

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Spurenelementstatus im Serum und der Follikelflüssigkeit bei
assistierter Reproduktion

Trace element status in serum and follicular fluid in assisted re-
production

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lilly Johanna Schmalbrock

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	4
1.1 Historische und aktuelle Relevanz künstlicher Befruchtung	4
1.2 Definition und Ursachen von Infertilität	4
1.2.1 Definition Infertilität	4
1.2.2 Polyzystisches Ovar Syndrom als Ursache von Infertilität	5
1.3 Herausforderungen reproduktionsmedizinischer Behandlung	5
1.3.1 Selektion des Embryos anhand morphologischer und morphokinetischer Parameter	5
1.3.2 Selektion des Embryos anhand Marker in Follikelflüssigkeit	6
1.4 Spurenelemente und Unfruchtbarkeit	6
1.4.1 Selen, GPX3 und SELENOP in Bezug auf Unfruchtbarkeit	6
1.4.2 Zink und Kupfer in Bezug auf Unfruchtbarkeit	7
1.5 Darstellung der Relevanz und Aufbau der Fragestellung	7
2 Material und Methodik	9
2.1 Studienpopulation	9
2.2 Probengewinnung	9
2.2.1 Gewinnung der Serum-/FF-Proben	9
2.2.2 Befruchtung der Eizellen	11
2.2.3 Inkubation und Lagerung der Embryonen	12
2.3 Bewertung der Eizell-/Embryoqualität	12
2.3.1 Bewertung der Eizell-/Embryoqualität anhand morphologischer Variablen... ..	12

2.3.2	Bewertung der Qualität von Embryonen anhand morphokinetischer Variablen	13
2.4	Methoden zur Spurenelement-, GPX3-, und SELENOP Bestimmung	14
2.4.1	Theorie und Messaufbau der Spurenelementmessung in Serum und FF	14
2.4.2	Durchführung der Spurenelementmessung in Serum und FF	16
2.4.3	Messaufbau und Hintergrund zu GPX3-Aktivität-Messung in Serum und FF	17
2.4.4	Durchführung der GPX3-Aktivität-Messung in Serum und FF	18
2.4.5	Hintergrund zur Funktion von SELENOP	19
2.4.6	Nachweis von SELENOP durch Western Blot in Serum und FF	19
2.5	Statistische Auswertung	19
3	Ergebnisse	21
3.1	Demographische und klinische Faktoren	21
3.2	Spurenelementstatus in Serum und FF	22
3.3	Variabilität des Spurenelementstatus in FF im Vergleich zum entsprechenden Serum	23
3.4	Spurenelementstatus im Verhältnis zu morphokinetischen Variablen	27
3.5	Komplementäre Biomarker des Se-Status in FF und entsprechenden Serumproben	30
3.6	Spurenelementstatus im Zusammenhang mit PCOS	33
4	Diskussion	36
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	36
4.2	Vergleich der PCOS- und Kontroll-Gruppe	37
4.3	Vergleich zwischen Spurenelementkonzentrationen in Serum und FF	38
4.4	Diskussion der Variabilität zwischen den einzelnen FF-Proben	39
4.5	Bezug zwischen Spurenelementkonzentrationen in FF und Eizell-/Embryoqualität	40
4.5.1	Se-Konzentrationen und Biomarker in FF in Bezug zu Eizell-/Embryoqualität	40

4.5.2 Cu- und Zn-Konzentrationen in FF in Bezug zu Eizell-/Embryoqualität	41
4.6 Spurenelementkonzentrationen und morphokinetische Parameter	42
4.7 Modell zur Entstehung der jeweiligen Spurenelementkonzentrationen in FF	44
4.8 Stärken und Schwächen der Studie	45
5 Schlussfolgerungen	48
Literaturverzeichnis	49
Eidesstattliche Versicherung	56
Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen	57
Auszug aus der Journal Summary List	59
Druckexemplar der Publikation	60
Lebenslauf	77
Komplette Publikationsliste	79
Danksagung	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakteristische Sekundärstrahlung ausgewählter Elemente.	15
Tab. 2: Übersicht zu demographischen und klinischen Daten.	22
Tab. 3: Morphokinetische Parameter ECC2/3 und S2/3 in Gruppe 4 und 5.....	27
Tab. 4: Morphokinetische Parameter in der PCOS und Kontroll-Gruppe.	28
Tab. 5: Spurenelementkonzentrationen in FF der PCOS- und Kontroll-Gruppe. ..	35

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Probengewinnung und Behandlungsschema.	10
Abb. 2: Schematische Darstellung der Befruchtungsoptionen.	11
Abb. 3: Klassifizierung der Follikelflüssigkeitsproben.	13
Abb. 4: Überblick über morphokinetische Zeiten.	14
Abb. 5: Übersicht zum Messaufbau der TXRF Analyse.	16
Abb. 6: Schematische Darstellung der Teilschritte des Glutathion-Systems.	18
Abb. 7: Vergleich der Spurenelementkonzentrationen in Serum- und FF.	23
Abb. 8: Spurenelementkonzentrationen im Serum und entsprechenden FF.	24
Abb. 9: Spurenelement-Konzentration in FF im Verhältnis zur Qualität.	26
Abb. 10: Korrelation von Morphokinetik und Spurenelementen in Gruppen 4/5. .	29
Abb. 11: GPX3-Aktivität als komplementärer Se-Biomarker in FF und Serum.	31
Abb. 12: Korrelation Gesamt-Se und GPX3-Aktivität in den Untergruppen.	32
Abb. 13: SELENOP als komplementärer Se-Status-Biomarker in FF und Serum.	33
Abb. 14: Spurenelementkonzentration in Seren der PCOS- und Kontroll-Gruppe.	34
Abb. 15: Schematische Übersicht zu Vorgehen und Fragestellung der Arbeit.	36
Abb. 16: Potenzielle Regulierungsmechanismen der FF-Zusammensetzung.	45

Abkürzungsverzeichnis

IVF	: In-vitro-Fertilisation
ART	: Assisted Reproductive Techniques (Technik der assistieren Reproduktion)
D.I.R.	: Deutsches IVF-Register
WHO	: Weltgesundheitsorganisation
PCOS	: Polyzystisches Ovar Syndrom
ET	: Embryotransfer
TLS	: time-lapse-system (Zeitraffersystem)
FF	: Follikelflüssigkeit
IGF-1	: Insulin-like Growth Factor 1
SCF	: Stem Cell Factor
Se	: Selen
GPX3	: Glutathionperoxidase 3
SELENOP	: Selenoprotein P
ROS	: Reaktive Sauerstoffspezies
TTP	: time-to-pregnancy (Zeit bis zur Schwangerschaft)
Zn	: Zink
Cu	: Kupfer
SOD1	: Superoxid-Dismutase 1
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
RNA	: Ribonukleinsäure
BMI	: Body Mass Index
ICSI	: Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
FSH	: Follikelstimulierendes Hormon
AMH	: Antimüller-Hormon
E2	: Estradiol
GnRH	: Gonadotropin-Releasing-Hormon
hCG	: humanes Choriongonadotropin
ECLIA	: Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
SOP	: Standard Operating Procedure
h	: Stunde
ECC	: Embryonen-Zell-Zyklus
S	: Synchronisationszeit

t	: Zeitpunkt
MW	: Mittelwert
MD/ Δ	: mittlerer Unterschied/Delta
SD	: Standardabweichung
TXRF	: Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz
dH ₂ O	: destilliertes Wasser
GSH	: reduziertes Glutathion
GR	: Glutathionreduktase
GSSG	: oxidiertes Gutathion
NADPH	: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
CV	: coefficient of variation (Variationskoeffizient)
n	: Anzahl
u.a.	: unter anderem
D	: Differenz
keV	: Kiloelektronenvolt
Fe	: Eisen
Ga	: Gallium
Mo	: Molybdän

Zusammenfassung

Das Polyzystisches Ovar Syndrom (PCOS) ist die häufigste Endokrinopathie bei Frauen im reproduktiven Alter, die in 75% mit Infertilität einhergeht. Allein in Europa werden 900.000 Zyklen künstlicher Befruchtung jährlich durchgeführt, wobei die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer weiterhin niedrig ist. Zur Verbesserung der Schwangerschaftsrate erfolgt die Auswahl der Eizelle anhand morphologischer Kriterien.

Während die Relevanz von Spurenelementen für Fertilität gezeigt wurde, ist der Einfluss auf Eizell-/Embryoqualität weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kupfer, Selen und Zink in Follikelflüssigkeiten (FF) als potenzielle Biomarker für Eizell-/Embryoqualität untersucht. Die erweiterte Selenstatusaufnahme mittels Glutathionperoxidase 3 (GPX3) und Selenoprotein-P (SELENOP) stellte einen Schwerpunkt dar. Unsere Hypothese lautete, dass höhere Spurenelementkonzentrationen mit verbesserter Eizell-/Embryoqualität einhergehen.

Hierzu untersuchten wir Proben (n=400 FF; n=40 Serum) von n=40 Frauen, unter Hormontherapie mit anschließender FF- und Eizellgewinnung. Eingeschlossen wurden dabei n=20 Frauen mit PCOS. Zur Qualitätsbeurteilung der Eizellen-/Embryonen wurden Gardner/Schoolcraft-Kriterien verwendet. Die FF der Eizellen-/Embryonen wurden fünf Qualitätsgruppen zugeordnet. Die Spurenelementkonzentrationen in den Proben wurden über Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse ermittelt. Die Probengewinnung erlaubte die Spurenelementkonzentrationen der einzelnen FF mit jeweils zugehörigen Serumproben zu vergleichen. Zur Berechnung der Konzentrationsdifferenzen der Spurenelemente zwischen den verschiedenen FF, wurden die Spurenelementkonzentrationen in Gruppe 1 (Follikel ohne Eizelle) als Basiswert verwendet und Konzentrationsdifferenzen zwischen FF der Gruppen 2 bis 5 abzüglich Gruppe 1 berechnet.

Über alle Proben hinweg zeigten sich niedrigere Spurenelementkonzentrationen in FF verglichen mit Serum. Der direkte Vergleich der bis zu n=10 FF pro Frau zeigte deutliche Konzentrationsschwankungen zwischen den Proben. Es konnte eine Tendenz zu niedrigeren Spurenelementkonzentrationen in FF der niedrigsten Qualitätskategorie festgestellt werden, sowie kürzere Synchronisationszeiten der Embryonen höchster Qualität. Es zeigten sich keine starken Unterschiede bezüglich der Spurenelementverteilung zwischen der PCOS- und Kontroll-Gruppe. GPX3 und SELENOP waren in FF nachweisbar und korrelierten positiv mit Selen.

Da FF mit der schlechtesten Qualität tendenziell niedrigere Spurenelementkonzentrationen aufwiesen, kommen wir zu dem Ergebnis, dass ein Spurenelementmangel unter reproduktionsmedizinischer Therapie mit einer schlechteren Eizell-/Embryoqualität assoziiert sein könnte. Die intraindividuellen Variationen weisen, neben der Beeinflussung durch Serumkonzentrationen, auf eine individuelle Feinabstimmung je Follikel hin. Die Arbeit könnte von unmittelbarer Bedeutung für die optimierte Auswahl einer Eizelle sein.

Abstract

In Europe, 900,000 IVF cycles are performed per year, reflecting the high demand for assisted reproduction. Infertility affects around 72 million couples worldwide. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy in women of reproductive age and is associated with infertility in 75%. The pregnancy rate per embryo transfer is low at 27-58%. A key factor in improving pregnancy rate is the selection of the oocyte/embryo, which is based on morphological and morphokinetic criteria. While the relevance of trace elements for fertility has been shown, the influence on oocyte/embryo quality is still unknown.

In this present study copper, selenium, and zinc in follicular fluid (FF) were investigated as potential biomarkers for oocyte/embryo quality. The determination of the selenium status incorporated three complementary biomarkers: selen, glutathione peroxidase (GPX3) and selenoprotein-P (SELENOP). Our hypothesis is that higher trace element concentrations are associated with improved oocyte/embryo quality.

To this end, we analyzed samples (n=400 FF; n=40 serum) from n=40 women undergoing hormone stimulation therapy followed by FF and oocyte retrieval. Included were n=20 women with PCOS. Gardner/Schoolcraft criteria were used to assess oocyte/embryo quality. The FF of the oocytes/embryos were assigned to five groups. Trace element concentrations in the samples were determined using total reflection X-ray fluorescence. The sample collection allowed to compare the trace element concentrations of the individual FF with respective serum samples. We considered the differences of the FF samples within a woman. To calculate the differences in trace element concentrations between the different FF samples, the trace element concentrations in group 1 (follicle

without oocyte) were used as a baseline value and concentration differences between FF of groups 2 to 5 minus group 1 were calculated.

Within the whole cohort, lower concentrations of trace elements were found in FF compared to serum. The direct comparison of up to n=10 FF per woman showed strong variations in the concentration of trace elements between the samples. A tendency towards lower trace element concentrations in FF of the lowest quality category was observed, as well as shorter synchronization times of the highest quality embryos. There were no strong differences in trace element distribution between the PCOS and control groups. GPX3 and SELENOP were detectable in FF and correlated with selenium.

Since FF with the poorest quality tended to have the lowest trace element concentrations, we conclude that trace element deficiency under reproductive medicine therapy may be associated with poorer oocyte/embryo quality. The intraindividual variations indicate, besides influences of serum concentrations, an individual fine-tuning in single follicles. The results could be of direct relevance for the optimized selection of an oocyte. Larger studies are needed to confirm the assumptions.

1 Einleitung

1.1 Historische und aktuelle Relevanz künstlicher Befruchtung

Die Möglichkeit zur extrakorporalen Befruchtung zählt mit zu den bemerkenswertesten medizinischen Durchbrüchen des 20. Jahrhunderts ¹. Dieser Fortschritt schenkte im Jahr 1978 Louise Brown nach erfolgreicher extrakorporaler Befruchtung mittels In-vitro-Fertilisation (IVF) als erstes „IVF-Baby“ ein Leben, und legte als Technik der assistierten Reproduktion (assisted reproductive techniques, ART) den Grundbaustein neuer Behandlungsmethoden für Familien mit unerfülltem Kinderwunsch ^{1, 2}.

Auch populärwissenschaftlich wird das Thema der künstlichen Befruchtung kontrovers diskutiert ². Die Kontroversen im Hinblick auf den moralischen Status des menschlichen Embryos sowie zu ethischen Grundsätzen in der ART-Praxis schlagen sich bis heute in einer breiten gesetzlichen Regulierung mit erheblichen internationalen Divergenzen nieder ²⁻⁴. Unabhängig davon ist die Nachfrage nach ART heute weiterhin groß. Laut dem Jahresbericht des Deutschen IVF Register (D.I.R.) von 2019 werden alleine in Europa pro Jahr über 900.000 IVF-Zyklen durchgeführt und etwa 200.000 Kinder nach außerkörperlicher Befruchtung geboren ⁵.

1.2 Definition und Ursachen von Infertilität

1.2.1 Definition Infertilität

Weltweit leiden rund 48 bis 72 Millionen Paare unter Infertilität ^{6, 7}. Infertilität beschreibt laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) „*die Unfähigkeit eines Paares, innerhalb 12 Monate, trotz regelmäßigen und ungeschützten Geschlechtsverkehrs eine Schwangerschaft zu erzielen*“ ⁸. Die Ursachen für Infertilität sind vielfältig. Bei Männern zählen Infektionen (z.B. Chlamydien), Entzündung von Hoden, Nebenhoden und Prostata, Operation, zystische Fibrose und anderen angeborenen anatomischen oder genetischen Varianten zu den häufigen Ursachen für Infertilität ⁹. Bei Frauen können Störungen der Eizellreifung (primäre oder sekundäre Ovarialinsuffizienz), Tubenfunktionsstörungen, sowie Veränderungen der Gebärmutter ursächlich sein ⁶.

1.2.2 Polyzystisches Ovar Syndrom als Ursache von Infertilität

Eine der häufigsten Ursachen für Infertilität von Frauen im gebärfähigen Alter ist das Polyzystische Ovar Syndrom (PCOS). Rund 75% der Frauen mit PCOS leiden unter Infertilität^{10, 11}. Die Diagnosestellung erfolgt bei Vorliegen von mindestens zwei der drei sogenannten Rotterdam-Kriterien, welche wie folgt definiert sind: 1.) Oligo- und/oder Anovulation, 2.) klinische und/oder biochemische Anzeichen von Hyperandrogenämie, 3.) sonographisch darstellbare polyzystische Ovarien¹².

Die Pathophysiologie des PCOS ist bisher nur teilweise verstanden. Als mögliche Ursachen werden unterschwellige Inflammation und eine periphere Insulinresistenz, welche häufig mit Übergewicht assoziiert ist, diskutiert^{11, 12}. Bezogen auf Infertilität bei PCOS gibt es Hinweise, dass sich Anpassungen des Lebensstiles wie Gewichtsreduktion bei Übergewicht vorteilig auf den Erfolg der reproduktionsmedizinischen Behandlung auswirken¹³.

1.3 Herausforderungen reproduktionsmedizinischer Behandlung

Während die Nachfrage nach künstlicher Befruchtung weiter steigt, bleibt die Erfolgsrate auf eine Lebendgeburt mit 27 - 58% pro Embryotransfer (ET) weiterhin niedrig^{14, 15}. Zur Verbesserung der Erfolgsraten wurden u.a die Abläufe zur Auswahl und Lagerung eines geeigneten Embryos optimiert¹.

1.3.1 Selektion des Embryos anhand morphologischer und morphokinetischer Parameter

Die Auswahl der zu befruchtenden Eizelle erfolgt traditionell anhand der mikroskopischen Auswertung morphologischer Parameter zu vordefinierten Zeitpunkten nach den Gardner-Schoolcraft-Kriterien¹⁶ und stellt den aktuellen Goldstandard dar. Das Zeitraffer-system (time-lapse-system, TLS) ist eine neuere Technologie, die eine nahezu kontinuierliche Beobachtung der Blastomer- und Embryonalentwicklung ermöglicht¹⁷. Die erfassten Zeitpunkte und Zeitintervalle werden als morphokinetische Parameter bezeichnet^{18, 19}. Beide Parameter sollen die Qualität einer Eizelle bewerten und werden herangezogen, um die Ergebnisse der ART zu verbessern. Der Stellenwert der Morphokinetik gegenüber der Morphologie in der Eizellbewertung ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussionen^{20, 21}. Bisher konnte kein einzelner Parameter identifiziert werden, der den zukünftigen Erfolg eines Embryos auf eine erfolgreiche Schwangerschaft mit Sicherheit vorhersagen kann²¹.

1.3.2 Selektion des Embryos anhand Marker in Follikelflüssigkeit

Neben der Morphologie und Morphokinetik der Eizelle ist die Untersuchung der Follikelflüssigkeit (FF) und deren Komponenten Gegenstand aktueller Forschung. Die FF umgibt die Eizelle und bildet eine spezielle Mikroumgebung für die Reifung und Entwicklung der Eizelle sowie des späteren Embryos²². Die FF setzt sich aus Plasmaexsudat sowie sekretorischen Produkten von Granulosa- und Thekazellen zusammen²³. Es wird angenommen, dass Veränderung in den Komponenten der FF sowohl die Qualität der Eizelle von der Reifung bis zur Befruchtung, als auch die frühere Embryonalentwicklung und die anschließende Schwangerschaft beeinflussen können²⁴. Unter anderem wurden Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), Peroxiredoxin 4, stem cell factor (SCF) und Laktoferrin als potenzielle Biomarker in FF hinsichtlich der Eizellqualität und Schwangerschaftserfolg diskutiert²⁵⁻²⁸. Im Sinne einer translationalen Forschung konnte sich bisher kein Marker im klinischen Alltag etablieren.

1.4 Spurenelemente und Unfruchtbarkeit

1.4.1 Selen, GPX3 und SELENOP in Bezug auf Unfruchtbarkeit

In mehreren Studien wurde die Rolle von Spurenelementen in Bezug auf männliche und weibliche Fruchtbarkeit sowie Unfruchtbarkeit unterstrichen²⁹⁻³³. Insbesondere Selen (Se) und Se-enthaltenden Proteine, wie die sekretierte Glutathionperoxidase (GPX3) oder Selenoprotein P (SELENOP), sind u.a aufgrund ihrer antioxidativen Funktion, welche die Zellen vor durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bedingte DNA- oder Zellmembranschäden schützt, an der Aufrechterhaltung von Abläufen innerhalb des Fortpflanzungssystems beteiligt^{30, 31, 34, 35}. Beispielsweise wurde eine niedrige Se-Konzentration im Serum als Risikofaktor für Schwangerschaftskomplikationen beschrieben und mit einer längeren Zeit bis zur Schwangerschaft (time-to-pregnancy TTP) in Verbindung gebracht^{36, 37}. Zudem wurde eine niedrigere Se-Konzentration in FF von Frauen mit ungeklärter Unfruchtbarkeit beschrieben³⁵.

