigen Schwankungen unterliegt.

CTX verlief sehr verschieden zu den übrigen Parametern. Nach Stagnation zwischen Lutealphase des Downregulationszyklus (T1) und Beginn der Stimulation in der Follikelphase des Stimulationszyklus (T2) kam es zum Anstieg des Mittelwertes während der Stimulationsperiode bis zur Follikelpunktion (T3). Nach der Follikelpunktion kam es wiederum zu einem Abfall von CTX bis T4 (Lutealphase des Stimulationszyklus). Die Veränderungen zwischen T3 und T4 erreichten beinahe Signifikanz ( $p=0,052$ ), die übrigen Veränderungen waren lediglich optisch nachzuvollziehen. Somit verlief der Knochenabbauparameter annähernd invers zum Verlauf der übrigen Knochenstoffwechselfparameter sowie gleichsinnig zu Estradiol und ebenfalls gleichsinnig zu FSH. Dies konnte nicht durch die oben besprochene Knochen-protective Wirkung von Estradiol erklärt werden. Seit einigen Jahren jedoch wird die Knochenabbau-fördernde Wirkung von FSH rege diskutiert. Grund für die Überlegung gab unter anderem die Frage, warum es bei perimenopausalen Frauen trotz noch adäquater Estradiol-Level zu einem rapiden Verlust der BMD kommt (Seifert-Klauss et al., 2006).

Sun et al. veröffentlichten 2006 ihre Ergebnisse zu FSH-Rezeptor-knock-out-Mäusen, welche im Gegensatz zu ovariectomierten Mäusen mit intaktem FSH-Rezeptor trotz massiven Hypogonadismus keinen BMD-Verlust aufwiesen. Die Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass FSH die Osteoklasten-Bildung auf verschiedenen Wegen stimulieren kann (Sun et al., 2006). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte zudem, dass FSH die TNF-alpha Produktion stimuliert

und so den Knochenabbau steigert (Iqbal, Sun, Kumar, Blair, & Zaidi, 2006). Zwar gibt es Zweifel an der Eignung von FSH-Rezeptor-knock-out-Mäusen, um die Wirkung von FSH alleine auf den Knochen zu untersuchen, unter anderem weil diese Mäuse hohe Testosteronwerte aufwiesen, welche ebenso einen protektiven Effekt auf den Knochen haben könnten (Prior, 2007). Auch kamen Gao et al. zu gegensätzlichen Ergebnissen und beobachteten, dass FSH-Rezeptor-knock-out-Mäuse nach Ovariectomie bei sinkenden Testosteron-Werten eine ebenso geringe BMD wie Wildtyp-Mäuse nach Ovariectomie hatten (Gao et al., 2007). Insgesamt erscheint es schwierig, die konträren Wirkungen von Gonadotropinen versus Steroidhormonen separat zu betrachten, da eine Hemmung von FSH zwangsweise auch zu einer Reduktion von Estradiol führt (Zhu et al., 2012). Zhu et al. umgingen das Problem der überlagerten Wirkung von Resorption-stimulierenden Gonadotropinen und Resorption-hemmenden Steroidhormonen, indem sie ovariectomierten Mäusen, welche durch den folgenden schweren Hypogonadismus einen starken Verlust von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen aufwiesen (BV/TV), anschließend einen FSH-Rezeptor Antikörper injizierten. Anders als die Schein-operierten Kontrollen zeigten die ovariectomierten Mäuse einen Anstieg des BV/TV nach Gabe des FSH-Rezeptor Antikörpers. Die Gabe des FSH-Rezeptor Antikörpers führte zu einer Steigerung des BV/TV, jedoch nicht zur vollständigen Kompensation des durch Hypogonadismus ausgelösten BV/TV-Verlustes. Daraus schlossen sie, dass die Wirkung von FSH auf den Knochen durchaus vorhanden sei, diese jedoch den unumstrittenen Einfluss von Estradiol auf den Knochen nicht in Frage stellt und eine Blockierung des FSH-Rezeptors den Verlust von Estradiol auch nicht komplett ausgleichen kann (Zhu et al., 2012). Ji et al. konnten 2018 das Vorhandensein von FSH-Rezeptoren im Knochen nachweisen. Das Blockieren des FSH-Rezeptors durch monoklonale Antikörper führte in Knochenmark-Zellkulturen zu einer Reduktion der Osteoklastenbildung und in ovariectomierten Mäusen zu einer histomorphologisch sichtbaren signifikanten Reduktion von Osteoklastenzahl und resorbierter Knochenoberfläche (Ji et al., 2018).

Der in unserer Studie erkennbare gleichsinnige Verlauf von FSH und dem Knochenabbaumarker CTX unterstützt die These, dass FSH den Knochenabbau stimuliert (Cannon, Kraj, & Sloan, 2011; Iqbal et al., 2006; Ji et al., 2018; Sun et al., 2006). Unsere Beobachtungen bekräftigen zudem die Ergebnisse zahlreicher Studien, die eine Korrelation zwischen CTX und FSH demonstrierten (Garcia-Martin et al., 2012; Perrien et al., 2006; Wang et al., 2015). Der optische Zusammenhang der Verläufe von FSH und CTX wurde

anschließend auch statistisch in der generalisierten Regression bekräftigt. Sich zyklisch veränderndes FSH hatte in unserer Studie demnach einen signifikant positiven Einfluss auf den Verlauf von CTX ( $p=0,0001$ ), was bedeutet, hohe FSH-Spiegel führten zu hohen CTX-Spiegeln und niedrige FSH-Spiegel zu niedrigen CTX-Spiegeln. Somit konnte gezeigt werden, dass FSH-Schwankungen sich unmittelbar auf den, den Knochenabbau repräsentierenden, Marker CTX auswirkten. Bereits Sun et al. merkten an, dass auch in natürlichen Zyklen ein Zusammenhang zwischen FSH und den Knochenabbauparametern sichtbar sei (Sun et al., 2006). So steigen die Knochenabbauparameter, insbesondere CTX, in der frühen bis mittleren Follikelphase an und fallen dann bis zum Ende der Lutealphase kontinuierlich ab, um anschließend wieder relativ rasch anzusteigen (Gass et al., 2008; Gorai et al., 1998; Mozzanega et al., 2013). Dies entspricht am ehesten dem typischen Verlauf von FSH, welches zu Beginn der Follikelphase scharf ansteigt und anschließend, bis auf einen kleinen Peak um den Eisprung, kontinuierlich abfällt (Chiu et al., 1999; Ecochard et al., 2014). Unsere Ergebnisse untermauern diese These und bekräftigen somit die Vermutung, dass FSH die Knochenresorption steigert.

Um auszuschließen, dass Estradiol und FSH ihren Einfluss auf den Knochen als Confounder verzerren, wurden beide jeweils in jedes generalisierte lineare Modell mit aufgenommen. Die Berechnungen erfolgten sowohl mit als auch ohne den jeweiligen potenziellen Confounder. Unsere beschriebenen Ergebnisse bezüglich Estradiol und OC sowie FSH und CTX waren in jedem Fall signifikant, was eine statistische Verzerrung durch gegenseitige Beeinflussung der Hormone größtmöglich ausschließt.

Bezüglich LH ließ sich im generalisierten linearen Modell kein Einfluss auf den Verlauf der Knochenstoffwechsellparameter erkennen. Progesteron konnte aufgrund lediglich zu T1 und T4 stattgefundener Messungen nicht in das generalisierte lineare Modell aufgenommen werden.

Zusammenfassend scheinen sowohl Estradiol als auch FSH Einfluss auf den Knochenstoffwechsel während Kinderwunschbehandlung zu haben und den Verlauf der Knochenstoffwechsel-Parameter zu beeinflussen. Am Ende des Stimulationszyklus (T4=Lutealphase des Stimulationszyklus) lagen die Mittelwerte der Knochenstoffwechsellparameter CTX (Delta T1/T4 n.s.), TRACP (Delta T1/T4  $p=0,000$ ) und Osteocalcin (Delta T1/T4  $p=0,006$ ) jeweils unterhalb des Ausgangswertes zu T1



(=Lutealphase des Downregulationszyklus, Nativwert ohne hormonellen Einfluss). Lediglich BAP lag zum Zeitpunkt T4 oberhalb des Mittelwerts zu T1 (Delta T1/T4 n.s.). Dies weist darauf hin, dass der knochenprotektive Einfluss des während des Stimulationszyklus stark erhöhten Estradiols den pro-resorptiven Stimulus durch rFSH-Gabe und kurzzeitige Estradiol-Suppression durch GnRH-Gabe überwiegt. Kurzfristig scheint die IVF-Therapie somit keinen negativen Einfluss auf den Knochen zu haben.

#### **4.3 Vergleich der Hormone und Knochenstoffwechselfparameter in Abhängigkeit von der Stimulationsart**

Serum-FSH stieg unter Therapie mit reinem rFSH schwächer zwischen T2 und T3 an und fiel anschließend von T3 zu T4 geringer ab als unter HMG Therapie. Estradiol hingegen zeigte zunächst (T2-T3) einen ähnlich hohen Anstieg unter rFSH wie unter HMG, fiel im Verlauf (T3-T4) unter rFSH jedoch anders als Serum-FSH stärker ab als unter HMG.

Die Knochenstoffwechselfparameter zeigten zu T3, wo FSH unter rFSH-Therapie signifikant niedriger war als unter HMG-Therapie, keine kohärente Tendenz. BAP und CTX waren unter rFSH tendenziell niedriger und OC und TRACP unter HMG. Damit zeigten alle Parameter die gleiche Tendenz wie zu T2, als noch keine Stimulationstherapie begonnen hatte. Somit kann vermutet werden, dass die geringfügigen Mittelwertsunterschiede (n.s.) zwischen den beiden Stimulationsgruppen zu T3 nicht durch die Stimulationsart bedingt waren.

Zu T4 hingegen waren die Knochenstoffwechselfparameter unter rFSH tendenziell höher als unter HMG (n.s.). Zu diesem Zeitpunkt waren signifikant höhere FSH-Werte und signifikant niedrigere Estradiol-Werte unter rFSH-Therapie aufgefallen. Somit kann sowohl der höhere FSH-Wert als auch der niedrigere Estradiol-Wert unter rFSH negativ auf den Knochenstoffwechsel eingewirkt und so zu höheren Knochenstoffwechselfparametern geführt haben. Da das zu T3 signifikant niedrigere FSH unter rFSH-Therapie keinen klaren Einfluss auf den Knochen zeigte, kann angenommen werden, dass die signifikant niedrigeren Estradiol-Werte unter rFSH zu T4 der ausschlaggebende Einflussfaktor auf den Knochen waren. Dennoch ließ sich erneut beobachten, dass CTX tendenziell in derjenigen Gruppe höher war, in der auch Serum-FSH höher war. Ein möglicher Einfluss durch Serum-FSH lässt sich hierbei somit nicht ausschließen. Insgesamt zeigte sich zusammenfassend nur ein tendenzieller Einfluss der Stimulationsart auf den Knochenstoffwechsel mit höherem Knochenumsatz unter rFSH-Therapie. Dieser wiederum ist mutmaßlich auf die entsprechend

modulierten Hormonwerte zurückzuführen, besonders auf Estradiol. Dass in diesen Teilbereichen keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte, ist möglicherweise auch auf die in diesem Fall kleine Gruppengröße zurückzuführen.

