

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und  
Frauenkrankheiten der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss von oralen, steroidal-antikonzeptiva auf das  
Sekretionsverhalten ovarieller Inhibine und von Aktivin

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von  
Sven Märdian  
aus München

Mainz, 2005

**Inhaltsverzeichnis**

1.	Einleitung.....	3
1.1	Historie .....	3
1.2	Biochemie und Physiologie .....	4
1.2.1	Biochemie .....	4
1.2.2	Physiologie .....	9
2.	Ziel der Untersuchung.....	11
2.1	Wirkungsweise oraler Kontrazeptiva .....	11
2.2	Fragestellung .....	12
3.	Material und Methoden.....	13
3.1	Material .....	13
3.1.1	Inhibin A ELISA .....	13
3.1.2	Inhibin B ELISA .....	14
3.1.3	Inhibin Pro $\alpha$ -C ELISA .....	15
3.1.4	Aktivin A ELISA .....	15
3.1.5	Minifuge RF .....	16
3.1.6	Beckmann Access Immunoassay System .....	16
3.1.7	Denley Wellwash 4 .....	16
3.1.8	SLT Spectra .....	16
3.1.9	EASY .....	17
3.1.10	Patientenkollektiv .....	17
3.1.11	Probengewinnung .....	18
3.2	Methoden .....	19
3.2.1	ELISA-Kits zur Hormonkonzentrationsbestimmung ...	19
3.2.2	Grundprinzip des ELISA .....	19
3.2.3	Inhibin A-Messung .....	21
3.2.4	Inhibin B-Messung .....	24
3.2.5	Inhibin Pro $\alpha$ -C-Messung .....	27

3.2.6	Aktivin A-Messung .....	29
3.2.7	Messung der klinischen Standardparameter (hFSH, hLH, Progesteron, Estradiol, Testosteron, Prolaktin) ....	31
3.2.8	Statistische Methoden .....	32
4.	Ergebnisse.....	33
4.1	Vergleich beider Gruppen im Zyklusverlauf .....	33
4.1.1	Inhibin A .....	33
4.1.2	Inhibin B .....	36
4.1.3	Inhibin Pro $\alpha$ -C .....	39
4.1.4	Aktivin A .....	42
4.1.5	hFSH .....	44
4.2	Korrelationen der ovariellen Proteohormone zu hFSH ...	46
4.2.1	Inhibin A/hFSH in beiden Gruppen .....	46
4.2.2	Inhibin B/hFSH in beiden Gruppen .....	47
4.2.3	Pro $\alpha$ -C/hFSH in beiden Gruppen .....	48
4.2.4	Aktivin A/hFSH in beiden Gruppen .....	49
5.	Diskussion.....	50
5.1	Hormonelle Regulation des Menstruationszyklus .....	50
5.2	Wirkmechanismus oraler Kontrazeptiva (1-Phasen-Präparate) .....	52
5.3	Generelle Physiologie der Inhibine .....	54
5.4	Einfluss der Kontrazeptiva auf die Inhibine .....	55
5.5	Kritische Betrachtung dieser Studie .....	62
6.	Zusammenfassung.....	63
7.	Literaturverzeichnis.....	66

## 1. Einleitung

### 1.1 Historie

Die Historie der ovariellen Proteohormone beginnt im Jahre 1932. Von McCullagh *et al.* wurde in diesem Jahr zum ersten Mal postuliert, dass es einen nichtsteroidalen Einfluss testikulären Ursprungs auf die Hypophyse gibt, welcher Inhibin genannt wurde. In den späten 1960er Jahren wurde erstmalig ein RIA (**r**adio **i**mmuno **a**ssay) entwickelt, der speziell FSH messen konnte (Woodruff und Mather 1995). Damit hatte man ein Instrument gefunden, um Einflüsse ovarieller oder testikulärer Faktoren auf die Hypophyse zu messen. Nach und nach wurde dadurch die Definition von Inhibin zu einem nichtsteroidalen Einfluss gonadalen Ursprungs überarbeitet, der spezifisch die FSH-Konzentration im Serum senken konnte (Channing *et al.* 1985). Im Jahre 1985 wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, in denen Inhibine vom Rind und Schwein charakterisiert wurden (Burger 1992; deKretser und Robertson 1989; Franchimont *et al.* 1989; Vale *et al.* 1988; Ying 1987; Choh *et al.* 1985).

1986 wurde von Vale *et al.* ein Protein gefunden, welches in der Lage war, die Ausschüttung von FSH zu stimulieren. Sie fanden heraus, dass dieses Protein ein Homodimer von Inhibin  $\beta$ A war. Im selben Jahr fanden Ling *et al.* ein weiteres Protein mit FSH stimulierender Wirkung, welches ein Heterodimer von Inhibin  $\beta$ A und Inhibin  $\beta$ B war. Darüber hinaus konnten sie die Ergebnisse von Vale *et al.* bestätigen. Diese Proteine wurden

Aktivine genannt (Vale *et al.* 1988). 1989 wurde der so genannte Monash RIA veröffentlicht (Woodruff und Mather 1995; Burger 1992; McLachlan *et al.* 1987 b). Mitte der 90er Jahre wurden von Groome *et al.* verschiedene ELISA Kits zur Messung von Inhibinen entwickelt, welche zum ersten Mal in der Lage waren, spezifische Formen der Inhibine zu messen ohne Kreuzreaktivität zu anderen Formen zu haben (Groome *et al.* 1995; Groome und O'Brien 1993; Groome *et al.* 1994; Groome *et al.* 1996).

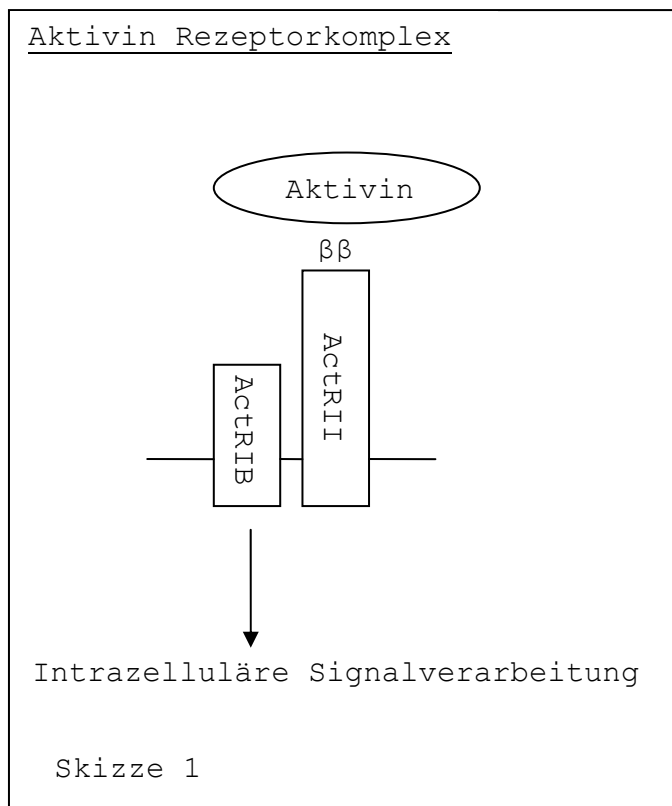
## **1.2 Biochemie und Physiologie**

### **1.2.1 Biochemie**

Der Beweis der Existenz eines Proteins, welches in der Lage war die Sekretion von FSH in der Hypophyse zu supprimieren, wurde 1982 erbracht (Ramasharma *et al.* 1982; Ramasharma *et al.* 1984; Yamashiro *et al.* 1984). Im Jahre 1984 gelang zum ersten Mal die chemische Charakterisierung von Inhibin (Ramasharma *et al.* 1984; Seidah *et al.* 1984). Die bioaktiven Moleküle der Inhibine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, die durch Disulfidbrücken entweder mit einer  $\beta$ A-Untereinheit (Inhibin A) oder einer  $\beta$ B-Untereinheit (Inhibin B) verbunden sind (Burger und Igarashi 1988). Auch bei den Aktivinen gibt es mehrere Formen. Aktivin A ist ein Homodimer von Inhibin  $\beta$ A, Aktivin AB ein Heterodimer aus den Untereinheiten Inhibin  $\beta$ A und Inhibin  $\beta$ B (Ling *et al.* 1986; Vale *et al.* 1986) und Aktivin B ein Homodimer von Inhibin  $\beta$ B (Vale *et al.* 1988). Die drei

Untereinheiten von Inhibin/Aktivin werden jeweils durch ein separates Gen codiert (Hillier 1991; Mason *et al.* 1985; Forage *et al.* 1986; Mason *et al.* 1986; Mayo *et al.* 1986; Esch *et al.* 1987). Durch die strukturellen Ähnlichkeiten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gehören die Inhibine und Aktivine zur Superfamilie der TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) (Vale *et al.* 1988). Aktivine und Inhibine sind Proteohormone, welche die Ausschüttung von hFSH und die follikuläre Funktion mit grundsätzlich gegensätzlicher Wirkung beeinflussen. Zum Beispiel stimuliert Aktivin die hFSH-Ausschüttung, während Inhibin diese unterdrückt (Vale *et al.* 1988); Inhibin dagegen stimuliert die Androgen-Produktion in Theca-Zellen, was wiederum von Aktivin inhibiert wird (Hsueh *et al.* 1987; Hillier 1991). Außerdem weiß man heute, dass sie noch viele verschiedene extragonadale Funktionen haben (Martens *et al.* 1997), wie zum Beispiel in der Differenzierung von Erythrozyten (Yu *et al.* 1987), der Induktion von Mesoderm (Smith *et al.* 1990; van den Eijnden-Van Raaji 1990), der Apoptose von Leberparenchym (Hully *et al.* 1994) und der Differenzierung und dem Wachstum verschiedener Zelltypen und -linien (Hedger *et al.* 1989; Gonzalez-Manchon und Vale 1989; Sakurai *et al.* 1994; Xu *et al.* 1995). Wie auch andere Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie (Martens *et al.* 1997), vermitteln die Aktivine ihre Wirkung durch Bindungen an einen Typ I- und einen Typ II-Rezeptor-Komplex (Welt 2002; Mathews 1994). Diese setzen sich jeweils aus einer extrazellulären,

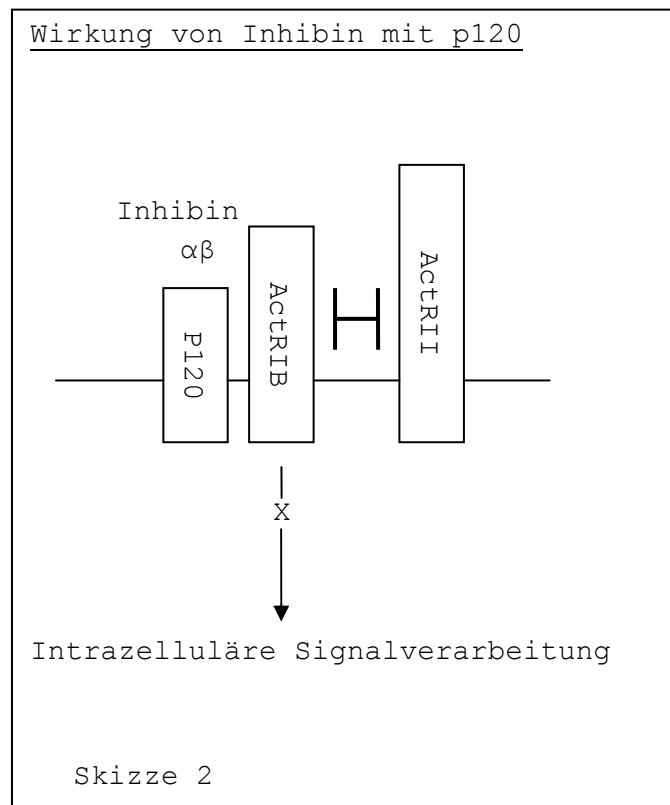
einer einzelnen transmembranösen und einer intrazellulären Serin-Threonin-Kinase-Bindungsdomäne zusammen (Martens *et al.* 1997; Lebrun und Vale 1997; Attisano *et al.* 1992; Mathews und Vale 1991; Ten Dijke *et al.* 1993). Bis jetzt wurden zwei Typ II-Rezeptoren, nämlich ActRII (Mathews und Vale 1991) und ActRIIB (Attisano *et al.* 1992; Mathews *et al.* 1992), sowie



zwei Typ I-Rezeptoren, nämlich ActRI oder ALK2 und ActRIB oder ALK4 (Attisano *et al.* 1992; Tsuchida *et al.* 1993; Carcamo *et al.* 1994), gefunden. Beide Subtypen des Typ II-Rezeptors (ActRII und ActRIIB) haben eine hohe Affinität zu Aktivin (Attisano *et al.* 1992; Mathews und Vale 1991; Mathews *et al.* 1992; Tsuchida *et al.* 1993; Mathews 1994). Der Typ I-

Rezeptor kann nicht an Aktivin binden, wenn er alleine exprimiert wird (Ebner *et al.* 1993) und benötigt die Coexpression des Typ II-Rezeptors, um den Liganden zu binden (Attisano *et al.* 1993; Ebner *et al.* 1993; Tsuchida *et al.* 1993). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass der Typ I-Rezeptor für die Signalweitergabe benötigt wird (Carcamo *et al.* 1994). Aus diesen Gründen stellte man die Hypothese auf, dass die funktionelle Form des Aktivin-Rezeptors einen heterodimeren

Komplex aus den beiden Typen von Aktivin-Rezeptoren darstellt (Carcamo *et al.* 1994; Lebrun und Vale 1996). In verschiedenen Studien konnte verifiziert werden, dass die beiden Rezeptortypen zusammen mit Aktivin einen stabilen Komplex bilden können (Attisano *et al.* 1992; Matthews und Vale 1993; Ten Dijke *et al.* 1994) (s. auch Skizze 1). Wenn nun Aktivin an den Typ II-Rezeptor bindet, so wird der Typ I-Rezeptor durch den Typ II-Rezeptor phosphoryliert (Mathews 1994; Attisano *et al.* 1996; Willis *et al.* 1996) und gibt das Signal durch verschiedene SMAD-Proteine an den Nukleus der Zelle weiter (Heldin *et al.* 1997).



Inhibin antagonisiert die Wirkung von Aktivin direkt am Rezeptor durch verschiedene Mechanismen. Zum einen bindet es kompetitiv zu Aktivin an den Typ II-Rezeptor (Lebrun und Vale 1997; Martens *et al.* 1997; Xu *et al.* 1995). Zum anderen wurden in verschiedenen Studien spezifische Inhibin-Rezeptoren nachgewiesen (Hertan *et*

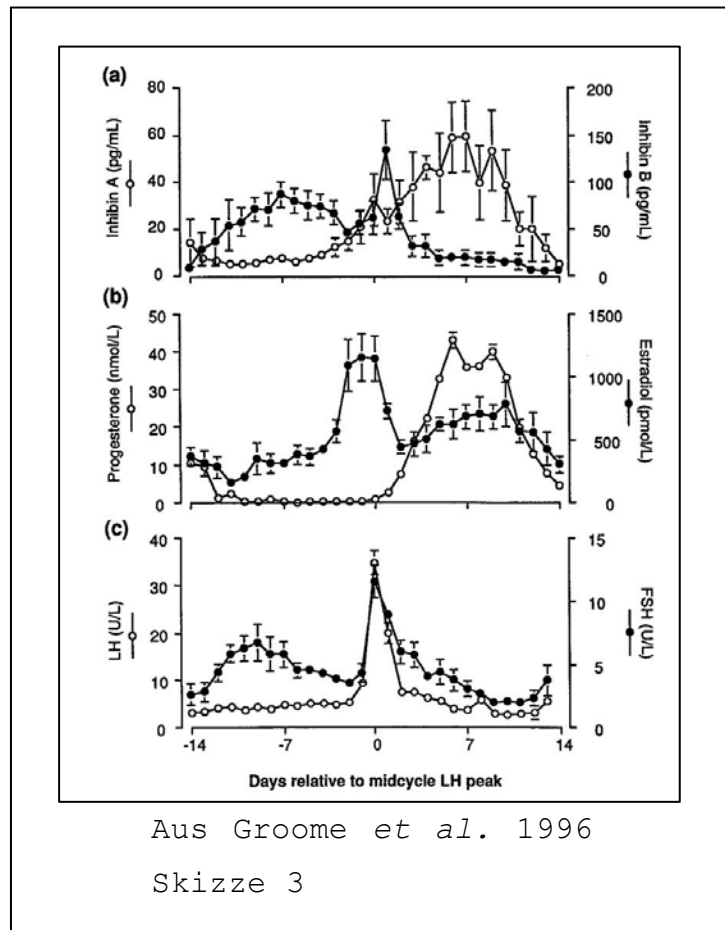
*al.* 1999; Draper *et al.* 1998). Das inhibinbindende Protein p120 (InhBP - **inhibin binding protein**) konnte aus hypophysären Zellen vom Rind extrahiert werden (Chong *et al.* 2000). Dieses membrangebundene Proteoglykan geht eine Bindung mit dem Typ I-



Rezeptor ein, was wiederum verhindert, dass sich der Typ II-Rezeptor anlagern kann (s. auch Skizze 2) (Chapman und Woodruff 2001). Dadurch kann der heterodimere Komplex aus den beiden Aktivin-Rezeptoren nicht ausgebildet werden, was wiederum eine Signalweitergabe nach intrazellulär verhindert (Welt 2002). Das zweite Protein, welches in der Lage ist Inhibin zu binden und damit den Aktivin-Rezeptor-Komplex zu beeinflussen, ist das  $\beta$ -Glykan des Typ III-TGF- $\beta$ -Rezeptor (Lewis *et al.* 2000). Inhibin bindet mit einer hohen Affinität an das  $\beta$ -Glykan, welches somit einen zweiten Inhibin Rezeptor darstellt. Das an Inhibin gekoppelte  $\beta$ -Glykan ist dann in der Lage, an den Typ II-Aktivin-Rezeptor zu binden und einen Dreierkomplex auszubilden. Durch diese Bindung wird die Anlagerung des Typ II-Rezeptors an den Typ I-Rezeptor verhindert. Somit kann keine weitere Signaltransduktion stattfinden (Welt 2002).