Bezogen auf Erkenntnisse in der Reproduktionsmedizin zeigte eine Studie von Wu et al., 2020, dass höhere Se-Werte in der Samenflüssigkeit mit einer höheren Schwangerschafts- und Lebendgeburtsrate assoziiert waren³⁸. Auch waren bei Frauen höhere Serum-Se-Konzentrationen positiv mit der Blastozystenentwicklung assoziiert, wohingegen

sich negative Assoziationen zwischen höheren Se-Konzentrationen in FF und der frühen Embryoentwicklung zeigten³⁸. In einer Studie von Wdowiak et al., 2017 konnte hingegen gezeigt werden, dass Frauen unter ART mit nachfolgend erfolgreicher Schwangerschaft vergleichen zu Frauen ohne nachfolgende Schwangerschaft höhere Se-Konzentrationen in FF aufwiesen³⁹.

1.4.2 Zink und Kupfer in Bezug auf Unfruchtbarkeit

Neben Se wurde die Rolle von Zink (Zn) und Kupfer (Cu) in der Reproduktionsphysiologie bezogen auf weibliche und männliche Unfruchtbarkeit diskutiert⁴⁰⁻⁴². Zn und Cu sind ebenfalls an der Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts beteiligt, hauptsächlich durch die Superoxid-Dismutase (SOD1)⁴³. Darüber hinaus wurde für Zn eine wichtige Rolle im Fortpflanzungssystem in Bezug auf seine physiologische Rolle bei der Zelldifferenzierung, Protein-, Desoxyribonukleinsäure (DNA)- und Ribonukleinsäure (RNA)-Synthese sowie im Rahmen von Entzündungen und der Immunabwehr beschrieben^{40, 44, 45}. Zn-Mangel konnte im Zusammenhang mit Störungen des männlichen und weiblichen Fortpflanzungssystems in Verbindung gebracht werden^{40, 46}. Cu ist physiologisch an Prozessen der Angiogenese und der Hämatopoese sowie Entzündungen und Immunabwehr beteiligt^{42, 47, 48}. Bereits 1984 berichteten Kiilholma et al. von niedrigeren Cu-Konzentrationen im Serum von Frauen mit vorzeitiger Entbindung⁴⁹.

Bezogen auf den Stellenwert in der Reproduktionsmedizin zeigten Kumar et al., 2018 einen Zusammenhang zwischen erhöhten Zn-Konzentrationen in FF von Follikeln, bei denen nachfolgend ein ET möglich war⁵⁰. Ingle et al., 2017 hingegen assoziierten höhere Zn-Konzentrationen mit einem geringeren Anteil befruchtete Eizellen und höhere Cu-Konzentrationen in FF mit einer besseren Eizell-/Embryoqualität⁵¹.

1.5 Darstellung der Relevanz und Aufbau der Fragestellung

Während die Auswirkungen eines Spurenelementmangels auf die Spermatogenese und die Eigenschaften der Spermien eingehend untersucht wurden⁵²⁻⁵⁴, sind die Wechselwirkungen dieser essenziellen Mikronährstoffe mit dem Follikel und der Eizellreifung nur unzureichend erforscht. Dies gilt besonders für ihren Stellenwert bei der Embryonenauswahl zum Zeitpunkt der Follikelpunktion im Rahmen einer ART, insbesondere im Zusammenhang mit PCOS.

In der vorliegenden Arbeit soll der Zusammenhang zwischen den Spurenelementen Cu, Se, und Zn und Eizell-/Embryoqualität als potenzieller Biomarker zur Auswahl eines geeigneten Embryos in der Reproduktionsmedizin untersucht werden. In der hypothesengenerierenden Arbeit wurden dazu die Spurenelementkonzentrationen von Cu, Se und Zn in FF und Serum von Frauen mit und ohne PCOS, die sich einer reproduktionsmedizinischen Therapie unterzogen, bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit etablierten morphologischen und morphokinetischen Parametern der Eizell-/Embryoqualität verglichen. Die vergleichende Analyse erlaubte es, die Hypothese zu überprüfen, ob Zn, Se und Cu-Konzentrationen im Serum und in den FF mit Qualitätsmerkmalen einer Eizelle korrelieren. Hierbei stellte die umfängliche Erfassung des Se Status durch Bestimmung drei komplementärer Biomarker (Se, GPX3, SELENOP) einen Schwerpunkt der Arbeit dar, welcher in den bisherigen Studien nur teilweise erfasst wurde.

Die Arbeit trägt damit zu einem besseren Verständnis der Rolle von Spurenelementen auf Eizell-/Embryoqualität bei und könnten deshalb von unmittelbarer Bedeutung für die optimierte Auswahl einer geeigneten Eizelle für die Befruchtung und später Reimplantation sein.

2 Material und Methodik

2.1 Studienpopulation

Die in dieser Studie eingeschlossenen Seren und FF stammen von Frauen, die sich einer ART am Kinderwunsch Institut Schenk GmbH in Dobl, Österreich, unterzogen haben. Die Frauen gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben für spätere retrospektive wissenschaftliche Analysen. Weiterhin wurde die Entnahme und Untersuchung von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt (Genehmigung Nr. 20-492 ex08/09). Die Studienkohorte setzte sich aus n=20 Frauen mit PCOS (PCOS-Gruppe) und n=20 Frauen mit nicht PCOS assoziierter Infertilität (Kontroll-Gruppe) zusammen. Das PCOS wurde anhand der Rotterdam-Kriterien diagnostiziert¹².

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme waren n=15 Frauen der PCOS-Gruppe und n=8 Frauen der Kontroll-Gruppe als primär infertil diagnostiziert. Eine vorangegangene Schwangerschaft oder die Unfruchtbarkeit des männlichen Partners stellten kein Ausschlusskriterium dar. Als klinische Parameter wurden Alter, Body Mass Index (BMI) und Raucheranamnese erfasst und zwischen der PCOS und Kontroll-Gruppe verglichen. Zudem wurden Angabe über die verwendete ART-Methode, intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) oder IVF, sowie Angaben zu Gewicht und Größe der Neugeborenen, welche innerhalb dieses reproduktionsmedizinischen Zyklus geboren wurden, betrachtet. Auch die Serumkonzentrationen der Hormone follikelstimulierende Hormon (FSH), Antimüller-Hormon (AMH) und Estradiol (E2) wurden dokumentiert.

2.2 Probengewinnung

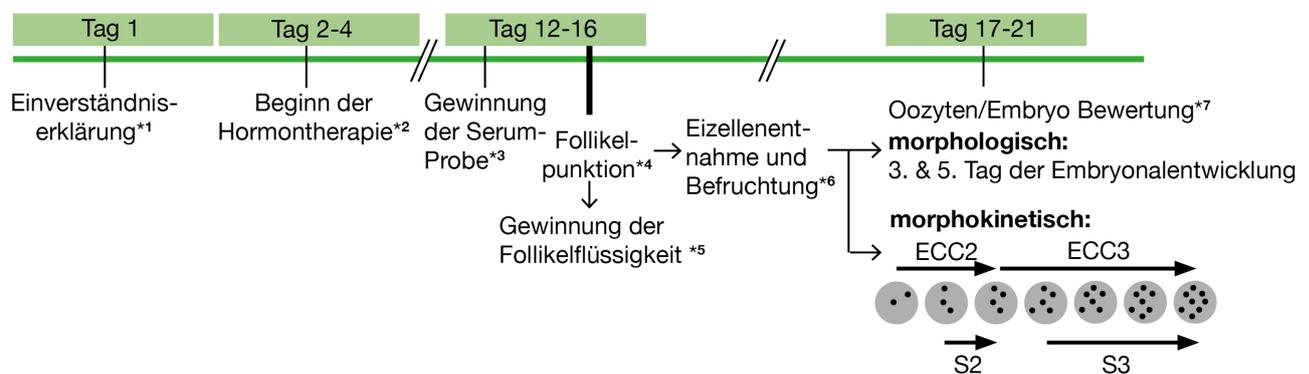
2.2.1 Gewinnung der Serum-/FF-Proben

Alle Proben wurden nach einem standardisierten Zeitplan entnommen und in der Biobank Graz der Medizinischen Universität Graz, Österreich hinterlegt (**Abb.1**)⁵⁵. Nach informierter Zustimmung wurde die Hormonbehandlung zwischen dem zweiten und vierten Tag gemäß einem Antagonisten Protokoll durchgeführt. Das Protokoll besteht aus einer FSH-Stimulation ab Tag zwei bis drei des Menstruationszyklus und der zusätzlichen Anwendung eines Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) Antagonisten ab Tag fünf bis sechs. Der Eisprung wurde 35 Stunden vor der Punktion durch Injektion von 5.000-10.000 IU humanem Choriongonadotropin (hCG) (Pregnyl, Merck Sharp & Dohme

Ges.m.b.H., Wien, Österreich) ausgelöst. Am Tag der Follikelpunktion (Tag 12 bis 16, **Abb. 1**), wurde 30 Minuten vor dem Eingriff eine Blutprobe entnommen und in den Seren die Konzentrationen von AMH, E2 und FSH mittels vollautomatischem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) quantitativ bestimmt⁵⁶. Die Follikel (Follikeldurchmesser mind. >15 mm) wurden unter Ultraschallsicht transvaginal punktiert und die Eizellen daraus entnommen. Für Punktion und Spülung wurde eine Steiner-TAN-Nadel verwendet, um die Sammlung einzelner FF zu gewährleisten. FF und Spülmedium wurden für jeden punktierten Follikel einzeln gesammelt. Von jeder Probandin, wurden jeweils zehn FF aus demselben Zyklus der Eizellstimulation aufbewahrt.⁵⁵

Abb. 1: Probengewinnung und Behandlungsschema.

Die Rekrutierung der Frauen erfolgte einen Tag vor Beginn der Hormonbehandlung (Tag 1). Eine



*¹ beinhaltet: Aufklärungsgespräch, Aufklärungsbogen, und Unterschrift

*² Protokoll zur kontrollierten ovariellen Hyperstimulation (COH): Follikelstimulierende Hormon & Gonadotropin-Releasing Hormon Antagonist (FSH; GnRH-Antagonist), humane Choriongonadotropin (hCG) ausgelöste Ovulation 35 Stunden vor Follikelpunktion

*³ Serumprobe wurde 30 Minuten vor Follikelpunktion entnommen

*⁴ mittels transvaginaler, ultraschallgesteuerter Follikelpunktion

*⁵ getrennte Sammlung von FF und Spülmedium, für jeden punktierten Follikel einzeln, getrennte Lagerung in Biobank ; Medium für retrospektiv erfolgte Spurenelementmessungen

*⁶ Aufbewahrung der Eizellen in beschrifteten Fünf-Well-Kulturschalen, wobei jede Eizelle einzeln behandelt wird, um eine genaue Verfolgung der jeweiligen Eizelle zu ermöglichen; Befruchtung (IVF oder ICSI) 1-4 Stunden nach Eizellenentnahme

*⁷ Embryonen wurden in time-lapse Systemen(Embryoskop) kultiviert und anhand ihrer Morphologie (am 3. und 5. Tag der Embryonalentwicklung) und Morphokinetik (ECC2/3; S2/3) bewertet

Serumprobe wurde pro Frau vor der Follikelpunktion und der Gewinnung der FF abgenommen (Tag 12-16). Die Eizellen und Embryonen wurden anhand ihrer morphologischen Merkmale beurteilt und morphokinetische Parameter erfasst (Tag 17-21). ECC=Embryonen-Zell-Zyklus, S= Synchronisation innerhalb der ECC. Mit *¹⁻⁷ sind zusätzliche Informationen zu dem jeweiligen Arbeitsschritt angegeben. Abbildung angelehnt an Schmalbrock et. al., 2021⁵⁷.

2.2.2 Befruchtung der Eizellen

Die Befruchtung erfolgte je nach Entwicklungsstand der Eizelle ein bis vier Stunden nach der Entnahme mittels IVF oder ICSI (**Abb.2**)⁵⁵. Im Rahmen der klassischen IVF kommt es durch Ko-Inkubation von Spermien und Eizelle zu einer Eizellbefruchtung. Bei der ICSI-Methode wird mittels Mikronadel ein Spermium direkt in das Zytoplasma der Eizelle injiziert⁵⁸. Ursprünglich beschränkte sich die Indikation zur ICSI-Therapie auf männliche Infertilität mit suboptimaler Spermienqualität⁵⁹. Ein Überprüfen auf erfolgreiche Befruchtung erfolgte nach 16-18 Stunden. Nach durchgeführter Befruchtung wurden die Embryonen in einem Universalnährmedium drei bis fünf Tage kultiviert⁵⁵.

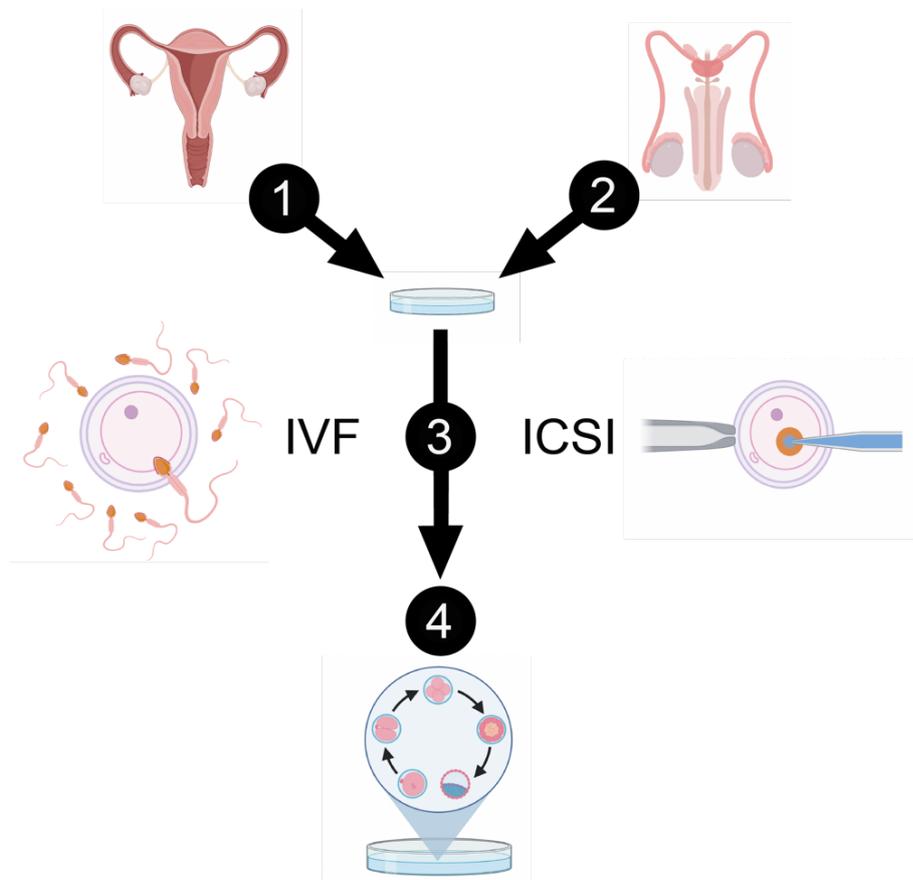


Abb. 2: Schematische Darstellung der Befruchtungsoptionen.

Schema einer In-vitro-Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). 1) + 2) Gewinnung von Eizellen und Spermien. 3) Befruchtung mittels IVF oder ICSI. 4) Reifung des Embryos und Embryonentransfer in den Uterus. Abb. 2 selbst erstellt mit Biorender free version.

2.2.3 Inkubation und Lagerung der Embryonen

Nach der Befruchtung wurden die Embryonen in einem Embryoskop-Zeitraffer-Inkubator (Vitrolife AB, Göteborg, Schweden) unter stabilen Bedingungen kultiviert. Die Zeitrafferaufnahmen wurden in Abständen von 15 Minuten durchgeführt und die morpho-kinetischen Parameter der Embryonalentwicklung gemäß Ciray et al., 2014 benannt ¹⁹. Am dritten oder fünften Tag der Embryonalentwicklung erfolgte der ET oder Kryokonservierung. Ein Schwangerschaftstest wurde 10 Tage nach erfolgtem ET durchgeführt. Die Vorbereitung und Verarbeitung der Proben erfolgte nach standardisierter Vorgehensweise (Standard Operating Procedure, SOP) nach Schenk et al., 2017 ⁵⁵.

2.3 Bewertung der Eizell-/Embryoqualität

2.3.1 Bewertung der Eizell-/Embryoqualität anhand morphologischer Variablen

Die entnommene FF wurde auf das Vorhandensein einer Oozyte untersucht, die vorhandenen Eizellen wurden entnommen und befruchtet. Am dritten Tag der Embryonalentwicklung wurde die Qualität des Embryos anhand der Anzahl, der Symmetrie sowie des Fragmentierungsgrades der Zellen bewertet ¹⁶. Am fünften Tag der Embryonalentwicklung wurde die Ausdehnung der Blastozyste, die Qualität der inneren Zellmasse (ICM), sowie die Qualität des Trophoektoderms bestimmt ¹⁶. Anhand dieser Merkmale wurden die FF in fünf Gruppen unterteilt, welche die Qualität der Eizelle und später Embryo widerspiegeln (**Abb. 3**). Insgesamt wurden n=70 FF ausgeschlossen, da sie mehr als einer Eizelle beinhalteten und keine eindeutige Zuordnung zu einer Gruppe möglich war.

A)

-  1) FF ohne Oocyte
-  2) FF mit Oocyte, degeneriert vor Befruchtung
-  3) FF mit Oocyte, nicht befruchtbar
-  4) FF mit Oocyte, degeneriert nach Befruchtung
-  5) FF mit Oocyte befruchtet, Embryo transferiert

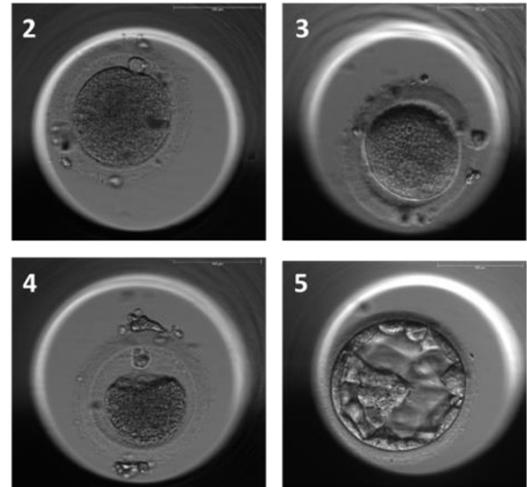
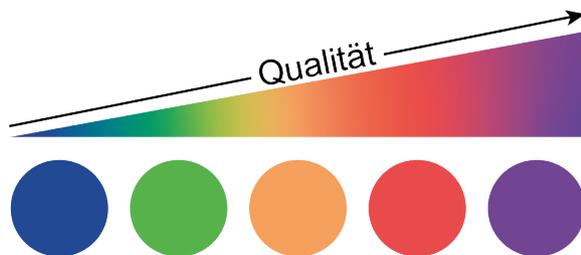
**B)**

Abb. 3: Klassifizierung der Follikelflüssigkeitsproben.

A) Die FF wurden nach der Eizellen-/Embryomorphologie in 5 Gruppen unterteilt: 1) FF ohne Eizelle; 2) FF mit vor der Befruchtung degenerierten oder verworfenen Eizelle; 3) FF mit nicht-befruchtbarer Eizelle; 4) FF mit nach der Befruchtung degenerierten Eizelle; 5) FF mit Embryo für ET oder Kryokonservierung. Auf der rechten Seite sind für die jeweilige Untergruppe mit Oocyte (2-5) repräsentative histologische Bilder von Eizellen der Gruppe 2 bis 4, sowie die Abbildung einer Blastozyste als Beispiel für Gruppe 5 abgebildet. **B)** Qualität der Gruppen in aufsteigender Sortierung. Abb. 3 modifiziert aus Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

2.3.2 Bewertung der Qualität von Embryonen anhand morphokinetischer Variablen

Ergänzend zur morphologischen Bewertung der Embryonen wurden morphokinetische Parameter mithilfe TLS erfasst. In der frühen Embryonalentwicklung durchlaufen die Blastomere eine gleichmäßige Zellteilung. Daraus ergeben sich die Zellstadien 1 – 2 – 4 – 8 – 16 und die darauf quadratisch folgenden Stadien. Die Zeitdauer, in der sich die Anzahl der Blastomere jeweils verdoppelt wird als Embryozellzyklen (ECC) beschrieben. T_n beschreibt hierbei den gemessenen Zeitpunkt (t) an dem die jeweilige Zellanzahl (n) das erste Mal klar abgrenzbar ist. ECC2 beschreibt beispielsweise die Dauer des zweiten

Zellzyklus, der zu einer Verdoppelung von zwei auf vier Zellen führt (t_4-t_2). Zusätzlich wurden die Synchronisationszeiten (S), welche die Zeiten zwischen dem Erreichen der nächsten geometrischen Sequenz beschreiben, berechnet. S2 ist die Synchronisationszeit (t_4-t_3) der Schwestern-Blastomere-Teilung innerhalb ECC2. Dazu analog werden die folgenden ECC und S berechnet (**Abb. 4**)¹⁹. Besonders die frühen Zellspaltungszeiten t_1-t_8 und die daraus berechenbaren Zeitintervalle ECC2/3 und S2/3 wurden in Studien als potenzielle Vorhersagemarker der Embryoqualität hervorgehoben^{18, 60-67}. In dieser Studie wählten wir analog dazu und im gemeinsamen Konsens mit den Embryolog:innen der Kinderwunschklinik Dobl ECC2/3 und S2/3 als Zeitpunkte der Beurteilung.