#### **4.4 Einfluss von Ovulation auf den Knochen**

Eine Arbeitsgruppe der Frauenklinik der TU München hatte bereits in einer vorangehenden Studie einen Zusammenhang zwischen Ovulationsgeschehen und Knochen gezeigt. Besagte Studie umfasste 176 Zyklen von neun Teilnehmerinnen (durchschnittlich 19,5 Zyklen pro Teilnehmerin) und untersuchte Serum-Hormone und Knochenstoffwechselfparameter sowie BMD auf mögliche Zusammenhänge abhängig vom Ovulationsgeschehen. Es zeigte sich, dass die Knochenabbauparameter DPD (Urin) und PYD (Urin) tendenziell, sowie CTX (Serum) signifikant niedriger in ovulatorischen Zyklen waren. Selbst in Zyklen, welche auf ovulatorische Zyklen folgten, blieb CTX signifikant niedriger als in Zyklen, denen ein anovulatorischer Zyklus vorangegangen war. BAP (Serum) hingegen wies in ovulatorischen Zyklen tendenziell höhere Werte auf (Niethammer et al., 2015).

Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den hier beobachteten Erkenntnissen. So konnte erneut gezeigt werden, dass CTX in Zyklen, deren vorangehender Zyklus anovulatorisch war, signifikant höher war als in Zyklen, deren vorangehender Zyklus ovulatorisch war. Auch die Knochenstoffwechselfparameter Osteocalcin und TRACP zeigten in Zyklen mit vorangegangenem anovulatorischen Zyklus durchgehend höhere Werte. Im Falle von CTX und OC konnte im generalisierten linearen Modell auch statistisch nachgewiesen werden, dass eine im Vorzyklus erfolgte Ovulation zu signifikant verminderten Knochenstoffwechselfparametern im Folgezyklus führte. Für TRACP zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu niedrigeren Werten im Folgezyklus, wenn im Vorzyklus eine Ovulation stattgefunden hatte. BAP wies zwar keine signifikanten Unterschiede abhängig davon auf, ob ein ovulatorischer oder anovulatorischer Zyklus vorangegangen war, jedoch war die Tendenz höherer BAP-Werte zu beobachten, wenn der vorangehende Zyklus ovulatorisch war. Somit unterschied sich BAP von den übrigen Parametern.

Auch nach Unterteilung in weitere Untergruppen bezüglich des Stimulationsprotokolls konnte zumeist weiterhin eine Tendenz zu höheren TRACP-, CTX- und OC-Werten in Zyklen mit anovulatorischem Vorzyklus beobachtet werden. Dass hier keine Signifikanzen erreicht wurden, ist möglicherweise in der durch Bildung mehrerer Untergruppen bedingten kleinen

Fallzahl begründet. Demnach ist wahrscheinlich, dass tatsächlich ein Einfluss durch Ovulation bestand.

Zudem konnte anhand der Daten zu T1 (Lutealphase des Downregulationszyklus, nativer Wert) auch in unserer Studie der Einfluss der Ovulation im aktuellen Zyklus auf den Knochen überprüft werden. CTX wies hier sowohl in unserer Studie, als auch in der Vorgängerstudie signifikant höhere Werte in anovulatorischen Zyklen auf. Durch Poolen der Daten ist dieser Nachweis in einer damit großen Zahl von 122 Zyklen gelungen. Dieses Poolen war möglich, da sich die Frauen alle in einer annähernd gleichen Zyklusphase befanden und die Methodik der Studien vergleichbar war. Da jedoch die 77 Zyklen der Anovulationsstudie von 9 Frauen mit mehrfachen wiederholten Zyklen stammten, wohingegen die 45 Zyklen aus der vorliegenden Arbeit jeweils von verschiedenen Patientinnen stammten, sind statistischen Verzerrungen durch die Wiederholerzyklen anzunehmen, da der t-Test für unabhängige Daten gewählt wurde. Wir betrachteten die Daten deshalb als unabhängig, da auch in mehreren Zyklen einer einzelnen Frau von intraindividuellen Schwankungen der Knochenstoffwechselformparameter ausgegangen werden kann, je nachdem, ob eine Ovulation stattgefunden hat oder nicht.

Diverse Studien weisen darauf hin, dass Zyklusunregelmäßigkeiten wie Oligomenorrhö oder stark variierende Zykluslängen zu einem erhöhten Frakturrisiko oder niedrigerer BMD führen können (Cooper & Sandler, 1997; Nicodemus, Folsom, & Anderson, 2001; Ouyang et al., 2007). Auch ob Ovulationsstörungen wie verkürzte Lutealphasen oder anovulatorische Zyklen mit einer Verminderung der BMD einhergehen, wurde in verschiedenen Studien untersucht. So zeigten Prior et al. in einer Studie mit 66 Frauen zwischen 20 und 42 Jahren, dass Probandinnen mit mehr als einem anovulatorischen Zyklus pro Jahr, beziehungsweise mehr als zwei Zyklen mit kurzer Lutealphase, innerhalb eines Jahres einen Verlust der Knochendichte erlitten, während Frauen mit normalen Zyklen sogar an Knochendichte gewannen (Prior, Vigna, Schechter, & Burgess, 1990). Waugh et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen mit einem ebenfalls negativen Effekt auf die Veränderung der Knochendichte durch größer/gleich drei anovulatorische Zyklen bzw. größer/gleich drei Zyklen mit einer Lutealphase unter 10 Tagen in zwei aufeinander folgenden Jahren (Waugh, Polivy, Ridout, & Hawker, 2007). Auch Bedford et al. konnten diese Ergebnisse mit ihrer Studie bekräftigen. Sie beschrieben eine verminderte Zunahme der Knochendichte an Lumbalwirbelsäule und

Hüfte bei Frauen mit mehr Ovulationsstörungen (Bedford, Prior, & Barr, 2010). Grewal et al. hingegen konnten in einer Teilstudie der großen SWAN-Studie (The Study of Women's Health Across the Nation) keinen Zusammenhang zwischen Ovulationsstörungen und BMD feststellen, allerdings war hier lediglich ein Zyklus pro Frau beobachtet worden, was möglicherweise zu einer Fehlkategorisierung der Frauen bezüglich gehäufte anovulatorischer Zyklen führte (Grewal, Sowers, Randolph, Harlow, & Lin, 2006).

So stellt sich die Frage, weshalb anovulatorische Zyklen zu höherem Knochenumsatz führen. Die Hormone Estradiol, FSH und LH wiesen in dieser Studie im t-Test zu keinem der vier Zeitpunkte, also auch nicht in der Lutealphase des Vorzyklus, signifikante Unterschiede zwischen ovulatorischen und anovulatorischen Zyklen auf. Sollte also die beobachtete Diskrepanz der Knochenstoffwechselfparameter mit höheren Werten für TRACP, OC und CTX und niedrigeren Werten für BAP nach Anovulation auf eine Diskrepanz eines der erwähnten Hormone im Vorzyklus zurückzuführen sein, so muss diese vor T1 vorgelegen und sich bis T1 wieder stabilisiert haben. De Souza et al. beschrieben in einer Studie zu Ovulationsstörungen und Knochen bei sportlich aktiven Frauen, dass nicht der niedrige Progesteron-Wert luteal, sondern die verlängerte Follikelphase mit frühfollikulär niedrigen Estradiol-Werten mit der BMD assoziiert waren (De Souza et al., 1997). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass frühfollikuläre Estradiol-Werte im Vorzyklus, welche in unserer Studie nicht erfasst wurden, Grund für die Unterschiede der Knochenstoffwechselfparameter abhängig vom Ovulationsstatus waren. Das einzige Hormon mit signifikanten Werteunterschieden zu T1 (Lutealphase des Vorzyklus) jedoch war das zur Unterscheidung ovulatorischer von anovulatorischen Zyklen genutzte Progesteron.

Diverse Studien postulieren einen protektiven Einfluss von Progesteron auf den Knochenstoffwechsel. In der bereits beschriebenen klinischen Studie von Prior et al. zeigte sich, dass Probandinnen mit Zunahme an Knochendichte innerhalb des Studienjahres signifikant höhere Progesteron-Werte hatten, als Probandinnen mit Abnahme der Knochendichte (Prior et al., 1990). Waller et al. hingegen konnten keine Assoziation zwischen Progesteron und Knochendichte bzw. Zyklusstörungen und Knochendichte feststellen (Waller et al., 1996). In experimentellen Studien zeigte sich ein Einfluss von Progesteron auf Osteoblasten. So beschrieben Sloop et al. eine Proliferation osteoblastischer Zellen von Ratten nach Stimulation der Zellen mit Progesteron in

Kombination mit 17 $\beta$ -Estradiol (Slootweg, Ederveen, Schot, Schoonen, & Kloosterboer, 1992). Liang et al. beobachteten eine Steigerung der Osteocalcin-Produktion sowie der Osteoblastenproliferation und -differenzierung durch Stimulation dieser mit Progesteron in vitro (Liang, Liao, Xu, Luo, & Xiao, 2003). Auch konnte unsere eigene Arbeitsgruppe bereits einen stimulierenden Effekt von Progesteron auf die Differenzierung von Osteoblasten in vitro zeigen. Nach Inkubation der Osteoblasten mit für die Lutealphase typischen Progesteron-Konzentrationen steigerte sich die Produktion der Alkalischen Phosphatase um bis zu 70% (Schmidmayr et al., 2008). Diese Erkenntnisse erklären unsere Beobachtungen nur zum Teil. So kann hierdurch der höhere BAP-Wert in ovulatorischen Zyklen erklärt werden, nicht jedoch der signifikant niedrigere Osteocalcin-Wert. Der Knochenumsatz scheint hier in ovulatorischen Zyklen insgesamt vermindert zu sein, mit Ausnahme des Knochenaufbauparameters BAP. Somit wird die proliferative Wirkung von Progesteron auf Osteoblasten zwar untermauert, jedoch nicht hinsichtlich Osteocalcin. Zudem kann die antiresorptive Wirkung ovulatorischer Zyklen mit konsekutiv niedrigen Abbauparametern nicht durch die Progesteron-abhängige Blastenstimulierung erklärt werden.