1.2.2 Physiologie

Die Inhibine (sowohl A als auch B) haben - wie bereits erwähnt



- die Fähigkeit, die Konzentration von hFSH zu unterdrücken (Vale *et al.* 1988; Knight 1996a; Welt 2002). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Verabreichen von FSH-haltigen Präparaten einen Anstieg der Inhibin-Konzentration nach sich zog (McLachlan *et al.* 1986; McLachlan *et al.* 1987a; Muttukrishna *et al.* 1994). Anhand dieser Daten wurde die Theorie einer reziproken

Beziehung zwischen der Inhibin-Sekretion des Ovars und der hFSH-Sekretion der Hypophyse etabliert (Knight 1996a). Durch die fehlerhaften Assay Kits der ersten und zweiten Generation (s. auch Kapitel 1) waren die Ergebnisse von Zyklusuntersuchungen, in deren Rahmen jene Kits verwendet wurden, nur eingeschränkt beurteilbar. Bis dahin war bekannt, dass zum einen die Konzentration von Inhibin A während der frühen Follikelphase niedrig und in der Mitte der lutealen

Phase maximal war, zum anderen die von Inhibin B während der frühen Follikelphase maximal und während der lutealen Phase niedrig war (Knight 1996). Erst in den Jahren zwischen 1994 bis 1996 wurden von Groome *et al.* Assay Kits entwickelt, die keine Kreuzreaktivität aufwiesen (Groome *et al.* 1994; Groome *et al.* 1996). Es wurde gezeigt, dass die Inhibin A-Konzentrationen zu Beginn des Zyklus zunächst niedrig blieben und erst in der späten follikulären Phase anstiegen, um dann einen Peak zu erreichen, der zeitgleich zum typischen LH-Peak in der Zyklusmitte auftrat. Ein zweiter Peak zeigte sich in der Mitte der lutealen Phase. Danach fielen die Inhibin A-Konzentrationen synchron mit der Progesteron-Konzentration während der lutealen Phase ab (Groome *et al.* 1994). Die Inhibin B-Konzentration verhielt sich dazu gegensätzlich: sie war zu Beginn des Zyklus (in der frühen follikulären Phase) hoch und fiel während der späten follikulären Phase in den Tagen vor der Ovulation ab. Es gab einen erneuten kurzen Peak zwei Tage nach der Ovulation, bevor die Inhibin B-Konzentration zur Mitte der lutealen Phase erneut fiel und auf niedrigem Niveau blieb (Groome *et al.* 1996) (s. hierzu auch Skizze 3).

## **2. Ziel der Untersuchung**

### **2.1 Wirkungsweise oraler Kontrazeptiva**

1951 meldete Carl Djerassi als Erster ein steroidales Kontrazeptivum zum Patent an. Bis heute haben sich die so genannten „Pillen“ nicht grundlegend verändert. Es handelt sich ganz überwiegend um eine Kombination aus Ethinylestradiol und einem Gestagen. Mit der Zeit konnten die Konzentrationen der Einzelbestandteile immer weiter gesenkt werden, so dass gegenwärtig eine Konzentration von unter 30 µg Ethinylestradiol ausreichende kontrazeptive Wirkung hat (Baird und Glasier 1993).

Östrogene und Gestagene werden ebenfalls vom Körper synthetisiert und stellen essentielle Steuerhormone im Menstruationszyklus dar. Dabei kommt es in erster Linie auf deren Konzentrationen und den Zeitpunkt des Auftretens innerhalb des Zyklus an. Geringe Mengen an Östrogen zu Beginn des Zyklus sorgen für die Heranreifung eines Follikels. Gegen Mitte des Zyklus steigt die Östrogenkonzentration an, so dass es zu einem Anstieg von LH und FSH kommt. Dadurch wird die Ovulation ausgelöst. Nach der Ovulation produziert das Corpus luteum Progesteron, welches das Endometrium auf die Nidation vorbereitet. Kommt es nicht zur Befruchtung der Eizelle und damit nicht zur Nidation, so fällt die Progesteronproduktion 14 Tage nach der Ovulation ab und es folgt die Menstruationsblutung (Wuttke 2000).

Findet eine Befruchtung mit nachfolgender Nidation statt, so bleiben die Östrogen- und Gestagen-Konzentrationen erhöht. Die oralen Kontrazeptiva machen sich diese natürlichen Verhältnisse zu Nutze. Sie täuschen dem Körper durch erhöhte Östrogen- und Gestagenkonzentrationen eine Schwangerschaft vor. Unter erhöhten Östrogenkonzentrationen wird die Heranreifung eines Follikels verhindert. Die erhöhte Gestagenkonzentration bewirkt zum einen, dass der Cervixschleim visköser wird und damit für Spermien undurchlässig. Zum anderen sorgt das Gestagen dafür, dass die Endometriumschleimhaut aufgebaut wird und erhalten bleibt. Die normale Einnahmedauer für die Pille beträgt 21 Tage mit nachfolgender siebentägiger Pause. Während dieser Pause kommt es zu einer Abbruchblutung, da der für die Aufrechterhaltung der Endometriumschleimhaut notwendige Gestagenspiegel abfällt.

## **2.2 Fragestellung**

Das Ziel dieser Untersuchung ist, die Rhythmik der ovariellen Proteohormone zu beschreiben und die Einflüsse hormoneller Kontrazeptiva darzustellen. Insbesondere sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es einen nachweisbaren Einfluss oraler Kontrazeption auf die Ausschüttung der ovariellen Proteohormone Inhibin A, Inhibin B, Inhibin Pro  $\alpha$ -C und Aktivin A?

- Wie ändern sich die Sekretionsmuster der untersuchten Proteohormone unter oraler Kontrazeption?
- Wenn es einen Einfluss der oralen Kontrazeptiva gibt, wird dann nur die Ausschüttung der Hormone verhindert oder wird ebenfalls die Produktion der Inhibine/Aktivine gehemmt?
- Lässt sich eine statistisch auffällige Korrelation zwischen den ovariellen Proteohormonen Inhibin A, Inhibin B, Inhibin Pro  $\alpha$ -C und Aktivin A nachweisen?

### **3. Material und Methoden**

Bei dieser Studie handelt es sich um eine experimentelle Untersuchung, die an Blutproben von freiwilligen Probandinnen durchgeführt wurde.

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Inhibin A ELISA**

Inhibin A Dimer Assay Kit (Ultra Sensitive) Product Code: MCA 950KZZ der Firma Oxford BIO-INNOVATION LTD., vertrieben durch BIOMAR Diagnostic Systems GmbH, 35043 Marburg.

- Mikrotiterplatte Inhibin A
- 6 % Natrium-Dodecylsulphat (SDS)

- Inhibin A-Standard (2000 pg/ml)
- Fötale Kälberserum
- Verdünnungslösung (Assay Diluent 020)
- Inhibin A-Detektionsantikörper
- Waschpuffer
- Substrat
- Verstärker (Amplifier)
- Stop Lösung

### **3.1.2 Inhibin B ELISA**

Inhibin B Assay Kit Product Code: MCA1312KZZ der Firma OXFORD BIO-INNOVATION LTD., vertrieben durch BIOMAR Diagnostic Systems GmbH, 35043 Marburg.

- Mikrotiterplatte Inhibin B
- 6 % Natrium-Dodecylsulphat (SDS)
- Inhibin B-Standard (2000 pg/ml)
- Fötale Kälberserum
- Verdünnungslösung (Assay Diluent 010)
- Inhibin B-Detektionsantikörper
- Waschpuffer
- Substrat
- Verstärker (Amplifier)
- Stop Lösung

### **3.1.3 Inhibin Pro $\alpha$ -C ELISA**

Inhibin Pro  $\alpha$ -C Assay Kit (Ultra Sensitive) Product Code: MCA 1254KZZ der Firma OXFORD BIO-INNOVATION LTD., vertrieben durch BIOMAR Diagnostic Systems GmbH, 35043 Marburg.

- Mikrotiterplatte Pro  $\alpha$ -C
- Pro  $\alpha$ -C-Standard (2000 pg/ml)
- Verdünnungslösung (Assay Diluent 020)
- Pro  $\alpha$ -C-Detektionsantikörper
- Waschpuffer
- Substrat
- Verstärker (Amplifier)
- Stop Lösung

### **3.1.4 Aktivin A ELISA**

Aktivin A Assay Kit Product Code: MCA 1426KZZ der Firma OXFORD BIO-INNOVATION LTD., vertrieben durch BIOMAR Diagnostic Systems GmbH, 35043 Marburg.

- Mikrotiterplatte Aktivin A
- 6 % Natrium-Dodecylsulphat (SDS)
- Serumalbuminlösung vom Rind
- Aktivin A-Standard (50 ng/ml)
- Verdünnungslösung (Assay Diluent 010)
- Aktivin Detektionsreagenz 1



- Aktivin Detektionsreagenz 2
- Waschpuffer 25fach konzentriert
- Substrat
- Verstärker (Amplifier)
- Stop Lösung

### **3.1.5 Minifuge RF**

Minifuge RF Zentrifuge der Firma Kendro Laboratory Products GmbH, Robert-Bosch-Strasse 1, 63505 Langenselbold.

### **3.1.6 Beckmann Access Immunoassay System**

Beckmann Access Immunoassay System der Firma Beckmann Coulter GmbH - Diagnostics, Europark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld.

### **3.1.7 Denley Wellwash 4**

Denley Wellwash 4 der Firma Denley Instruments Limited, Natts Lane, Billinghamurst, West Sussex, RH14 9EY, England.

### **3.1.8 SLT Spectra**

SLT Spectra der Firma Tecan Deutschland GmbH, Theodor Storm Strasse 17, 74564 Crailsheim.

### **3.1.9 EASY**

EASY Software zum Auswerten der photometrischen Daten der ELSIA Kits.

### **3.1.10 Patientenkollektiv**

In die Studie wurden insgesamt  $n = 18$  Probandinnen für die Zyklusuntersuchungen aufgenommen. Die teilnehmenden Frauen befanden sich alle in der reproduktiven Phase ihres Lebens. Es wurden keine Frauen in der Menopause oder vor der ersten Menses in die Studie aufgenommen. Von allen Probandinnen wurden innerhalb eines Menstruationszyklus jeweils 8 Vollblutproben entnommen. Alle teilnehmenden Frauen waren zum Zeitpunkt der Studie gesund und befanden sich nicht in ärztlicher Behandlung. Außer der oralen Kontrazeption nahmen die Frauen keine Hormonpräparate oder andere, den Menstruationszyklus beeinflussenden, Medikamente ein. Von diesen in die Studie aufgenommenen Frauen nahmen 9 regelmäßig ein orales Kontrazeptivum ein, wodurch sie einen regelmäßigen Zyklus mit einer Länge von 28 Tagen hatten. Die anderen 9 Frauen hatten einen regelmäßigen Zyklus zwischen 24 und 40 Tagen Dauer. Die Probandinnen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt (ohne Kontrazeption → Gruppe 1; mit Kontrazeption → Gruppe 2). Gegenstand der Untersuchung waren Vollblutproben, die nach einem im Studiendesign festgelegten Zeitplan entnommen wurden. Es wurden ausschließlich nicht schwangere Probandinnen gewählt. Um eventuelle Erkrankungen der inneren

Geschlechtsorgane oder andere Erkrankungen zu erkennen, die zum Ausschluss aus der Studie geführt hätten, wurde eine ausführliche Anamnese erhoben. Außerdem wurden mithilfe der gewonnenen Proben jeweils auch die klinischen Standardparameter hLH, hFSH, Progesteron, Testosteron, Prolaktin und Estradiol bestimmt, um die anamnestisch erhobenen Daten zu erhärten und eventuelle Abweichungen der ovariellen Proteohormone zu erklären.

Die Frauen wurden vor der Teilnahme über den Zweck und Verlauf dieser Studie sowie die Risiken einer Venenpunktion aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung jeder teilnehmenden Frau liegt vor.

### **3.1.11 Probengewinnung**

Für die Experimente wurden von den Probandinnen Vollblutproben, mittels Punktion einer peripheren Vene (zumeist V. mediana cubiti) nach klinischem Standard, entnommen. Die Blutentnahmen fanden nach einem im Studiendesign festgelegten Schema an den Tagen 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 28 des Menstruationszyklus statt, wobei der erste Tag der Regelblutung als Tag 1 definiert wurde. Es wurde darauf geachtet, die Proben der verschiedenen Tage jeweils zur gleichen Uhrzeit zu entnehmen, um das Ergebnis durch eventuelle Tagesschwankungen nicht zu verfälschen.

Alle gewonnenen Vollblutproben wurden bei 8000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und das Serum im Überstand abpipettiert.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Bei einer Probandin wurden Proben an jedem Zyklustag entnommen.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 ELISA-Kits zur Hormonkonzentrationsbestimmung**

Für diese Arbeit kamen ELISA-Kits der Firma OXFORD BIO-INNOVATION LTD. zum Einsatz. Die hier verwendeten Inhibin Pro  $\alpha$ -C Kits wurden von Groome *et al.* 1995, die Inhibin A Kits von Groome *et al.* 1994, die Inhibin B Kits von Groome *et al.* 1996 und die Aktivin A Kits von Knight *et al.* 1996b entwickelt. Die Aktivin A Kits wurden von Muttukrishna *et al.* 1996 erfolgreich eingesetzt. Die Leistung der Inhibin A Kits konnte in unabhängigen Studien (Lambert-Messerlian *et al.* 1994, Muttukrishna *et al.* 1994) bestätigt werden. Die Kits beruhen alle auf dem gleichen Prinzip, welches nachfolgend vorgestellt wird.

### **3.2.2 Grundprinzip des ELISA**

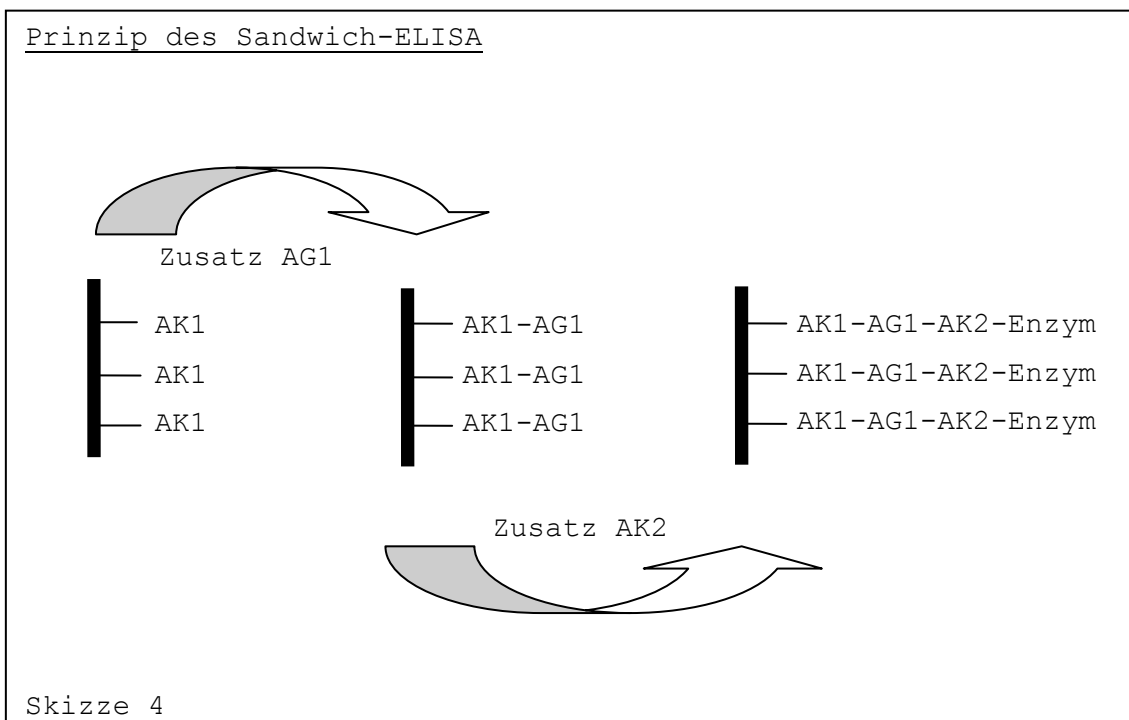
ELISA - **e**nzyme **l**inked **i**mmunosorbent **a**ssay - ist ein Verfahren, welches 1971 von van Weemen und Schuurs entwickelt wurde. Es ermöglicht den Nachweis eines Antigens oder Antikörpers und

damit die Bestimmung der Konzentration eines gesuchten Stoffes in einer Flüssigkeit.