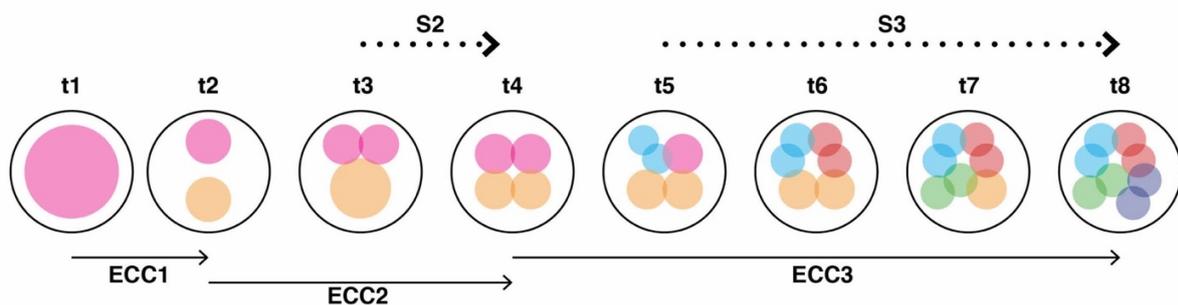


Abb. 4: Überblick über morphokinetische Zeiten.

T_n sind die Messpunkte, an denen die jeweilige Zellzahl (n) erstmals abgrenzbar ist. Die Embryozellzyklen (ECC) geben die Zeitdauer an, die benötigt wird, um die quadratischen Zellstadien zu erreichen. Die Synchronisationszeiten (S) geben die Zeitdauer zwischen der Zellverdopplung an. Abb. 4 selbst erstellt und modifiziert nach Ciray et al., 2014¹⁹.

2.4 Methoden zur Spurenelement-, GPX3-, und SELENOP Bestimmung

2.4.1 Theorie und Messaufbau der Spurenelementmessung in Serum und FF

Die Se-, Cu- und Zn-Konzentrationen wurden mittels Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) unter Verwendung des T-Stars (Bruker nano GmbH, Berlin, Deutschland) in Serum- und FF-Proben bestimmt⁶⁸. Alle Messungen erfolgten mindestens als Duplikate. Die Funktionsweise des TXRF beruht auf dem physikalischen Prinzip der charakteristischen Röntgenstrahlung einzelner Elemente, dem so genannten Linienspektrum. Die Röntgenröhre stellt eine Molybdänlampe (Anode), welche die Röntgenstrahlung emittiert, die in sehr kleinem Winkel auf den Probenträger trifft. Da nur wenige μL der Probe auf dem Träger aufgetragen sind und der Einstrahlungswinkel sehr niedrig ist, wird die Erregungsstrahlung nahezu vollständig vom Probenträger reflektiert (Total-

reflexion). Die in der Probe enthaltenen Elemente werden durch den Energieeintrag angeregt und können ihrerseits Licht emittieren. Die Wellenlänge der Sekundärstrahlung ist abhängig vom Aufbau des Elements und ist aus diesem Grund für jedes Element charakteristisch (**Tab. 1**)^{69, 70}.

Tab. 1: Charakteristische Sekundärstrahlung ausgewählter Elemente.

Element	K α 1 Strahlung (keV)
Fe	6,40
Cu	8,05
Zn	8,64
Ga	9,25
Se	11,22
Mo	17,48

keV= Kiloelektronenvolt; Fe = Eisen; Cu = Kupfer; Zn = Zink; Ga = Gallium; Se = Selen; Mo = Molybdän modifiziert nach: X-Ray Data Booklet Table 1-2. Photon energies, in electron volts, of principal K-, L-, and M-shell emission lines⁷¹.

Die Intensität der Röntgenstrahlung, abgebildet als Fläche unter dem Fluoreszenzpeaks innerhalb des Spektrums, ist eine Näherung proportional zur Konzentration des Spurenelements. Zur Quantifizierung der Messergebnisse wird zu den Proben das Element Gallium in bekannter Konzentration hinzugegeben (**Abb.5**). Um die jeweilige Konzentration des jeweiligen Elements zu erhalten, wird die Fläche unterhalb des Spektrums auf die Fläche des Gallium-Standards bezogen (**Abb.5**)⁶⁸⁻⁷⁰.

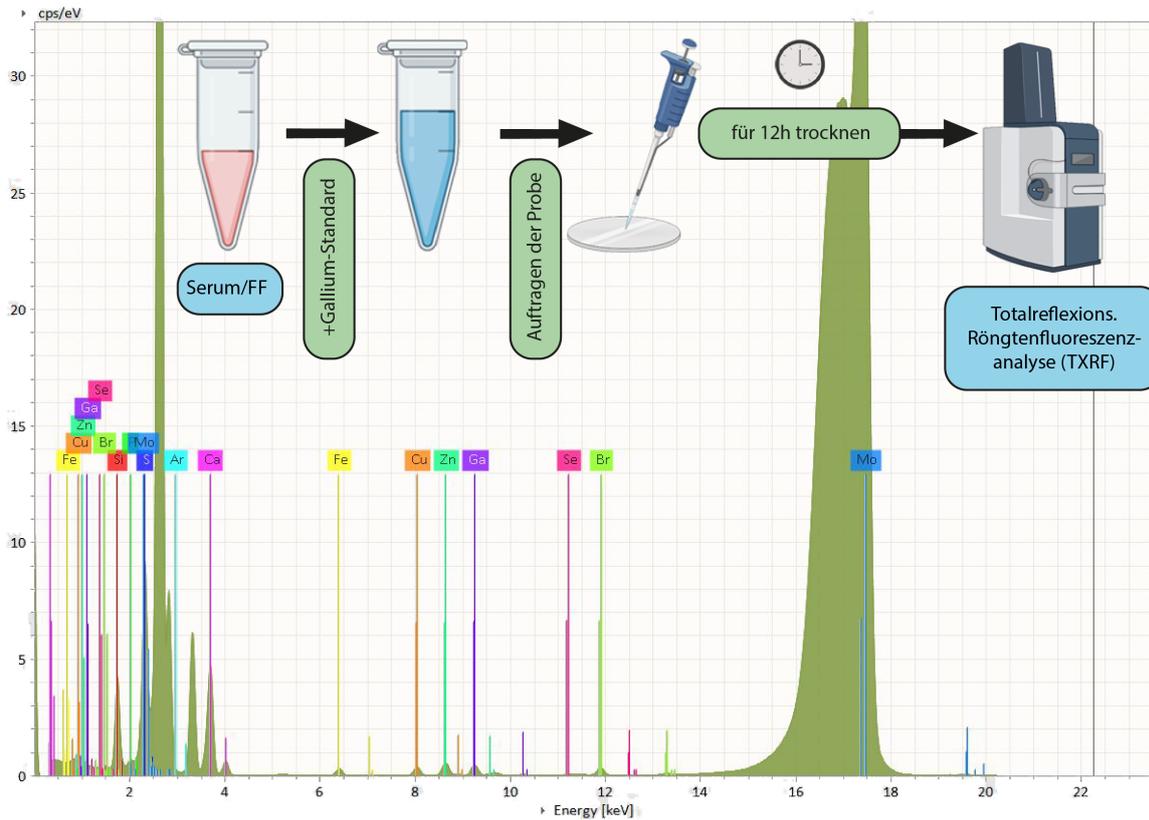


Abb. 5: Übersicht zum Messaufbau der TXRF-Analyse.

Ausgangsmaterial der Messungen sind Seren und FF der in die Studie eingeschlossenen Frauen. Die Schritte der TXRF-Analyse umfassen: 1.) Zugabe eines internen Gallium-Standards zu den Proben; 2.) Pipettieren der Proben auf Quarz-Glasplättchen; 3.) 12 h Trocknen der Proben; 4.) Spurenelementmessung mittels TXRF; 5.) Ableitung der Konzentrationen anhand der abgebildeten Spektren jeweils in Bezug zur bekannten Menge des Gallium-Standards. Abb. 5 selbst erstellt mit biorender free version.

2.4.2 Durchführung der Spurenelementmessung in Serum und FF

Es wurden 10 μL der Serum- oder FF-Probe mit einem gleichen Volumen eines Galliumstandards (1000 $\mu\text{g/L}$) verdünnt und gründlich gemischt. 8 μL der Verdünnung wurden auf polierte Quarzglassträger aufgetragen und über Nacht bei 37° getrocknet (**Abb.5**)⁶⁸. Alle Glassträger wurden vor jedem Gebrauch gereinigt, um Messergebnisse nicht zu verfälschen. Dies umfasste das Einweichen in destilliertem Wasser (dH_2O), ein 30% Acetonbad für 2 min bei 700 Umdrehungen pro Minute, Abdampfen für 30 min, Salpetersäurebad für eine Stunde bei 70°C und dreimaliges Waschen mit dH_2O . Anschließend wurden die sauberen Probenträger bei 37°C im Wärmeinkubator über Nacht getrocknet (**Abb.5**). Die Probenträger wurden in das Messgerät überführt und jeweils für

750 s vermessen⁶⁸. Als interne Kontrolle wurde ein Pool von n=25 gesunden Spenderseren (in.vent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) in jedem Lauf mitgeführt (n=2). Dieser ergab einen Inter- und Intra-Assay-Variabilitätskoeffizienten (CV) unter 5%.

2.4.3 Messaufbau und Hintergrund zu GPX3-Aktivität-Messung in Serum und FF

Die GPX3-Aktivität in Serum- und FF wird durch ein gekoppeltes enzymatisches Testverfahren bestimmt, das den Verbrauch von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) bei 340 nm und 25°C misst^{72,73}. Die indirekte Bestimmungsmethode basiert auf der Oxidation von Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG), welche durch GPX katalysiert wird, GSSG wird in einer gekoppelten Reaktion von Glutathionreduktase (GR) und NADPH wieder zu GSH reduziert wird. Die Abnahme der NADPH-Absorption bei 340 nm während der Oxidation von NADPH zu NADP⁺ entspricht der GPX-Aktivität, da die GPX den geschwindigkeitslimitierenden Faktor der gekoppelten Reaktion darstellt (**Abb. 6**)⁷⁴.

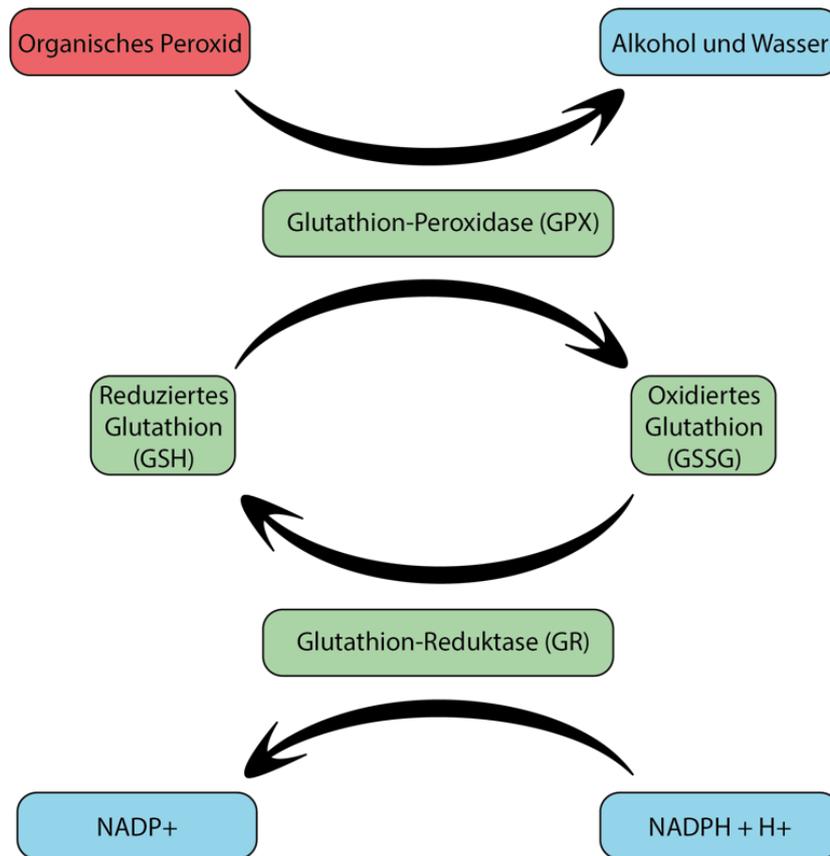


Abb. 6: Schematische Darstellung der Teilschritte des Glutathion-Systems.

Die Se-abhängige Glutathionperoxidase ist ein wichtiges antioxidatives Enzyme und verantwortlich für den Schutz vor oxidativen Stressoren. GPX3 ist das ins Plasma sekretierte Isoenzym.

Die Teilschritte der Redoxreaktionen umfassen:

- 1) Reduktion organische Peroxide durch GPX zu unschädlichen Verbindungen wie z.B. Wasser oder Alkohol unter parallel ablaufender Oxidation von GSH zu GSSG
- 2) Reduktion von GSSG unter Verbrauch von NADPH zur Rückgewinnung von GSH

Abbildung vereinfacht und modifiziert nach ⁷⁴.

2.4.4 Durchführung der GPX3-Aktivität-Messung in Serum und FF

Insgesamt wurden 5 µL der Serum- und FF wurden auf 96-Well-Platten und 200 µL einer Testmischung hinzugegeben. Die Testmischung setzt sich zusammen aus 1 mM NaN₃, 3,4 mM reduziertem Glutathion, 0,3 U/mL Glutathion-Reduktase und 0,27 mg/mL NADPH. Die enzymatische Reaktion wird durch Hinzugabe von 10 µL 0,00375% Wasserstoffperoxid gestartet ^{72, 73}. Eine konstante Serumprobe wurde zur Qualitätskontrolle in jeden Testlauf einbezogen und ergab einen Inter- und Intra-Assay-CV unter 20 %.

2.4.5 Hintergrund zur Funktion von SELENOP

SELENOP ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich in der Leber gebildet wird und rund 40% des Plasmaselens enthält⁵³. SELENOP hat somit als Transport- und Speicherprotein von Se eine Schlüsselfunktion für die Versorgung der antioxidativ wirkenden Selenoenzyme. SELENOP ist neben der Gesamt-Se-Messung im Serum ein alternativer etablierter Biomarker für den Se-Status im Serum⁷⁵.

2.4.6 Nachweis von SELENOP durch Western Blot in Serum und FF

Der Proteinnachweis von SELENOP erfolgte mittels Western Blot nach etabliertem Vorgehen⁷⁵. Dabei wurde die SDS-PAGE mit 12,5%igen Bis-Tris-Gelen in Kombination mit einem Tris-SDS-Laufpuffer verwendet. Humanes Serum oder FF wurden 1:20 in dH₂O verdünnt und Lämmli-Probenpuffer (200 mM Tris-HCL, pH 7,5, 50% Glycerin, 4% SDS, 0,04% Bromphenolblau) hinzugegeben. Die Proteine wurden in Proteintransferpuffer (250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,3) mit 20 % Methanol auf eine 0,2 µm PVDF-Membran (Thermo Fisher Scientific) geblottet. Für die Visualisierung der membrangebundenen Proteine wurde PonceauS (Sigma) verwendet. SELENOP wurde mit anti-humanen SELENOP-Antikörpern (ASKA Biotech GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) und einem Anti-Maus-IgG-HRP vom Schaf (Amersham, UK) in Kombination mit den ECL Western Blotting Detection Reagenzien und Hyperfilm™ (GE Healthcare GmbH) nachgewiesen. Die Quantifizierung der relativen SELENOP-Expression erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA, Version 1.53i).

2.5 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mit dem Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics 25, Chicago, IL, USA) und GraphPad Prism 7.Ink (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die parametrischen Daten wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Alle Spurenelementkonzentrationen in den Proben wurden als Duplikate in zwei unabhängigen Messungen bestimmt. Für die weitere Berechnung wurden MW bestimmt. Da es sich bei den FF um abhängige Proben handelt, wurden für jede Frau MW der Spurenelementkonzentrationen in den jeweiligen morphologischen Untergruppen separat berechnet. Die Spurenelementkonzentration der Gruppen 2 - 5 wurden als Differenzen (Δ) der Konzentrationen der zugehörigen FF der Gruppe 1 (ohne Eizelle = baseline) gebildet. Die berechneten Differenzen wurden mittels

t-Test verglichen. Unterschiede der morphokinetischen Zeiten zwischen Gruppe 4 und 5 wurden mit einem gepaarten t-Test überprüft. Die Bestimmung der Korrelationen der gemessenen Parameter in Serum- und FF-Proben erfolgte mittels Pearson-Korrelationsanalyse. Die vergleichende Proteinquantifizierung von SELENOP in Serum und FF erfolgte mittels t-Test. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant definiert (*= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$), ****= $p \leq 0,0001$). Für klinische Variablen wurde mittels linearen gemischten Modells korrigiert, wobei PCOS (Serum) oder PCOS und Follikelqualität als feste Effekte, und das Alter als Co-Variante eingeschlossen wurde. Die Probanden wurden als zufälliger Effekt einbezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische und klinische Faktoren

Die PCOS und Kontroll-Gruppe wurden bezüglich demographischer und klinischer Aspekte verglichen (**Tab. 2**). Die Probandinnen in der Kontroll-Gruppe waren signifikant älter als die PCOS-Gruppe (MW±SD: 35±3 Jahre vs. 29±4 Jahre, $p<0,0001$). Bei beiden Gruppen lag ein ähnliches Körpergewicht berechnet als BMI vor. Das Verhältnis von ICSI zu IVF betrug $n=19/1$ in der Kontroll-Gruppe und $n=15/3$ in der PCOS-Gruppe. Die Angaben zu der verwendeten Befruchtungsmethode fehlten in der PCOS-Gruppe für $n=2$ Frauen.

In der Kontroll-Gruppe wurden $n=8/20$ (40%) Frauen schwanger, $n=7/8$ (87,5%) mit anschließender Lebendgeburt. In der PCOS-Gruppe wurden $n=7/20$ (35%) Frauen nach der Befruchtungstherapie schwanger, $n=5/7$ (71,4%) davon mit erfolgreicher Lebendgeburt. Kein Unterschied fand sich bezüglich Neugeborenen-Größe und -Gewicht zwischen PCOS- und Kontroll-Gruppe (**Tab. 2**).

Zum Zeitpunkt der Follikelpunktion, konnten signifikant niedrigere Serum AMH-Konzentrationen in der Kontroll-Gruppe festgestellt werden ($3,47\pm 2,23$ versus $8,21\pm 4,56$; $p=0,0004$), während vergleichbare FSH und E2 Serum-Konzentrationen gemessen wurden.

Tab. 2: Übersicht zu demographischen und klinischen Daten.

Parameter	Kontroll-Gruppe n=20		PCOS n=20		p-Wert
	MW±SD	n	MW±SD	n	
Klinische Parameter					
Alter (Jahr)	35±3	20	29±4	20	<0,0001
BMI (kg/m ²)	22,4±3,1	20	22,6±2,6	20	n.s.
Hormonstatus					
FSH [mIU/ml]	6,43±1,55	19	6,58±2,03	19	n.s.
AMH [ng/ml]	3,47±2,23	19	8,21±4,56	17	0,0004
E2 [pg/ml]	38±15,1	19	38,3±15,5	19	n.s.
Neugeborene					
Neugeborenengröße (cm)	48±4	7	50±5	5	n.s.
Neugeborenengewicht (g)	2994±863	7	3001±809	5	n.s.
ICSI/IVF	-	19/1	-	15/3*	-

FSH=Follikelstimulierendes Hormon; AMH=Anti-Müller-Hormon; E2=Estradiol; ICSI=Intrazytoplasmatische Spermieninjektion; IVF=In-vitro-Fertilisation; BMI=Body-Mass-Index; *Daten nicht vorhanden für n=2 Frauen; n.s.=nicht signifikant; modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷.