In unserer Studie zeigte Progesteron signifikant höhere Werte in der Lutealphase des vorangehenden Zyklus. Dies entsprach den Erwartungen, denn ovulatorische Zyklen wurden durch ein Progesteron  $\geq 6$  ng/ml im vorangehenden Zyklus definiert. Dieser Unterschied war in der Lutealphase des Stimulationszyklus nicht mehr feststellbar. Progesteron zeigte in der multiplen Regressionsanalyse zu T1 keinen wesentlichen Einfluss auf die Knochenstoffwechselfparameter (s. Appendix Kapitel 7.2.). Sollte Progesteron also der relevante Einflussfaktor auf die Knochenstoffwechselfparameter in ovulatorischen Zyklen gewesen sein, so muss seine Wirkung aus dem Vorzyklus trotz Anpassung der Hormonwerte im Folgezyklus nachgewirkt haben. Es bleibt unklar, ob die Diskrepanz der Knochenstoffwechselfparameter nach ovulatorischem beziehungsweise anovulatorischem Zyklus auf Progesteron an sich zurückzuführen ist, oder ob Progesteron lediglich ein Indikator ovulatorischer Zyklen ist, der Grund für die differenten Knochenstoffwechselfparameter jedoch in einer anderen Eigenschaft ovulatorischer Zyklen begründet liegt, wie beispielsweise in bone morphogenic proteins oder anderen Knochenbeeinflussenden Hormonen.

#### **4.5 Seitenarm: Einfluss von Vitamin D auf Fertilitäts- und Schwangerschaftsrate**

Während der Auswertungen zum Knochenstoffwechsel fiel ein deutlicher Unterschied zwischen dem durchschnittlichen Vitamin D-Wert der schwanger gewordenen Probandinnen im Vergleich mit dem der nicht erfolgreich fertilisierten Probandinnen auf. Dies führte zu weiteren Analysen in einem Seitenarm der Studie, der sich mit dem Einfluss von Vitamin D auf den Erfolg der in vitro Fertilisation beschäftigte.

Vitamin D erfüllt neben seiner Rolle im Knochenstoffwechsel zahlreiche weitere Aufgaben im menschlichen Körper. Auch im Reproduktionstrakt scheint es eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte der Vitamin D-Rezeptor (VDR) unter anderem im Endometrium von Mäusen nachgewiesen werden (Zarnani et al., 2010). Perez-Fernandez et al. fanden diesen Rezeptor ebenfalls in der menschlichen Hypophyse und vermuteten eine mögliche Regulation der Hormonsekretion durch Vitamin D (Perez-Fernandez et al., 1997). Barrera et al. konnten zeigen, dass Vitamin D die Estradiol- und Progesteron-Synthese in der menschlichen Plazenta stimuliert (Barrera et al., 2007). Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass adäquat hohe Vitamin D-Werte eine wichtige Rolle für das erfolgreiche Austragen einer Schwangerschaft spielen könnten.

Ein möglicher Zusammenhang spiegelte sich auch im hier beschriebenen Kollektiv von 83 Kinderwunschpatientinnen zumindest in Teilen wider. So konnten zwar keine signifikanten Unterschiede der Vitamin D-Werte erfolgreich schwanger gewordener Frauen und nicht schwangerer Frauen festgestellt werden, jedoch waren dennoch deutlich niedrigere Vitamin D-Werte bei nicht schwangeren Frauen aufgefallen. Schwangere Frauen wiesen einen mittleren Vitamin D-Wert von 23 ng/ml (Median 21) auf, während der durchschnittliche Vitamin D-Wert nicht schwangerer Frauen/von Frauen mit Abort lediglich bei 19 ng/ml (Median 17) lag. In einer multiplen Regressionsanalyse zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Vitamin D auf die Geburtenrate. Auch die ROC-Kurve erreichte mit einer Fläche unter der Kurve von 0,669 keine ausreichenden Werte, um anhand des Vitamin D-Wertes den Erfolg einer IVF-Behandlung voraussehen zu können, jedoch lieferte sie dennoch einen Hinweis auf potentielle Zusammenhänge. Bei keiner der Patientinnen mit Vitamin D-Werten unter 13,5 ng/ml war die Fertilisationstherapie erfolgreich, während Patientinnen mit Vitamin D-Werten über 29,5 ng/ml eine sehr hohe Geburtenrate von 27,3% aufwiesen.

Bisherige Studien zu diesem Thema kommen zu uneinheitlichen Ergebnissen. So konnten Aleyasin et al. in einer Studie mit 82 Kinderwunschpatientinnen keine positive Korrelation zwischen Vitamin D in der Follikelflüssigkeit und Fertilisationsrate feststellen, während Farzadi et al. bei 80 Kinderwunschpatientinnen eine positive Korrelation zwischen Implantationsrate und Vitamin D in der Follikelflüssigkeit beschrieben (Aleyasin et al., 2011; Farzadi et al., 2015). Garbedian et al. beobachteten bei einem Vitamin D Cut-off von 75 nmol/L (entspricht 30 ng/ml) eine signifikant höhere Schwangerschaftsrate nach IVF-Therapie und zudem einen häufigeren Tag 5 Blastozysten-Transfer, was ihrer Meinung nach auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Embryonenqualität und maternalen Vitamin D-Spiegeln hinwies (Garbedian, Boggild, Moody, & Liu, 2013). Rudick et al. kamen bei 99 Patientinnen mit Eizellspende zu ähnlichen Ergebnissen. Auch sie beobachteten eine höhere Schwangerschaftsrate bei Frauen mit Vitamin D-Werten über 30 ng/ml, sahen den Grund darin allerdings im Einfluss von Vitamin D auf das Endometrium der Kinderwunschpatientinnen, da durch die Eizellspende ein Einfluss des Vitamin D-Werts der Kinderwunschpatientinnen auf die Oozyten ausgeschlossen werden konnte (Rudick et al., 2014). Banker et al. betrachteten sowohl Eizellspenderinnen als auch Eizellempfängerinnen bezüglich des Vitamin D-Spiegels und Fruchtbarkeit und kamen bei einer Studiengröße von insgesamt 291 Frauen zu dem Ergebnis, dass ein höherer Vitamin D-Spiegel weder auf die Oozytenqualität, noch auf Implantationsrate und erfolgreiches Austragen einer Schwangerschaft signifikanten Einfluss hat, jedoch waren in beiden Gruppen Tendenzen hinsichtlich höherer Fertilität bei höherem Vitamin D-Wert erkennbar (Banker, Sorathiya, & Shah, 2017). Aflatoonian et al. verglichen 57 Patientinnen mit kontrollierter Vitamin D-Substitution auf Werte über 30 ng/ml mit Patientinnen ohne Substitution und Werten deutlich unter 30 ng/ml Vitamin D. Sie konnten dabei keine Unterschiede zwischen chemischer und klinischer Schwangerschaftsrate der beiden Gruppen feststellen (Aflatoonian, Arabjahvani, Eftekhari, & Sayadi, 2014). Da es sich jedoch bei dieser Studie um Patientinnen im Kryo-Zyklus, d.h. in einem Fertilisationszyklus mit bereits in vorherigen Zyklen gewonnenen, tiefgefrorenen Embryonen handelte, kann durch dieses Studiendesign ein möglicher Einfluss von Vitamin D auf die Embryonenqualität nicht ausgeschlossen werden. Auch Studien mit größeren Fallzahlen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So beschrieben Polyzos et al. in einer Studie mit 368 Kinderwunschpatientinnen eine signifikant höhere Geburtenrate bei Frauen mit Vitamin D-Werten über 20 ng/ml, während Franasiak et

al. in einer Studie mit 517 Frauen in Kinderwunschtherapie weder einen Einfluss von Vitamin D auf die Schwangerschaftsrate, noch einen Cut-off Vitamin D-Wert für eine erfolgreiche Fertilisationstherapie feststellten (Franasiak et al., 2015; Polyzos et al., 2014).

Zusammenfassend gibt es sowohl in unserer Studie, als auch in experimentellen und klinischen Studien anderer Arbeitsgruppen deutliche Hinweise darauf, dass Vitamin D einen Einfluss auf den Erfolg einer Schwangerschaft hat. Zu diesem Ergebnis kamen auch Irani et al. in ihrer systematischen Literaturanalyse zum Thema Vitamin D und Fertilität (Irani & Merhi, 2014). Limitationen dieses Seitenarms unserer Studie stellen jedoch die geringe Fallzahl und zudem das nicht vollständig auf diese Fragestellung ausgerichtete Studiendesign dar. So wurden der Tag des Blastozysten-Transfers, die Qualität der Embryonen und die Anzahl der eingesetzten Embryonen pro IVF-Zyklus nicht berücksichtigt. Weitere Studien, die diese Faktoren einbeziehen und eine größere Fallzahl aufweisen, werden daher zur weiteren Klärung der Fragestellung benötigt.



## 5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden zu je vier Zeitpunkten in IVF-Zyklen von 71 Frauen Hormon- und Knochenstoffwechselfparameter bestimmt – ausgehend von der Lutealphase im Vorzyklus, in der üblicherweise die Downregulation im Rahmen einer IVF-Behandlung beginnt. Die unter Stimulationstherapie verstärkten zyklischen Hormonschwankungen hatten Einfluss auf den Knochenmetabolismus.

Der Verlauf von Estradiol wurde durch Downregulation und Stimulation geprägt mit bis zu 5-fach höheren Werten zu T3 als periovulatorisch in natürlichen Zyklen (1150 pg/ml zu T3 versus 200-300 pg/ml in natürlichen Zyklen periovulatorisch). Osteocalcin verlief während des Fertilisationszyklus signifikant invers zu Estradiol ( $p=0,0166$ ), was im Repeated Measures Modell gezeigt werden konnte. Insgesamt ging höheres Estradiol mit vermindertem Knochenumbau einher, wie aufgrund seiner antiresorptiven Eigenschaften erwartet.

Unter Downregulation entfiel der FSH-Anstieg zwischen Lutealphase und Follikelphase, im Vergleich zu publizierten Daten aus natürlichen Zyklen waren die Gonadotropin-Konzentrationen im Serum niedriger. Der zyklische Verlauf von FSH hatte signifikant positiven Einfluss auf den Verlauf des Knochenabbauparameters CTX ( $p=0,0001$ ), passend zu dem Postulat von Sun et al., dass FSH eigenständig Knochenabbau fördert (Sun et al., 2006). Auch für diese Berechnung wurde das Repeated Measures Modell genutzt.

Ein direkter Einfluss von Progesteron in der Lutealphase der Stimulationsphase auf die Knochenstoffwechselfparameter konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch wurden zeitversetzte Effekte von Ovulation, beziehungsweise Anovulation im Vorzyklus auf die Knochenstoffwechselfparameter im Stimulationszyklus beobachtet: nach anovulatorischen Zyklen folgten - unabhängig vom Hormonverlauf im Folgezyklus - erhöhte CTX ( $p=0,003$ ), TRACP (n.s.) und OC ( $p=0,0129$ )-Werte. Der Knochenaufbauparameter BAP hingegen war in Zyklen mit ovulatorischem Vorzyklus höher (n.s.). Auch nach Aufteilung in Untergruppen entsprechend der Stimulationsart (HMG versus rFSH) blieb dieser Zusammenhang weiter bestehen. Diese Studie bestätigt einen Zusammenhang zwischen Ovulation und Knochenumsatz, zur genaueren Erforschung der Hintergründe sind jedoch weitere Studien mit Erfassung mehrerer aufeinander folgender Zyklen und weiterer potentieller Einflussfaktoren nötig.