Das ELISA-Verfahren gehört zu den Immunosorbenttests und beruht auf dem im Folgenden erläuterten Prinzip:

Der ELISA basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Beim hier verwendeten sog. Sandwich-ELISA wird ein Antigen nachgewiesen. Auf einem Festkörper (hier: Mikrotiterplatte) sind Antikörper (AK1, s. Skizze 4) gegen ein Epitop eines Antigens (AG1, s. Skizze 4) fest gebunden. Bringt man nun die Testflüssigkeit mit dem zu bestimmenden Stoff in diese Platte, so bilden sich zwischen den gebundenen AK1 und dem gesuchten AG1 Bindungen in Form von Immunkomplexen aus. Dadurch wird das AG1 an die Platte gebunden. Durch wiederholte Waschungen wird das überschüssige Antigen entfernt. Man gibt nun einen zweiten Antikörper (AK2, s. Skizze 4) hinzu, welcher zusätzlich an ein Enzym gekoppelt ist. Dieser zweite Antikörper (Detektionsantikörper) besitzt eine Bindungsstelle für ein anderes Epitop des gesuchten Antigens. Er kann deshalb an die bereits vorhandenen Immunkomplexe (AK1-AG1) binden. Daher wird dieses Verfahren auch als „Sandwich-ELISA“ bezeichnet. Mit Hilfe des an den Detektionsantikörper gebundenen Enzyms kann man nun eine Indikatorreaktion in Gang setzen. Meistens wird dafür ein Substrat verwendet, welches in einen Farbstoff umgewandelt wird. Die Enzymaktivität, und damit die Intensität des gebildeten Farbstoffes, sind dabei abhängig von der Menge der Sandwich-Komplexe. Diese Intensität wird quantitativ photometrisch gemessen. Anhand einer Standardkurve, die durch Messung von Standards bekannter Konzentrationen aufgestellt

wird (Eichkurve), können unbekannte Konzentrationen abgelesen werden. In den hier verwendeten Kits kommt als Enzym eine alkalische Phosphatase zum Einsatz, die ihr Substrat in einen Farbstoff umsetzt. Dabei ist die Intensität des Farbstoffes direkt proportional zur Konzentration des gesuchten Hormons. Die Intensität des Farbstoffes wird daraufhin bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch gemessen.



### 3.2.3 Inhibin A-Messung

Die Bestimmung des Inhibin A erfolgte mit dem im Abschnitt 3.1.1 genannten ELISA-Kit. Der Versuch nahm zwei Tage in Anspruch. Zunächst wurde das fötale Kälberserum vorbereitet,

indem zu der mitgelieferten Trockenform 5 ml destilliertes Wasser gegeben und die Lösung 10 Minuten lang geschüttelt wurde. Als nächstes mussten die Standards durch Zugabe von 1,3 ml des mitgelieferten fötalen Kälberserums vorbereitet werden. Damit erreichte der Standard eine Konzentration von 2000 pg/ml. Als dritten vorbereitenden Schritt wurde der Waschpuffer, welcher in 25 fach konzentrierter Form vorlag, verdünnt, um eine einfache Konzentration zu erreichen.

Mit dem vorbereiteten Standard wurde nun eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem zunächst 0,25 ml des Standards mit 0,75 ml fötalem Kälberserum vermischt wurden. Diese Lösung (S1) hatte dann eine Konzentration von 500 pg/ml. Nun wurden in sieben Reagenzgläschen je 0,3 ml des Kälberserums pipettiert. Von S1 wurden daraufhin 0,3 ml in das erste dieser Röhrchen pipettiert (S2). Von S2 wurden anschließend 0,3 ml in das nächste Röhrchen pipettiert (S3). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis alle sieben Reagenzgläschen gefüllt waren. So ergab sich eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml und 3,9 pg/ml.

Daraufhin wurden je 100 µl der Seren, der Standards und des Kälberserums (als Nullprobe) in 1,5 ml fassende Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. In jedes dieser Röhrchen wurden 50 µl 6 %-iges SDS gegeben und gemischt.

Anschließend wurden alle Reagenzgläschen für 3 Minuten in ein 100 °C warmes Wasserbad gestellt.

Nachdem die Proben wieder abgekühlt waren, wurden noch 100 µl Assay Diluent hinzugegeben und gemischt.

Danach wurden zu jedem Röhrchen 50 µl 6 %-ige Wasserstoffperoxydlösung (welche zuvor frisch vorbereitet wurde) gegeben. Die Proben wurden nun 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Vorbehandlung der Proben diente dazu, Methionin-Reste im Epitop durch Oxidation zu verändern; dadurch wurde dessen Affinität für den Capture-Antikörper verbessert.

Nach der Inkubationszeit wurden 80 µl jeder Probe (auch die Standards und das fötale Kälberserum) in doppelter Ausführung in die Kammern einer Mikrotiterplatte pipettiert.

Danach wurde die Platte abgedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Detektionsantikörper in Lösung gebracht, indem zum Pulver 1 ml Verdünnungslösung gegeben wurde. Nachdem das Pulver sich gelöst hatte, wurden erneut 5 ml Assay Diluent hinzugegeben.

Die Mikrotiterplatte wurde nun gewaschen (maschinell mit dem Denley Wellwash 4); dazu wurden die einzelnen Kammern vollständig mit Waschpuffer gefüllt und dieser dann wieder abgesaugt. Diese Waschprozedur wurde insgesamt viermal durchgeführt. Danach wurden 50 µl des Detektionsantikörpers in jede Kammer pipettiert. Daraufhin wurde die abgedeckte Platte eine Stunde inkubiert.

Anschließend wurde die Platte erneut - wie oben beschrieben - achtmal gewaschen, wobei beim letzten Durchgang der Puffer für 15 Minuten in den Kammern verblieb. In dieser Zeit wurde das Substrat vorbereitet, welches ebenfalls in Pulverform vorlag. Es wurde mit einer speziell vorgegebenen Lösung vermischt. Der Puffer wurde dann aus den Kammern abgesaugt und die Platte



weitere dreimal gewaschen. Danach wurden 50 µl Substrat in die Kammern pipettiert. Die Platte wurde anschließend erneut abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde der Amplifier vorbereitet. Dazu wurden Amplifier-Pulver und Amplifier-Diluent gemischt.

Nach der Inkubationszeit wurden dann 50 µl des Amplifiers in die Vertiefungen pipettiert.

Der Farbumschlag erfolgte recht schnell, so dass direkt mit den Messungen bei 490 nm im Photometer (SLT Spectra) begonnen werden konnte. Die endgültige Messung erfolgte, als der Standard mit der Konzentration von 500 pg/ml eine Absorption von 2,0 erreicht hatte.

#### **3.2.4 Inhibin B-Messung**

Die Bestimmung des Inhibin B erfolgte mit dem in Abschnitt 3.1.2 genannten ELISA-Kit. Der Versuch nahm zwei Tage pro Mikrotiterplatte in Anspruch. Im ersten Schritt wurden die Reagenzien, die für den ersten Versuchstag benötigt wurden, vorbereitet. Dazu wurde das fetale Kälberserum mit 5 ml Aqua dest. gelöst und 10 Minuten vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der Inhibin B-Standard mit 1,1 ml des fetalen Kälberserums gelöst, um eine Konzentration von 2000 pg/ml zu erreichen. Als dritten vorbereitenden Schritt wurde der Waschpuffer, der in 25fach konzentrierter Form vorlag bis auf eine einfache Konzentration mit Aqua dest. verdünnt. Danach wurde der Assay-Standard hergestellt, indem zunächst 0,3 ml des fetalen Kälberserums in sieben Mikrozentrifugenröhrchen

(1,5 ml) gegeben wurden. Anschließend wurden 0,3 ml des Standards mit der Konzentration von 2000 pg/ml in das erste Röhrchen pipettiert. Nach gründlichem Mischen wurden daraus wiederum 0,3 ml in das nächste Röhrchen gegeben. Mit allen anderen Röhrchen wurde entsprechend verfahren. Daraus ergab sich eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,6 pg/ml.

Nun wurden je 100 µl der Standards und der Probandenserum in beschriftete Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Außerdem wurden noch zwei weitere Röhrchen als „Null“-Probe mit je 100 µl fetalem Kälberserum gefüllt. Danach wurden je 50 µl des SDS 060 in jedes Röhrchen pipettiert.

Anschließend wurden die Röhrchen verschlossen und für drei Minuten in ein 100 °C warmes Wasserbad gestellt.

Nach dem Abkühlen wurden in einem weiteren Schritt 100 µl des Assay-Diluent in jedes Röhrchen gegeben.

Danach wurden 50 µl einer frisch vorbereiteten 6 %-igen Wasserstoffperoxydlösung in alle Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden 30 Minuten lang inkubiert.

Durch diese Behandlung werden Methionin-Reste im Epitop für den Capture-Antikörpers oxidativ modifiziert, so dass eine Affinitätssteigerung erreicht wird.

Nun wurden je 80 µl der hergestellten Lösung als Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde dann gut verschlossen und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zunächst wiederum die Reagenzien des Tages vorbereitet. Dazu wurde zum Inhibin B-

Detektionsantikörper 1 ml Assay-Diluent gegeben. Nach gründlichem Mischen wurden weitere 5 ml hinzugefügt.

Danach wurde die Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer maschinell insgesamt viermal gewaschen.

Anschließend wurden 50 µl des Antikörpers in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde dann gut verschlossen und für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde die Platte wiederum achtmal gewaschen, wobei beim letzten Durchgang der Puffer für 15 Minuten in den Vertiefungen verblieb. In der Zwischenzeit wurde das Substrat vorbereitet, indem die Pulverform mit Substrat-Diluent gelöst wurde.

Nach Ablauf der 15 Minuten wurde der Waschpuffer verworfen und die Platte erneut dreimal gewaschen.

Anschließend wurden 50 µl des Substrates in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde wieder verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Am Ende dieser Inkubationszeit wurde der Amplifier vorbereitet, indem das Pulver wiederum mit dem Amplifier-Diluent gelöst wurde. Nach der Inkubationszeit wurden dann 50 µl des Amplifiers in die Vertiefungen pipettiert. Der Farbumschlag erfolgte recht schnell, so dass die Messungen direkt beginnen konnten. Die Messungen wurden mit einem Photometer (SLT Spectra) bei 490 nm Wellenlänge durchgeführt. Die endgültige Messung erfolgte, als der Standard mit der Konzentration von 1000 pg/ml eine Absorption von 2,0 erreicht hatte.

### 3.2.5 Inhibin Pro $\alpha$ -C-Messung

Die Bestimmung des Inhibin Pro  $\alpha$ -C wurde mit dem in Abschnitt 3.1.3 genannten ELISA-Kit vorgenommen. Diese Bestimmung erfolgte über einen Zeitraum von zwei Tagen. Zunächst wurden die Reagenzien, die für den ersten Tag benötigt wurden und in Trockenpulverform vorlagen, mit Verdünnungslösung aufgelöst. Die Patientenseren wurden vorher aufgetaut und auf Zimmertemperatur (18 - 26 °C) erwärmt. Im ersten Schritt wurde die Standardreihe hergestellt, indem der vorgegebene Standard mit einer Konzentration von 200 pg/ml mit Hilfe einer Verdünnungsreihe zu folgenden Konzentrationen verdünnt wurde: 100 pg/ml, 50 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,12 pg/ml, 1,56 pg/ml. Diese Standards wurden für die Festlegung einer Standardkurve benötigt. Die Patientenseren wurden im nächsten Schritt im Verhältnis 1:5 mit Assay Diluent verdünnt. Daraufhin erfolgte die Bestückung der Mikrotiterplatte mit den vorbereiteten Patientenseren und den Standards mit jeweils 50  $\mu$ l pro Vertiefung in doppelter Ausführung. Zwei Vertiefungen wurden als Farbstoffleerprobe (blank) nicht befüllt und in zwei weitere wurde der Assaypuffer pipettiert, der im weiteren Procedere wie eine normale Probe behandelt wurde. Die Platte wurde dann luftdicht abgeschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am zweiten Versuchstag wurden zunächst die Detektionsantikörper vorbereitet, indem zu der im Kit vorhandenen Pulverform 1 ml Verdünnungslösung zugegeben wurde. Anschließend wurde die Lösung mit weiteren 5 ml Verdünnungslösung verdünnt.

Die Mikrotiterplatte wurde nun gewaschen, indem die Kammern der Platte vollständig mit Waschpuffer gefüllt und anschließend der Puffer wieder abgesaugt wurde. Dieser Zyklus wurde nun insgesamt viermal wiederholt. Das Waschen erfolgte maschinell mit dem Denley Wellwash 4. Nach dem letzten Waschvorgang wurde in die Kammern je 50 µl des vorbereiteten Antikörpers pipettiert. Danach wurde die Platte erneut dicht abgeschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die Platte achtmal gewaschen, wobei beim letzten Zyklus der Puffer nicht direkt abgesaugt wurde, sondern für 15 Minuten in den Kammern verblieb. In dieser Zeit wurde das Substrat vorbereitet, welches ebenfalls in Pulverform vorlag. Dieses Pulver wurde mit dem Substratdiluent vermischt und in Lösung gebracht.

Nach den 15 Minuten wurde der Waschpuffer abgesaugt und die Platte ein weiteres Mal mit drei Zyklen gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurde mittel Löschpapier dafür gesorgt, dass sich kein Puffer mehr in den Kammern oder auf der Platte befand.

Es wurden nun 50 µl des Substrates in die Kammern pipettiert. Die Platte wurde verschlossen und für zwei Stunden inkubiert. Währenddessen wurde die Verstärkerlösung vorbereitet. Auch diese lag in Pulverform vor und wurde mit einer im Kit vorhandenen Lösung vermischt.

Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurden nun 50 µl der Verstärkerlösung in die Kammern pipettiert.

Der Farbumschlag erfolgte recht schnell, so dass direkt mit den Messungen begonnen werden konnte. Dazu wurde die Platte in ein Photometer (SLT Spectra) gestellt und die Absorption der

Kammern bei 490 nm gemessen. Die endgültige Messung erfolgte, als die Kammer, die den 200 pg/ml Standard enthielt, eine Absorption von 2,0 zeigte.

### **3.2.6 Aktivin A-Messung**

Zur Aktivin A Bestimmung wurde das in 3.1.4 genannte Kit verwendet. Diese Messung beanspruchte eine Versuchsdauer von zwei Tagen. Zunächst wurden die Proben und Reagenzien des ersten Tages vorbereitet. Für dieses Kit mussten alle Serumproben und Standards im Verhältnis 1:2 mit Serumalbuminlösung vom Rind (BSA) verdünnt werden.

Zunächst wurde der Aktivin A-Standard, welcher in Pulverform (gefriergetrocknet) vorlag, in 1 ml 5 %-igem BSA gelöst, um damit eine Konzentration von 50 pg/ml zu erreichen. Nun wurde die Standardverdünnungsreihe hergestellt, indem zuerst 0,1 ml des Standards mit der Konzentration von 50 pg/ml in ein Reagenzröhrchen gegeben wurden. Dann wurden 0,9 ml BSA hinzugefügt, um eine Konzentration von 5 ng/ml zu erhalten. Es wurden nun 0,2 ml BSA in sechs weitere Röhrchen gegeben. Aus dem ersten (5 ng/ml Standard) wurden dann 0,2 ml in das zweite Röhrchen transferiert und gut geschüttelt. Dieses Verfahren wurde bei allen weiteren Röhrchen wiederholt. Es ergab sich eine Standardreihe mit folgenden Konzentrationen: 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,312 ng/ml, 0,156 ng/ml, 0,078 ng/ml.

Der Waschpuffer musste ebenfalls verdünnt werden, da er 25fach konzentriert vorlag. Er wurde bis auf eine einfache Konzentration mit Aqua dest. verdünnt.

Nun wurden je 125 µl von jedem Standard und jeder Serumprobe in 1,5 ml fassende Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. Zusätzlich wurde in ein weiteres Röhrchen 125 µl BSA als „Null“-Probe gegeben.

Anschließend wurden 125 µl 6 %-iges SDS zu jedem Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden verschlossen und für drei Minuten in ein 100 °C warmes Wasserbad gestellt.

Nach dem Abkühlen der Röhrchen wurden jeweils 20 µl einer 30 %-igen Wasserstoffperoxydlösung in jedes Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

In dieser Zeit wurden 25 µl Assay Diluent in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden je 100 µl der Proben und Standards als Doppelwerte in die Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde verschlossen und eine Stunde, ebenfalls bei Raumtemperatur, inkubiert.

In dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung des Detektionsreagenz 1, indem zum mitgelieferten Reagenz (in Pulverform) 1 ml Assay Diluent gegeben wurde. Nachdem das Pulver sich gelöst hatte, wurden weitere 3 ml Assay Diluent hinzugegeben.

Nach der Inkubationszeit wurden nun 25 µl des Reagenz in jede Vertiefung der Platte pipettiert.

Die Platte wurde dann wiederum verschlossen und über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag wurde zunächst das Detektionsreagenz 2 vorbereitet, indem es wiederum zunächst in 1 ml Assay Diluent

gelöst wurde und anschließend eine Verdünnung mit weiteren 5 ml Assay Diluent erfolgte.