3.2 Spurenelementstatus in Serum und FF

Die Konzentrationen von Se, Cu und Zn wurden in Serum- und FF-Proben mittels TXRF bestimmt. Für alle drei Spurenelemente zeigten sich signifikant niedrigere Konzentrationen in FF im Vergleich zu Serum (**Abb. 7 A, B, C**). Der Unterschied lag für Cu bei 50%, für Zn bei 54% und für Se bei 64%. Es konnte eine starke positive Korrelation für Se und Cu und eine etwas schwächere Korrelation für Zn zwischen Serum (n=38) und FF berechnet als MW (n=38) pro Frau festgestellt werden (**Abb. 7 D, E, F**).

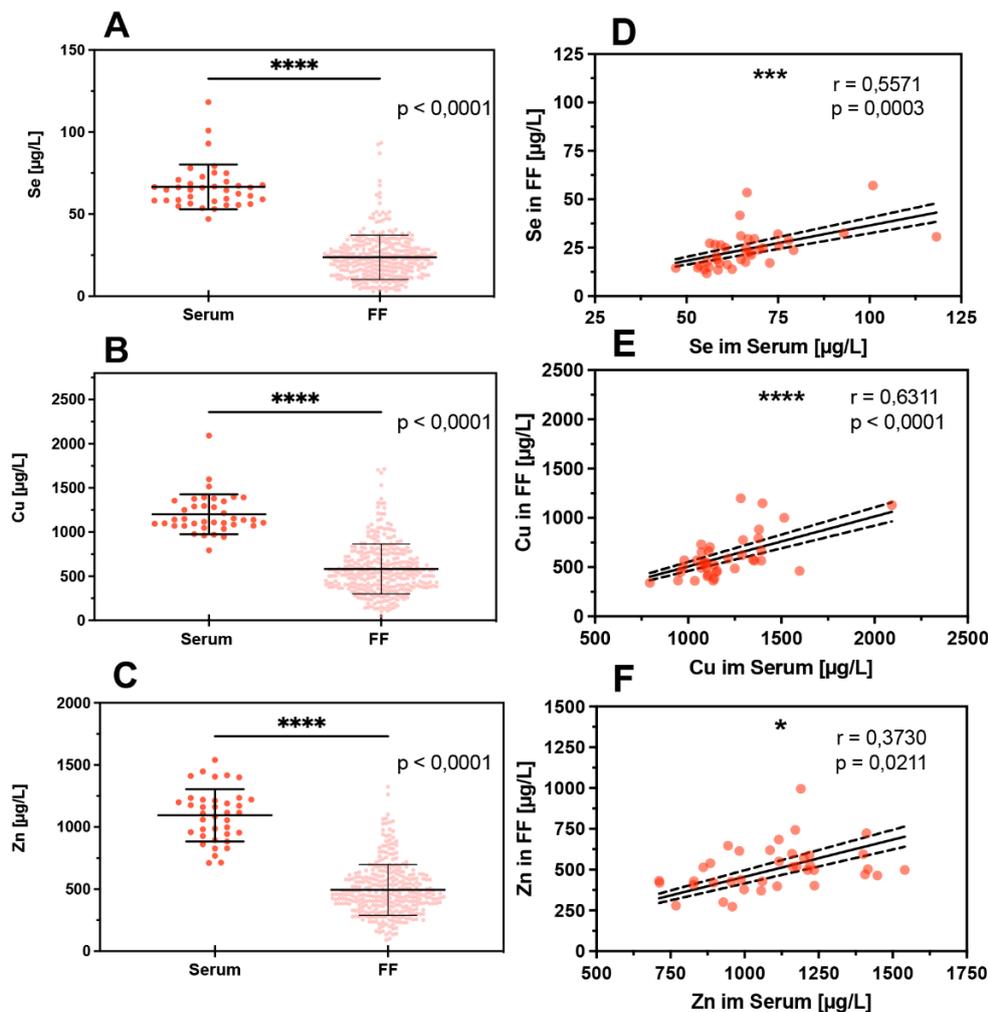


Abb. 7: Vergleich der Spurenelementkonzentrationen in Serum- und FF.

Die Spurenelemente wurden in Serumproben ($n=38$) und FF (Se $n=324$, Cu $n=330$, Zn $n=330$) von Frauen, unter ART bestimmt. Die Se-, Cu-, Zn-Konzentrationen in FF waren niedriger verglichen zu den jeweiligen Serumkonzentrationen (A-C). Zwischen den FF- und Serumproben wurde eine lineare und positive Korrelation der Se-, Cu-, Zn-Konzentrationen festgestellt (D-F). Abb. 7 modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

3.3 Variabilität des Spurenelementstatus in FF im Vergleich zum entsprechenden Serum

Pro Frau wurden $n=1$ Serum und bis zu $n=10$ FF vermessen. Über die gesamte Studiengruppe zeigten sich deutliche Schwankungen der gemessenen Konzentrationen für Se (A), Cu (B), und Zn (C), welche in den einzelnen FF-Proben einer Frau gemessen wurden (**Abb. 8**). Die Schwankungen der Spurenelementkonzentrationen zwischen den

FF einer Frau (intra-individuell) waren dabei teilweise größer als die Schwankung zwischen allen FF-Proben in der gesamten Kohorte (inter-individuell). Für Se lässt sich eine intra-individuelle Konzentrationsschwankung von minimal: $11 \pm 5 \mu\text{g/L}$ bis maximal: $59 \pm 30 \mu\text{g/L}$ (MW \pm SD) und eine inter-individuelle Schwankung von $24 \pm 10 \mu\text{g/L}$ (MW \pm SD) in der gesamten Kohorte finden (**Abb. 8 A, #gesamt**). Gleiches gilt für Zn (intra-individuell $273 \pm 71 \mu\text{g/L}$ bis $907 \pm 235 \mu\text{g/L}$; versus inter-individuell $505 \pm 129 \mu\text{g/L}$; MW \pm SD) und Cu (intra-individuell $341 \pm 55 \mu\text{g/L}$ bis $1148 \pm 329 \mu\text{g/L}$; versus inter-individuell $603 \pm 212 \mu\text{g/L}$; MW \pm SD) **Abb. 8 B, C #gesamt**).

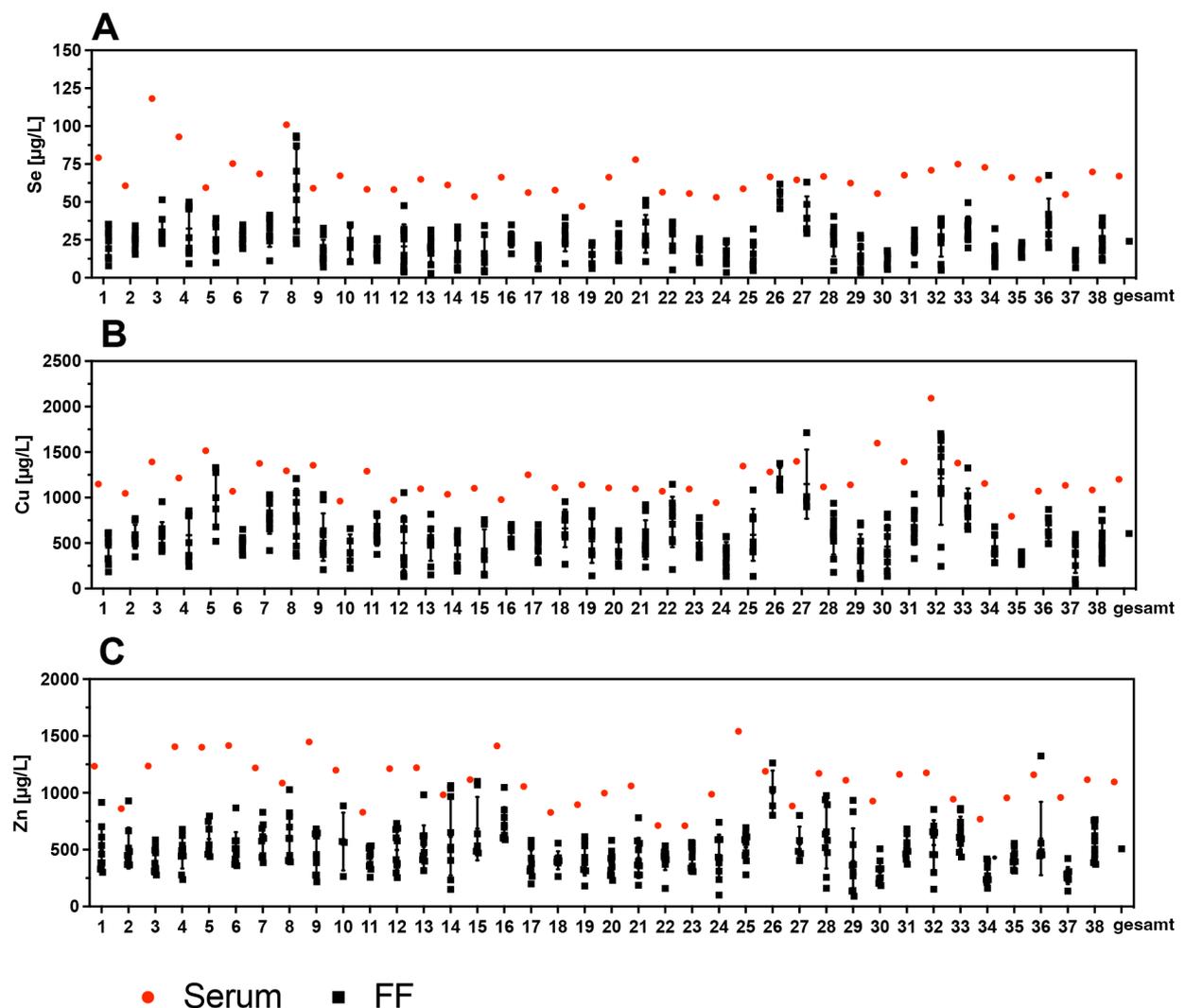


Abb. 8: Spurenelementkonzentrationen im Serum und entsprechenden FF.

Die Spurenelementkonzentrationen wurden in $n=1$ Serumprobe mit bis zu $n=10$ entsprechenden FF pro Frau verglichen. Es zeigt sich eine hohe Variabilität der Spurenelementkonzentrationen: A) Se; B) Cu; C) Zn in den verschiedenen FF einer Frau. Nr.1-19, 38=Kontroll-Gruppe; Nr.20-37=PCOS-Gruppe. Abb. 8 modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

Die FF wurden, in die im Methodik-Teil beschriebenen, Qualitätsgruppen unterteilt (**Abb. 9 A, B, C**). Die Spurenelementkonzentrationen der Gruppe 1 (FF ohne Eizelle) wurden als Basiswert verwendet. Davon ausgehend wurden jeweils die Unterschiede zwischen den FF der Gruppen 2 bis 5 abzüglich des Basiswerts (Gruppe 1, FF ohne Eizelle) für jede Frau berechnet. Die mittleren Unterschiede (MD) wurden als Δ -Gruppen ($\Delta 2-1$, $\Delta 3-1$, $\Delta 4-1$, $\Delta 5-1$) bezeichnet (**Abb. 9 D-F**).

Insgesamt zeigen die Daten, dass die FF mit schlechter Qualität (Gruppe 1) im Allgemeinen niedrigere Spurenelementkonzentrationen aufwiesen als die FF mit höherer Eizellqualität in den Gruppen 2-5. Bezogen auf die mittleren Unterschiede zeigten sich bei Se für Gruppe 5, Cu für Gruppe 2, 4 und 5, und bei Zn für Gruppe 2 und 4 Unterschiede vergleichen mit Gruppe 1. Keine Unterschiede konnten für Cu, Se und Zn in $\Delta 3-1$ festgestellt werden.

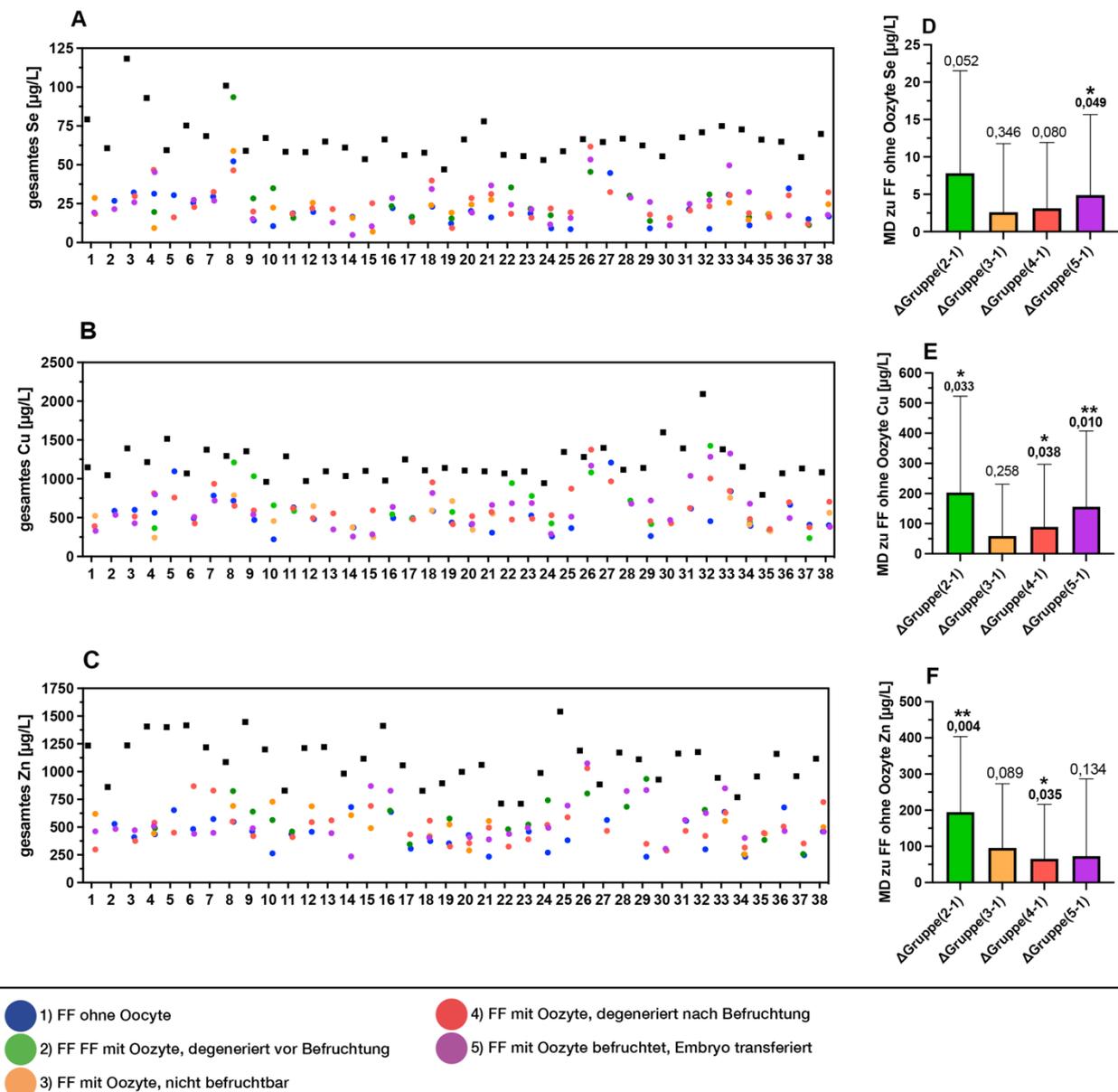


Abb. 9: Spurenelement-Konzentration in FF im Verhältnis zur Qualität.

Die Se-, Cu- und Zn-Konzentrationen sind für jede Qualitätsgruppe der entsprechenden FF-Proben in verschiedenen Farben dargestellt: Gruppe 1 (blau, schlechte Qualität), Gruppe 2 (grün), Gruppe 3 (orange), Gruppe 4 (rot) und Gruppe 5 (violett, höchste Qualität). Starke Unterschiede zwischen den Serum- und den FF-Proben und innerhalb der verschiedenen FF unterschiedlicher Qualität werden für (A) Se, (B) Cu und (C) Zn beobachtet. Die mittleren Unterschiede (MD) der Spurenelementkonzentrationen in FF unterschiedlicher Qualität in Bezug auf die Gruppe 1 als Referenz sind für (D) Se, (E) Cu und (F) Zn angegeben. Im Allgemeinen werden höhere Spurenelementkonzentrationen im Serum und in den Gruppen der FF mit höherer Qualität als in Gruppe 1 beobachtet. Nr. 1-19, 38 Kontroll-I und Nr. 20-37 PCOS-Gruppe. Abb. 9 modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

3.4 Spurenelementstatus im Verhältnis zu morphokinetischen Variablen

Neben den morphologischen Parametern wurden auch morphokinetische Zeiten der Embryonen gemessen. Die Zeitpunkte der Spaltung und spezifische frühe Entwicklungsendpunkte der Embryonen sind genauer in **Abb. 4** erläutert. Die Zeitpunkte des zweiten und dritten Embryozellzyklus (ECC2/3) sowie die Zeiten der Synchronisation (S2/3) wurden für die Gruppen 4 und 5 berechnet (**Tab. 3**). Die Zeit bis zum Erreichen der Synchronisation nach Beginn der zweiten und dritten Spaltung (S2/3) war in Gruppe 5 signifikant kürzer als in Gruppe 4 (**Tab. 3**). Die Zeiten für ECC2/3 waren in Gruppe 5 im Vergleich zu Gruppe 4 ebenfalls kürzer, wenn auch nicht signifikant (**Tab. 3**).

Es wurden keine Unterschiede zwischen den berechneten morphokinetischen Zeiten zwischen PCOS- und Kontroll-Gruppe festgestellt (**Tab. 4**).

Tab. 3: Morphokinetische Parameter ECC2/3 und S2/3 in Gruppe 4 und 5.

Parameter	Gruppe 4		Gruppe 5		p-Wert
	MW±SD	n	MW±SD	n	
ECC2 (h)	13,6± 6,0	19	12,6±1,5	19	n.s.
ECC3 (h)	22,7±7,3	15	19,1±3,5	15	n.s.
S2 (h)	5,2±5,8	20	1,8±2,6	20	0,023
S3 (h)	15,7±9,1	15	8,7±4,8	15	0,017

ECC=Embryozellzyklus; S=Synchronisationszeit; h=Stunde; n.s.=nicht signifikant MW=Mittelwert; SD=Standartabweichung; modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021 ⁵⁷

Tab. 4: Morphokinetische Parameter in der PCOS und Kontroll-Gruppe.

Parameter	Kontroll-Gruppe		PCOS-Gruppe		p-Wert
	MW±SD	n	MW±SD	n	
ECC2 Gruppe 4 (h)	13,7± 5,4	14	14,0±6,1	15	n.s.
ECC2 Gruppe 5 (h)	11,0±4,1	12	12,4±1,2	14	n.s.
ECC3 Gruppe 4 (h)	28,2±10,2	11	23,0±7,5	14	n.s.
ECC3 Gruppe 5 (h)	19,2±4,1	9	19,2±3,2	14	n.s.
S2 Gruppe 4 (h)	5,4±5,0	14	5,5±5,9	15	n.s.
S2 Gruppe 5	2,5±2,7	13	1,6±2,4	14	n.s.
S3 Gruppe 4	23,1±11,0	11	15,9±8,5	14	n.s.
S3 Gruppe 5	9,1±5,2	9	9,1±4,1	14	n.s.

ECC=Embryozellzyklus; S=Synchronisationszeit; h=Stunde; n.s.=nicht signifikant; MW=Mittelwert; SD=Standartabweichung

Zusätzlich wurden die Spurenelementkonzentrationen der Gruppen 4 und 5 auf Korrelationen bezüglich morphokinetischer Zeiten untersucht. Die Beziehungen zwischen morphokinetischen Parametern, Spurenelementkonzentrationen und GPX3-Aktivität sind als Korrelations-Heatmap für Gruppe 4 und 5 dargestellt (**Abb.10**). In den FF aus Gruppe 4 korrelierten die Cu- und Se-Konzentrationen mit S3. Entsprechend der Se-S3-Korrelation fand sich die GPX3-S3-Korrelation in Gruppe 4. Darüber hinaus gab es eine negative Korrelation von Se mit ECC2. In Gruppe 5 korrelierten die Zn- und Se-Konzentrationen mit ECC2 (**Abb.10**).

Die Embryo-Zellanzahlen werden von Gruppen 1 bis 3 nicht erreicht, nachfolgend können die morphokinetischen Parameter nicht berechnet werden.