Die Frage, ob die Stimulationsart (LH/FSH versus rFSH) einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat, konnte unter anderem aufgrund der kleinen Gruppengrößen nicht vollständig geklärt werden: Hormon- und Knochenstoffwechselfparameter schwankten besonders periovulatorisch (um die Follikelpunktion zu T3) unabhängig von der Stimulationsart. Am Ende des Stimulationszyklus (T4) waren die Knochenstoffwechselfparameter in der mit rFSH stimulierten Gruppe tendenziell höher (n.s.), während in dieser Gruppe Serum-FSH signifikant höher und Serum-Estradiol signifikant niedriger war. In der Stimulationsgruppe mit den jeweils höheren Serum-FSH-Werten fanden sich tendenziell auch höhere CTX-Werte (n.s.).

Der kurzfristige Einfluss von rFSH- oder FSH/LH-Applikation im Rahmen einer Fertilisationstherapie auf den Knochenmetabolismus zeigte sich in supprimierten Mittelwerten von CTX (Delta T1/4 n.s.), TRACP (Delta T1/T4  $p=0,000$ ) und OC (Delta T1/T4  $p=0,006$ ) zu T4, was gleichermaßen auf das während des Stimulationszyklus stark erhöhte Estradiol sowie supprimierte FSH zurückgeführt werden kann.

Die ROC-Kurve zur prädiktiven Wertigkeit der bei den Kinderwunschpatientinnen gemessenen Vitamin D-Werte bezüglich eines späteren Schwangerschaftserfolges zeigte mit einer Sensitivität von 0,889 und einer Spezifität von 0,446 keinen sicheren Zusammenhang. Nach Anwendung des CRT-Algorithmus (Classification and Regression Trees) zeigte das Baumdiagramm tendenziell bessere Ergebnisse (27,3% Schwangerschaftsrate) bei Frauen mit höheren Vitamin D-Spiegeln ( $>29,5$  ng/ml) gegenüber der Gesamt-Schwangerschaftsrate (15%) bei Vitamin D-Spiegeln  $>13,5$  ng/ml. Von 23 Patientinnen mit Vitamin D-Konzentrationen  $<13,5$  ng/ml Serum wurde im Beobachtungszeitraum keine schwanger. Um zu validieren, welche Bedeutung Vitamin D für den Schwangerschaftseintritt und das Schwangerschaftsoutcome hat, sind größere prospektive Studien erforderlich.

## 6 Quellenverzeichnis

- Aflatoonian, A., Arabjahvani, F., Eftekhar, M., & Sayadi, M. (2014). Effect of vitamin D insufficiency treatment on fertility outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles: A randomized clinical trial. *Iran J Reprod Med*, 12(9), 595-600.
- Al-Safi, Z., McAvery, B., & Santoro, N. (2000). The Postmenopausal Woman. In L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, F. Singer, A. Vinik & M. O. Weickert (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Aleyasin, A., Hosseini, M. A., Mahdavi, A., Safdarian, L., Fallahi, P., Mohajeri, M. R., Abbasi, M., Esfahani, F. (2011). Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 159(1), 132-137. doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.07.006
- Banker, M., Sorathiya, D., & Shah, S. (2017). Vitamin D Deficiency Does Not Influence Reproductive Outcomes of IVF-ICSI: A Study of Oocyte Donors and Recipients. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 10(2), 79-85. doi: 10.4103/jhrs.JHRS\_117\_16
- Baron, R. (2000). Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling. In L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, F. Singer, A. Vinik & M. O. Weickert (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Barrera, D., Avila, E., Hernandez, G., Halhali, A., Biruete, B., Larrea, F., & Diaz, L. (2007). Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103(3-5), 529-532. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.12.097
- Bartl, R. . (2004). *Osteoporose, Prävention - Diagnostik - Therapie* (2. ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Baxter-Jones, A. D., Faulkner, R. A., Forwood, M. R., Mirwald, R. L., & Bailey, D. A. (2011). Bone mineral accrual from 8 to 30 years of age: an estimation of peak bone mass. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(8), 1729-1739. doi: 10.1002/jbmr.412
- Bedford, J. L., Prior, J. C., & Barr, S. I. (2010). A prospective exploration of cognitive dietary restraint, subclinical ovulatory disturbances, cortisol, and change in bone density over two years in healthy young women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(7), 3291-3299. doi: 10.1210/jc.2009-2497
- Brosius, Felix. (2013). *SPSS 21* (1 ed.). Heidelberg/ München/ Landsberg/ Frechen/ Hamburg: mitp.
- Bühl, Achim. (2014). *SPSS 22. Einführung in die moderne Datenanalyse* (Vol. 14.). Hallbergmoos: Pearson.
- Calvo, M. S., Eyre, D. R., & Gundberg, C. M. (1996). Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Reviews*, 17(4), 333-368. doi: 10.1210/edrv-17-4-333

- Cannon, J. G., Kraj, B., & Sloan, G. (2011). Follicle-stimulating hormone promotes RANK expression on human monocytes. *Cytokine*, 53(2), 141-144. doi: 10.1016/j.cyto.2010.11.011
- Chiu, K. M., Ju, J., Mayes, D., Bacchetti, P., Weitz, S., & Arnaud, C. D. (1999). Changes in bone resorption during the menstrual cycle. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(4), 609-615. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.4.609
- Christgau, S. (2000). Circadian variation in serum CrossLaps concentration is reduced in fasting individuals. *Clinical Chemistry*, 46(3), 431.
- Chubb, S. A. (2012). Measurement of C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) in serum. *Clinical Biochemistry*, 45(12), 928-935. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.03.035
- Cooper, G. S., & Sandler, D. P. (1997). Long-term effects of reproductive-age menstrual cycle patterns on peri- and postmenopausal fracture risk. *American Journal of Epidemiology*, 145(9), 804-809.
- De Souza, M. J., Miller, B. E., Sequenzia, L. C., Luciano, A. A., Ulreich, S., Stier, S., Prestwood, K., Lasley, B. L. (1997). Bone health is not affected by luteal phase abnormalities and decreased ovarian progesterone production in female runners. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(9), 2867-2876. doi: 10.1210/jcem.82.9.4201
- Diedrich, K., & Ludwig, M. (2013). *Reproduktionsmedizin* G. Griesinger (Ed.) doi:10.1007/978-3-642-30181-0
- Duijkers, I. J., Vemer, H. M., Hollanders, J. M., Willemsen, W. N., Bastiaans, L. A., Hamilton, C. J., Thomas, C. M., Borm, G. F. (1993). Different follicle stimulating hormone/luteinizing hormone ratios for ovarian stimulation. *Human Reproduction*, 8(9), 1387-1391.
- Ecochard, R., Guillermin, A., Leiva, R., Bouchard, T., Direito, A., & Boehringer, H. (2014). Characterization of follicle stimulating hormone profiles in normal ovulating women. *Fertility and Sterility*, 102(1), 237-243 e235. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.034
- Eriksen, E. F., Colvard, D. S., Berg, N. J., Graham, M. L., Mann, K. G., Spelsberg, T. C., & Riggs, B. L. (1988). Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 241(4861), 84-86.
- Fahrmeir, Ludwig, Kneib, Thomas, & Lang, Stefan. (2007). *Regression. Modelle, Methoden und Anwendungen*. Berlin/ Heidelberg/ New York: Springer-Verlag.
- Farzadi, L., Khayatzadeh Bidgoli, H., Ghojzadeh, M., Bahrami, Z., Fattahi, A., Latifi, Z., Shahnazi, V., Nouri, M. (2015). Correlation between follicular fluid 25-OH vitamin D and assisted reproductive outcomes. *Iran J Reprod Med*, 13(6), 361-366.
- Franasiak, J. M., Molinaro, T. A., Dubell, E. K., Scott, K. L., Ruiz, A. R., Forman, E. J., Werner, M. D., Hong, K. H., Scott, R. T., Jr. (2015). Vitamin D levels do not affect IVF outcomes following the transfer of euploid blastocysts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(3), 315 e311-316. doi: 10.1016/j.ajog.2014.09.029
- Gao, J., Tiwari-Pandey, R., Samadfam, R., Yang, Y., Miao, D., Karaplis, A. C., Sairam, M. R., Goltzman, D. (2007). Altered ovarian function affects skeletal homeostasis

- independent of the action of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 148(6), 2613-2621. doi: 10.1210/en.2006-1404
- Garbedian, K., Boggild, M., Moody, J., & Liu, K. E. (2013). Effect of vitamin D status on clinical pregnancy rates following in vitro fertilization. *CMAJ Open*, 1(2), E77-82. doi: 10.9778/cmajo.20120032
- Garcia-Martin, A., Reyes-Garcia, R., Garcia-Castro, J. M., Rozas-Moreno, P., Escobar-Jimenez, F., & Munoz-Torres, M. (2012). Role of serum FSH measurement on bone resorption in postmenopausal women. *Endocrine*, 41(2), 302-308. doi: 10.1007/s12020-011-9541-7
- Gass, M. L., Kagan, R., Kohles, J. D., & Martens, M. G. (2008). Bone turnover marker profile in relation to the menstrual cycle of premenopausal healthy women. *Menopause*, 15(4 Pt 1), 667-675. doi: 10.1097/gme.0b013e31815f8917
- Goldring, S. R. (2015). The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open*, 1(Suppl 1), e000049. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000049
- Gorai, I., Chaki, O., Nakayama, M., & Minaguchi, H. (1995). Urinary biochemical markers for bone resorption during the menstrual cycle. *Calcified Tissue International*, 57(2), 100-104.
- Gorai, I., Taguchi, Y., Chaki, O., Kikuchi, R., Nakayama, M., Yang, B. C., Yokota, S., Minaguchi, H. (1998). Serum soluble interleukin-6 receptor and biochemical markers of bone metabolism show significant variations during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(2), 326-332. doi: 10.1210/jcem.83.2.4584
- Grewal, J., Sowers, M. R., Randolph, J. F., Jr., Harlow, S. D., & Lin, X. (2006). Low bone mineral density in the early menopausal transition: role for ovulatory function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(10), 3780-3785. doi: 10.1210/jc.2006-0544
- Halleen, J. M., Alatalo, S. L., Janckila, A. J., Woitge, H. W., Seibel, M. J., & Vaananen, H. K. (2001). Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clinical Chemistry*, 47(3), 597-600.
- Halleen, J. M., Alatalo, S. L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A. J., & Vaananen, H. K. (2000). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(7), 1337-1345. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.7.1337
- Hannon, R. A., Clowes, J. A., Egleton, A. C., Al Hadari, A., Eastell, R., & Blumsohn, A. (2004). Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone*, 34(1), 187-194.
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergard, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E. V., Jönsson, B., Kanis, J. A. (2013). Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*, 8, 136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1