Nach der viermaligen Reinigung der Platte mithilfe des Denley Wellwash 4 (s. oben), wurden 50 µl des zweiten Detektionsreagenz in jede Vertiefung der Platte gegeben. Die Platte wurde verschlossen und eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte insgesamt achtmal gewaschen, wobei beim letzten Durchgang der Waschpuffer für 15 Minuten in den Vertiefungen verblieb. In dieser Zeit wurde das Substrat mit dem Substrat Diluent gelöst. Nach den 15 Minuten wurde die Platte erneute dreimal gewaschen.

Nun wurden in jede Vertiefung 50 µl des Substrates gegeben. Die Platte wurde erneut verschlossen und zwei Stunden lang inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Amplifier vorbereitet, durch Lösung in Amplifier Diluent.

Nach der Inkubationszeit wurden 50 µl des Amplifiers in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Der Farbumschlag erfolgte recht schnell, so dass direkt mit den Messungen im Photometer (SLT Spectra, 490 nm) begonnen werden konnte. Die endgültige Messung erfolgte, als der Standard mit der Konzentration von 5 ng/ml eine Absorption von 2,0 erreicht hatte.

### **3.2.7 Messung der klinischen Standardparameter (hFSH, hLH, Progesteron, Estradiol, Testosteron, Prolaktin)**

Die Messung der klinischen Standardparameter wurde mit Hilfe des Beckmann Access Immunoassay System der Firma Beckmann



Coulter GmbH - Diagnostics vorgenommen. Da dieses System im klinischen Alltag eingesetzt wird und der European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/EC entspricht, wird hier auf eine nähere Beschreibung verzichtet.

### **3.2.8 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte am Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz auf einem PC unter Verwendung des Softwaresystems SPSS Version 9.

Für die deskriptive Darstellung wurden für die stetigen Variablen der Median sowie die 25%- und die 75%-Perzentile angegeben und in Grafiken verwandt.

Zur Untersuchung der stetigen Variablen (Hormonwerte) wurde der Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben herangezogen.

Die Auswertung der stetigen Variablen im zeitlichen Verlauf wurde mit dem Friedman-Test für mehr als zwei abhängige Stichproben durchgeführt.

Für die Korrelation zwischen einzelnen Hormonen wurde der Spearman Korrelations-Koeffizient herangezogen.

Es erfolgte für den Vergleich der zwei Gruppen für jedes ausgewertete Hormon eine Korrektur der p-Werte nach Bonferroni, so dass p-Werte von  $p \leq 0,00625$  als statistisch signifikant zum multiplen Niveau  $\alpha = 5 \%$  angesehen wurden.

Alle anderen statistischen Tests wurden im Sinne einer deskriptiven Datenanalyse verwendet.

## 4. Ergebnisse

Es wurden insgesamt  $n = 18$  Frauen in die Zyklusuntersuchung eingeschlossen und, wie in Kapitel 3.1.10 dargestellt in Gruppen aufgeteilt. Von jeder dieser Frauen lagen Vollblutproben vor, die entsprechend dem Studiendesign abgenommen wurden (s. auch Kapitel 3.1.11). Nachdem die Daten statistisch - wie bereits in Kapitel 3.2.8 erläutert - ausgewertet wurden, ergaben sich die im Folgenden dargestellten Ergebnisse.

### 4.1 Vergleich beider Gruppen im Zyklusverlauf

#### 4.1.1 Inhibin A

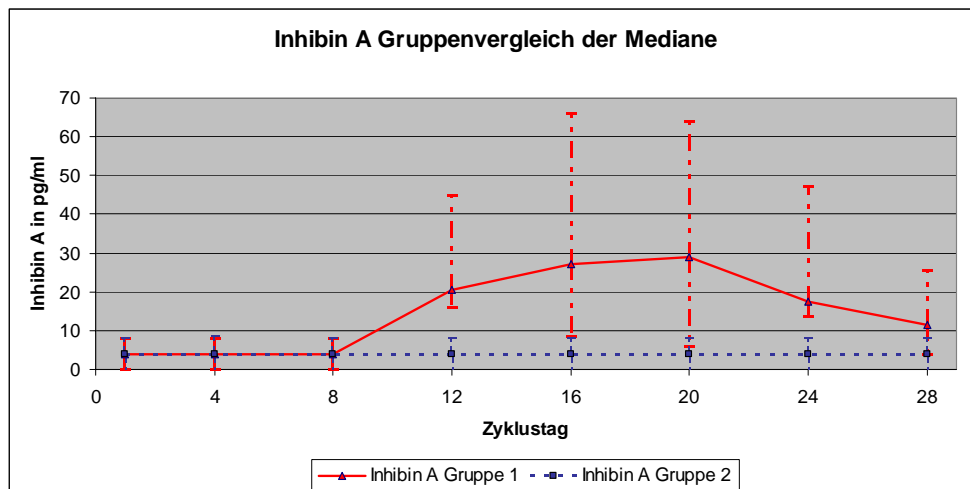


Abb. 1: Inhibin A im Gruppenvergleich (Gruppe 1 ohne Kontrazeption, Gruppe 2 mit Kontrazeption); angegeben sind Mediane sowie 25%- und 75%-Quartile.

n = 18	InA1	InA4	InA8	InA12	InA16	InA20	InA24	InA28
<b>Gruppe 1</b>	3,9	3,9	3,9	20,6	27,3	29,05	17,5	11,6
<b>Gruppe 2</b>	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
<b>p-Werte</b>	0,931	0,387	0,931	0,000	0,000	0,001	0,027	0,019

Datentabelle 1: Mediane in Zahlen sowie p-Werte aus der statistischen Auswertung

Die Inhibin A-Werte liegen in Gruppe 2 auf einem niedrigen Niveau (s. Abb. 1, blau gestrichelte Kurve), wobei die in der Datentabelle 1 angegebenen Werte von 3,9 pg/ml der unteren Messgenauigkeit der Inhibin A-Kits entsprechen. Daher kann an dieser Stelle keine Aussage darüber gemacht werden, ob die gemessenen Werte den tatsächlichen Werten entsprechen oder ob es unterhalb dieses Niveaus noch Schwankungen der realen Werte gibt.

Der Zyklusverlauf von Inhibin A in Gruppe 1 stellt sich völlig anders dar (s. Abb. 1, rote Kurve). Zu Beginn des Zyklus bleiben die Werte an den Tagen 1 bis 8 auf einem tiefen Niveau, um dann an Tag 12 von 3,9 pg/ml auf 20,6 pg/ml und an Tag 20 weiter auf ein Maximum von 29,05 pg/ml zu steigen. Nach dem 20. Zyklustag fallen die Werte zum Ende des Menstruationszyklus hin wieder ab und erreichen am 28. Tag einen Wert von 11,6 pg/ml.

Im Vergleich der beiden Gruppen zeigt sich in der Gruppe ohne Kontrazeption ein eingipfliger Verlauf der Kurve, die ab dem 8. Tag stetig ansteigt, bis sie am 20. Zyklustag ein Maximum erreicht. Bei Frauen, die unter der Wirkung oraler Hormonpräparate stehen, zeigen sich keine Zyklusschwankungen. Es ließ sich statistisch beweisen, dass die Schwankungen der Gruppe 1 statistisch signifikant im zeitlichen Verlauf sind (p

$\leq 0,001$  im Friedman-Test). Es konnte in Gruppe 2 entsprechend gezeigt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf gibt ( $p = 0,069$  im Friedman-Test). Inhibin A wird hier durch die Hormongaben unterdrückt. An den Tagen 12 ( $p \leq 0,001$ ; s. auch Datentabelle 1), 16 ( $p \leq 0,001$ ; s. auch Datentabelle 1) und 20 ( $p \leq 0,001$ ; s. auch Datentabelle 1) ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen hochsignifikant. An den Tagen 24 ( $p = 0,027$ ; s. auch Datentabelle 1) und 28 ( $p = 0,019$ ; s. auch Datentabelle 1) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede mehr, dennoch kann man deutlich eine Tendenz hin zum signifikanten Unterschied erkennen. Zu Beginn des Zyklus (Tag 1 bis 8) liegen beide Kurven im selben Niveau, woraus sich keine signifikanten Unterschiede ergeben (Tag 1:  $p = 0,931$ ; Tag 4:  $p = 0,387$ ; Tag 8:  $p = 0,931$ ; s. auch Datentabelle 1). Auch hier kann keine Aussage getroffen werden, ob es nicht doch einen Niveauunterschied vorliegt, da die Messgenauigkeit der Inhibin A-Kits unterschritten wurde.

#### 4.1.2 Inhibin B

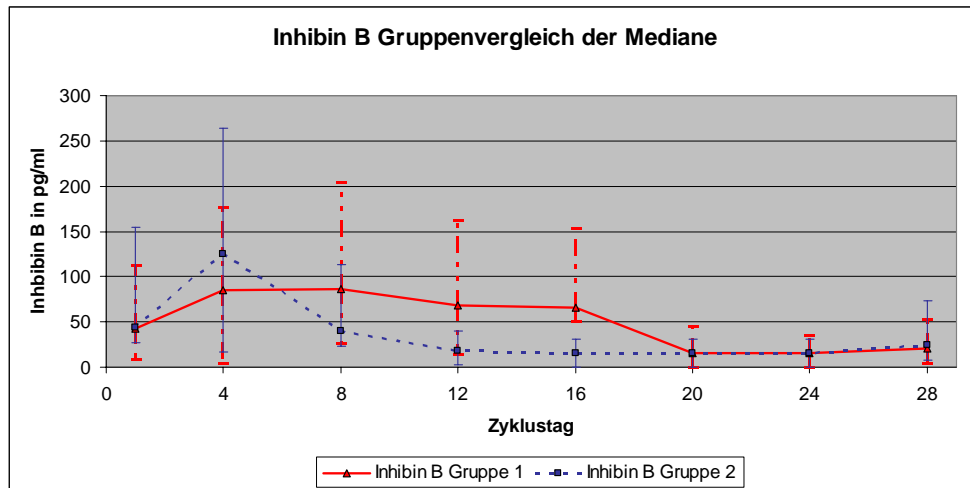


Abb. 2: Inhibin B im Gruppenvergleich (Gruppe 1 ohne Kontrazeption, Gruppe 2 mit Kontrazeption); angegeben sind Mediane sowie 25%- und 75 %-Quartile.

n = 18	InB1	InB4	InB8	InB12	InB16	InB20	InB24	InB28
Gruppe 1	42,6	84,4	85,9	68,6	65,4	16,05	15,6	20
Gruppe 2	43,4	124,32	39,4	18,4	15,6	15,6	15,6	24,6
p-Werte	1,000	0,094	0,094	0,004	0,031	0,236	0,370	0,833

Datentabelle 2: Mediane in Zahlen sowie p-Werte aus der statistischen Auswertung

Die Inhibin B-Werte von Gruppe 1 steigen innerhalb der ersten vier Zyklustage zunächst schnell von 42,6 pg/ml auf 84,4 pg/ml an (s. Abb. 2, rote Kurve). Danach wird die Kurve flacher und die Werte halten sich über den 8. Tag (an welchem das Maximum mit 85,9 pg/ml erreicht wird) hinaus auf diesem Niveau, um dann langsam im weiteren Verlauf bis zum 16. Zyklustag auf 65,4 pg/ml zu fallen. Hier gibt es nun einen steileren Knick und die Werte sinken innerhalb der nächsten vier Tage auf ein Niveau von 16,05 pg/ml ab. Am 24. Tag fallen die Werte auf das

Minimum von 15,6 pg/ml, wobei hier die untere Grenze der Messgenauigkeit des Inhibin B-Kits erreicht oder sogar unterschritten wird. In den letzten vier Tagen steigt der Spiegel dann wieder auf 20 pg/ml an.

In Gruppe 2 (s. Abb. 2, blau gestrichelte Kurve) liegt der Inhibin B-Spiegel zu Beginn nahezu auf derselben Höhe wie in Gruppe 1 (Tag 1: 43,4 pg/ml). Bis zum 4. Zyklustag steigt der Spiegel jedoch rasant auf 124,32 pg/ml an, um bis zum 8. Tag ebenso schnell wieder auf 39,4 pg/ml abzufallen. Die Werte fallen danach weiter und erreichen am 16. Zyklustag den Tiefstwert, wobei sie hier die untere Messgenauigkeit des Inhibin B-Kits unterschreiten. Die Werte bleiben bis zum 24. Tag auf diesem niedrigen Niveau und steigen zum Ende des Zyklus (Tag 28: 24,6 pg/ml) wieder an.

In Gruppe 1 zeigt sich ein eingipfliger Verlauf der Kurve mit einem Maximum am 8. Zyklustag (85,9 pg/ml). Insgesamt ist der Kurvenverlauf eher flach und die Anstiege bzw. Abfälle der Werte verlaufen langsam. Trotzdem zeigte die statistische Untersuchung einen signifikanten zeitlichen Verlauf in dieser Gruppe ( $p = 0,003$  nach Friedman). In der Gruppe Frauen mit oraler Kontrazeption hingegen steigt die Kurve zunächst steil an und hat einen Peak am 4. Zyklustag. In weiteren Verlauf jedoch fallen die Werte schnell ab und unterschreiten am 16. Tag die Messgenauigkeit der Kits. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs zeigte auch hier ein eindeutig signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,001$  in der Auswertung nach Friedman).

Im Vergleich beginnen die Verläufe der beiden Gruppen auf demselben Niveau (Tag 1:  $p = 1,000$ ; s. auch Datentabelle 2),

wobei Gruppe 2 zunächst steil und Gruppe 1 eher flach ansteigt (Tag 4:  $p = 0,094$ ; s. auch Datentabelle 2). Am vierten Tag liegen die Werte der Gruppe 2 höher als die Werte von Gruppe 1. Bis zum 8. Tag liegen die Werte von Gruppe 1 wieder höher als die von Gruppe 2 (Tag 8:  $p = 0,094$ ; s. auch Datentabelle 2). Im weiteren Verlauf wird der an den Tagen 4 und 8 nur tendenziell erkennbare Unterschied immer deutlicher und wird am 12. Zyklustag statistisch signifikant ( $p = 0,004$ ). Über den 16. Tag mit einem p-Wert von 0,031 erreichen die beiden Gruppen ab dem 20. Zyklustag bis zum Ende des Zyklus (Tag 20:  $p = 0,236$ ; Tag 24:  $p = 0,370$ ; Tag 28:  $P = 0,833$ ; s. auch Datentabelle 2) wieder identische Level.

Ob es am Ende des Zyklus zwischen den beiden Gruppen noch Unterschiede auf einem sehr niedrigen Niveau gibt, kann man anhand der vorliegenden Daten nicht sagen, da in Gruppe 2 die Messgenauigkeit der Kits an den Tagen 16, 20 und 24 und in Gruppe 1 am Tag 24 unterschritten wurde.

### 4.1.3 Inhibin Pro $\alpha$ -C

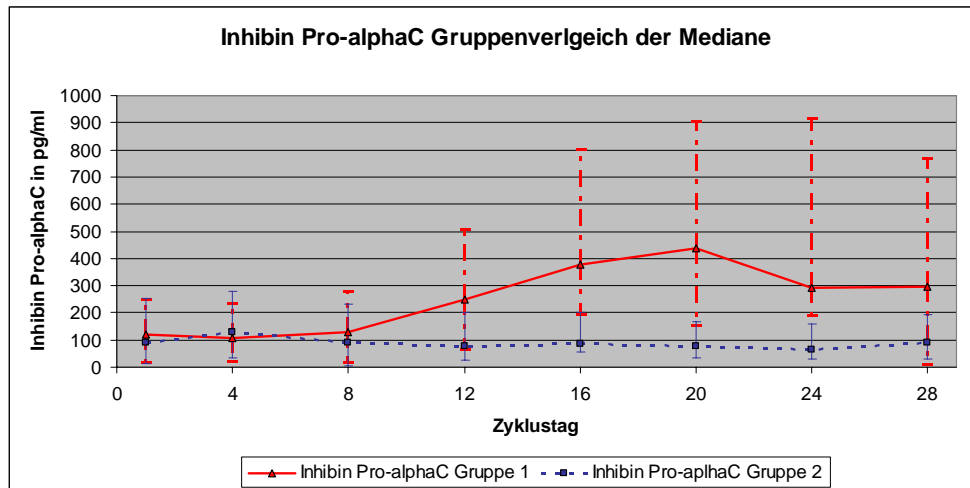


Abb. 3: Inhibin Pro  $\alpha$ -C im Gruppenvergleich (Gruppe 1 ohne Kontrazeptivum, Gruppe 2 mit Kontrazeptivum); angegeben sind Mediane sowie 25%- und 75%-Quartile.

n = 18	Proa-C1	Proa-C4	Proa-C8	Proa-C12	Proa-C16	Proa-C20	Proa-C24	Proa-C28
<b>Gruppe 1</b>	121,2	106,6	130,5	249,1	377,4	436,65	292,95	297,1
<b>Gruppe 2</b>	89,9	126,8	89,1	78,9	84,8	75,8	66,1	92,05
<b>p-Werte</b>	0,387	0,730	0,190	0,011	0,024	0,008	0,027	0,093

Datentabelle 3: Mediane in Zahlen sowie p-Werte aus der statistischen Auswertung

Der Verlauf in Gruppe 2 (s. Abb. 3, blau gestrichelte Kurve) unterliegt während des gesamten Zyklus nur wenigen Schwankungen. Die Werte steigen zunächst diskret von 89,9 pg/ml (Tag 1, s. auch Datentabelle 3) auf 126,8 pg/ml (Tag 4, s. auch Datentabelle 3) an. Im weiteren Verlauf fällt der Spiegel dann wieder auf 89,1 pg/ml am Tag 8 ab und bleibt nun bis zum 20. Tag auf diesem Niveau. Am 24. Tag wird das Minimum mit 66,1 pg/ml erreicht. Zum Ende des Zyklus steigen die Werte dann erneut auf 92,05 pg/ml (Tag 28, s. auch Datentabelle 3).