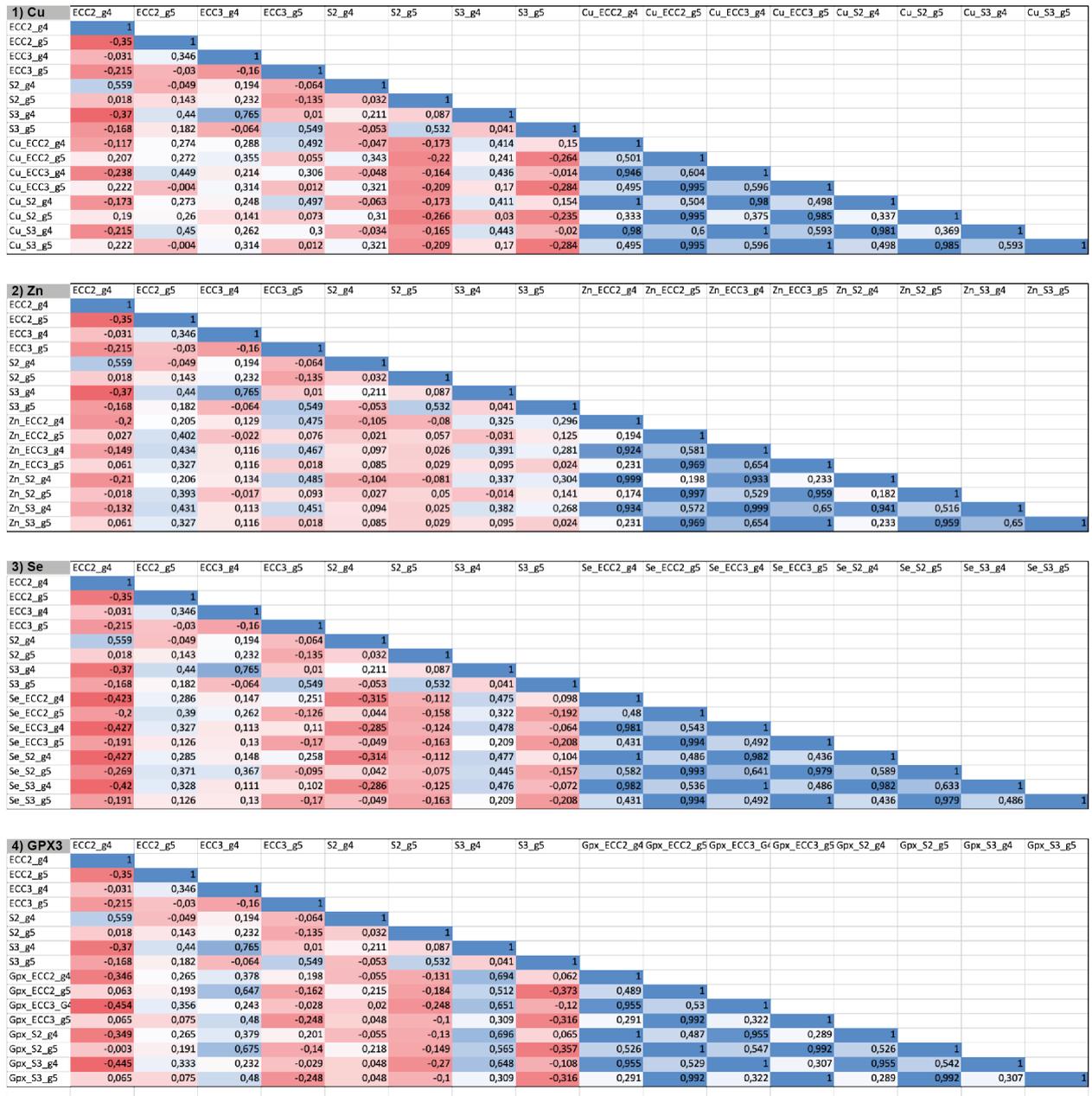


Abb. 10: Korrelation von Morphokinetik und Spurenelementen in Gruppen 4/5.

Farbkodierung: Blau steht für eine positive Korrelation, rot für eine negative Korrelation. Die zunehmende Farbintensität gibt die zunehmende Stärke der Korrelation an. Die Korrelationen ergeben sich aus dem Bezug der Werte in der Längs- sowie Querspalte. Die Kodierung erfolgt nach Ciray et al., 2014: ECC(2/3)_g(4/5) beschreibt den ersten/zweiten Embryonenzellzyklus in Gruppe 4/5; S(2/3)_g(4/5) die Synchronisationszeiten eins/zwei in Gruppe 4/5. Jeweils berechnet und aufzeigt für Cu (A), Zn (B), Se (C) und der GPX3-Aktivität (D). Abb. 10 modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

3.5 Komplementäre Biomarker des Se-Status in FF und entsprechenden Serumproben

Mittels verschiedener Selenoproteine, welche als Se-Biomarker genutzt werden, kann die Nährstoffversorgung mit dem Spurenelement Se zusätzlichen beurteilt werden^{34, 35, 75}. In dieser Studie wurden dafür neben dem Gesamt-Se die komplementäre Biomarker GPX3 und SELENOP bestimmt.

Die intra-individuell unterschiedlichen Se-Konzentrationen in FF ließen sich anhand der GPX3-Aktivität bestätigen. Mit einer Spanne von minimal 55 ± 31 U/L bis maximal 189 ± 53 U/L (MW \pm SD) gegenüber einer inter-individuellen GPX3-Aktivität von 100 ± 32 U/L (MW \pm SD) (**Abb. 11 A**). Im Einklang mit dem Befund eines niedrigerem Gesamt-Se in FF wurde auch eine 53% niedrigere GPX3-Aktivität in FF verglichen mit Serum beobachtet (**Abb. 11 B**). Es wurde eine lineare und positive Korrelation für die GPX3-Aktivität im Serum und den entsprechenden FF-Proben innerhalb einer Frau festgestellt (**Abb. 11 C**). Die GPX3-Aktivität im Serum korrelierte nur gering mit der Se-Konzentration im Serum (**Abb. 11 D**). In der FF konnte hingegen eine starke und lineare Korrelation zwischen der GPX3-Aktivität und Se-Konzentration beobachtet werden (**Abb. 11 E**).

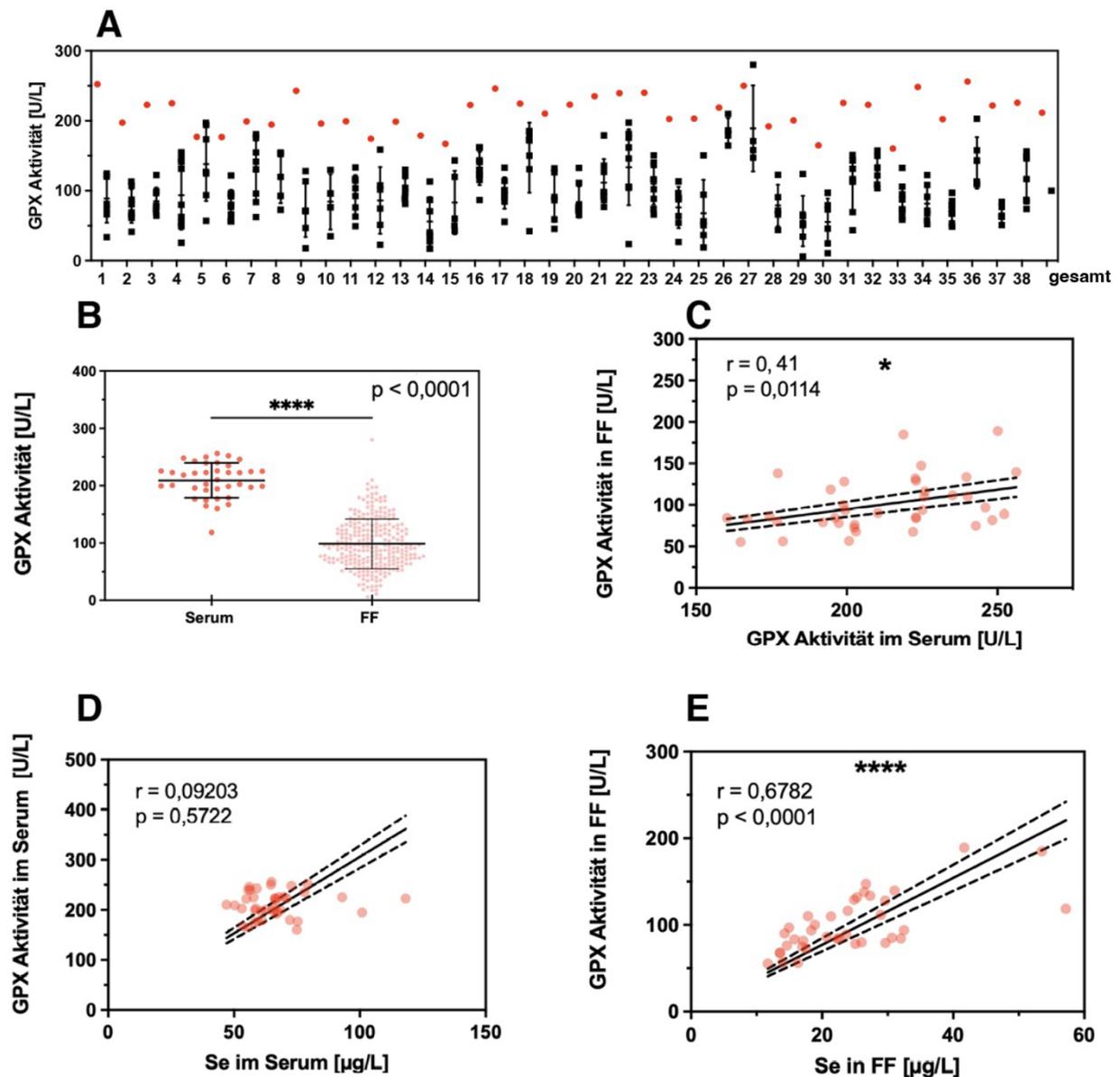


Abb. 11: GPX3-Aktivität als komplementärer Se-Biomarker in FF und Serum.

A) Vergleich der GPX3-Aktivität im Serum mit der Aktivität in den entsprechenden FF (n=4-10) je Frau. Nr.1-19, 38 Kontroll-Gruppe, Nr.20-37 PCOS-Gruppe, B) Übersicht zu GPX3-Expression in Serum- und FF-Proben, C) Korrelation der GPX3-Aktivität in Serum- und entsprechenden FF-Proben, D) Korrelation der GPX3-Aktivität und der Gesamt-Se-Konzentration im Serum, E) GPX3-Aktivität und die Gesamt-Se-Konzentration in den FF, Abb. 11 modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

Weiter wurden die Korrelationen zwischen Se und GPX3-Aktivität innerhalb der fünf Untergruppen genauer betrachtet (**Abb. 12**). Dabei fanden sich sehr gute Korrelationen innerhalb der Untergruppen 1, 2, 4, 5 und eine mäßige Korrelation für Gruppe 3.

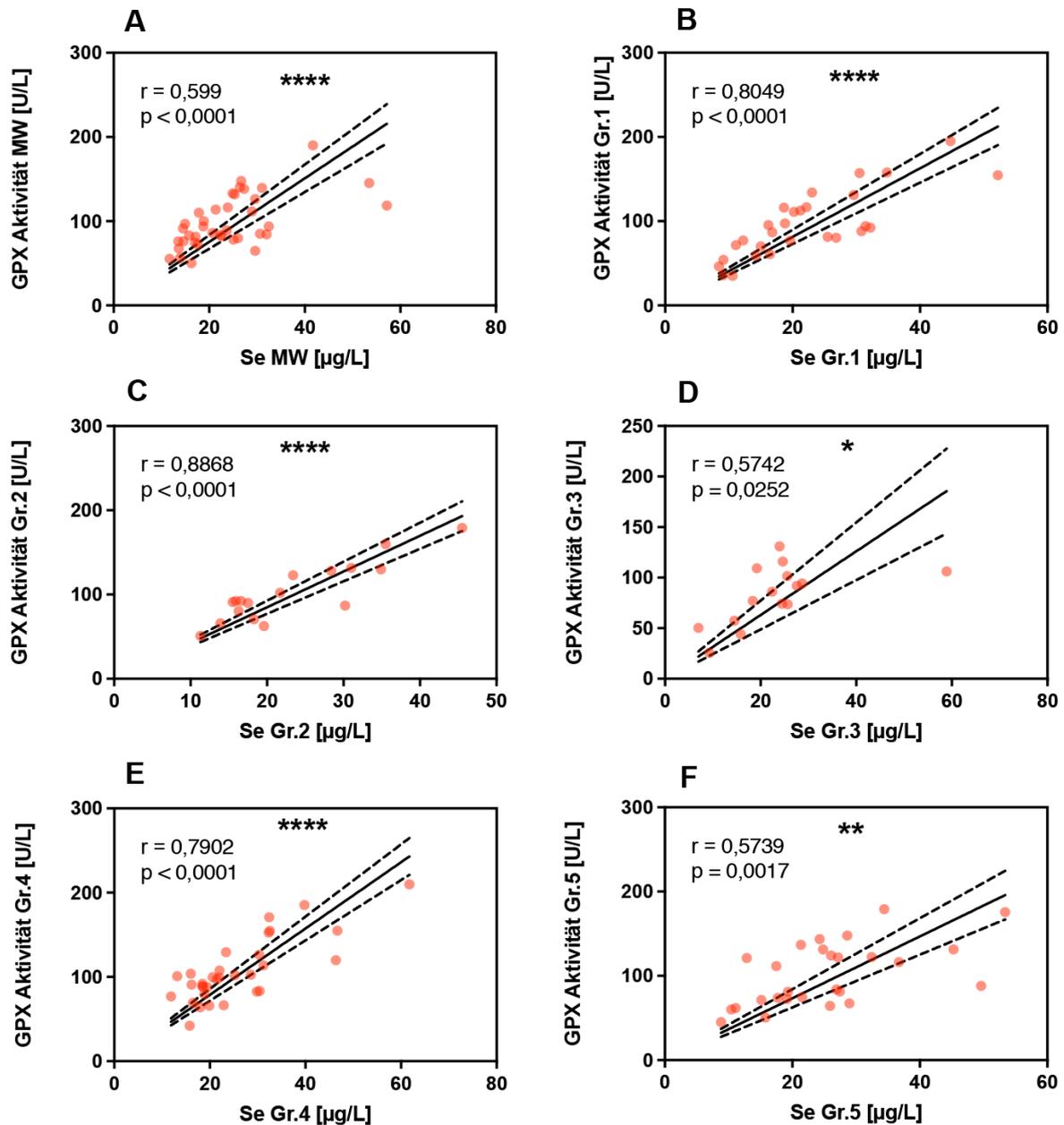


Abb. 12: Korrelation Gesamt-Se und GPX3-Aktivität in den Untergruppen.

A) FF ohne Eizelle, B) FF mit einer Eizelle, die vor der Befruchtung degenerierte, C) FF mit einer Eizelle, die nicht befruchtet werden konnte, D) FF mit einer Eizelle, die nach der Befruchtung degenerierte, E) FF mit einer erfolgreich befruchteten Eizelle, die später als Embryo übertragen oder für einen späteren Transfer eingefroren wurde; F) als MW pro Frau in jeweiligen FF (n=4-10)

Als weiterer Biomarker wurde SELENOP exemplarisch für $n=2$ Frauen, jeweils $n=1$ aus der Kontroll- und PCOS-Gruppe, qualitativ in FF und Serum-Proben nachgewiesen und konnte mit dem Gesamt-Se gut korreliert werden (**Abb. 13**).

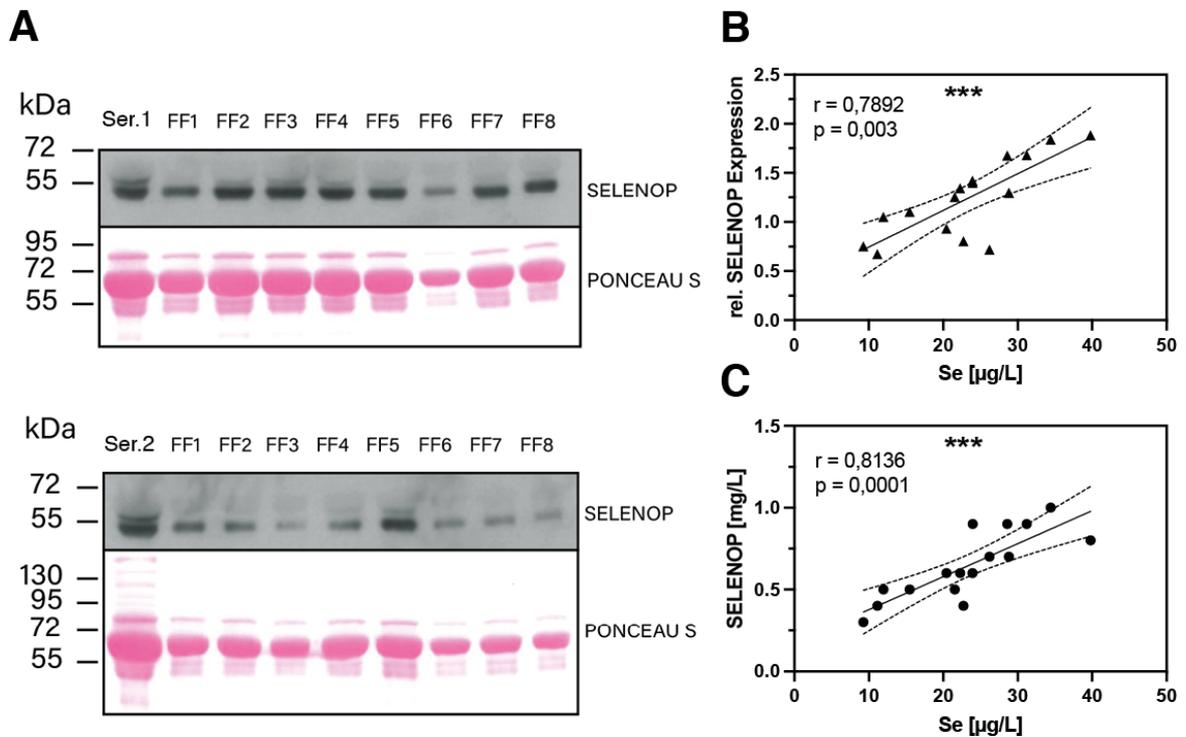


Abb. 13: SELENOP als komplementärer Se-Status-Biomarker in FF und Serum.

A) Western-Blot mit SELENOP-Expression bei 50-55kDa in den FF-Proben und entsprechenden Serumprobe. (Ser steht für Serum und FF1-8 für die jeweiligen FF). Ponceau S illustriert die Beladung der Spuren zum besseren Vergleich der Signalstärken, B) die relativen SELENOP-Werte zeigen in den FF eine positive lineare Korrelation mit der Gesamt-Se-Konzentration, C) zusätzlich wurde ein SELENOP mittels SELENOP-Elisa nachgewiesen und konnte mit den Se-Konzentrationen der zugehörigen Proben positiv und linear korreliert werden. Abb. 13 modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

3.6 Spurenelementstatus im Zusammenhang mit PCOS

Bei der Unterteilung der gesamten Kohorte ($n=40$) in die Kontroll- ($n=20$) und PCOS-Gruppe ($n=20$) zeigten sich niedrigere Zn-Konzentration im Serum der PCOS-Gruppe ($\text{MW} \pm \text{SD}$: $1029 \pm 195 \mu\text{g/L}$ vs. $1159 \pm 203 \mu\text{g/L}$). Die Cu und Zn-Konzentrationen und GPX3-Aktivitäten unterschieden sich im Serum nicht zwischen den zwei Gruppen (**Abb. 14 B,C,D**).