- Hlaing, T. T., & Compston, J. E. (2014). Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Annals of Clinical Biochemistry*, *51*(Pt 2), 189-202. doi: 10.1177/0004563213515190
- Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Spelsberg, T. C., & Riggs, B. L. (1999). Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, *140*(9), 4367-4370. doi: 10.1210/endo.140.9.7131
- Iqbal, J., Sun, L., Kumar, T. R., Blair, H. C., & Zaidi, M. (2006). Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(40), 14925-14930. doi: 10.1073/pnas.0606805103
- Irani, M., & Merhi, Z. (2014). Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. *Fertility and Sterility*, *102*(2), 460-468 e463. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.046
- Janssen, Jürgen, & Laatz, Wilfried. (2013). *Statistische Datenanalyse mit SPSS. Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests* (8 ed.). Berlin/Heidelberg Springer Gabler.
- Ji, Y., Liu, P., Yuen, T., Haider, S., He, J., Romero, R., Chen, H., Bloch, M., Kim, S. M., Lizneva, D., Munshi, L., Zhou, C., Lu, P., Iqbal, J., Cheng, Z., New, M. I., Hsueh, A. J., Bian, Z., Rosen, C. J., Sun, L., Zaidi, M. (2018). Epitope-specific monoclonal antibodies to FSHbeta increase bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1718144115
- Johnell, O., & Kanis, J. A. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, *17*(12), 1726-1733. doi: 10.1007/s00198-006-0172-4
- Kovacs, C. S. (2001). Calcium and bone metabolism in pregnancy and lactation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(6), 2344-2348. doi: 10.1210/jcem.86.6.7575
- Kuchuk, N. O., van Schoor, N. M., Pluijm, S. M., Chines, A., & Lips, P. (2009). Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: global perspective. *Journal of Bone and Mineral Research*, *24*(4), 693-701. doi: 10.1359/jbmr.081209
- Kupka, M. S., Ferraretti, A. P., de Mouzon, J., Erb, K., D'Hooghe, T., Castilla, J. A., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., Goossens, V., European IVF-Monitoring Consortium for the European Society of Human Reproduction and Embryology. (2014). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE†. *Human Reproduction*, *29*(10), 2099-2113. doi: 10.1093/humrep/deu175
- Lee, S., Kumagai, T., Hashimoto, J., Satoh, A., Suzuki, T., Yamai, K., & Ohta, S. (2012). A change of osteocalcin (OC) and tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRACP-5b) with the menstrual cycle. *Hormone and Metabolic Research*, *44*(9), 699-703. doi: 10.1055/s-0032-1311606
- Liang, M., Liao, E. Y., Xu, X., Luo, X. H., & Xiao, X. H. (2003). Effects of progesterone and 18-methyl levonorgestrel on osteoblastic cells. *Endocrine Research*, *29*(4), 483-501.

- Maeda, S. S., & Lazaretti-Castro, M. (2014). An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, *58*(2), 162-171.
- Martin, A. S., Monsour, M., Kissin, D. M., Jamieson, D. J., Callaghan, W. M., & Boulet, S. L. (2016). Trends in Severe Maternal Morbidity After Assisted Reproductive Technology in the United States, 2008-2012. *Obstetrics and Gynecology*, *127*(1), 59-66. doi: 10.1097/AOG.0000000000001197
- Martin-Millan, M., Almeida, M., Ambrogini, E., Han, L., Zhao, H., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., O'Brien, C. A., Manolagas, S. C. (2010). The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Molecular Endocrinology*, *24*(2), 323-334. doi: 10.1210/me.2009-0354
- Mozzanega, B., Gizzo, S., Bernardi, D., Salmaso, L., Patrelli, T. S., Mioni, R., Finos, L., Nardelli, G. B. (2013). Cyclic variations of bone resorption mediators and markers in the different phases of the menstrual cycle. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *31*(4), 461-467. doi: 10.1007/s00774-013-0430-4
- Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., Nishina, H., Takeda, S., Takayanagi, H., Metzger, D., Kanno, J., Takaoka, K., Martin, T. J., Chambon, P., Kato, S. (2007). Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, *130*(5), 811-823. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.025
- Nenonen, A., Cheng, S., Ivaska, K. K., Alatalo, S. L., Lehtimäki, T., Schmidt-Gayk, H., Uusi-Rasi, K., Heinonen, A., Kannus, P., Sievänen, H., Vuori, I., Väänänen H. K., Halleen, J. M. (2005). Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(10), 1804-1812. doi: 10.1359/JBMR.050403
- Nguyen-Pascal, M. L., Thomas, J. L., Bergougnoux, L., Garnero, P., Drapier-Faure, E., & Delmas, P. D. (2005). Norethisterone acetate may enhance the skeletal effects of estradiol on biochemical markers of bone turnover in menopausal women after a 12-week treatment period. *Climacteric*, *8*(2), 136-145. doi: 10.1080/13697130500103433
- Nicodemus, K. K., Folsom, A. R., & Anderson, K. E. (2001). Menstrual history and risk of hip fractures in postmenopausal women. The Iowa Women's Health Study. *American Journal of Epidemiology*, *153*(3), 251-255.
- Nielsen, H. K., Brixen, K., Bouillon, R., & Mosekilde, L. (1990). Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *70*(5), 1431-1437. doi: 10.1210/jcem-70-5-1431
- Niethammer, B., Körner, C., Schmidmayr, M., Luppä, P., & Seifert-Klauss, V. (2015). Non-reproductive Effects of Anovulation. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, *75*(12), 1250-1257. doi: 10.1055/s-0035-1558298
- O'Connor, K. A., Holman, D. J., & Wood, J. W. (2001). Menstrual cycle variability and the perimenopause. *American Journal of Human Biology*, *13*(4), 465-478. doi: 10.1002/ajhb.1078

- Omodei, U., Mazziotti, G., Donarini, G., Gola, M., Guella, V., Pagani, F., Bugari, G., Porcelli, T., Giustina, A. (2013). Effects of recombinant follicle-stimulating hormone on bone turnover markers in infertile women undergoing in vitro fertilization procedure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *98*(1), 330-336. doi: 10.1210/jc.2012-2778
- Ouyang, F., Wang, X., Arguelles, L., Rosul, L. L., Venners, S. A., Chen, C., Hsu Y. H., Terwedow, H., Wu, D., Tang, G., Yang, J., Xing, H., Zang, T., Wang, B., Xu, X. (2007). Menstrual cycle lengths and bone mineral density: a cross-sectional, population-based study in rural Chinese women ages 30-49 years. *Osteoporosis International*, *18*(2), 221-233. doi: 10.1007/s00198-006-0210-2
- Pellegrini, G. G., Gonzales Chaves, M. M., Fajardo, M. A., Ponce, G. M., Toyos, G. I., Lifshitz, F., Friedman, S. M., Zeni, S. N. (2012). Salivary bone turnover markers in healthy pre- and postmenopausal women: daily and seasonal rhythm. *Clinical Oral Investigations*, *16*(2), 651-657. doi: 10.1007/s00784-011-0538-7
- Perez-Fernandez, R., Alonso, M., Segura, C., Munoz, I., Garcia-Caballero, T., & Diguez, C. (1997). Vitamin D receptor gene expression in human pituitary gland. *Life Sciences*, *60*(1), 35-42.
- Perrien, D. S., Achenbach, S. J., Bledsoe, S. E., Walser, B., Suva, L. J., Khosla, S., & Gaddy, D. (2006). Bone turnover across the menopause transition: correlations with inhibins and follicle-stimulating hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *91*(5), 1848-1854. doi: 10.1210/jc.2005-2423
- Petsos, P., Mamtora, H., Ratcliffe, W. A., & Anderson, D. C. (1987). Inadequate luteal phase usually indicates ovulatory dysfunction: observations from serial hormone and ultrasound monitoring of 115 cycles. *Gynecological Endocrinology*, *1*(1), 37-45.
- Plumelle, D., Lombard, E., Nicolay, A., & Portugal, H. (2014). Influence of diet and sample collection time on 77 laboratory tests on healthy adults. *Clinical Biochemistry*, *47*(1-2), 31-37. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.002
- Polyzos, N. P., Anckaert, E., Guzman, L., Schiettecatte, J., Van Landuyt, L., Camus, M., Smits, J., Tournaye, H. (2014). Vitamin D deficiency and pregnancy rates in women undergoing single embryo, blastocyst stage, transfer (SET) for IVF/ICSI. *Human Reproduction*, *29*(9), 2032-2040. doi: 10.1093/humrep/deu156
- Prior, J. C. (1998). Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocrine Reviews*, *19*(4), 397-428. doi: 10.1210/edrv.19.4.0341
- Prior, J. C. (2007). FSH and bone--important physiology or not? *Trends in Molecular Medicine*, *13*(1), 1-3. doi: 10.1016/j.molmed.2006.11.004
- Prior, J. C., Vigna, Y. M., Schechter, M. T., & Burgess, A. E. (1990). Spinal bone loss and ovulatory disturbances. *New England Journal of Medicine*, *323*(18), 1221-1227. doi: 10.1056/NEJM199011013231801
- Qvist, P., Christgau, S., Pedersen, B. J., Schlemmer, A., & Christiansen, C. (2002). Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone*, *31*(1), 57-61.



- Raith-Paula, Elisabeth , Frank-Herrmann, Petra , Freundl, Günter , & Strowitzki, Thomas. (2013). *Natürliche Familienplanung heute, Modernes Zykluswissen für Beratung und Anwendung* Springer-Verlag (Ed.) doi:10.1007/978-3-642-29784-7
- Reifenstein, E. C., Jr., & Albright, F. (2011). The classic: the metabolic effects of steroid hormones in osteoporosis. 1946. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(8), 2096-2127. doi: 10.1007/s11999-011-1832-z
- Roggia, C., Gao, Y., Cenci, S., Weitzmann, M. N., Toraldo, G., Isaia, G., & Pacifici, R. (2001). Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13960-13965. doi: 10.1073/pnas.251534698
- Rudick, B. J., Ingles, S. A., Chung, K., Stanczyk, F. Z., Paulson, R. J., & Bendikson, K. A. (2014). Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donor-recipient cycles. *Fertility and Sterility*, 101(2), 447-452. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.10.008
- Ruopp, M. D., Perkins, N. J., Whitcomb, B. W., & Schisterman, E. F. (2008). Youden Index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biom J*, 50(3), 419-430. doi: 10.1002/bimj.200710415
- S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.: Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. (13.11.2014, 17.11.2014). 3.11.2015, from [http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie\\_2014/DVO-Leitlinie\\_Osteoporose\\_2014\\_Kurzfassung\\_und\\_Langfassung\\_18.09.2014.pdf](http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie_2014/DVO-Leitlinie_Osteoporose_2014_Kurzfassung_und_Langfassung_18.09.2014.pdf)
- Schlemmer, A., Hassager, C., Risteli, J., Risteli, L., Jensen, S. B., & Christiansen, C. (1993). Possible variation in bone resorption during the normal menstrual cycle. *Acta Endocrinologica*, 129(5), 388-392.
- Schmidmayr, M., Magdolen, U., Tübel, J., Kiechle, M., Burgkart, R., & Seifert-Klauss, V. (2008). Progesteron verstärkt die Differenzierung primärer humaner Osteoblasten in Langzeit-Kulturen. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 68(07), 722-728. doi: 10.1055/s-2008-1038711
- Seibel, M. J. (2005). Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clinical Biochemist*, 26(4), 97-122.
- Seibel, M. J. (2006). Clinical application of biochemical markers of bone turnover. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 50(4), 603-620.
- Seifert-Klauss, V., Fillenber, S., Schneider, H., Lupp, P., Mueller, D., & Kiechle, M. (2012). Bone loss in premenopausal, perimenopausal and postmenopausal women: results of a prospective observational study over 9 years. *Climacteric*, 15(5), 433-440. doi: 10.3109/13697137.2012.658110
- Seifert-Klauss, V., Link, T., Heumann, C., Lupp, P., Haseitl, M., Laakmann, J., Rattenhuber, J., Kiechle, M. (2006). Influence of pattern of menopausal transition on the amount of trabecular bone loss. Results from a 6-year prospective longitudinal study. *Maturitas*, 55(4), 317-324. doi: 10.1016/j.maturitas.2006.04.024
- Seifert-Klauss, V., & Prior, J. C. (2010). Progesterone and bone: actions promoting bone health in women. *J Osteoporos*, 2010, 845180. doi: 10.4061/2010/845180