In Gruppe 1 (s. Abb. 3, rote Kurve) schwanken die Hormonspiegel in den ersten 8 Tagen des Zyklus nur gering (zwischen 106,6 pg/ml an Tag 4 und 130,50 pg/ml an Tag 8, s. auch Datentabelle 3). Im weiteren Verlauf steigen die Werte drastisch an (Tag 12: 249,1 pg/ml; Tag 16: 377,4 pg/ml) und erreichen am 20. Tag das Maximum mit 436,65 pg/ml (s. auch Datentabelle 3). Zum Ende des Zyklus hin fällt der Hormonspiegel dann wieder auf Werte um 300 pg/ml ab (Tag 24: 292,95 pg/ml; Tag 28: 297,1 pg/ml).

In Gruppe 2 (unter dem Einfluss oraler Kontrazeptiva) wird der Inhibin Pro  $\alpha$ -C-Gehalt des Blutes auf ein einheitlich niedriges Niveau supprimiert. Die Werte unterliegen dabei, im Vergleich zu den Unterschieden in Gruppe 1, nur geringen Schwankungen (Minimum an Tag 24: 66,1 pg/ml; Maximum an Tag 4: 126,8 pg/ml), die sich jedoch im zeitlichen Verlauf statistisch signifikant unterscheiden ( $p = 0,001$  nach Friedman). In Gruppe 1 zeigt sich ein zunächst niedriger Hormonspiegel, der ab dem 8. Tag ansteigt. Die Kurve zeigt insgesamt einen eingipfligen Verlauf mit einem Maximum am 20. Tag (436,65 pg/ml; s. auch Abb. 3). Auch in dieser Gruppe ließ sich mit Hilfe des Friedman-Testes nachweisen, dass die zeitlichen Unterschiede nicht zufällig entstehen ( $p = 0,001$ ).

Die beiden Gruppen zeigen im Vergleich völlig verschiedene Verlaufsmuster. Beide Gruppen liegen zunächst in den ersten 8 Tagen des Zyklus auf fast gleichem Niveau (s. Abb. 3). Daher kommt es auch an diesen Tagen zu keinem signifikanten Unterschied in der statistischen Auswertung (Tag 1:  $p = 0,387$ ; Tag 4:  $p = 0,730$ ; Tag 8:  $p = 0,190$ ). Bis zum nächsten Messpunkt an Tag 12 steigen die Werte in Gruppe 1 stark an,

wobei statistisch gesehen nur eine Tendenz zu erkennen ist (Tag 12:  $p = 0,011$ ). Diese Tendenz hin zu einem signifikanten Unterschied setzt sich im Verlauf fort (Tag 16:  $p = 0,024$ ) und wird am 20. Zyklustag mit einem p-Wert von  $p = 0,008$  am deutlichsten. Ein signifikanter Unterschied wird durch eine große Streubreite der Werte während des gesamten Zyklus nicht erreicht (Tag 20:  $p = 0,027$ ; Tag 28:  $p = 0,093$ ; s. auch *Datentabelle 3*).

Durch die große Streubreite der Inhibin Pro  $\alpha$ -C-Werte kann hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen herausgearbeitet werden. Die Tendenz ist aber in durch die p-Werte insgesamt deutlich zu sehen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass ein signifikanter Unterschied mit größeren Fallzahlen nachzuweisen wäre.

#### 4.1.4 Aktivin A

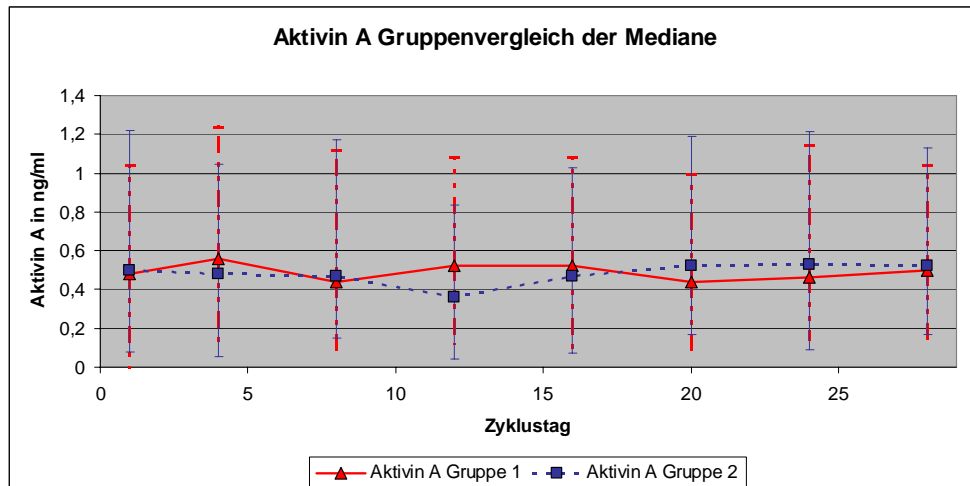


Abb. 4: Aktivin A im Gruppenvergleich (Gruppe 1 ohne Kontrazeptivum, Gruppe 2 mit Kontrazeptivum); angegeben sind Mediane sowie 25%- und 75%-Quartile.

n = 18	Akt1	Akt4	Akt8	Akt12	Akt16	Akt20	Akt24	Akt28
<b>Gruppe 1</b>	0,48	0,56	0,44	0,52	0,52	0,44	0,46	0,5
<b>Gruppe 2</b>	0,5	0,48	0,47	0,36	0,47	0,52	0,53	0,52
<b>p-Werte</b>	1,000	0,541	0,815	0,074	0,423	0,721	0,505	0,876

Datentabelle 4: Mediane in Zahlen sowie p-Werte aus der statistischen Auswertung

Die Aktivin A-Werte der Gruppe 1 (s. Abb. 4, rote Kurve) schwanken während des gesamten Zyklus nur geringfügig. Die Daten erreichen am 4. Zyklustag ein Maximum von 0,56 ng/ml (von 0,48 ng/ml am 1. Tag angestiegen). Dieses Maximum wird gefolgt von einem Abfall des Spiegels auf 0,44 ng/ml am darauf folgenden Messpunkt (Tag 8). Zum 12. Tag hin steigen die Werte dann wieder an und bilden einen erneuten Peak (0,52 ng/ml) mit einer leichten Plateauphase, die bis zum 16. Zyklustag anhält. Danach fällt der Spiegel wieder auf 0,44 ng/ml am 20. Tag des

Menstruationszyklus ab, um anschließend erneut auf die Ausgangswerte anzusteigen (Tag 24: 0,46 ng/ml; Tag 28: 0,5 ng/ml).

In Gruppe 2 (s. Abb. 4, blau gestrichelte Kurve) ergibt sich ein sehr ähnliches Bild. Der Spiegel fällt hier zunächst von 0,5 ng/ml am 1. Zyklustag auf ein Minimum von 0,36 ng/ml am 12. Tag ab. Bis zum Ende des Monatszyklus steigen die Werte dann erneut wieder bis auf das Ausgangsniveau an (s. auch Datentabelle 4).

In Gruppe 1 zeigt sich ein Kurvenverlauf mit einer geringen Schwankungsbreite (zwischen 0,44 ng/ml (→ Tag 8, Tag 20) und 0,56 ng/ml (→ Tag 4)). Durch diese ergibt sich ein fast konstanter Aktivin A-Spiegel über den gesamten Zyklus, der auch statistisch keinen signifikanten Schwankungen unterworfen ist ( $p = 0,110$  im Friedman-Test). In Gruppe 2 fällt der Kurvenverlauf ähnlich aus. Auch hier unterliegen die Daten nur geringen Schwankungen (Minimum: Tag 12 mit 0,36 ng/ml; Maximum: Tag 24 mit 0,53 ng/ml). Wie auch schon für Gruppe 1 beschrieben, ergibt sich für die Gruppe 2 ebenfalls ein fast konstanter Hormonspiegel während des gesamten Zyklus, der allerdings im Gegensatz zu Gruppe 1 noch signifikanten Schwankungen im zeitlichen Verlauf unterworfen ist ( $p = 0,029$  nach Friedman).

Statistisch kann kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Die p-Werte lassen auch keine Aussage über eine Tendenz zu, da der niedrigste p-Wert mit  $p = 0,074$  bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,00625$  dies nicht zulässt.

Den Daten dieser Studie zufolge gibt es an keinem Messpunkt einen signifikanten Unterschied der Hormonspiegel. Die Daten weisen insgesamt auch eine große Schwankungsbreite auf. Es scheint, als haben orale Kontrazeptiva auf den Aktivin A-Spiegel keinen Einfluss während des Menstruationszyklus.

#### 4.1.5 hFSH

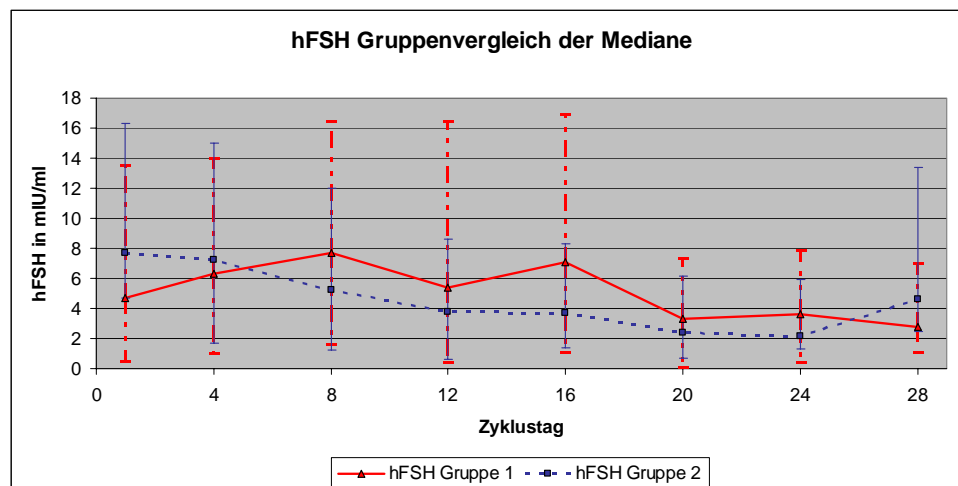


Abb. 5: hFSH im Gruppenvergleich (Gruppe 1 ohne Kontrazeptivum, Gruppe 2 mit Kontrazeptivum); angegeben sind Mediane sowie 25%- und 75%-Quartile.

n = 18	hFSH1	hFSH4	hFSH8	hFSH12	hFSH16	hFSH20	hFSH24	hFSH28
Gruppe 1	4,66	6,29	7,72	5,4	7,11	3,3	3,59	2,75
Gruppe 2	7,66	7,24	5,24	3,74	3,7	2,35	2,16	4,6

Datentabelle 4: Mediane in Zahlen aus der statistischen Auswertung

Die hFSH-Werte der Gruppe 1 (s. Abb. 5, rote Kurve) unterliegen im Verlauf zyklusabhängigen Schwankungen. Die Messwerte steigen zunächst vom 1. bis zum 8. Zyklustag von

4,66 mIU/ml auf ein Maximum von 7,72 mIU/ml an. Nachfolgend fällt der hFSH Spiegel wieder auf 5,4 mIU/ml am 12. Tag, um bis zum 16. Tag wieder auf einen Wert von 7,11 mIU/ml anzusteigen und damit ein zweites Maximum im Verlauf des Zyklus zu bilden. Nach diesem zweiten Peak fallen die Messwerte auf ein niedriges Niveau (3,3 mIU/ml am 20. Tag, 3,59 mIU/ml am 24. Tag und 2,75 mIU/ml am 28. Tag) ab und bilden eine Plateauphase bis zum Ende des Zyklus.

In Gruppe 2 zeigt sich ein anderes Bild. Zunächst befinden sich die hFSH-Werte an den ersten beiden Messtagen auf einem Niveau von 7,66 mIU/ml (Tag 1) und 7,24 mIU/ml (Tag 2). Nach dem 2. Zyklustag fallen die Werte schrittweise auf 5,24 mIU/ml am 8. Tag, 3,74 mIU/ml und 2,35 mIU/ml an den Tagen 12 und 20 ab, um schließlich ein Minimum von 2,16 mIU/ml am 24. Zyklustag zu erreichen. Zum Ende des Zyklus erreichen die Daten dann einen Wert von 4,6 mIU/ml und nähern sich damit wieder den Ausgangswerten an.

In Gruppe 1 (ohne hormonelle Kontrazeption) zeigt sich ein zweigipfliger Zyklusverlauf mit dem ersten Maximum am 8. Zyklustag (7,72 mIU/ml) und dem zweiten Maximum an Tag 16 (7,11 mIU/ml). Nach Erreichen des zweiten Peaks fallen die Werte stark ab und halten sich bis zum Ende des Zyklus auf einem niedrigen Niveau. In Gruppe 2, deren Probandinnen unter der Wirkung oraler Kontrazeptiva stehen, zeigt sich ein anderer Verlauf. Der hFSH Spiegel ist an den ersten beiden Messtagen (Zyklustag 1 und 4) zunächst auf einem hohen Niveau. Zum 8. Zyklustag hin fällt der hFSH-Wert stark auf ein niedrigeres Niveau ab, um im weiteren Verlauf bis zum Ende des Zyklus stetig weiter abzusinken. Die ersten beiden Messtage

liegen in der Menstruationsphase des Zyklus, d. h. je nach Präparat werden entweder keine Tabletten eingenommen oder es werden Tabletten eingenommen, die keine Hormondosen enthalten. Daher wird der hFSH Spiegel zu diesem Zeitpunkt nicht unterdrückt, was allerdings im weiteren Verlauf sehr wohl der Fall ist und auch den Daten bzw. Abb. 5 entnommen werden kann.

#### 4.2 Korrelationen der ovariellen Proteohormone zu hFSH

Die statistische Untersuchung nach Korrelationen erfolgte in dieser Studie mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten, da dieser bei kleinen Fallzahlen Vorteile gegenüber anderen Koeffizienten hat.

##### 4.2.1 Inhibin A/hFSH in beiden Gruppen

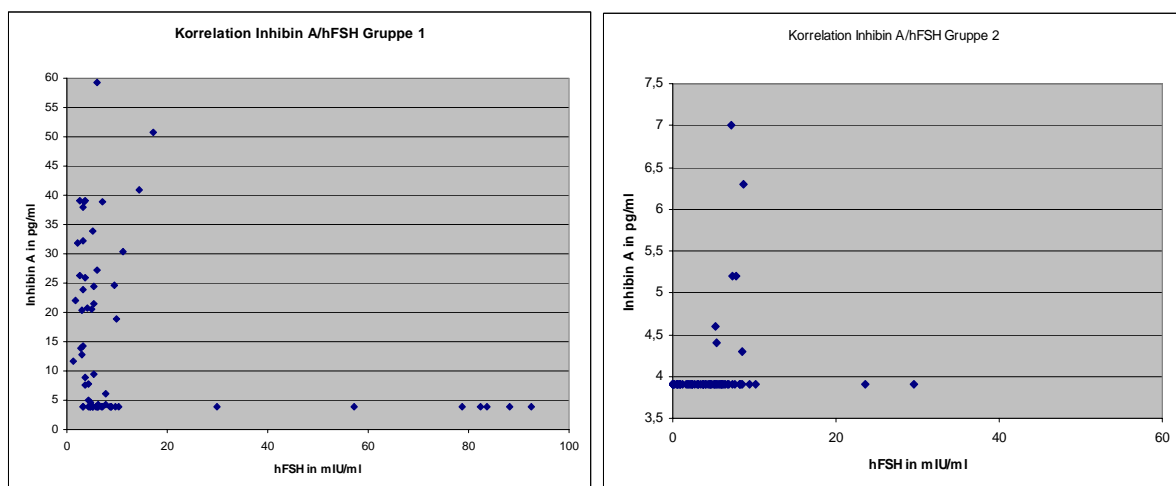


Abb. 5: Korrelation zwischen Inhibin A und hFSH in Gruppe 1 (links) und Gruppe 2 (rechts)

In Gruppe 1, unter der Wirkung oraler Kontrazeptive, konnte eine negative Korrelation nach Spearman nachgewiesen werden ( $r = -0,385$ ;  $p \leq 0,001$ ). In der Gruppe ohne hormonelle Kontrazeption dagegen sind die Wertepaare positiv korreliert ( $r = 0,337$ ;  $p = 0,004$ ).