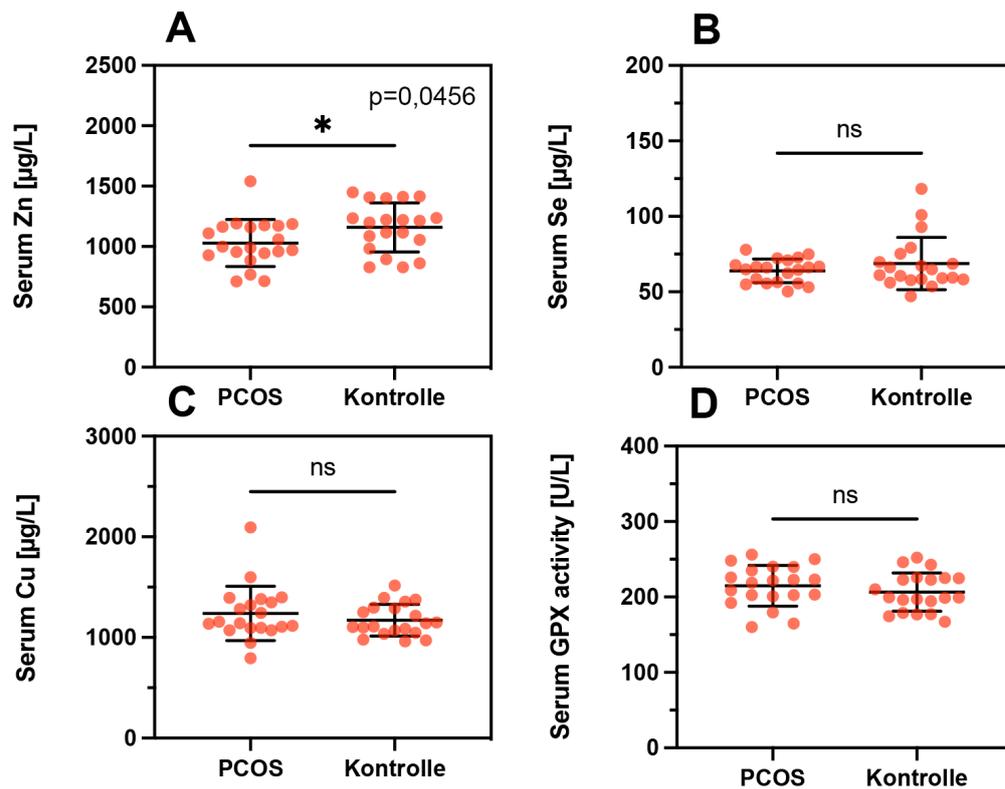


Abb. 14: Spurenelementkonzentration in Seren der PCOS- und Kontroll-Gruppe.

A) Zn; B) Se; C) Cu-Konzentrationen und D) GPX3-Aktivität aufgeteilt in die PCOS (n=20) und Kontroll-Gruppe (n=20); n.s.=nicht signifikant. Abb. 14 nach Schmalbrock et al., 2021 ⁵⁷

Bezogen auf die Spurenelementkonzentrationen im Verhältnis zu den Qualitätsmerkmalen der FF wiesen Frauen mit PCOS leicht niedrigere Zn-Konzentrationen in FF-Proben der Gruppe 3 (MW±SD: 571±111 µg/L vs. 419±142 µg/L; p=0,029) und erhöhte Cu-Konzentrationen in Gruppe 5 (MW±SD: 507±190 µg/L vs. 742±318 µg/L; p=0,039) auf. Es wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede bezogen auf Spurenelementkonzentrationen in den FF-Untergruppen festgestellt (**Tab. 5**).

Der Vergleich der Spurenelementkonzentrationen der Gruppen 2-5 im Unterschied zu den Konzentrationen in Gruppe 1 zwischen PCOS- und Kontroll-Gruppe zeigte höhere Cu (MW±SD: 27±141 µg/L vs. 274±277 µg/L; p=0,02) und Zn (MW±SD: -28±169 µg/L vs. 164±215 µg/L; p=0,036) in den FF mit hoher Qualität verglichen zu den Konzentrationen in FF ohne Eizelle (**Tab. 5**).

Tab. 5: Spurenelementkonzentrationen in FF der PCOS- und Kontroll-Gruppe.

Gruppe		Kontroll-Gruppe		PCOS-Gruppe		p-Wert
		MW ± SD	n	MW ± SD	n	
1	Se [µg/L]	23 ± 10	17	19 ± 11	13	n.s.
	Cu [µg/L]	555 ± 191	17	518 ± 267	13	n.s.
	Zn [µg/L]	474 ± 118	17	402 ± 164	13	n.s.
	GPX3 [U/L]	96 ± 33	17	96 ± 49	13	n.s.
2	Se [µg/L]	31 ± 26	8	24 ± 11	10	n.s.
	Cu [µg/L]	683 ± 289	8	682 ± 381	10	n.s.
	Zn [µg/L]	569 ± 144	8	572 ± 231	10	n.s.
	GPX3 [U/L]	103 ± 25	8	102 ± 42	10	n.s.
3	Se [µg/L]	24 ± 14	10	22 ± 5	5	n.s.
	Cu [µg/L]	516 ± 185	10	479 ± 179	5	n.s.
	Zn [µg/L]	571 ± 111	10	419 ± 142	5	0,029
	GPX3 [U/L]	86 ± 35	10	75 ± 12	5	n.s.
4	Se [µg/L]	26 ± 11	16	24 ± 11	17	n.s.
	Cu [µg/L]	619 ± 176	16	652 ± 276	17	n.s.
	Zn [µg/L]	536 ± 170	16	467 ± 174	17	n.s.
	GPX3 [U/L]	111 ± 36	16	103 ± 40	17	n.s.
5	Se [µg/L]	22 ± 11	13	27 ± 12	15	n.s.
	Cu [µg/L]	507 ± 190	13	742 ± 318	15	0,039
	Zn [µg/L]	503 ± 167	13	591 ± 220	15	n.s.
	GPX3 [U/L]	97 ± 38	13	105 ± 38	15	n.s.
Δ Gruppe (2 – 1)	Se [µg/L]	9 ± 17	8	7 ± 9	6	n.s.
	Cu [µg/L]	179 ± 283	8	236 ± 389	6	n.s.
	Zn [µg/L]	138 ± 120	8	270 ± 285	6	n.s.
	GPX3 [U/L]	21 ± 45	7	8 ± 25	5	n.s.
Δ Gruppe (3 – 1)	Se [µg/L]	2 ± 11	8	3 ± 7	4	n.s.
	Cu [µg/L]	75 ± 189	8	28 ± 152	4	n.s.
	Zn [µg/L]	128 ± 167	8	31 ± 205	4	n.s.
	GPX3 [U/L]	0 ± 42	8	-22 ± 13	3	n.s.
Δ Gruppe (4 – 1)	Se [µg/L]	2 ± 9	13	4 ± 9	13	n.s.
	Cu [µg/L]	46 ± 190	13	132 ± 223	13	n.s.
	Zn [µg/L]	83 ± 161	13	49 ± 143	13	n.s.
	GPX3 [U/L]	9 ± 39	12	3 ± 26	11	n.s.
Δ Gruppe (5 – 1)	Se [µg/L]	1 ± 8	10	9 ± 12	11	n.s.
	Cu [µg/L]	27 ± 141	10	274 ± 277	11	0,02
	Zn [µg/L]	-28 ± 169	10	164 ± 215	11	0,036
	GPX3 [U/L]	3 ± 31	9	10 ± 42	9	n.s.

n.s.= nicht signifikant; Δ=Differenz/Delta; MW=Mittelwert; SD=Standartabweichung; Se=Selen; Cu=Kupfer; Zn=Zink; GPX3=Glutathionperoxidase-3. Tab. 5 modifiziert nach Schmalbrock et al., 2021⁵⁷

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Zielsetzung der Arbeit lag in der Untersuchung der Rolle der Spurenelemente Cu, Zn und Se auf die Eizell-/Embryoqualität. Dazu wurden die Konzentrationen der Spurenelemente im Serum und FF von Frauen nach Hormonstimulationstherapie gemessen. Ein Schwerpunkt lag auf der umfangreichen Erfassung des Se-Status, welcher anhand drei komplementärer Biomarker (Gesamt-Se, GPX3-Aktivität, SELENOP) ermittelt wurde. Im Rahmen der Probenauswahl wurde ein möglicher Unterschied in der Spurenelementverteilung bei Frauen mit und ohne PCOS berücksichtigt. Unsere Hypothese lautet, dass höhere Spurenelementkonzentrationen mit verbesserter Eizell- und nachfolgend Embryoqualität einhergehen.

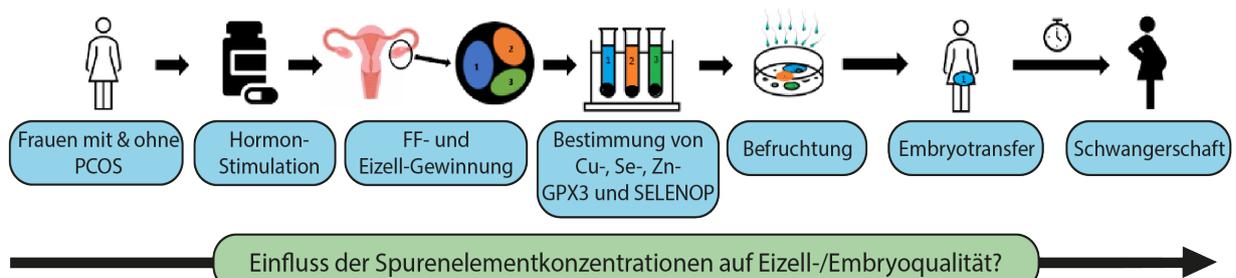


Abb. 15: Schematische Übersicht zu Vorgehen und Fragestellung der Arbeit.

Übersicht zu klinischem, laborchemischem und wissenschaftlichem Ablauf Abb. 15 selbst erstellt mit biorender free version.

Innerhalb der gesamten Kohorte zeigten sich niedrigere Konzentrationen der Spurenelemente in FF im Vergleich zu Serum. Der direkte Vergleich der bis zu n=10 FF-Proben untereinander, gewonnen jeweils pro Frau, zeigte deutliche Konzentrationschwankungen der Spurenelemente. Besonders zu betonen ist hierbei, dass die verglichenen FF-Proben jeweils in einer Punktionssitzung gewonnen wurden. Der Vergleich der Spurenelementkonzentrationen im Serum mit dem jeweiligen MW der FF-Proben ergab eine positive Korrelation.

Bei der Auswertung der Spurenelementverteilung in Bezug auf die Gruppeneinteilung anhand morphologischer und morphokinetischer Parameter, konnte eine Tendenz zu niedrigeren Spurenelementkonzentrationen in FF der niedrigsten Qualitätskategorie (Gruppe 1) festgestellt werden, sowie kürzere Synchronisationszeiten der Embryonen

höchster Qualität (Gruppe 5). Darüber hinaus zeigten sich keine starken Unterschiede bezüglich der Spurenelementverteilung zwischen der PCOS- und Kontroll-Gruppe. Die Se-Biomarker GPX3 und SELENOP waren in FF nachweisbar und korrelierten auch hier positiv mit der gesamten Se-Konzentration in den entsprechenden Proben. Dies deutet darauf hin, dass die drei Biomarker nicht nur im Serum, sondern auch in FF als komplementäre Biomarker bezüglich des Se-Status verwendet werden können und höhere Se-Konzentrationen in Follikeln mit höherer Qualität nachweisbar sind.

4.2 Vergleich der PCOS- und Kontroll-Gruppe

Zum Zeitpunkt der Follikelpunktion wurden signifikant niedrigere AMH-Konzentrationen in der Kontroll-Gruppe im Einklang mit höherem Alter in dieser Gruppe nachgewiesen. Die physiologische Abnahme des AMH-Spiegels im Alter mit Abnahme der ovariellen Reserven konnte in Studien gezeigt werden ⁷⁶. Darüber hinaus wurde berichtet, dass die AMH-Spiegel im Serum bei Frauen mit PCOS im Vergleich zu Frauen mit normalem Eisprung deutlich höher sind und AMH-Messungen einen alternativen Marker zur Detektion von PCOS darstellen könnten ^{76, 77}.

Der Alters- und Hormonunterschied der PCOS- und Kontroll-Gruppe stellt eine realistische Situation im klinischen Alltag von Kinderwunschkliniken dar. Mit rund 15% ist das PCOS die häufigste endokrinologische Erkrankung bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter, die in 75% der Fälle mit Infertilität einhergeht ^{10, 78}. Wohingegen Frauen ohne PCOS erst im höheren Alter mit abnehmender ovarieller Reserve und damit einhergehenden ausbleibendem Schwangerschaftserfolg eine Kinderwunschklinik aufsuchen. Dem vermeintlichen miss-matching zwischen PCOS- und Kontroll-Gruppe bezüglich Alter und Hormonstatus unterliegen auch andere Studien, exemplarisch sei auf die Studie von Mai et al., 2021 verwiesen ⁷⁹.

Weiterhin wurden die Gruppen auf Unterschiede bezüglich Spurenelementkonzentrationen in Serum und FF untersucht. In der Übersichtsarbeit von Nasiadek et al., 2020 wurden auch die Studien von Li et al., 2016, Özer et al., 2016 und Farhood et al., 2017 (siehe dort Tab. 2) genannt, die eine verminderte Serum-Zn-Konzentration bei Frauen mit PCOS im Vergleich zu Frauen ohne PCOS nachwiesen ⁴⁰. Die niedrigen Zn-Serumkonzentrationen wurden mit der bei PCOS teilweise einhergehende Insulinresistenz und Hyperandrogenämie in Zusammenhang gebracht ⁴⁰.

Bezüglich Se-Serum-Konzentrationen und PCOS konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede herausgearbeitet werden, andere Fall-Kontroll-Studien deuteten darauf hin, dass Patienten mit PCOS niedrigere Serumspiegel von Se aufweisen als Kontroll-Gruppen und diskutierten das in Zusammenhang mit einem verminderten antioxidativen Schutz und ROS-induzierter Hyperglykämie ⁸⁰.

Bezogen auf Unterschiede in FF, konnten niedrigere Zn-Konzentrationen in FF, die nicht befruchtet werden konnten (Gruppe 3) und höhere Cu-Konzentrationen in FF der höchsten Qualität (Gruppe 5) gefunden werden. Sun et al., 2019 stellten in ihrer PCOS-Gruppe ebenfalls höhere Cu-Konzentrationen fest und beschrieben, dass der erhöhte Cu-Gehalt in der FF mit einer höheren Anzahl von entnehmbaren Eizellen in der PCOS-Gruppe, aber einer niedrigeren Rate von Embryonen hoher Qualität verbunden war ⁸¹.

Insgesamt konnten entgegen den Erwartungen in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede der Cu-, Zn und Se-Konzentrationen in Serum und in FF-Proben bei Frauen mit und ohne PCOS in Bezug zu Eizell-/Embryoqualität herausgearbeitet werden. Das PCOS stellt einen Überbegriff mit phäno- und genotypischen Untertypen dar ^{11, 78}. Das Fehlen von Unterschieden kann somit in der mangelnden Subtypisierung der PCOS-Gruppe in Frauen mit und ohne Hyperandrogenämie, oder mit und ohne Insulinresistenz, sowie der Heterogenität der Kontroll-Gruppe begründet sein.

4.3 Vergleich zwischen Spurenelementkonzentrationen in Serum und FF

Die durchschnittliche Se-Konzentration im Serum lag bei etwa $67 \pm 14 \mu\text{g/L}$ und stellt damit im Vergleich zu Referenzdaten aus einer europäischen Querschnittsanalyse (EPIC, n=1915) eine Unterversorgung dar, wohingegen die Zn- und Cu-Konzentration im Serum innerhalb der angegebenen Referenzwerte lagen ⁸². Zu dieser Beobachtung passt, dass die entnommenen Seren von in Österreich lebenden Frauen stammen und Österreich, wie andere Gebiete in Mitteleuropa, ein Se-Mangelgebiet darstellt ⁸³. Die erniedrigten Se-Werte im Serum können somit durch die schlechte Se-Bodenversorgung in Österreich erklärt werden.

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien zeigten sich niedrigere Konzentrationen der Spurenelemente in FF verglichen mit Serum ^{35, 38, 39, 51}. Betrachtet man das Verhältnis zwischen Konzentrationen im Serum und FF, lässt sich in unserem Studienkollektiv jedoch ein verglichen mit anderen Studien betonter Gradient darstellen. In der Studie

von Wu et al., 2020, welche n=103 in China lebende Paaren einschloss, lag die Se-Konzentration in FF etwa doppelt so hoch (Serum: 108 µg/L, FF: 71 µg/L vs. Serum: 67 µg/L, FF: 25 µg/L, **Abb.7**) und somit näher an den Serum-Se-Konzentrationen ³⁸. Dies lässt sich auf eine in Teilen Chinas bessere Se-Bodenversorgung und damit höhere Serum-Se-Konzentrationen zurückführen ⁸⁴. Diese Beobachtung unterstreicht die Hypothese, dass die Se-Konzentrationen im Serum die Se-Konzentrationen in FF beeinflussen.

In der Supplementationsstudie von Özkaya et al., 2011 wurde beschrieben, dass Cu, Zn und Se in Serum und FF bei Frauen, nach hormoneller Überstimulationstherapie im Rahmen einer IVF abnahm ⁸⁵. Leider konnten wir den Einfluss dieser Hypothese auf die niedrigen Spurenelementkonzentrationen im Serum der in dieser Arbeit eingeschlossenen Frauen nicht überprüfen, da für den Großteil unsere Probandinnen die Serummessung vor Beginn der Hormontherapie fehlten.

Betrachtet man anstelle der gesamten Kohorte die jeweiligen Frauen einzeln, zeigt sich eine positive Korrelation zwischen den Spurenelementkonzentrationen im Serum und den zugehörigen FF berechnet als MW. Angesichts der positiven Korrelation von Serum und FF liegt es nahe, dass sich Defizite von Spurenelementen im Serum auf die FF übertragen können. Eine Verbesserung der Spurenelementversorgung könnte somit nicht nur die Spurenelementkonzentrationen im Serum erhöhen, sondern voraussichtlich auch den Spurenelementstatus in FF anheben.

4.4 Diskussion der Variabilität zwischen den einzelnen FF-Proben

In Anbetracht unserer standardisierten und gut kontrollierten Probengewinnung ⁵⁵, welche die Punktion und nachfolgend Analyse einzelner FF ermöglichte, weisen unsere Daten auf eine vorab unerwartet hohe Variation zwischen den verschiedenen FF innerhalb einer Frau hin. Die intra-individuelle Variabilität konnte im Falle von Se durch zwei weitere Biomarker (GPX3, SELENOP) bestätigt werden.

Silberstein et al., 2009 und Butts et al., 2021 berichteten ebenfalls von intra-individuellen Konzentrationsunterschieden zwischen FF einer Frau. Silberstein et al., 2009 erklärte dies bedingt durch unterschiedlichen Follikelgrößen, wohingegen Butts et al., 2021 die Variation durch Unterschiede in demografischen und klinischen Parametern, wie beispielsweise Alter oder BMI, begründete ^{86, 87}. Die in unserer Studie eingeschlossenen Follikel wiesen einen Mindestdurchmesser von 15 mm auf, kleinere Follikel wurden für unsere Analyse nicht verwendet. Somit scheint der Einfluss einer hohen inter-follikulären

Variabilität bedingt durch die Follikelgröße als wahrscheinlich vernachlässigbar. Der Bezug zu demographischen Daten konnte mittels eines linear gemischten Modells bezüglich Interaktionen zwischen Eizell-/Embryoqualität, PCOS und Alter keine Einflüsse für diese Kohorte herausarbeiten. Als Einschränkung ist zu erwähnen, dass weitere möglicherweise relevante demographischen Angaben durch die kleine Gruppenanzahl und das geringe Auftreten bestimmter Merkmale in den Gruppen (z.B. Rauchen) nicht überprüft werden konnte.

4.5 Bezug zwischen Spurenelementkonzentrationen in FF und Eizell-/Embryoqualität

4.5.1 Se-Konzentrationen und Biomarker in FF in Bezug zu Eizell-/Embryoqualität

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass höhere Se-Konzentrationen in FF der retrospektiv am höchsten klassifizierten Eizellen-/Embryonen (Gruppe 5) zugeordnet werden können. Dazu passend beschrieben auch Wdowiak et al., 2017 in ihrer Studie, die n=221 Frauen unter IVF einschloss, dass in der Gruppe, die eine Schwangerschaft erreichte, höhere Se-Konzentrationen in den FF beobachtet wurden³⁹. Als möglicher Mechanismus wurde besonders die zentrale antioxidative Wirkung von Se über GPX3 und SELENOP und die Kontrolle der oxidativen Mikroumgebung diskutiert^{39, 88, 89}. Ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, Eizellqualität und nachfolgend erfolgreicher IVF/ICSI-Therapie wurde in mehreren Studien gezeigt⁸⁹⁻⁹¹. Basierend auf unseren Ergebnissen und den genannten Studien ist es denkbar, dass ein Se-Mangel und ein vermindertes Vorkommen der Selenoproteine mit einer schlechten Eizellenqualität einhergeht und umgekehrt ein ausreichender Se-Spiegel in FF über verminderten oxidativen Stress mit einer erhöhten Eizell-/Embryoqualität einhergeht. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diesen möglichen Zusammenhang zu bestätigen.