- Slootweg, M. C., Ederveen, A. G., Schot, L. P., Schoonen, W. G., & Kloosterboer, H. J. (1992). Oestrogen and progestogen synergistically stimulate human and rat osteoblast proliferation. *Journal of Endocrinology*, *133*(2), R5-8.
- Srivastava, S., Toraldo, G., Weitzmann, M. N., Cenci, S., Ross, F. P., & Pacifici, R. (2001). Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(12), 8836-8840. doi: 10.1074/jbc.M010764200
- Stepaniak, U., Szafraniec, K., Kubinova, R., Malyutina, S., Peasey, A., Pikhart, H., Pajak, A., Bobak, M. (2013). Age at natural menopause in three central and eastern European urban populations: the HAPIEE study. *Maturitas*, *75*(1), 87-93. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.02.008
- Sun, L., Peng, Y., Sharrow, A. C., Iqbal, J., Zhang, Z., Papachristou, D. J., Zaidi, S., Zhu, L. L., Yaroslavskiy, B. B., Zhou, H., Zallone, A., Sairam, M. R., Kumar, T. R., Bo, W., Braun, J., Cardoso-Landa, L., Schaffler, M. B., Moonga, B. S., Blair, H. C., Zaidi, M. (2006). FSH directly regulates bone mass. *Cell*, *125*(2), 247-260. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.051
- Tavaniotou, A., & Devroey, P. (2006). Luteal hormonal profile of oocyte donors stimulated with a GnRH antagonist compared with natural cycles. *Reprod Biomed Online*, *13*(3), 326-330.
- Urban, Dieter, & Mayerl, Jochen. (2011). *Regressionsanalyse: Theorie, Technik und Anwendung* (4., überarbeitete und erweiterte Auflage ed.). Wiesbaden: VS Verlag.
- VanHouten, J. N., & Wysolmerski, J. J. (2003). Low estrogen and high parathyroid hormone-related peptide levels contribute to accelerated bone resorption and bone loss in lactating mice. *Endocrinology*, *144*(12), 5521-5529. doi: 10.1210/en.2003-0892
- Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyere, O., Foldes, A. J., Garnero, P., Griesmacher, A., McClung, M., Morris, H. A., Silverman, S., Trenti, T., Wahl, D. A., Cooper, C., Kanis, J. A., IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group, Iof-Ifcc Bone Marker Standards Working. (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis International*, *22*(2), 391-420. doi: 10.1007/s00198-010-1501-1
- Waller, K., Reim, J., Fenster, L., Swan, S. H., Brumback, B., Windham, G. C., Lasley, B., Ettinger, B., Marcus, R. (1996). Bone mass and subtle abnormalities in ovulatory function in healthy women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *81*(2), 663-668. doi: 10.1210/jcem.81.2.8636286
- Wang, B., Song, Y., Chen, Y., Wang, E. S., Zheng, D., Qu, F., & Zhou, J. H. (2015). Correlation analysis for follicle-stimulating hormone and C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen in menopausal transition women with osteoporosis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(2), 2417-2422.
- Waugh, E. J., Polivy, J., Ridout, R., & Hawker, G. A. (2007). A prospective investigation of the relations among cognitive dietary restraint, subclinical ovulatory disturbances, physical activity, and bone mass in healthy young women. *American Journal of Clinical Nutrition*, *86*(6), 1791-1801.
- Westergaard, L. G., Erb, K., Laursen, S., Rasmussen, P. E., & Rex, S. (1996). The effect of human menopausal gonadotrophin and highly purified, urine-derived follicle

- stimulating hormone on the outcome of in-vitro fertilization in down-regulated normogonadotrophic women. *Human Reproduction*, 11(6), 1209-1213.
- Yarram, S. J., Perry, M. J., Christopher, T. J., Westby, K., Brown, N. L., Lamminen, T., Rulli, S. B., Zhang, F. P., Huhtaniemi, I., Sandy, J. R., Mansell, J. P. (2003). Luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice and transgenic human chorionic gonadotropin (hCG)-overexpressing mice (hCG alphabeta+) have bone phenotypes. *Endocrinology*, 144(8), 3555-3564. doi: 10.1210/en.2003-0036
- Yilmaz, H., Ozgur, K., Isikoglu, M., Sonmez, C., & Uner, M. (2004). Bone resorption starts at 14 days of treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist in in vitro fertilization cycles. *Gynecological Endocrinology*, 19(1), 40-46.
- Youden, W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3(1), 32-35.
- Zarnani, A. H., Shahbazi, M., Salek-Moghaddam, A., Zareie, M., Tavakoli, M., Ghasemi, J., Rezania, S., Moravej, A., Torkabadi, E., Rabbani, H., Jeddi-Tehrani, M. (2010). Vitamin D3 receptor is expressed in the endometrium of cycling mice throughout the estrous cycle. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2738-2743. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.045
- Zhu, L. L., Blair, H., Cao, J., Yuen, T., Latif, R., Guo, L., Tourkova, I. L., Li, J., Davies, T. F., Sun, L., Bian, Z., Rosen, C., Zallone, A., New, M. I., Zaidi, M. (2012). Blocking antibody to the beta-subunit of FSH prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stimulating bone synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14574-14579. doi: 10.1073/pnas.1212806109
- Zittermann, A., Schwarz, I., Scheld, K., Sudhop, T., Berthold, H. K., von Bergmann, K., van der Ven, H., Stehle, P. (2000). Physiologic fluctuations of serum estradiol levels influence biochemical markers of bone resorption in young women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(1), 95-101. doi: 10.1210/jcem.85.1.6250

## 7 Appendix

### 7.1 Abbruchgründe und Sonderfälle im Studienkollektiv

- Abbruch vor T1, n=3: Nr. 5002 (finanzielle Gründe), Nr. 67 (zu wenig Serum zu T1), Nr. 79 (berufl. Gründe)
- Abbruch vor T2, n=8: Nr. 4 (Zyklusstörungen unter Synarella), Nr. 8 (pers. Gründe), Nr. 28 (zu jung), Nr. 53 (keine BE bei T2), Nr. 59 (keine BE bei T2), Nr. 90 (pers. Gründe), Nr. 3002 (kein Stimulationsbeginn), Nr. 1702 (finanzielle Gründe)
- Abbruch vor T3, n=4: Nr. 18 (Zyklusunregelmäßigkeiten), Nr. 24 (keine Eizellen), Nr. 42 (zu wenige Follikel), Nr. 76 (keine BE bei T3)
- Nr. 49 nur im Vitamin D-Kollektiv wegen mehrmaligen Abbruchs und Neubeginn der T1 und T2 Medikation
- Nr. 56 nur im Vitamin D-Kollektiv wegen zu langer Zeit zwischen T1 und Stimulationsbeginn
- Long ohne T4, n=13: (Nr. 5, Nr. 15, Nr. 39, Nr. 44, Nr. 51, Nr. 58, Nr. 68, Nr. 75, Nr. 84, Nr. 88, Nr. 92, Nr. 93, Nr. 95)

### 7.2 Einflussparameter auf die Marker des Knochenstoffwechsels

#### 7.2.1 Statistische Herangehensweise in der multiplen Regressionsanalyse

In einer multiplen Regressionsanalyse wurde der Einfluss von erhobenen Daten wie Hormonwerten oder dem BMI auf die einzelnen Knochenstoffwechselfparameter jeweils zu T1 modelliert. Dummy-Variablen wurden genutzt, um beispielsweise die Auswirkung des Stimulationsprotokolls auf die Knochenstoffwechselfparameter festzustellen. Auf diese Weise konnten auch nominalskalierte Variablen in eine Regressionsanalyse einbezogen werden (Brosius, 2013, p. 568). Zur Modellauswahl diente das Informationskriterium nach Akaike (AIC), welches durch schrittweise Selektion das Modell liefert, das den abhängigen Wert am besten erklärt. (Fahrmeir, Kneib, & Lang, 2007, pp. 161-165). Das daraus resultierende multiple Regressionsmodell eignet sich, um den Einfluss der entscheidenden Parameter auf die Zielgröße zu modellieren. Auf diese Weise konnten sowohl multiples Testen, als auch Multikollinearität und Confounding bestmöglich reduziert werden. Die Modellauswahl nach

AIC erfolgte mit dem Programm R, die multiple Regressionsanalyse mit SPSS. Voraussetzungen für das Testen der linearen Regression ist die Homoskedastizität, das heißt, dass die Varianzen gleich sind. Diese wurde durch ein Streudiagramm geprüft, wobei auf der x-Achse die Regression der standardisierten, geschätzten Werte der abhängigen Variable aufgetragen wurden und auf der y-Achse die standardisierten Residuen. Eine weitere Bedingung ist der Ausschluss von Autokorrelation (Fahrmeir et al., 2007, pp. 64-70). Der Durbin-Watson-Test zeigte Werte zwischen 1,48 und 2,4 womit kein Hinweis auf Autokorrelation bestand, während ein Wert von 0 für eine vollständig positive Autokorrelation, ein Wert von 4 für eine vollständig negative Autokorrelation und ein Wert von 2 für keinen Anhalt für Autokorrelation steht (Bühl, 2014, p. 452). Multikollinearität, also die annähernd lineare Abhängigkeit zweier oder mehrerer Kovariablen voneinander, wurde ebenfalls ausgeschlossen. Mit SPSS lässt sich hierfür der Toleranzwert und der VIF (variance inflation factor) berechnen. Hier empfehlen Urban & Mayerl, dass der Toleranzwert nicht unter 0,25 (bei möglichen Werten von 0 bis 1, wobei 1 für eine vollständig eigenständige Variable spricht) und der VIF (entspricht  $1/\text{Toleranz}$  und liegt bei schwerer Multikollinearität bei 10) nicht über 5 liegen sollte (Urban & Mayerl, 2011, pp. 225-232). Das korrigierte Bestimmtheitsmaß  $R^2$ , welches um die Anzahl an Regressoren und den Stichprobenumfang korrigiert wird, wurde zur Bestimmung der Stärke des erklärenden Modells herangezogen (Urban & Mayerl, 2011, p. 169).