#### 4.2.2 Inhibin B/hFSH in beiden Gruppen

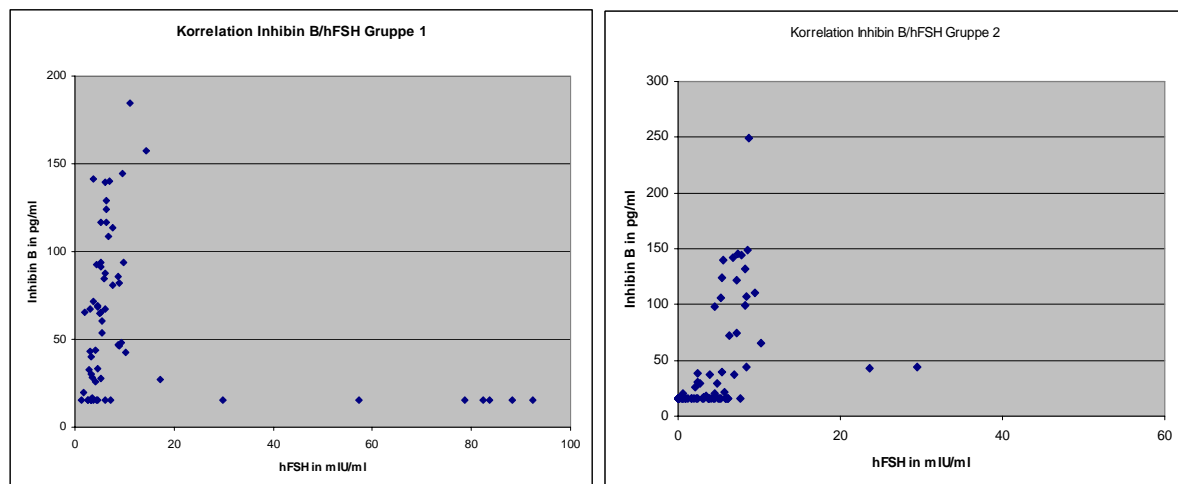


Abb. 6: Korrelation zwischen Inhibin B und hFSH in Gruppe 1 (links) und Gruppe 2 (rechts)

Bei dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Inhibin B-Werte in Gruppe 1 nicht statistisch auffällig miteinander korreliert sind ( $r = 0,185$ ;  $p = 0,137$ ). Beim Kollektiv ohne Einflussnahme oraler Kontrazeptive sind die Wertepaare stark positiv miteinander korreliert ( $r = 0,687$ ;  $p \leq 0,001$ ). Die Korrelation zwischen Inhibin B und hFSH wird folglich durch die Wirkung oraler Kontrazeptiva aufgehoben.



#### 4.2.3 Pro $\alpha$ -C/hFSH in beiden Gruppen

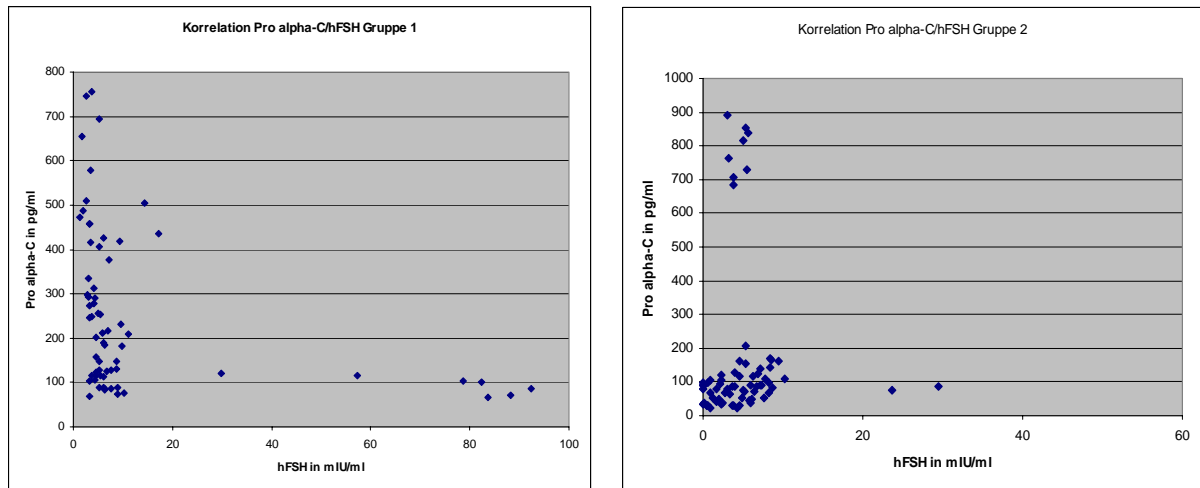


Abb. 7: Korrelation zwischen Pro  $\alpha$ -C und hFSH in Gruppe 1 (links) und Gruppe 2 (rechts)

Inhibin Pro  $\alpha$ -C und hFSH sind in beiden Gruppen statistisch auffällig miteinander korreliert, wobei der Korrelationskoeffizient in Gruppe 1 negativ ( $r = -0,525$ ;  $p \leq 0,001$ ) und in Gruppe 2 positiv ist ( $r = 0,318$ ;  $p = 0,007$ ).

#### 4.2.4 Aktivin A/hFSH in beiden Gruppen

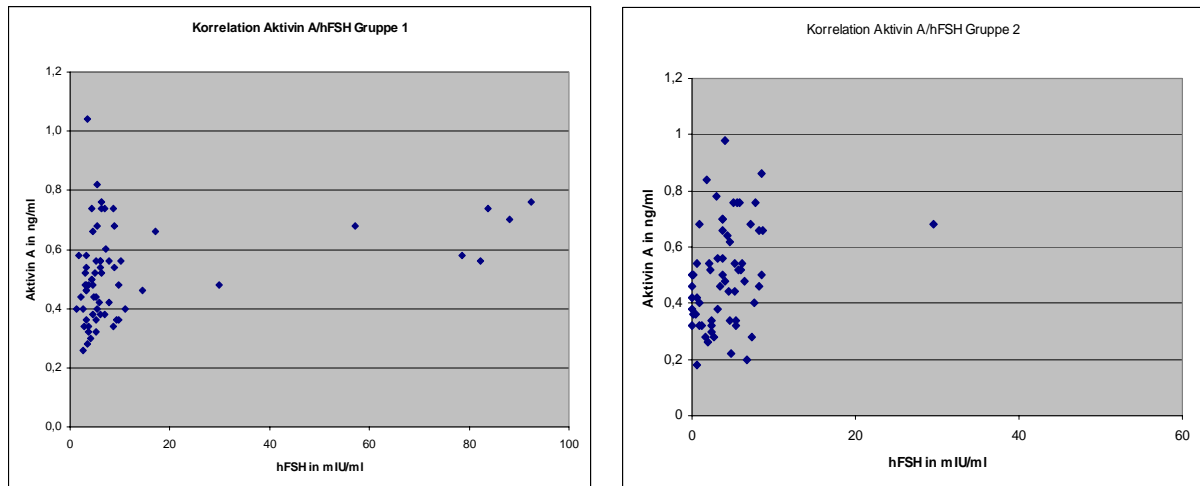


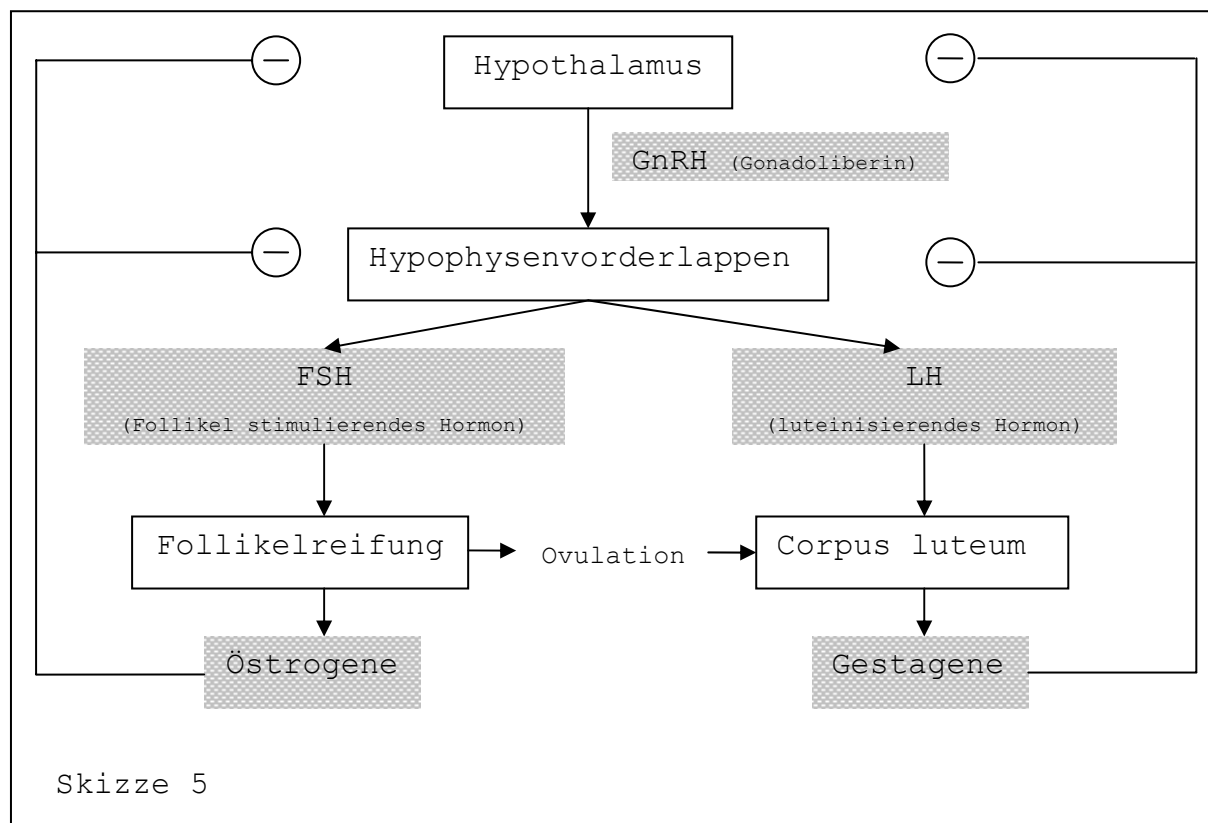
Abb. 8: Korrelation zwischen Aktivin A und hFSH in Gruppe 1 (links) und Gruppe 2 (rechts)

Bei dieser statistischen Auswertung konnten ebenfalls statistisch auffällige Korrelationen zwischen den untersuchten Werten gefunden werden. Die Hormone Aktivin A und hFSH sind in der Gruppe, die unter der Wirkung oraler Kontrazeptiva stehen, positiv miteinander korreliert ( $r = 0,350$ ;  $p = 0,004$ ). In der Gruppe ohne den Einfluss oraler Kontrazeption findet sich ebenfalls eine positive Korrelation ( $r = 0,327$ ;  $p = 0,010$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1 Hormonelle Regulation des Menstruationszyklus

Im Folgenden wird zunächst auf die hormonelle Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Ovarien-Achse und deren physiologische Folgen eingegangen.



Als oberste Kontrollinstanz des Regelkreises (s. Skizze 5) dient der Hypothalamus, der durch GnRH (**G**onadotropin-**R**eleasing-**H**ormon oder Gonadoliberin) die Hypophyse zur Ausschüttung von hFSH und hLH stimuliert. Die Ausschüttung der regulatorischen Hormone GnRH, hFSH und hLH erfolgt pulsatil.

Die absoluten Hormonkonzentrationen unterliegen zyklusabhängigen Schwankungen (Petrides 1998). Das von der Hypophyse ausgeschüttete hFSH gelangt über den Blutkreislauf zu den Ovarien und bewirkt dort das Heranreifen einer Kohorte von Follikeln (Tag 1-4), welche wiederum beginnen, in einem speziellen Teil der Zellen, den Granulosa-Zellen, Östrogene zu produzieren. Aus dieser Kohorte wird dann ein Follikel aus bisher unbekannter Ursache selektiert (Tag 5-7) und reift schließlich zum sprungreifen Graaf-Follikel heran (Tag 8-12). Bisher ist bekannt, dass die Auswahl des Follikels eng mit seiner Fähigkeit, Östrogene zu produzieren verknüpft ist (Petrides 1998). Eine zweite wichtige Wirkung der Östrogene ist deren Wirkung auf das Endometrium. Dort führen sie zu einer Proliferation der Schleimhaut. Die Östrogene im Blut bewirken in niedrigen Konzentrationen, durch einen negativen Feedback Mechanismus auf die Hypophyse und den Hypothalamus, dass die hFSH- und hLH-Spiegel zunächst ebenfalls auf einem niedrigen Niveau bleiben. Bis zur Zyklusmitte hin steigen die Östrogen-Konzentrationen stetig an (s. auch Skizze 3). Durch die sehr hohen Östrogen-Spiegel in der Zyklusmitte reagiert die Hypophyse mit einem plötzlichen Anstieg der hFSH- und hLH-Ausschüttung. Hierbei handelt es sich um die so genannte positiv rückkoppelnde Wirkung der Östrogene. Durch diesen hLH-Peak wird schließlich die Ovulation ausgelöst. Das sich aus dem Graaf-Follikel bildende Corpus luteum beginnt dann, angeregt durch hLH, Progesteron zu produzieren und abzugeben (Luteinisierung der Zellen). Das führt wiederum dazu, dass sich die Endometriumschleimhaut verändert (sekretorische Phase), um damit die Nidation der sich in der Tube befindenden

Eizelle vorzubereiten. In dieser Phase des Menstruationszyklus wirken die immer noch erhöhten Östrogenspiegel zusammen mit dem ansteigenden Progesteronspiegel wieder negativ rückkoppelnd auf die Hypophyse und den Hypothalamus, wodurch es zu einem Abfall der erhöhten hFSH- und hLH-Spiegel kommt. Kommt es nicht zur Befruchtung der Eizelle mit nachfolgender Nidation, geht das Corpus luteum innerhalb eines Zeitraumes von 14 Tagen zu Grunde. In der Folge fällt der Progesteronspiegel ab, es kommt zu regressiven Veränderungen der Endometriumschleimhaut, was schließlich zur Menstruationsblutung führt (Wuttke 2000).

## **5.2 Wirkmechanismus oraler Kontrazeptiva (1-Phasen-Präparate)**

Um die Zusammenhänge des Einflusses hormoneller Kontrazeptiva auf die ovariellen Proteohormone besser zu verstehen, muss man zunächst genauer den Wirkmechanismus eben dieser Hormonpräparate auf die Hypophyse beleuchten.

Die Probandinnen dieser Studie nahmen alle 1-Phasen-Präparate ein. Diese setzen sich aus einer fixen Östrogen-/Gestagendosis über 21 Tage des Zyklus zusammen. In der letzten Woche des Zyklus kommt es durch das Fehlen der Hormondosen zu einer Menstruationsblutung (Hormonentzugsblutung). Bei manchen Präparaten wird eine siebentägige Einnahmepause eingelegt, bei anderen wird während dieser Zeit eine Pille ohne Wirkstoff (Placebo) eingenommen. Die konzeptionsschützende Wirkung der Pille beruht auf der funktionellen Ausschaltung der Hypophyse. Bei den Präparaten wird die negativ rückkoppelnde Wirkung der

Östrogene und Gestagene auf die höheren Steuerzentren (Hypophyse und Hypothalamus) ausgenutzt. Durch die kontinuierliche Gabe niedriger Östrogendosen wird die hypophysäre Ausschüttung von hFSH und hLH unterdrückt. Durch das fehlende hFSH kommt es in den Ovarien nicht zur Heranreifung eines Follikels, was zur Folge hat, dass es nicht zur Ovulation kommt. Überdies kommt es durch die Östrogenwirkung zum Aufbau der Endometriumschleimhaut. Aus diesem Grund ist es wichtig, Östrogene mit Gestagenen zu kombinieren (s. u.). Diese wiederum entfalten mehrere Wirkungen. Zum einen wird die zusätzliche ovulationshemmende Wirkung dieser Hormongruppe ausgenutzt. Durch Gestagene kommt es ebenfalls, über einen negativ rückkoppelnden Einfluss auf die Hypophyse und den Hypothalamus, zu einer verminderten Freisetzung von hLH, womit sich die ovulationshemmende Wirkung erklärt (s. auch Skizze 5). Zum anderen verändert sich der Cervixschleim dergestalt, dass es eindringenden Spermien erschwert wird, in den Uterus zu gelangen (die Viskosität des cervikalen Schleimes verändert sich). Die dritte wichtige Wirkung besteht in der Umwandlung des Endometriumepithels (sekretorische Phase). Durch die begleitende Gestagengabe steht das Endometrium nicht ausschließlich unter der Östrogenwirkung, was ein erhöhtes Carcinomrisiko zur Folge hätte. Ferner kommt es nach Absetzen der Gestagene in der siebentägigen Einnahmepause zu regressiven Veränderungen der Endometriumschleimhaut und damit zur Hormonentzugsblutung.