Auch in unserer Studie wurden als komplementäre Biomarker SELENOP und GPX3 berücksichtigt. Wie auch bereits von Paszkowski et al., 1995 beschrieben sahen wir eine positive Korrelation der beiden Biomarker in FF wohingegen im Serum keine Korrelation beobachtet wurde⁸⁹. Die fehlende Korrelation von Se und GPX3 im Serum könnte durch präanalytische Fehllagerung von Serumproben erklärt werden. Die Verzögerung bis zur richtigen Lagerung, kann die GPX3-Proteinstruktur und damit die nach-

träglich gemessene GPX3-Aktivität beeinflussen⁹². Im Gegensatz dazu werden FF-Proben möglicherweise als wertvollere Proben angesehen und unmittelbar unter richtigen Konditionen aufbewahrt.

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass GPX3 und SELENOP im Serum bei ausreichender Se-Zufuhr gesättigte Expressionsniveaus erreichen können⁹³⁻⁹⁵. Die Sättigungsbereiche in FF von Gesamt-Se und den Selenoproteinen sind jedoch unbekannt. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl GPX3 als auch SELENOP in FF nachweisbar sind und linear mit den Serumspiegeln korrelierten (**Abb. 11, 12, 13**). Dies weist darauf hin, dass in FF ähnliche Mechanismen zur Kontrolle und Begrenzung der Se-Versorgung und der Selenoprotein-Konzentrationen wirken. Eine Limitation stellte hierbei dar, dass wir keine Sättigungsgrenze im Serum sicher feststellen konnten, da es sich wie beschrieben, um Proben aus Se-Mangelgebiet lebenden Frauen handelt und folglich auch in den FF der Sättigungsbereich nicht erreicht wurde⁸³. Die Ermittlung der Sättigungsgrenze in FF ist ein Ziel weiterführender Untersuchungen.

4.5.2 Cu- und Zn-Konzentrationen in FF in Bezug zu Eizell-/Embryoqualität

Bezüglich Cu in FF und Fruchtbarkeit lassen sich unterschiedliche Ergebnisse aktueller Forschungsarbeiten herausarbeiten. In einer Studie von Tolunay et al., 2016 zeigte sich in n=130 gepoolten FF von Frauen mit unerklärter Infertilität eine Abnahme einer erfolgreichen Schwangerschaftsfortsetzung um fast 72% pro 1µg/dL FF-Cu-Konzentrationserhöhung⁹⁶. In der Studie konnte jedoch kein Schwellenwert für den negativen Effekt von FF-Cu auf den Schwangerschaftserfolg definiert werden. In einer weiteren Studie von Ingle et al., 2017 konnten höhere Cu-Konzentrationen in FF mit einer besseren Embryoqualität assoziiert werden⁵¹, diese Aussage ergibt sich auch aus unseren Ergebnissen.

Die zunächst divergent erscheinenden Ergebnisse spiegeln die Hypothese von Tolunay et al., 2016 wider, der ein Cu-Konzentrationsfenster in FF beschreibt, das die Fruchtbarkeit in positive oder negative Richtung beeinflusst⁹⁶. Betrachtet man die Cu-Konzentrationen, die im Mittel in den FF der jeweiligen Studien gemessen wurden, lag die Cu-Konzentration in FF von Frauen mit erfolgreicher Schwangerschaft in der Studie von Tolunay et al., 2016 bei 730 µg/L und in der Gruppe ohne Schwangerschaftserfolg bei 1030µg/L. In unseren Proben lag der Cu-FF MW bei etwa 605 µg/L. Aus diesen Werten lässt sich ein grober Schwellenwert für Cu in FF als potenziell schädlicher Faktor für die Eizell-/Embryoentwicklung abschätzen. Für die Ermittlung der genauen Unter- und Obergrenze der Cu-Konzentrationen in FF fehlen jedoch weitere Studien.

Dem Spurenelement Zn werden im Allgemeinen positive Eigenschaften bezüglich Fertilität wie antiinflammatorische und zellaufbauende Funktionen zugeschrieben^{32, 33}. Überraschenderweise zeigte sich in unserer Auswertung kein Unterschied zwischen FF mit Eizelle/Embryo höchster Qualität (Gruppe 5) und FF ohne Eizelle/Embryo (Gruppe 1). Im Gegensatz dazu beschrieben Tolunay et al., 2016 positive Korrelationen zwischen Zn-Konzentration in FF und der Anzahl höherqualitativer Embryonen⁹⁶. In der Pilotstudie von Ingle et al., 2017 wurden Spurenelementkonzentrationen in Urin und FF von n=58 Frauen unter IVF gemessen⁵¹. Sie zeigten, dass höhere Zn-Konzentrationen in FF mit einem geringeren Anteil an befruchteten Eizellen pro Frau einhergingen, jedoch positive Korrelationen zwischen der Gesamtzahl an erzeugten Embryonen und der Zn-Konzentration im Urin nachweisbar waren. Betrachtet man auch hier die Zn-Konzentrationen, die im Mittel in den FF der jeweiligen Studien gemessen wurden genauer, fand sich bei Tolunay et al., 2016 rund 770 µg/l, in unseren Proben rund 507 µg/l und bei Ingle et al. 2017 nur 467µg/l im Mittel^{51, 96}. Auch hier ließe sich ein Konzentrationsfenster mit positiven Einflüssen auf die Eizellqualität anhand der Daten diskutieren.

Zusammenfassen lässt sich festhalten, dass in der aktuellen Forschung die spezifische Rolle von Zn, besonders bezüglich verschiedener Konzentrationen in Serum und Follikeln, im weiblichen Fortpflanzungssystem nicht einheitlich geklärt ist und auch hier Unter- und Obergrenzen, welche positive oder negative Einflüsse auf die Eizell-/Embryoqualität haben fehlen.

4.6 Spurenelementkonzentrationen und morphokinetische Parameter

In einigen Kinderwunschkliniken werden über TLS generierte morphokinetische Parameter eingesetzt, um die Lebensfähigkeit von Embryonen und die Chance auf eine Lebendgeburt nach ART vorherzusagen^{18, 61, 66}. Das TLS stellt im Vergleich zur morphologischen Beurteilung eine potenziell objektivere und besser reproduzierbare Technologie mit weniger umlagerungsbedingten Störeinflüssen auf die Eizell-/Embryoqualität dar²¹. Anhand früherer TLS-Studien wurde ein Zusammenhang zwischen dem schnelleren Erreichen der nächsten Zellanzahl, besonders in Bezug auf frühe Spaltungszeiten (=t1 bis t8) und sich daraus ergebenden Zeitintervalle ECC2/3 und S2/3 und der Embryoqualität hervorgehoben^{18, 60-67}. Mesequer et al., 2011 schlugen ein Embryo-Scoring auf Grundlage eines Klassifikationsbaums mit den S2 sowie CC2-Zeiten zur Auswahl von Embryonen mit höherer Einnistungswahrscheinlichkeit vor¹⁸. Darauf aufbauend betonte

die Studie von Schachter-Safrai et al., 2021 auch ECC3 und S3 als wichtige frühe Zeitintervalle, die bei Verlängerung mit einer höheren Rate an Fehlimplantationen einhergingen⁶⁶. Auch die Ergebnisse von Kljajic et al., 2022, Dal Canto et al., 2012 und Cetinkaya et al., 2015 konnten anhand unterschiedlicher Spaltungsrhythmen zwischen Embryopopulationen guter und schlechterer Qualität unterscheiden, wobei eine verlängerte Spaltzeiten mit einer schlechteren Embryonen-Qualität einherging. Das findet sich auch in unseren Ergebnissen mit moderat verlängerten Spaltungs- und signifikant verlängerten Synchronisationszeiten für Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 5 wieder (**Tab. 3**).

Nur wenige Studien untersuchten bisher morphokinetische Variablen in Zusammenhang mit Spurenelementen als zusätzlichen Qualitätsmarker. Wdowiak et al., 2017 überprüfte in einer ICSI-Studie bei n=221 Frauen aus Polen unter anderem den Einfluss von Cu, Se und Zn in FF auf den ICSI-Erfolg unter Berücksichtigung der Dynamik der Embryonalentwicklung³⁹. In der Gruppe mit erfolgreicher Schwangerschaft (n=68) wurden negative Korrelationen zwischen Se-, Zn- und Cu-Gehalt und frühen embryonalen Entwicklungszeiten gefunden³⁹. Hingegen zeigten unsere Ergebnisse eine positive Korrelation zwischen Se und Zn-Konzentrationen und frühen Spaltintervallen der höchsten Qualitätsgruppe mit voraussichtlich bestem ART-Erfolg. Die divergierenden Ergebnisse weisen auf eine noch nicht geklärte Bedeutung der Spurenelemente für eine erfolgreiche Embryonenentwicklung im Zusammenhang mit morphokinetischen Zeiten hin. Es kann vermutet werden, dass ein bestimmter Zeitrahmen für die Zellverdopplung und Synchronisation den erfolgreichen Entwicklungsprozess des frühen Embryos begünstigt. Dabei kann eine zu niedrige oder zu hohe Spurenelement-Konzentration das genaue Timing der Zellteilung behindern und damit zu einer Veränderung der morphokinetischen Spaltzeiten führen, was in weiterführenden Untersuchungen zu bestätigen bleibt.

Bezüglich des Zusammenhangs von PCOS und morphokinetischen Parametern finden sich wenige Studien, alle ohne Berücksichtigung der Spurenelementkonzentrationen. Eine Studie von Wissing et al., 2014 berichtete über eine Verlängerung der morphokinetischen Embryonalspaltzeiten bei hyperandrogenen PCOS-Frauen⁹⁷. Dass in unserer Arbeit keine Unterschiede der morphokinetischen Zeiten zwischen PCOS- und Kontroll-Gruppe herausgearbeitet werden konnten (**Tab. 4**) kann mit der fehlenden Subtypisierung der PCOS-Gruppe wie bereits angemerkt in Zusammenhang stehen.

Zusätzlich wird der Vergleich der Studien untereinander durch uneinheitliche Nomenklatur und dem Fokus auf unterschiedlichen frühe Embryonalspaltzeiten erschwert

¹⁹. Eine einheitliche Nomenklatur und Standardisierung der TLS generierten Daten ist anzustreben.

4.7 Modell zur Entstehung der jeweiligen Spurenelementkonzentrationen in FF

Zusammenfassend scheinen die unterschiedlichen Spurenelementkonzentrationen in den FF die verschiedenen Eizell-/Embryoqualitäten wieder zu spiegeln. Es konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, dass höhere Spurenelementkonzentrationen zwangsläufig eine bessere Eizell-/Embryoqualität bedingen. Vielmehr stützen die Daten die Hypothese einer streng kontrollierten und fein abgestimmten Mikroumgebung für die entwickelnde Eizelle, die nicht nur die erforderliche Versorgung mit Mikronährstoffen, sondern auch einen Schutz vor überschüssigen und potenziell toxischen Spurenelementkonzentrationen beinhaltet. In Analogie zu der Theorie einer dosisabhängigen Auswirkung von Spurenelementen auf die Eizell-/Embryoqualität, sind die unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Se im Serum auf den menschlichen Organismus schon umfassend beschrieben ⁸⁴. Dabei reichen schon niedrige Nahrungsmengen aus um Schädigungen bedingt durch einen Se-Mangel zu verhindern. Höhere Dosen scheinen das Auftreten von Tumorentstehung, kardiovaskuläre Erkrankungen und Immunerkrankungen zu verringern ^{68, 82}. In übermäßig hohen Dosen können unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet werden ⁸⁴.

Der Einfluss der Spurenelementkonzentrationen im Serum auf die MW der betreffenden FF-Proben, sowie das breite intra-individuellen Konzentrationsspektrum zwischen FF innerhalb einer Frau, weisen darauf hin, dass neben einem allgemeinen Regulierungsmechanismus ausgehend vom Serum, die Komponenten der FF lokalen Regulationsmechanismen unterliegen (**Abb. 16**). Ein Zusammenhang zwischen ernährungsbedingter Zufuhr und Konzentrationen in Serum und FF ist bereits für Schwermetalle wie Quecksilber und Arsen von Butts et al. 2020 beschrieben und konnte auch für Zn, Cu und Se in einer Supplementationsstudie bei Frauen unter IVF im Vergleich zu Frauen unter IVF ohne Supplementationen, gezeigt werden ^{85, 98}.

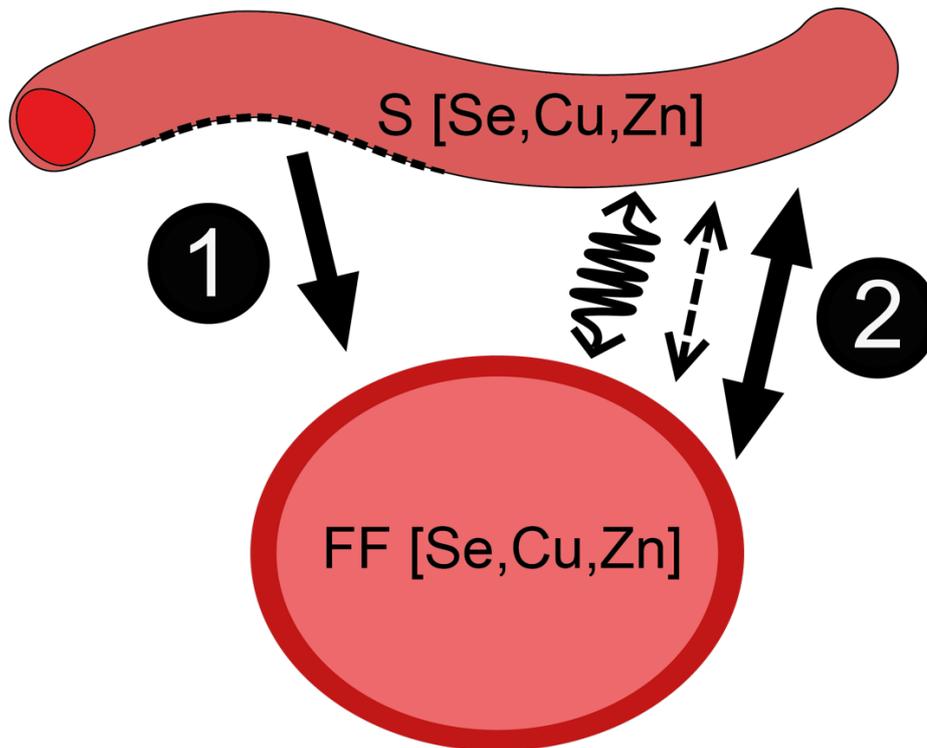


Abb. 16: Potenzielle Regulierungsmechanismen der FF-Zusammensetzung.

Die Se, Cu, und Zn-Konzentrationen in den FF werden möglicherweise beeinflusst durch:

- 1.) Filtration der entsprechenden Serumkonzentrationen
- 2.) Weitere lokale bspw. autokrine oder parakrine Regulationsmechanismen

Abb. 16 selbst erstellt mit Adobe InDesign.

Die genauen molekularen Mechanismen, die zu unterschiedlichen Spurenelementkonzentrationen in FF einer Frau führen, sind nicht bekannt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass der Spurenelementstatus in FF nicht ausschließlich durch Filtration des Serums kontrolliert wird⁸⁷, sondern stark regulierenden Mechanismen unterliegt^{22, 23}. Dies könnte eine hormonelle und endokrine Kontrolle der Aufnahme- und Erhaltungsmechanismen von Spurenelementen und der von Spurenelementen abhängigen Proteine und Enzyme beinhalten, um eine individuelle und fein abgestimmte Mikroumgebung für den zugehörigen Follikel zu kreieren^{22, 57}. Die Spurenelementkonzentrationen in einzelnen FF könnten somit einen zugänglichen Biomarker über die jeweilige Eizell-/Embryoqualität darstellen.

4.8 Stärken und Schwächen der Studie

Eine Limitierung der Arbeit stellt die begrenzte Anzahl an untersuchten Frauen (n=40) dar, wodurch im Vergleich mit der hohen Anzahl an FF-Proben (n=400) nur wenige

FF-Untergruppen gebildet werden konnten. Die kleine Fallzahl könnte zu einer Unter- oder umgekehrt zu einer Überrepräsentation der statistischen Ergebnisse geführt haben. Besonders bezüglich der morphokinetischen Zeiten, da hier die Gruppengröße besonders klein bis zu $n=15$ waren, aber auch in einigen Qualitätsuntergruppen wie Gruppe 3 (Eizellen, die nicht befruchtet werden konnten) mit $n=15$. Verschärft wurde dieses Problem zusätzlich bei der Unterteilung in PCOS- und Kontroll-Gruppe bis $n=5$. Allerdings handelt es sich um eine hypothesengenerierende Arbeit, welche Hinweise auf bisher wenig erforschte Zusammenhänge identifizieren und andeuten sollte. Dieses Ziel konnte trotz der geringen Fallzahl verfolgt werden.

Eine weitere Limitation stellt die Heterogenität innerhalb der Kontroll-Gruppe dar. Die Kontroll-Gruppe umfasste Frauen mit unterschiedlichen Infertilitätsursachen. Zudem wurden Frauen auch eingeschlossen, deren Infertilität möglicherweise nur bedingt eingeschränkt war und die Ursache der Kinderlosigkeit in einer isoliert männlichen Infertilität begründet sein könnte. Eine noch präzisere Unterteilung nach Infertilitätsursachen wäre erstrebenswert, um potenzielle Unterschiede bezogen auf Spurenelemente und Infertilitätsursache differenzierter herausarbeiten zu können. Dennoch stellt der Ausschluss eines PCOS bereits eine wichtige Unterscheidung zu anderen Fertilitätsursachen dar und kann somit als Vergleich herangezogen werden.

Zu den besonderen Stärken der Studie gehören die etablierten und validierten Technologien, die für das Messen der Spurenelemente und Enzymaktivität verwendet wurden, sowie die hohe Qualität der Proben aus der Biobank. Dies erlaubte uns, einzelne FF mit jeweils zugehörigen Serumproben zu vergleichen und im Gegensatz zu vielen anderen Studien nicht gepoolte FF zu analysieren.

Darüber hinaus berücksichtigten wir, im Gegensatz zu anderen Studien, in unseren Analysen im Besonderen die Abhängigkeit der jeweiligen FF innerhalb einer Frau untereinander und konnten dementsprechende Unterschiede herausarbeiten. Die Spurenelementkonzentrationen in Gruppe 1 (FF ohne Eizelle) wurden als Basiswert verwendet und die Konzentrationsdifferenz zwischen FF der Gruppen 2 bis 5 abzüglich Gruppe 1 jeweils pro Frau berechnet (**Abb. 9**).

Ein besonderer Schwerpunkt lag in der umfangreichen Analyse des Se-Status. Im Serum sind Gesamt-Se, GPX3 und SELENOP als äquivalente Biomarker etabliert und lassen sich jeweils in deren Ausmaß positiv miteinander korrelieren^{93, 94}. Eine regelhafte Messung komplementärer Biomarker des Se-Status in FF wurde in vorherigen Studien nicht etabliert. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit, nach bestem Wissen, als erste

Studie SELENOP in FF qualitativ nachweisen und in Zusammenschau mit Gesamt-Se und der GPX3 Aktivität in FF in Bezug zu Eizell-/Embryoqualität umfassend betrachten. Die Messungen der komplementären Biomarker dienen auch als Validierung der besonders niedrigen Se-Konzentrationen in FF. Eine Überprüfung der FF-Messungen mittels im Serum bereits etablierter Biomarker erschien daher sinnvoll.

Ferner erfolgte die Spurenelementquantifizierung an einem von den Geburtskliniken unabhängigen Standort und wurde von Wissenschaftler:innen durchgeführt, welche gegenüber den klinischen Merkmalen verblindet waren. Dadurch wurde eine unvoreingenommene Analyse und Interpretation ermöglicht.

5 Schlussfolgerungen

Ausgehend von den Ergebnissen unserer Studie kann zusammenfassend geschlossen werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Spurenelementen im Serum und FF besteht und insbesondere die drei Biomarker des Se-Status (Gesamt-Se, GPX3 und SELENOP) in den FF-Proben positiv korrelieren. Dies unterstreicht eine gleichwertige Eignung der drei Biomarker für die Bewertung des follikelspezifischen Se-Status. Die genauen Mechanismen, welche die Spurenelementverhältnisse im Serum mit denen im Follikel verbinden, sind bisher unzureichend verstanden. Dies konnte aufgrund der großen Variabilität zwischen verschiedenen FF, die von derselben Frau zur gleichen Zeit gewonnen wurden, auch in unseren Ergebnissen abgebildet werden.

Da die FF mit der schlechtesten Qualität, also FF ohne Eizelle, tendenziell die niedrigsten Spurenelementkonzentrationen der Follikel innerhalb einer Frau aufwiesen, kommen wir zu dem Ergebnis, dass ein Mangel an Spurenelementen vor und während einer reproduktionsmedizinischen Therapie und der Eizellentwicklung vermieden werden sollte. Um die oben beschriebene Annahme eines fein abgestimmten Spurenelementgleichgewichts in FF im Bezug zu Vitalität der Eizelle und später Embryo zu bestätigen, bedarf es indes weiterer Studien mit größerem Studenumfang, gegebenenfalls als prospektiv randomisierte Substitutionsstudien mit zusätzlicher Vermessung der gepaarten Spermienflüssigkeiten.