Potentielle Zusammenhänge zwischen Regressoren und abhängigen Variablen wurden zunächst durch Streudiagramme dargestellt. Hierbei wurden die einzelnen Werte der unabhängigen Variable jeder Studienteilnehmerin auf der Abszissenachse (x-Achse), die jeweiligen Werte der abhängigen Variable auf der Ordinatenachse (y-Achse) aufgetragen. Die zusätzlich aufgetragene Regressionsgerade, welche sich aus der Formel  $y = a + bx$  (a ist der Y-Achsenabschnitt, b ist die Steigung) berechnet, gibt Aufschluss zur Art des Zusammenhangs. Die Stärke des Erklärungsgehalts der unabhängigen Variable x in Bezug auf die abhängige Variable y wurde zu jedem Streudiagramm durch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  bestimmt, welches sich zwischen 0 und 1 befindet und sich 1 annähert, je höher der Erklärungsgehalt des Regressors auf die abhängige Variable ist (Janssen & Laatz, 2013, pp. 395-398).

### 7.2.2 Auswertung

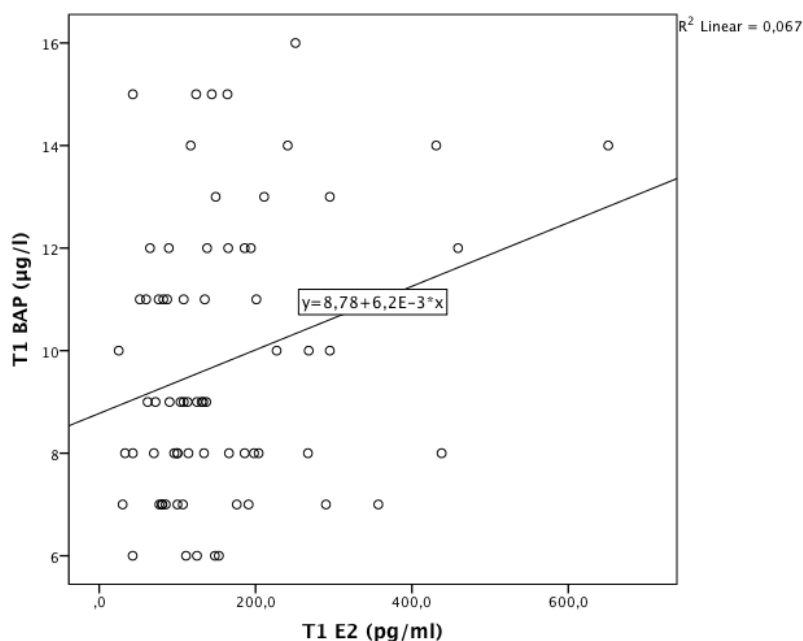
Im Rahmen der Datenerfassung wurden verschiedenste Parameter erhoben, die möglicherweise Einfluss auf den Knochenmetabolismus haben. Zusammenhänge deuteten sich bereits in einigen der zunächst erstellten Streudiagramme an. Anschließend wurde in einer multiplen Regressionsanalyse der Einfluss der Basisparameter Alter, Vitamin D, Kalzium und BMI, positive Osteoporose-Familienanamnese, anamnestisch bekannte Knochenbrüche, Milchkonsum (Tage/Woche) und Zigarettenkonsum (Zigaretten/Tag und seit wie vielen Jahren), Kaffeeconsum (Tassen/Tag) sowie der Einfluss der Hormone LH, FSH, Estradiol und Progesteron auf die Knochenstoffwechselfparameter BAP, OC, CTX und TRACP zum Zeitpunkt T1 modelliert. Um ein möglichst genaues, aber dennoch einfaches Modell zu erhalten, wurde das Informationskriterium AIC verwendet, welches durch Rückwärtsselektion jeweils solange Kovariablen aus dem Gesamtmodell entfernt, bis es bei einer größtmöglichen Reduktion des Modellwahlkriteriums AIC die Selektion stoppt (Fahrmeir et al., 2007, pp. 161-167). Hierbei kristallisierten sich zwei Faktoren heraus, die durch die Selektion nach AIC in jedes Modell zur Erklärung des jeweiligen Knochenstoffwechselfparameters aufgenommen wurden: Estradiol und der Milchkonsum der Patientinnen (s. Tab. 15). Estradiol stellte sich zudem in drei Fällen als signifikanter Prädiktor für BAP ( $p=0,022$ ), CTX ( $p=0,001$ ) und TRACP ( $p=0,001$ ) heraus, während Milchkonsum bei Osteocalcin ( $p=0,035$ ) und CTX ( $p=0,015$ ) signifikante Werte erreichte. Interessant war hier die Richtung des Einflusses von Estradiol auf den Knochenmetabolismus. Entgegen der Erwartung, dass Estradiol den Knochenabbau hemmt und so zu geringeren Knochenstoffwechselfparameterwerten führt, zeigte sich in allen signifikanten Fällen ein gleichsinniger Zusammenhang zwischen Estradiol und den Knochenstoffwechselfparametern. Somit führten höhere Werte von Estradiol auch zu höheren Knochenstoffwechselfparametern (s. Abb. 20). Hoher Milchkonsum dagegen führte zu niedrigen Knochenstoffwechselfparametern. FSH wurde zweimal in das erklärende Modell aufgenommen und zeigte davon einen signifikant positiven Einfluss auf Osteocalcin ( $p=0,045$ ), was Hinweis auf einen vermehrten Knochenumsatz bei hohen FSH-Werten gab. Vitamin D wurde zweimal zu den erklärenden Parametern gezählt und zeigte einen signifikant negativen Einfluss auf TRACP ( $p=0,009$ ). Dies entsprach den Erwartungen, wonach hohes Vitamin D mit niedrigen Knochenstoffwechselfparametern assoziiert zu sein scheint

(Kuchuk, van Schoor, Pluijm, Chines, & Lips, 2009). LH wurde einmalig in das Modell aufgenommen und zeigte auf Osteocalcin einen signifikant negativen Einfluss ( $p=0,008$ ).

**Tabelle 15: Modelle selektiert nach AIC. Fett dargestellt sind Parameter, die entsprechend  $p \leq 0,05$  Signifikanz aufwiesen, in Klammern das korrigierte Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für das jeweilige Modell**

T1	BAP	OC	CTX	TRACP
Parameter	<b>E2</b> , Milchkonsum, Vit D	<b>FSH, LH, E2</b> , <b>Milchkonsum</b> , Zigaretten/Tag	<b>E2</b> , Milchkonsum, Zigaretten/Tag	<b>E2</b> , FSH, Prog, <b>Vit D</b> , Milchkonsum, Kaffeekonsum, Familien anam. pos., Knochenbruch pos.
Bestimmtheitsmaß	$R^2 = 0,088$	$R^2 = 0,112$	$R^2 = 0,234$	$R^2 = 0,360$

Insgesamt fiel somit auf, dass am häufigsten ein Einfluss von Estradiol auf die Knochenstoffwechselfparameter nachgewiesen werden konnte, dieser jedoch entgegen der Erwartung positiv gerichtet war. FSH erschien als weitere potenziell positive Einflussgröße, ebenso wie der wöchentliche Milchkonsum (in Tagen/Woche), der einen negativen Einfluss auf die Parameter hatte.



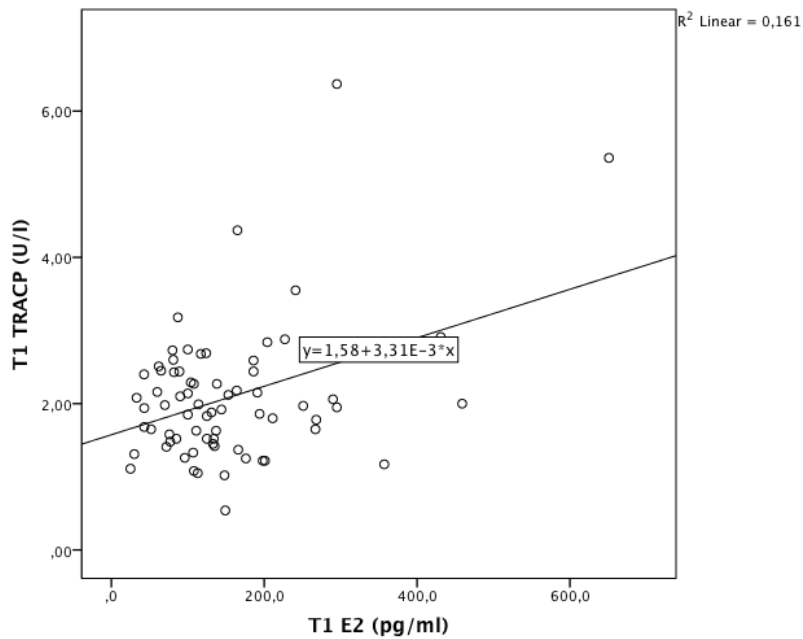
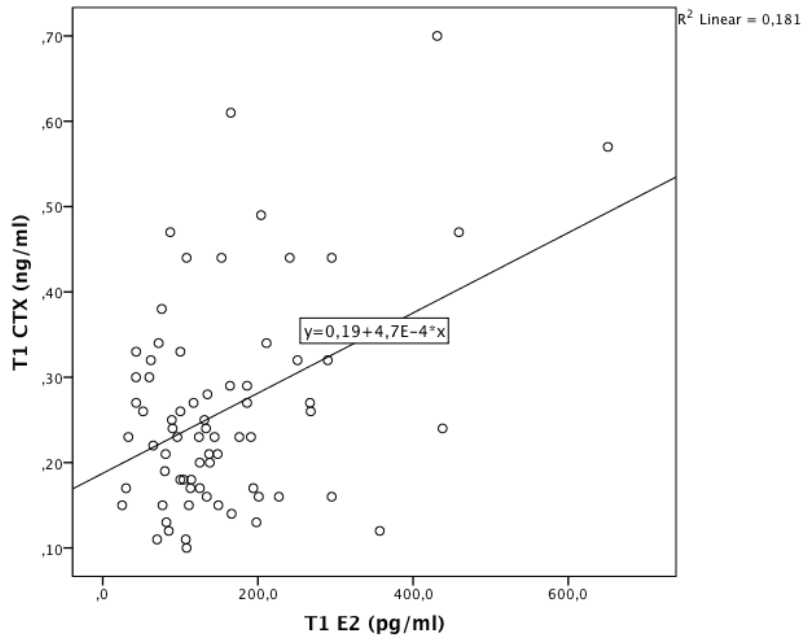


Abbildung 20: Streudiagramme zum Zusammenhang zwischen E2 und den Knochenstoffwechselfparametern zu T1. Es werden nur in der multiplen Regression festgestellte signifikante Zusammenhänge dargestellt