### 5.3 Generelle Physiologie der Inhibine

Die Inhibine werden in den Granulosa- und Theca interna-Zellen des Ovars produziert und von dort auch in das umgebende Gewebe und den Blutkreislauf abgegeben (Vale *et al.* 1988, Knight *et al.* 1996, Hayes *et al.* 1998 Luisi *et al.* 2005). Viele Studien in der Vergangenheit unterstützen das Konzept, dass Inhibine gonadale Botenstoffe sind, die ein physiologisch negatives Feedback auf die hFSH-Ausschüttung der Hypophyse ausüben (Luisi *et al.* 2005, Welt 2002). Darüber hinaus haben die Inhibine auch noch verschiedene paracrine Wirkungen, wie zum Beispiel den Einfluss der Inhibine auf die Androgenproduktion der Theca-Zellen (Welt 2002, Luisi *et al.* 2005). Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt in den Wirkungen der oralen Kontrazeptiva auf die Ausschüttung der Inhibine.

Während der folliculären Phase des Menstruationszyklus ist Inhibin B mengenmäßig die Hauptform der sezernierten Inhibine. Von Beginn des Zyklus steigen die Konzentrationen an, um ein Maximum zum Zeitpunkt der erhöhten hFSH-Ausschüttung zu erreichen. Zwei Tage nach dem typischen LH-Peak der Zyklusmitte gibt es ein erneutes Maximum in der Inhibin B-Konzentrationskurve. Danach fallen die Werte auf ein niedriges Niveau ab (Groome *et al.* 1996, Luisi *et al.* 2005). Inhibin A hingegen verhält sich entgegengesetzt. Hier sind die Konzentrationen während der frühen folliculären Phase niedrig und steigen in der späten folliculären Phase an. Zeitgleich mit dem in der Zyklusmitte gelegenen LH-Peak erreicht auch die Inhibin A-Konzentration ein Maximum. Ein zweites Maximum wird

dann in der Mitte der lutealen Phase erreicht (s. auch Skizze 3) (Groome *et al.* 1994, Luisi *et al.* 2005). Anhand dieser Daten schlussfolgerten Welt *et al.* 1997 zum einen, dass Inhibin B einer der Hauptmarker für die Heranreifung eines Follikels unter dem Einfluss von hFSH zu sein scheint, und zum anderen, dass Inhibin A, welches hauptsächlich in den Zellen des Corpus luteum gebildet wird, eine Rolle beim negativen Feedback des Ovars auf die hFSH-Ausschüttung während des follikulär-lutealen Übergangs spielt (Luisi *et al.* 2005).

Aktivin A, als Gegenspieler der Inhibine im Bezug auf die hFSH-Ausschüttung (Knight 1996), verstärkt die von hFSH stimulierte Expression der Gene, die für die Proliferation und Differenzierung der Granulosa-Zellen verantwortlich sind (El-Hefnawy und Zeleznik 2001, Welt 2002). Des Weiteren konnte an Affen gezeigt werden, dass Aktivin A sowohl einen positiven (in der frühen follikulären Phase) als auch einen negativen (in der späten lutealen Phase) Effekt auf die LH-Ausschüttung hat (Knight 1996).

#### **5.4 Einfluss der Kontrazeptiva auf die Inhibine**

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die oralen Kontrazeptiva durch ihre niedrigen Östrogen- und Gestagendosen einen signifikanten Einfluss auf die Inhibin-Spiegel während des Menstruationszyklus haben. Untersucht wurden die Unterschiede der einzelnen Hormone (Inhibin A, Inhibin B, Inhibin Pro  $\alpha$ -C, Aktivin A) zu jedem Messpunkt (alle 4 Tage über einen Zyklus). Dabei wurden zwei Gruppen (Gruppe 1 ohne



hormonelle Kontrazeption und Gruppe 2 unter Einfluss oraler Kontrazeptiva) gebildet und miteinander verglichen.

Wie bereits oben erwähnt (s. Kapitel 1.2.2 und Kapitel 5.3), ist die momentane Lehrmeinung, dass die Inhibine mittels eines negativen Feedbackmechanismus auf hFSH in den hormonellen Regelkreis des weiblichen Zyklus eingreifen (Luisi *et al.* 2005, Welt 2002, Vale *et al.* 1988, Knight 1996a). Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass durch Gabe von FSH die Inhibin-Spiegel ansteigen (McLachlan *et al.* 1986, McLachlan *et al.* 1987a, Muttukrishna *et al.* 1994, Burger, Groome und Robertson 1998). Theoretischen Überlegungen zufolge sollten sich die Inhibin-Spiegel durch eine Suppression von hFSH unterdrücken lassen. Eben dieser Effekt konnte in dieser Studie nachgewiesen werden.

Die Inhibin A-Spiegel werden durch die Kontrazeptiva über den Zeitraum des gesamten Zyklus auf einem Niveau unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Kits ( $< 3,9$  pg/ml) gehalten. Die schon beschriebenen Zyklusverläufe von Inhibin A mit einem Anstieg und Maximum in der zweiten Zyklushälfte (Groome *et al.* 1994, Knight 1996, Groome *et al.* 1996) konnten durch diese Studie ebenfalls nachvollzogen werden (s. Abb. 1). Von Beginn des Zyklus bis zum 8. Tag liegen die Kurven der beiden Vergleichsgruppen unter dem Niveau der Nachweisgrenze. Anschließend steigt die Kurve der Kontrollgruppe (Gruppe 2) stetig an und erreicht ihr Maximum (29,05 pg/ml) am 20. Tag des Zyklus. Danach fallen die Inhibin A-Spiegel wieder stetig ab. Es konnte bei den Messungen an den Tagen 12 ( $p < 0,001$ ), 16 ( $p < 0,001$ ) und 20 ( $p < 0,001$ ) ein hochsignifikanter Unterschied gezeigt werden. An den Tagen 24 ( $p = 0,027$ ) und 28

( $p = 0,019$ ) ist eine Tendenz hin zu statistisch auffälligen Unterschieden zu erkennen. Durch eine Analyse der Daten mit Hilfe des Friedman-Testes kann für Gruppe 1 vermutet werden, dass es sich bei den Zyklusschwankungen nicht um zufällige Schwankungen handelt ( $p \leq 0,001$ ). Durch die Suppression von Inhibin A in Gruppe 2 konnten hier keine auffälligen Schwankungen herausgearbeitet werden.

Die erhobenen Inhibin B-Daten bestätigen ebenfalls die bereits bekannten Verläufe (Groome *et al.* 1994, Knight 1996, Groome *et al.* 1996) (vgl. Kapitel 4.1.2). Auch Inhibin B wird durch die oralen Kontrazeptiva vollständig unterdrückt und auf einem Niveau unterhalb der Nachweisgrenze gehalten ( $< 15,6$  pg/ml). Allerdings gibt es zu Beginn des Zyklus hier einen Peak am 4. Tag (124,32 pg/ml), der sich aber nicht signifikant ( $p = 0,094$ ) von Gruppe 1 unterscheidet. Wie bereits oben beschrieben, wurden die ersten Blutproben (Tag 1 und Tag 4) während pillenfreien Phase abgenommen. Daher steht zu diesem Zeitpunkt die Hypophyse nicht unter einem supprimierenden Östrogeneinfluss, was gemäß dem Regelkreis (Wuttke 2000) zur Ausschüttung von hFSH führt. Als physiologische Reaktion der Ovarien kommt es zu einem Anstieg der Inhibin B-Konzentration. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Groome *et al.* von 1994 überein. Er konnte zeigen, dass die Sekretion von Inhibin B eng mit einem adäquaten hFSH Stimulus verknüpft ist. Am 7. Tag des Zyklus setzt dann die Wirkung der oralen Kontrazeption ein, was wiederum zur Suppression der Hypophyse mit nachfolgendem Abfall des hFSH-Spiegels führt (vgl. Kapitel 4.1.5). Das wiederum führt über die oben genannten Zusammenhänge zum Abfall der Inhibin B-Spiegel. Die hier

erhobenen Daten bestätigen die dargestellten Beziehungen. Eine statistisch auffällige Differenz konnte hier am vierten Messtag (12. Zyklustag,  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden. Am 4. ( $p = 0,094$ ) und 8. Tag ( $p = 0,094$ ) ist eine deutliche Tendenz zu erkennen. In der zweiten Zyklushälfte unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht mehr signifikant voneinander (s. Abb. 2). Die Friedman-Analyse zeigte auch bei der Auswertung von Inhibin B für beide Gruppen signifikante zeitliche Schwankungen (Gruppe 1:  $p = 0,003$ ; Gruppe 2:  $p \leq 0,001$ ). Um die Frage zu klären, ob es sich bei der Suppression von Inhibin A und Inhibin B um eine Hemmung der Ausschüttung oder der Produktion handelt, wurde hier das Vorläuferpolypeptid Inhibin Pro  $\alpha$ -C (Casper, Seufert und Pollow 2000) untersucht. Wie bei den anderen untersuchten Hormonen konnte auch hier der bekannte Zyklusverlauf (Groome *et al.* 1995) nachvollzogen und bestätigt werden. Ohne den Einfluss oraler Kontrazeption steigen die Konzentrationen stetig an und erreichen ein Maximum (436,65 pg/ml) in der zweiten Zyklushälfte am 20. Tag, um danach wieder abzufallen. Unter dem Einfluss der Pille wird der Inhibin Pro  $\alpha$ -C Spiegel auf ein einheitlich niedriges Niveau (Minimum: 66,1 pg/ml, Maximum: 126,8 pg/ml) supprimiert. Die Daten unterliegen nur geringen Schwankungen. Ein annähernd signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte am 20. Tag ( $p = 0,008$ ) nachgewiesen werden. An den umliegenden Zyklustagen ist eine deutliche Tendenz zu erkennen (Tag 12:  $p = 0,011$ ; Tag 16:  $p = 0,024$ ; Tag 24:  $p = 0,027$ ). Durch die Auswertung der Daten mit dem Test nach Friedman konnten für Gruppe 1 ( $p \leq 0,001$ ) und Gruppe 2 ( $p \leq 0,001$ ) im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede

nachgewiesen werden. Es konnte hier gezeigt werden, dass orale Kontrazeptiva die Konzentration des Vorläuferpeptids der Inhibine senken, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich bei den Einflüssen auf Inhibin A und B tatsächlich auch um eine Hemmung der Produktion dieser beiden Hormone und nicht nur um eine Hemmung der Ausschüttung der Stoffe handelt. An welcher Stelle der Synthese von Inhibin A und B, bzw. welche Enzyme hier gehemmt werden, muss in weiterführenden biochemischen Studien geklärt werden. Ebenfalls sollte es Ziel weiterer Studien sein, zu erforschen, ob es zusätzlich zur Synthesehemmung noch einen hemmenden Einfluss auf die Ausschüttung der Hormone gibt.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchung von Aktivin A in dieser Studie, so zeigt sich kein statistisch auffälliger Unterschied in den Zyklusverläufen der beiden verglichenen Gruppen. Die Daten beider Gruppen schwanken nur geringfügig (Gruppe 1: Minimum: 0,44 pg/ml, Maximum: 0,56 pg/ml; Gruppe 2: Minimum: 0,36 pg/ml, Maximum: 0,53 pg/ml). Es scheint, als haben die oralen Kontrazeptiva keinen Einfluss auf die Produktion und Ausschüttung von Aktivin A. Es wurde hier ein im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen (Knight 1996, Muttukrishna *et al.* 1996), abweichender Verlauf der Aktivin A-Spiegel bei Gruppe 1 gefunden. Hier ergibt sich, wie bereits erwähnt, ein recht homogener Verlauf über den gesamten Zyklus mit einem minimalen Median von 0,44 pg/ml und einem maximalen von 0,56 pg/ml. Im durchgeführten Friedmann-Test konnten keine signifikanten Schwankungen im zeitlichen Verlauf nachgewiesen werden ( $p = 0,110$ ). In Gruppe 2 zeigte sich ein ähnlicher Verlauf mit nur geringen Schwankungen, welche sich aber im

zeitlichen Verlauf noch statistisch auffällig voneinander unterscheiden ( $p = 0,029$  im Friedmann-Test).

Durch die oben dargestellten Ergebnisse und Zusammenhänge muss man als Nächstes diskutieren, ob die ovariellen Proteohormone mit hFSH korrelieren. Da wir im Rahmen dieser Arbeit nachweisen konnten, dass durch eine Suppression von hFSH auch die Inhibine supprimiert werden, vermutet man einen solchen Zusammenhang. In dieser Studie wurden die Korrelationen zwischen allen Proteohormonen und hFSH gebildet. Da von schiefen Daten ausgegangen werden muss, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Es konnte im Falle von Inhibin A ein Koeffizient von  $r = -0,385$  nachgewiesen werden, der auch statistisch auffällig war ( $p \leq 0,001$ ). Wenn man sich aber die Verteilung der Daten vor Augen führt (vgl. Abb. 5), muss man feststellen, dass diese Korrelation durch die in den Daten enthaltenen Extremwerte hervorgerufen wird. Eine wirkliche Korrelation kann an dieser Stelle nicht postuliert werden. Bei den Auswertungen der Korrelationen von Inhibin B zu hFSH zeigte sich ein ähnliches Bild. In Gruppe 1 ( $r = 0,185$ ,  $p = 0,137$ ) konnte keine auffällige Korrelation gezeigt werden; Gruppe 2 zeigte hier zwar eine statistische Auffälligkeit ( $r = 0,687$ ,  $p \leq 0,001$ ), aber auch daraus kann keine klinische Relevanz der Auffälligkeit (vgl. Abb. 6) abgeleitet werden. Auch in diesem Fall muss eingeräumt werden, dass die auffälligen statistischen Maßzahlen von Extremwerten hervorgerufen werden. Eine negative Korrelation, wie sie andere Arbeiten gezeigt haben (Casper, Seufert und Pollock 2000), konnte hier nicht nachvollzogen werden. Ebenso wenig konnte eine positive

Korrelation, wie sie Welt *et al.* 1997 zeigten, bestätigt werden. Betrachtet man die Korrelationen von Pro  $\alpha$ -C mit hFSH kommt man zum gleichen Schluss wie schon bei den ersten beiden dargestellten Korrelationsanalysen: Es ergeben sich zwar statistisch auffällige Maßzahlen (Gruppe 1:  $r = -0,525$ ,  $p \leq 0,001$ ; Gruppe 2:  $r = 0,318$ ,  $p = 0,007$ ), die jedoch keine Relevanz haben, wenn man zugleich die Werteverteilung (vgl. Abb. 7) heranzieht. Bei der Betrachtung von Aktivin A, bei welchem hier kein Einfluss oraler Kontrazeptiva gezeigt werden konnte, wurde ebenfalls keine Korrelation von Aktivin A zu hFSH gefunden (Gruppe 1:  $r = 0,327$ ,  $p = 0,010$ ; Gruppe 2:  $r = 0,350$ ,  $p = 0,004$ ). Diese Ergebnisse bestätigen die vermutete Unabhängigkeit der Aktivin A-Spiegel von hFSH aus den Zyklusbetrachtungen (s. o.). In der Literatur ist beschrieben, dass Aktivin A in der Lage ist, die Ausschüttung von hFSH zu stimulieren (Vale *et al.* 1986, Ling *et al.* 1986, Vale *et al.* 1988). Dessen ungeachtet gibt es widersprüchliche Ergebnisse, was die Korrelation zwischen Aktivin A und hFSH angeht. So beschrieben Muttukrishna *et al.* 1996, dass Aktivin A im Serum einen zu hFSH parallel verlaufenden zweigipfligen Verlauf hat, was eine enge Beziehung zwischen den beiden Faktoren andeutet. Dagegen konnten die Ergebnisse von Casper, Seufert und Pollow 2000 und Lockwood *et al.* 1996, die zeigten, dass die Produktion von Aktivin A nicht durch hFSH beeinflusst wird, hier bestätigt werden.

### 5.5 Kritische Betrachtung dieser Studie

Da bisher noch keine Studien über den Einfluss oraler Kontrazeptiva veröffentlicht wurden, kann hier nur auf die bekannten Zusammenhänge zwischen Inhibinen und hFSH (McLachlan *et al.* 1986, McLachlan *et al.* 1987a, Muttukrishna *et al.* 1994, Luisi *et al.* 2005, Welt 2002, Vale *et al.* 1988, Knight 1996a) aufgebaut werden. Zunächst bleibt festzuhalten, dass die oralen Kontrazeptiva durch ihre Wirkung auf die Hypophyse die ovariellen Proteohormone Inhibin A, Inhibin B und Inhibin Pro  $\alpha$ -C supprimieren. Aktivin A scheint von den zirkulierenden hFSH-Spiegeln unbeeinflusst. Gerade hier gibt es widersprüchliche Ergebnisse (Muttukrishna *et al.* 1996, Lockwood *et al.* 1996). Gegenwärtig bedarf es dort einer weiteren Klärung durch intensive Zyklusuntersuchungen. Des Weiteren gibt es sehr widersprüchliche Daten hinsichtlich der Korrelation zwischen Inhibinen/Aktivin zu hFSH (Welt *et al.* 1997, Lockwood *et al.* 1996, Casper, Seufert und Pollow 2000, Muttukrishna *et al.* 1996). Diese Tatsachen sollten durch weitere intensive Untersuchungen geklärt werden. In Bezug auf die Inhibine, konnten die vorbeschriebenen Verläufe anderer Autoren (Groome *et al.* 1994, Groome *et al.* 1995, Groome *et al.* 1996, Knight *et al.* 1996) nachvollzogen werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Synthese der Inhibine supprimiert wird (Suppression von Inhibin Pro  $\alpha$ -C). In geeigneten Studien sollte geklärt werden, in welchem Schritt die Synthese, bzw. welche Enzyme gehemmt werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob zusätzlich noch eine Hemmung der

Ausschüttung der Hormone existiert. Die hier erhobenen Daten zeigten eine große Streubreite auf. Die Probengewinnung wurde standardisiert durchgeführt, um Fehler zu vermeiden. Es muss hier von einer interindividuellen Variabilität der Hormonwerte ausgegangen werden, die diese Streubreite erklärt. Dadurch erreichten einige der statistischen Auswertungen nicht das geforderte Signifikanzniveau. Diese Tatsache könnte durch größere Fallzahlen behoben werden. Dennoch konnte an vielen Stellen (vgl. die Datentabellen im Kapitel 4) schon jetzt eine eindeutige Tendenz erkannt werden. Ein weiteres Problem stellt die Messgenauigkeit der einzelnen Assay Kits dar. Die Inhibine A und B wurden durch die orale Kontrazeption auf ein Niveau unterhalb der Messgenauigkeit dieser Kits supprimiert. Durch Kits mit einer besseren Messgenauigkeit könnte geklärt werden, wie weit die Inhibine tatsächlich supprimiert werden und ob es noch Schwankungen auf niedrigem Niveau gibt.

## **6. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob orale Kontrazeptiva einen Einfluss auf die ovariellen Proteohormone Inhibin A, Inhibin B, Inhibin Pro  $\alpha$ -C und Aktivin A haben. Dazu wurden insgesamt  $n = 18$  gesunde Probandinnen in der reproduktiven Phase ihres Lebens in die Studie aufgenommen. Es wurden zwei Gruppen gebildet mit jeweils  $n = 9$  Probandinnen, wobei die eine Gruppe unter dem Einfluss oraler Kontrazeptiva (1-Phasen-Präparate) stand, und die andere Gruppe einem



spontanen Menstruationszyklus unterlag. Die ausgewerteten Ergebnisse erbrachten folgende Erkenntnisse:

- Es gibt einen signifikanten Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die ovariellen Proteohormone. Durch die Wirkung der geringen Hormondosen (Östrogene/Gestagene) kommt es zur Suppression von Inhibin A, Inhibin B und Inhibin Pro  $\alpha$ -C. Dies geschieht wahrscheinlich indirekt über die Suppression von hFSH. Auf Aktivin A scheinen orale Kontrazeptiva keinen Einfluss auszuüben.
- Das Sekretionsmuster von Aktivin A verändert sich nicht. Es konnten hier keine statistischen Auffälligkeiten erhoben werden. Bei den Inhibinen ändern sich die Sekretionsmuster drastisch. Während Inhibin Pro  $\alpha$ -C auf einem einheitlich niedrigen Niveau gehalten wird, werden die Messwerte von Inhibin A und Inhibin B über den gesamten Zyklus auf ein Niveau unterhalb der Nachweisgrenze supprimiert.
- Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die biologisch aktiven Inhibine (A und B) supprimiert werden, sondern auch das Vorläufermolekül Inhibin Pro  $\alpha$ -C. Aus diesem Grund wird hier gefolgert, dass die oralen Kontrazeptiva nicht nur die Ausschüttung der Inhibine unterdrücken, sondern dass ebenfalls deren Synthese supprimiert wird.

- Es konnte keine klinisch relevante Korrelation zwischen den ovariellen Proteohormonen und hFSH nachgewiesen werden. Statistische Auffälligkeiten konnten durch wenige Extremwerte erklärt werden. Diese wiederum könnten durch die pulsatile Ausschüttung der Gonadotropine bedingt sein.

In weiterführenden Studien sollte der noch ausstehende Signifikanznachweis für die Supprimierung von Inhibin Pro  $\alpha$ -C erbracht werden. Hierfür sind größere Fallzahlen notwendig. Des Weiteren sollte in weiterführenden biochemischen Untersuchungen geklärt werden, an welchem Punkt der Synthese die Produktion der Proteohormone gehemmt wird und ob es gleichzeitig eine Hemmung der Ausschüttung gibt.

## 7. Literaturverzeichnis

Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F. M., Weis, B., Massagué, J., Wrana, J. L. (1993) Identification of human activin and TGF $\beta$  type I receptors that form heterodimeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* **75**: 671-680

Attisano, L., Wrana, J. L., Cheifetz, S., Massagué, J. (1992) Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* **68**: 97-108

Attisano, L., Wrana, J. L., Montalvo, E., Massagué, J. (1996) Activation of signalling by the activin receptor complex. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 1066-1073

Baird, D. T., Glasier, A. (1993) Hormonal contraception. *New England Journal of Medicine* **328**: 1543-1549

Burger, H. G. (1992) Inhibin. *Reproductive Medicine Review* **1**: 1-20

Burger, H. G., Groome, N. P., Robertson, D. M. (1998) Both inhibin A and B respond to exogenous follicle-stimulating hormone in the follicular phase of the human menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**: 4167-4169

Burger, H. G., Igarashi, M. (1988) Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **66**: 885-886

Carcamo, J., Weis, F. M. B., Ventura, F., Weiser, R., Wrana, J. L., Attisano, L., Massagué, J. (1994) Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. Molecular and Cellular Biology **14**: 3810-3821

Casper, F. W., Seufert, R. J., Pollow, K. (2000) Inverse correlation between baseline Inhibin B and FSH after stimulation with GnRH: a study of serum levels of Inhibin A and B, pro alpha-C and activin A in women with ovulatory disturbances before and after stimulation with GnRH. European Journal of Endocrinology **143**: 77-84

Channing, C. P., Gordon, W. L., Liu, W-K., Ward, D.N. (1985) The physiology and biochemistry of ovarian inhibin. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **178**: 339-361

Chapman, S. C., Woodruff, T. K. (2001) Modulation of activin signal transduction by inhibin B and inhibin-binding protein (InhBP). Molecular Endocrinology **15**: 668-679

Chong H., Pangas, S. A., Bernard, D. J., Wang, E., Gitch, J., Chen, W., Draper, L. B., Cox, E. T., Woodruff, T. K. (2000)

Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system. *Endocrinology* **141**: 2600-2607

deKretser, D. M., Robertson, D. M. (1989) The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biology of Reproduction* **40**: 33-47

Draper, L. B., Matzuk, M. M., Roberts, V. J., Cox, E., Weiss, J., Mather, J. P., Woodruff, T. K. (1998) Identification of an inhibin receptor in gonadal tumors from inhibin  $\alpha$ -subunit knockout mice. *The journal of biological chemistry* **273**: 398-403

Ebner, R., Chen, R. H., Lawler, S., Zioncheck, T., Derynck, R. (1993) Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- $\beta$  or activin. *Science* **262**: 900-902

El-Hefnawy, T., Zeleznik, A. J. (2001) Synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin D2 expression in rat granulosa cells. *Endocrinology* **142**: 4357-4362

Esch, F. S., Shimasaki, S., Cooksey, K., Mercado, M., Mason, A. J., Ying, S.-Y., Ueno, N., Ling, N. (1987) Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rat ovarian inhibins. *Molecular Endocrinology* **1**: 388-396

Forage, R. G., Ring, J. W., Brown, R. W., McInerey, B. V., Cobon, G. S., Gregson, R. P., Robertson, D. M., Morgan, F. J.,

Hearn, M. T. W., Findlay, J. K., Wettenhall, R. E. H., Burger, H. G., deKretser, D. M. (1986) Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **83**: 3091-3095

Franchimont, P., Hazee-Hagelstein, M., Jaspar, J., Charlet-Renard, C., Demoulin, A. (1989) Inhibin and related peptides: mechanisms of action and regulation of secretion. The Journal of Steroid Biochemistry **32**: 193-197

Gonzalez-Manchon, C., Vale, W. (1989) Activin A, inhibin and transforming growth factor-beta modulate growth of two gonadal cell lines. Endocrinology **125**: 1666-1672

Groome, N.P., Illingworth, P.J., O'Brien, M., Cookie, I., Ganesan, T. S., Baird, D. T. and McNeilly, A.S. (1994) Detection of Dimeric Inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. Clinical Endocrinology **40**: 717-723

Groome, N.P., Illingworth, P. J., O'Brien, M., Pai, R., Rodger, F. E., Mather, J. P. and McNeilly, A. S. (1996) Measurement of dimeric Inhibin B throughout the human menstrual cycle. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **81(4)**: 1400-1405

Groome, N. P., Illingworth, P. J., O'Brien, M., Priddle, J., Weaver, K. and McNeilly, A. S. (1995) Quantification of

Inhibin Pro  $\alpha$ -C-containing forms in human serum by a new ultra sensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **80**: 2926-2932

Groome, N. P., O'Brien, M. (1993) Immunoassays for inhibin and its subunits. Further application of the synthetic peptide approach. Journal of immunological methods **165**: 167-176

Hayes, F. J., Hall, J. E., Boepple, P. A., Crowley, W. F. Jr. (1998) Differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of Inhibin. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **83**: 1835-1841

Hedger, M. P., Drummond, A. E., Robertson, D. M., Risbridger, G. P., deKretser, D. M. (1989) Inhibin and activin regulate [<sup>3</sup>H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. Molecular and cellular endocrinology **61**: 133-138

Heldin, C. H., Miyazono, K., Ten Dijke, P. (1997) TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature **390**: 465-471

Hertan, R., Farnworth, P. G., Fitzsimmons, K. L., Robertson, D. M. (1999) Identification of high affinity binding sites for inhibin on ovine pituitary cells in culture. Endocrinology **140**: 6-12

Hillier, S. G. (1991) Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *Journal of Endocrinology* **131**: 171-175

Hsueh, A. J. W., Dahl, K. D., Vaughan, J., Tucker, E., Rivier, J., Bardin, C. W., Vale, W. (1987) Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 5082-5086

Hully, J. R., Chang, L., Schwall, R., H., Widmer, H. R., Terrell, T. G., Gillet, N., A. (1994) Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. *Hepatology* **20**: 854-862

Knight, P. G. (1996 a) Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Frontiers in Neuroendocrinology* **17**: 476-509

Knight, P. G., Muttukrishna, S. and Groome, N. P. (1996 b) Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of ,total' activin-A concentrations in serum and follicular fluid. *Journal of Endocrinology* **148**: 267-279

Lambert-Messerlian, G. M., Hall, J. E., Sluss, P. M., et al. (1994) Relatively low levels of dimeric inhibin circulate in men and women with polycystic ovarian syndrome using a



specific two-site enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **79**: 45-50

Lebrun, J. J., Vale, W. (1997) Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the typ I and typ II activin receptors and human erythroid differentiation. Molecular and Cellular Biology **17**: 1682-1691

Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, H., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., Guillemin, R. (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the  $\beta$  subunits of the two forms of inhibin. Nature **321**: 779-782

Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M., Vale, W. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signaling. Nature **404**: 411-414

Lockwood, G. M., Muttukrishna, S., Groome, N. P., Knight, P. G., Ledger, W. L. (1996) Circulating inhibins and activin A during GnRH-analogue down-regulation and ovarian hyperstimulation with recombinant FSH for in vitro fertilisation-embryo transfer. Clinical Endocrinology **45**: 741-748

Luisi, S., Florio, P., Reis, F. M., Petraglia F. (2005) Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. Human Reproductive Update **11**: 123-135

Martens, J. W., de Winter, J. P., Timmerman, M. A., McLuskey, A., van Schaik, R. H. N., Themmen, A. P. N., de Jong, F. H. (1997) Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* **138**: 2928-2936

Mason, A. J., Hayflick, J. S., Ling, N., Esch, F., Hotta, M., Guillemin, R. (1986) Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- $\beta$ . *Nature* **318**: 659-663

Mason, A. J., Niall, H. D., Seeburg, P. H. (1986) Structure of two human ovarian inhibins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **135**: 957-964

Mathews, L. S. (1994) Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocrine Reviews* **15**: 310-325

Mathews, L. S., Vale, W. (1991) Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* **65**: 973-982

Mathews, L. S., Vale, W. (1993) Characterization of type II activin receptors: binding, processing, and phosphorylation. *The journal of biological chemistry* **268**: 19013-19018

Mathews, L. S., Vale, W., Kintner, C. R. (1992) Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in *Xenopus* embryos. *Science* **255**: 1702-1705

Mayo, K. E., Cerelli, G. M., Spiess, J., Rivier, J., Rosenfeld, M. G., Evans, R. M., Vale, W. (1986) Inhibin A-subunit cDNAs from porcine ovary and human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 5849-5853

McCullagh, D. R. (1932) Dual endocrine activity of the testis. *Science* **76**: 19-20

McLachlan, R. I., Robertson, D. M., Healy, D. L., Burger, H. G., deKretser, D. M. (1986) Plasma inhibin levels during gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation for IVF: A new index of follicular function? *Lancet* **1**: 1233-1234

McLachlan, R. I., Robertson, D. M., Healy, D. L., Burger, H. G., deKretser, D. M. (1987 a) Circulating immunoreactive inhibin in the luteal phase and early gestation in women undergoing ovulation induction. *Fertility and Sterility* **48**: 1011-1015

McLachlan, R. I., Robertson, D. M., Healy, D. L., Burger, H. G., deKretser, D. M. (1987 b) Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal menstrual cycle. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* **65**: 954-961

Muttukrishna, S., Fowler, P.A., George, L., Groome, N. P., Knight, P. G. (1996) Changes in peripheral serum levels of total Activin-A during the menstrual cycle and pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **81**: 3328-3334

Muttukrishna, S., Fowler, P. A., Groome, N. P., Mitchell, G. G., Robertson, W. R., Knight, P. G. (1994) Serum concentration of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotropin. *Human Reproduction* **9**: 1634-1642

Petrides, P. E. (1998) Endokrine Gewebe III: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe S. 813-854. In: Löffler, G., Petrides, P. E. (Hrsg.) *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage. Springer Verlag Berlin, Heidelberg und New York

Ramasharma, K., Sairam, M. (1982) Isolation and characterization of inhibin from human seminal plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences* **383**: 307-328

Ramasharma, K., Sairam, M. R., Seidah, N. G., Chretien, M., Yamashiro, D., Li, C. H., Manjunath, P., Schiller, P. W. (1984) Isolation, structure, and synthesis of a human seminal plasma peptide with inhibin-like activity. *Science* **223**: 1199-1202

Sakurai, T., Abe, Y., Kasuya, Y., Takuwa, N., Shiba, R., Yamashita, T., Endo, T., Goto, K. (1994) Activin A stimulates mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts without activation of

mitogen-activated protein kinases. The journal of biological chemistry **269**: 14118-14122

Seidah, N. G., Ramasharma, K., Sairam, M. R., Chretien, M. (1984) Partial amino acid sequence of a human seminal plasma peptide with inhibin-like activity. FEBS Letters **167**: 98-102

Smith, J. C., Price, B. M., van Nimmen, K., Huylebroeck, D. (1990) Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. Nature **345**: 729-731

Ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C. H., Miyazono, K. (1993) Activin receptor like kinases: a novel subclass of cell surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. Oncogene **8**: 2879-2887

Ten Dijke, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Franzen, P., Laiho, M., Miyazono, K., Heldin, C. H. (1994) Characterization of type I receptors for transforming growth factor and activin. Science **264**: 101-104

Tsuchida, K., Mathews, L. S., Vale, W. (1993) Cloning and characterisation of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**: 11242-11246

Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D., Spiess, J. (1986) Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* **321**: 776-779

Vale, W., Rivier, C., Hsueh, A., Campen, C., Meunier, H., Biesak, T. (1988) Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Progress in Hormone Research* **44**: 1-34

Van den Eijnden-Van Raaji, A. J., van Zoelent, E., J., van Nimmen, K., Koster, C. H., Snoek, G. T., Durston, A., J., Huylebroeck, D. (1990) Activin-like factor from a *Xenopus laevis* cell line responsible for mesoderm induction. *Nature* **345**: 732-734

Van Weemen, B. K., Schuurs, A. H. W. M. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **15**: 232-236

Welt, C. K., Martin, K. A., Taylor, A. E., Lambert-Messerlian, G., Crowley, W. F. Jr., Smith, J. A. (1997) Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**: 2645-2652

Welt, C. K. (2002) The physiology and pathophysiology of inhibin, activin and follistatin in female reproduction. *Current Opinions in Obstetrics and Gynecology* **14**: 317-323

Willis, S. A., Zimmerman, C. M., Li, L., Mathews, L. S. (1996) Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Molecular Endocrinology* **10**: 367-379

Woodruff, T. K., Mather, J. P. (1995) Inhibin, Activin and the female reproductive axis. *Annual Reviews of Physiology* **57**: 219-244

Wuttke, K. (2000) Endokrinologie S. 370-407. In: Schmidt, R. F., Thews, G., Lang, F. (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. 28. Auflage. Springer Verlag Berlin, Heidelberg und New York

Xu, J., McKeehan, K., Matsuzaki, K., McKeehan, W. L. (1995) Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *The journal of biological chemistry* **270**: 6308-6313

Ying, S.-Y. (1987) Inhibins and activins: chemical properties and biological activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **186**: 253-264

Yu, J., Shao, L. E., Lemas, V., Yu, A. L., Vaughan, J., Rivier, J., Vale, W. (1987) Importance of FHS-releasing protein and inhibin in erythrodifferentiation. *Nature* **330**: 854-86