### 7.3 Korrelationen der Knochenstoffwechselfparameter untereinander

Tabelle 16: Korrelationen der Knochenstoffwechselfparameter untereinander zu T1-T4

Korrelationen																
	T1BAP	T1OC	T1CTX	T1TRACP	T2BAP	T2OC	T2CTX	T2TRACP	T3BAP	T3OC	T3CTX	T3TRACP	T4BAP	T4OC	T4CTX	T4TRACP
T1BAP	1	0,276	0,390	0,0350**	0,825	0,316**	0,289	0,329**	0,817	0,245	0,425	0,407**	0,786	0,218	0,170	0,275
		0,021	0,001	0,003	0,000	0,007	0,014	0,005	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,100	0,202	0,037
	71	70	71	71	71	71	71	71	70	69	71	71	58	58	58	58



T1OC	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,276 0,021 70	1 70 70	0,415 0,000 70	0,350** 0,003 70	0,273 0,022 70	0,856 0,000 70	0,373 0,001 70	0,248 0,038 70	0,219 0,071 69	0,620 0,000 68	0,572 0,000 70	0,357** 0,002 70	0,262 0,049 57	0,702 0,000 57	0,238 0,074 57	0,464** 0,000 57
T1CTX	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,390 0,001 71	0,415 0,000 70	1 0,000 71	0,620** 0,000 71	0,359 0,002 71	0,470 0,000 71	0,511 0,000 71	0,534** 0,000 71	0,322 0,007 70	0,302 0,012 69	0,639 0,000 71	0,558** 0,000 71	0,264 0,045 58	0,517 0,000 58	0,507 0,000 58	0,513** 0,000 58
T1TRACP	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,350 0,003 71	0,350 0,003 70	0,620 0,000 71	1 0,000 71	0,466 0,000 71	0,425 0,000 71	0,451 0,000 71	0,890** 0,000 71	0,295 0,013 70	0,444 0,000 69	0,565 0,000 71	0,904** 0,000 71	0,226 0,087 58	0,556 0,000 58	0,516 0,000 58	0,867** 0,000 58
T2BAP	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,825** 0,000 71	0,273 0,022 70	0,359** 0,002 71	0,466** 0,000 71	1 0,006 71	0,324** 0,006 71	0,323** 0,006 71	0,405** 0,000 71	0,845** 0,000 70	0,250 0,038 69	0,371** 0,001 71	0,524** 0,000 71	0,778** 0,000 58	0,321 0,014 58	0,257 0,051 58	0,436** 0,001 58
T2OC	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,316 0,007 71	0,856 0,000 70	0,470 0,000 71	0,425** 0,000 71	0,324 0,006 71	1 0,000 71	0,473 0,000 71	0,344** 0,003 71	0,296 0,013 70	0,688 0,000 69	0,577 0,000 71	0,393** 0,001 71	0,403 0,002 58	0,753 0,000 58	0,351 0,007 58	0,562** 0,000 58
T2CTX	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,289 0,014 71	0,373 0,001 70	0,511 0,000 71	0,451** 0,000 71	0,323 0,006 71	0,473 0,000 71	1 0,000 71	0,488** 0,000 71	0,228 0,058 70	0,278 0,021 69	0,617 0,000 71	0,508** 0,000 71	0,163 0,220 58	0,316 0,016 58	0,477 0,000 58	0,372** 0,004 58
T2TRACP	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,329 0,005 71	0,248 0,038 70	0,534 0,000 71	0,890** 0,000 71	0,405 0,000 71	0,344 0,003 71	0,488 0,000 71	1 0,000 71	0,234 0,051 70	0,286 0,017 69	0,518 0,000 71	0,873** 0,000 71	0,193 0,146 58	0,455 0,000 58	0,552 0,000 58	0,837** 0,000 58
T3BAP	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,817 0,000 70	0,219 0,071 69	0,322 0,007 70	0,295 0,013 70	0,845 0,000 70	0,296 0,013 70	0,228 0,058 70	0,234 0,051 70	1 0,000 70	0,225 0,063 69	0,318 0,007 70	0,389** 0,001 70	0,829 0,000 57	0,303 0,022 57	0,152 0,259 57	0,228 0,087 57
T3OC	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,245 0,042 69	0,620 0,000 68	0,302 0,012 69	0,444** 0,000 69	0,250 0,038 69	0,688 0,000 69	0,278 0,021 69	0,286 0,017 69	0,225 0,063 69	1 0,000 69	0,505 0,000 69	0,340** 0,004 69	0,230 0,087 56	0,694 0,000 56	0,298 0,026 56	0,486** 0,000 56
T3CTX	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,425 0,000 71	0,572 0,000 70	0,639 0,000 71	0,565** 0,000 71	0,371 0,001 71	0,577 0,000 71	0,617 0,000 71	0,518** 0,000 71	0,318 0,007 70	0,505 0,000 69	1 0,000 71	0,601** 0,000 71	0,308 0,019 58	0,557 0,000 58	0,555 0,000 58	0,542** 0,000 58
T3TRACP	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,407 0,000 71	0,357 0,002 70	0,558 0,000 71	0,904** 0,000 71	0,524 0,000 71	0,393 0,001 71	0,508 0,000 71	0,873** 0,000 71	0,389 0,001 70	0,340 0,004 69	0,601 0,000 71	1 0,000 71	0,306 0,020 58	0,478 0,000 58	0,504 0,000 58	0,823** 0,000 58
T4BAP	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,786 0,000 58	0,262 0,049 57	0,264 0,045 58	0,226 0,087 58	0,778 0,000 58	0,403 0,002 58	0,163 0,220 58	0,193 0,146 58	0,829 0,000 57	0,230 0,087 56	0,308 0,019 58	0,306 0,020 58	1 0,020 58	0,265 0,044 58	0,051 0,705 58	0,242 0,067 58
T4OC	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,218 0,100 58	0,702 0,000 57	0,517 0,000 58	0,556** 0,000 58	0,321 0,014 58	0,753 0,000 58	0,316 0,016 58	0,455** 0,000 58	0,303 0,022 57	0,694 0,000 56	0,557 0,000 58	0,478** 0,000 58	0,265 0,044 58	1 0,000 58	0,473 0,000 58	0,598** 0,000 58
T4CTX	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,170 0,202 58	0,238 0,074 57	0,507 0,000 58	0,516** 0,000 58	0,257 0,051 58	0,351 0,007 58	0,477 0,000 58	0,552** 0,000 58	0,152 0,259 57	0,298 0,026 56	0,555 0,000 58	0,504** 0,000 58	0,051 0,705 58	0,473 0,000 58	1 0,000 58	0,619** 0,000 58
T4TRACP	Pearson-Korrelation Sig. (2-seitig) N	0,275 0,037 58	0,464 0,000 57	0,513 0,000 58	0,867** 0,000 58	0,436 0,001 58	0,562 0,000 58	0,372 0,004 58	0,837** 0,000 58	0,228 0,087 57	0,486 0,000 56	0,542 0,000 58	0,823** 0,000 58	0,242 0,067 58	0,598 0,000 58	0,619 0,000 58	1 0,000 58

\*. Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

\*\* .Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

## 7.4 CTX-Auswertung mit ausschließlich Vormittagsfällen

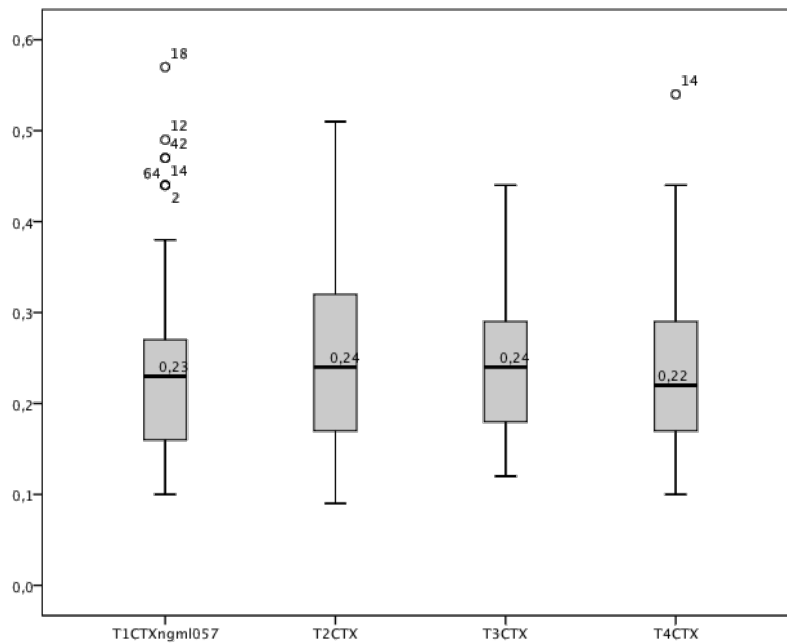


Abbildung 21: Verlauf von CTX, ausschließlich Vormittagsfälle

Tabelle 17: generalisiertes Modell mit ausschließlich vormittags abgenommenen Werten, Einfluss von FSH auf CTX

Schätzer des Effekts von FSH auf CTX					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
FSH	0,0032	0,0010	0,0013	0,0052	0,0010
Faktor Zeit	0,0008	0,0047	-0,0084	0,0100	0,8693

Schätzer des Effekts von FSH (und E2) auf CTX					
Parameter	Schätzwert	Standardfehler	95% Konfidenzgrenzen		p-Wert
FSH	0,0041	0,0011	0,0019	0,0063	0,0002
E2	-0,0000	0,0000	-0,0000	0,0000	0,0869
Faktor Zeit	0,0048	0,0060	-0,0069	0,0166	0,4212

## 8 Danksagung

Ich danke zunächst Frau Univ. Prof. Dr. M. B. Kiechle für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Seifert-Klauss, die mir Einblick in die Welt der Forschung und Wissenschaft verschaffte, die mich auf meinem Weg von der Themensuche bis zur Fertigstellung der Doktorarbeit zu jedem Zeitpunkt wissenschaftlich wie menschlich unermüdlich unterstützte und durch die ich mich, nicht zuletzt aufgrund ihrer herzlichen Art, jederzeit rundum gut betreut fühlte.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Probandinnen, für ihr Vertrauen, ihre Zeit und ihre nicht selbstverständliche Motivation, die Wissenschaft durch die Teilnahme an Studien zu unterstützen.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Berg und den Drs. Lesoine, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gegebenheiten, die diese Studie erst möglich machten. Danke auch an das gesamte Praxisteam, das mich oft mit Rat und Tat unterstützte.

Danke an die Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie unter Direktor Univ.-Prof. Dr. Jürgen Ruland, für die Auswertung verschiedenster Laborparameter. Besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Heike Schneider, die mir bei Fragen zur klinischen Chemie stets umfangreich und prompt zur Seite stand.

Danken möchte ich zudem dem Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE), Bernhard Ulm und besonders Rainer Probst, für ihre geduldige und konstruktive Beratung bei Fragen zur Datenauswertung und Statistik.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir meinen Weg durch das Studium und die Promotion ebneten und immer für mich da sind.