Literaturverzeichnis

1. Niederberger C, Pellicer A, Cohen J, Gardner DK, Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, Rosenwaks Z, Cobo A, Swain JE, Schoolcraft WB, Frydman R, Bishop LA, Aharon D, Gordon C, New E, Decherney A, Tan SL, Paulson RJ, Goldfarb JM, Brännström M, Donnez J, Silber S, Dolmans M-M, Simpson JL, Handyside AH, Munné S, Eguizabal C, Montserrat N, Izpisua Belmonte JC, Trounson A, Simon C, Tulandi T, Giudice LC, Norman RJ, Hsueh AJ, Sun Y, Laufer N, Kochman R, Eldar-Geva T, Lunenfeld B, Ezcurra D, D'Hooghe T, Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Meldrum DR, Casper RF, Fatemi HM, Devroey P, Galliano D, Wikland M, Sigman M, Schoor RA, Goldstein M, Lipshultz LI, Schlegel PN, Hussein A, Oates RD, Brannigan RE, Ross HE, Pennings G, Klock SC, Brown S, Van Steirteghem A, Rebar RW, LaBarbera AR. Forty years of IVF. *Fertility and Sterility*. 2018;110(2):185-324.e185.
2. Fishel S. First in vitro fertilization baby-this is how it happened. *Fertil Steril*. 2018;110(1):5-11.
3. Gianaroli L, Ferraretti AP, Magli MC, Sgargi S. Current regulatory arrangements for assisted conception treatment in European countries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;207:211-213.
4. Serour GI, Serour AG. Ethical issues in infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;43:21-31.
5. Blumenauer V CU, Fehr D, Fiedler K, Gnoth C, Krüssel JS, Kupka MS, Ott A, Tandler-Schneider A. D·I·R Jahrbuch 2019, Deutsches IVF-Register e.V. (D·I·R)®. *J Reproduktionsmed Endokrinologie* 2020. 2019.
6. Farquhar CM, Bhattacharya S, Repping S, Mastenbroek S, Kamath MS, Marjoribanks J, Boivin J. Female subfertility. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):7.
7. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*. 2007;22(6):1506-1512.
8. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1520-1524.
9. Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihljajev V, Pomm K, Ladva R, Korrovits P, Laan M. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod*. 2017;32(1):18-31.
10. Costello MF, Misso ML, Balen A, Boyle J, Devoto L, Garad RM, Hart R, Johnson L, Jordan C, Legro RS, Norman RJ, Moran L, Mocanu E, Qiao J, Rodgers RJ, Rombauts L, Tassone EC, Thangaratinam S, Vanky E, Teede HJ. A brief update on the evidence supporting the treatment of infertility in polycystic ovary syndrome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2019;59(6):867-873.
11. Patel S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018;182:27-36.
12. group TREAsPcw. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction*. 2004;19(1):41-47.
13. Legro RS, Dodson WC, Kunselman AR, Stetter CM, Kris-Etherton PM, Williams NI, Gnatuk CL, Estes SJ, Allison KC, Sarwer DB, Diamond MP, Schlaff WD,

- Casson PR, Christman GM, Barnhart KT, Bates GW, Usadi R, Lucidi S, Baker V, Zhang H, Eisenberg E, Coutifaris C, Dokras A. Benefit of Delayed Fertility Therapy With Preconception Weight Loss Over Immediate Therapy in Obese Women With PCOS. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(7):2658-2666.
14. Saket Z, Källén K, Lundin K, Magnusson Å, Bergh C. Cumulative live birth rate after IVF: trend over time and the impact of blastocyst culture and vitrification. *Human Reproduction Open.* 2021;2021(3).
 15. Yang R, Niu Z-R, Chen L-X, Liu P, Li R, Qiao J. Analysis of related factors affecting cumulative live birth rates of the first ovarian hyperstimulation in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection cycle: a population-based study from 17,978 women in China. *Chinese Medical Journal.* 2021;134(12):1405-1415.
 16. Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol Hum Reprod.* 2016;22(10):704-718.
 17. Gallego RD, Remohí J, Meseguer M. Time-lapse imaging: the state of the art†. *Biology of Reproduction.* 2019;101(6):1146-1154.
 18. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26(10):2658-2671.
 19. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, Sayed S. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod.* 2014;29(12):2650-2660.
 20. Lundin K, Park H. Time-lapse technology for embryo culture and selection. *Ups J Med Sci.* 2020;125(2):77-84.
 21. Chen M, Wei S, Hu J, Yuan J, Liu F. Does time-lapse imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical in vitro fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178720.
 22. Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2018;35(5):735-751.
 23. Zakerkish F, Brännström M, Carlsohn E, Sihlbom C, van der Post S, Thoroddsen A. Proteomic analysis of follicular fluid during human ovulation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 2020;99(7):917-924.
 24. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril.* 2015;103(2):303-316.
 25. Mehta BN, Chimote NM, Chimote MN, Chimote NN, Nath NM. Follicular fluid insulin like growth factor-1 (FF IGF-1) is a biochemical marker of embryo quality and implantation rates in in vitro fertilization cycles. *J Hum Reprod Sci.* 2013;6(2):140-146.
 26. Yi Q, Meng C, Cai LB, Cui YG, Liu JY, Meng Y. Peroxiredoxin 4, a new oxidative stress marker in follicular fluid, may predict in vitro fertilization and embryo transfer outcomes. *Ann Transl Med.* 2020;8(17):1049.
 27. Tan J, Zou Y, Wu X-W, Tian L-F, Su Q, He J-X, Huang Z-H, Zhao Y, Wu L-P, Wu Q-F. Increased SCF in Follicular Fluid and Granulosa Cells Positively Correlates With Oocyte Maturation, Fertilization, and Embryo Quality in Humans. *Reproductive Sciences.* 2017;24(11):1544-1550.

28. Yanaihara A, Mitsukawa K, Iwasaki S, Otsuki K, Kawamura T, Okai T. High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2007;87(2):279-282.
29. Roychoudhury S, Nath S, Massanyi P, Stawarz R, Kacaniova M, Kolesarova A. Copper-induced changes in reproductive functions: in vivo and in vitro effects. *Physiol Res*. 2016;65(1):11-22.
30. Mintziori G, Mousiolis A, Duntas LH, Goulis DG. Evidence for a manifold role of selenium in infertility. *Hormones (Athens)*. 2020;19(1):55-59.
31. Mistry HD, Broughton Pipkin F, Redman CW, Poston L. Selenium in reproductive health. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(1):21-30.
32. Allouche-Fitoussi D, Breitbart H. The Role of Zinc in Male Fertility. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20):7796.
33. Vickram S, Rohini K, Srinivasan S, Nancy Veenakumari D, Archana K, Anbarasu K, Jeyanthi P, Thanigaivel S, Gulothungan G, Rajendiran N, Srikumar PS. Role of Zinc (Zn) in Human Reproduction: A Journey from Initial Spermatogenesis to Childbirth. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(4):2188.
34. Qazi IH, Angel C, Yang H, Pan B, Zoidis E, Zeng CJ, Han H, Zhou GB. Selenium, Selenoproteins, and Female Reproduction: A Review. *Molecules*. 2018;23(12).
35. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clinica Chimica Acta*. 1995;236(2):173-180.
36. Rayman MP, Wijnen H, Vader H, Kooistra L, Pop V. Maternal selenium status during early gestation and risk for preterm birth. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2011;183(5):549-555.
37. Grieger JA, Grzeskowiak LE, Wilson RL, Bianco-Miotto T, Leemaqz SY, Jankovic-Karasoulos T, Perkins AV, Norman RJ, Dekker GA, Roberts CT. Maternal Selenium, Copper and Zinc Concentrations in Early Pregnancy, and the Association with Fertility. *Nutrients*. 2019;11(7).
38. Wu S, Wang M, Deng Y, Qiu J, Zhang X, Tan J. Associations of toxic and essential trace elements in serum, follicular fluid, and seminal plasma with In vitro fertilization outcomes. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;204:110965.
39. Wdowiak A, Wdowiak E, Bojar I. Evaluation of trace metals in follicular fluid in ICSI-treated patients. *Ann Agric Environ Med*. 2017;25(2):213-218.
40. Nasiadek M, Stragierowicz J, Klimczak M, Kilanowicz A. The Role of Zinc in Selected Female Reproductive System Disorders. *Nutrients*. 2020;12(8):2464.
41. Ota E, Mori R, Middleton P, Tobe-Gai R, Mahomed K, Miyazaki C, Bhutta ZA. Zinc supplementation for improving pregnancy and infant outcome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015(2):Cd000230.
42. Tvrdá E, Peer R, Sikka SC, Agarwal A. Iron and copper in male reproduction: a double-edged sword. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(1):3-16.
43. Garratt M, Bathgate R, de Graaf SP, Brooks RC. Copper-zinc superoxide dismutase deficiency impairs sperm motility and in vivo fertility. *Reproduction*. 2013;146(4):297-304.
44. Chasapis CT, Ntoupa P-SA, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Archives of Toxicology*. 2020;94(5):1443-1460.
45. Ackland ML, Michalczyk AA. Zinc and infant nutrition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016;611:51-57.

46. Beigi Harchegani A, Dahan H, Tahmasbpour E, Bakhtiari kaboutaraki H, Shahriary A. Effects of zinc deficiency on impaired spermatogenesis and male infertility: the role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Human Fertility*. 2020;23(1):5-16.
47. Spencer BH, Vanderlelie J, Perkins A. Essentiality of Trace Element Micronutrition in Human Pregnancy: A Systematic Review. *Journal of Pregnancy and Child Health*. 2015;2015:1-7.
48. Cetin I, Berti C, Calabrese S. Role of micronutrients in the periconceptual period. *Hum Reprod Update*. 2010;16(1):80-95.
49. Medicine Io. *Nutrition During Pregnancy: Part I: Weight Gain, Part II: Nutrient Supplements*. Washington, DC: The National Academies Press; 1990.
50. Kumar S, Mishra V, Thaker R, Gor M, Perumal S, Joshi P, Sheth H, Shaikh I, Gautam AK, Verma Y. Role of environmental factors & oxidative stress with respect to in vitro fertilization outcome. *Indian J Med Res*. 2018;148(Suppl):S125-s133.
51. Ingle ME, Bloom MS, Parsons PJ, Steuerwald AJ, Kruger P, Fujimoto VY. Associations between IVF outcomes and essential trace elements measured in follicular fluid and urine: a pilot study. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34(2):253-261.
52. Michaelis M, Gralla O, Behrends T, Scharpf M, Endermann T, Rijntjes E, Pietschmann N, Hollenbach B, Schomburg L. Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(3):905-910.
53. Renko K, Werner M, Renner-Müller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, Scharpf M, Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem J*. 2008;409(3):741-749.
54. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. 1999;285(5432):1393-1396.
55. Schenk M, Huppertz B, Obermayer-Pietsch B, Kastelic D, Hörmann-Kröpfl M, Weiss G. Biobanking of different body fluids within the frame of IVF-a standard operating procedure to improve reproductive biology research. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(2):283-290.
56. Schenk M, Kröpfl JM, Obermayer-Pietsch B, Feldmeier E, Weiss G. Anti-Mullerian hormone concentrations in individual follicular fluids within one stimulated IVF cycle resemble blood serum values. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017;34(9):1115-1120.
57. Schmalbrock LJ, Weiss G, Rijntjes E, Reinschissler N, Sun Q, Schenk M, Schomburg L. Pronounced Trace Element Variation in Follicular Fluids of Subfertile Women Undergoing Assisted Reproduction. *Nutrients*. 2021;13(11).
58. Isikoglu M, Avci A, Kendirci Ceviren A, Aydınuraz B, Ata B. Conventional IVF revisited: Is ICSI better for non-male factor infertility? Randomized controlled double blind study. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021;50(7):101990.
59. Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Human Reproduction Update*. 2004;10(1):19-28.
60. Kljajic M, Saymé N, Krebs T, Wagenpfeil G, Baus S, Solomayer E-F, Kasoha M. Zygote Diameter and Total Cytoplasmic Volume as Useful Predictive Tools of Blastocyst Quality. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. (EFirst).

61. Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:54.
62. Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2013;28(10):2643-2651.
63. Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, Comi R, Fadini R. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online.* 2012;25(5):474-480.
64. Cetinkaya M, Pirkevi C, Yelke H, Colakoglu YK, Atayurt Z, Kahraman S. Relative kinetic expressions defining cleavage synchronicity are better predictors of blastocyst formation and quality than absolute time points. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(1):27-35.
65. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online.* 2012;25(4):371-381.
66. Schachter-Safrai N, Kan-Tor Y, Karavani G, Or Y, Shufaro Y, Har-Vardi I, Buxboim A, Ben-Meir A. Does quantity equal quality?—A morphokinetic assessment of embryos obtained from young women with decreased ovarian response to controlled ovarian stimulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2021;38(5):1115-1122.
67. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Human Reproduction.* 2001;16(12):2652-2657.
68. Hughes DJ, Fedirko V, Jenab M, Schomburg L, Méplan C, Freisling H, Bueno-de-Mesquita HB, Hybsier S, Becker NP, Czuban M, Tjønneland A, Outzen M, Boutron-Ruault MC, Racine A, Bastide N, Kühn T, Kaaks R, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Lagiou P, Panico S, Peeters PH, Weiderpass E, Skeie G, Dagrund E, Chirlaque MD, Sánchez MJ, Ardanaz E, Ljuslinder I, Wennberg M, Bradbury KE, Vineis P, Naccarati A, Palli D, Boeing H, Overvad K, Dorransoro M, Jakszyn P, Cross AJ, Quirós JR, Stepien M, Kong SY, Duarte-Salles T, Riboli E, Hesketh JE. Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *Int J Cancer.* 2015;136(5):1149-1161.
69. Alov NV. Total reflection X-ray fluorescence analysis: Physical foundations and analytical application (A review). *Inorganic Materials.* 2011;47(14):1487-1499.
70. Szoboszlai N, Polgári Z, Mihucz VG, Zárny G. Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Analytica Chimica Acta.* 2009;633(1):1-18.
71. Kirz J, Attwood DT, Henke BL, Howells MR, Kennedy KD, Kim K-J, Kortright JB, Perera RCC, Pianetta P, Riordan JC, Scofield JH, Stradling GL, Thompson AC, Underwood JH, Vaughan D, Williams GP, Winick H. *Center for X-ray Optics, X-ray Data Booklet.* : Lawrence Berkeley National Laboratory. LBNL Report #: PUB-490. ; 1986.
72. Moghaddam A, Heller RA, Sun Q, Seelig J, Cherkezov A, Seibert L, Hackler J, Seemann P, Diegmann J, Pilz M, Bachmann M, Minich WB, Schomburg L. Selenium Deficiency Is Associated with Mortality Risk from COVID-19. *Nutrients.* 2020;12(7):2098.

73. Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J.* 2003;370(Pt 2):397-402.
74. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2020;33(7):498-516.
75. Hybsier S, Schulz T, Wu Z, Demuth I, Minich WB, Renko K, Rijntjes E, Köhrle J, Strasburger CJ, Steinhagen-Thiessen E, Schomburg L. Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. *Redox Biol.* 2017;11:403-414.
76. Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Human Reproduction Update.* 2014;20(5):688-701.
77. Teede H, Misso M, Tassone EC, Dewailly D, Ng EH, Azziz R, Norman RJ, Andersen M, Franks S, Hoeger K, Hutchison S, Oberfield S, Shah D, Hohmann F, Ottey S, Dabadghao P, Laven JSE. Anti-Müllerian Hormone in PCOS: A Review Informing International Guidelines. *Trends Endocrinol Metab.* 2019;30(7):467-478.
78. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, Piltonen T, Norman RJ. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2018;33(9):1602-1618.
79. Mai Z, Liu M, Pan P, Li L, Huang J, Chen X, Yang D. Comparison of Cumulative Live Birth Rate Between Aged PCOS Women and Controls in IVF/ICSI Cycles. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:724333.
80. Hajizadeh-Sharafabad F, Moludi J, Tutunchi H, Taheri E, Izadi A, Maleki V. Selenium and Polycystic Ovary Syndrome; Current Knowledge and Future Directions: A Systematic Review. *Horm Metab Res.* 2019;51(5):279-287.
81. Sun Y, Wang W, Guo Y, Zheng B, Li H, Chen J, Zhang W. High copper levels in follicular fluid affect follicle development in polycystic ovary syndrome patients: Population-based and in vitro studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;365:101-111.
82. Moghaddam A, Heller RA, Sun Q, Seelig J, Cherkezov A, Seibert L, Hackler J, Seemann P, Diegmann J, Pilz M, Bachmann M, Minich WB, Schomburg L. Selenium Deficiency Is Associated with Mortality Risk from COVID-19. *Nutrients.* 2020;12(7).
83. Stoffaneller R, Morse NL. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. *Nutrients.* 2015;7(3):1494-1537.
84. Li S, Xiao T, Zheng B. Medical geology of arsenic, selenium and thallium in China. *Science of The Total Environment.* 2012;421-422:31-40.
85. Özkaya MO, Nazıroğlu M, Barak C, Berkkanoglu M. Effects of Multivitamin/Mineral Supplementation on Trace Element Levels in Serum and Follicular Fluid of Women Undergoing in Vitro Fertilization (IVF). *Biological Trace Element Research.* 2011;139(1):1-9.
86. Butts CD, Bloom MS, McGough A, Lenhart N, Wong R, Mok-Lin E, Parsons PJ, Galusha AL, Yucel RM, Feingold BJ, Browne RW, Fujimoto VY. Variability of essential and non-essential trace elements in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;209:111733.
87. Silberstein T, Saphier O, Paz-Tal O, Gonzalez L, Keefe DL, Trimarchi JR. Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure. *Fertil Steril.* 2009;91(5):1771-1774.

88. Ceko MJ, Hummitzsch K, Hatzirodos N, Bonner WM, Aitken JB, Russell DL, Lane M, Rodgers RJ, Harris HH. X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function†. *Metallomics*. 2014;7(1):71-82.
89. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta*. 1995;236(2):173-180.
90. Borowiecka M, Wojsiat J, Polac I, Radwan M, Radwan P, Zbikowska HM. Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58(6):301-305.
91. Bedaiwy MA, Elnashar SA, Goldberg JM, Sharma R, Mascha EJ, Arrigain S, Agarwal A, Falcone T. Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(1):51-55.
92. Heller S, Müller C, Ausländer W. Qualitätssicherung bei Enzymaktivitätsbestimmungen. In: von Boroviczény K-G, Merten R, Merten UP, eds. *Qualitätssicherung: im Medizinischen Laboratorium*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1987:363-403.
93. Hoefflich J, Hollenbach B, Behrends T, Hoeg A, Stosnach H, Schomburg L. The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians. *Br J Nutr*. 2010;104(11):1601-1604.
94. Hurst R, Armah CN, Dainty JR, Hart DJ, Teucher B, Goldson AJ, Broadley MR, Motley AK, Fairweather-Tait SJ. Establishing optimal selenium status: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(4):923-931.
95. Xia Y, Hill KE, Li P, Xu J, Zhou D, Motley AK, Wang L, Byrne DW, Burk RF. Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(3):525-531.
96. Tolunay HE, Şükür YE, Ozkavukcu S, Seval MM, Ateş C, Türksoy VA, Ecemiş T, Atabekoğlu CS, Özmen B, Berker B, Sönmezer M. Heavy metal and trace element concentrations in blood and follicular fluid affect ART outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;198:73-77.
97. Wissing ML, Bjerge MR, Olesen AIG, Hoest T, Mikkelsen AL. Impact of PCOS on early embryo cleavage kinetics. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014;28(4):508-514.
98. Butts CD, Bloom MS, McGough A, Lenhart N, Wong R, Mok-Lin E, Parsons PJ, Galusha AL, Yucel RM, Feingold BJ, Browne RW, Fujimoto VY. Seafood consumption is associated with higher follicular fluid arsenic (As) and mercury (Hg) concentrations in women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Environ Res*. 2020;188:109753.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lilly Johanna Schmalbrock, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Spurenelementstatus im Serum und der Follikelflüssigkeit bei assistierter Reproduktion / Trace element status in serum and follicular fluid in assisted reproduction selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Lilly Johanna Schmalbrock hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Lilly Johanna Schmalbrock, Gregor Weiss , Eddy Rijntjes, Nina Reinschissler, Qian Sun, Michael Schenk, Lutz Schomburg (2021) Pronounced Trace Element Variation in Follicular Fluids of Subfertile Women Undergoing Assisted Reproduction, *Nutrients*, **13**(11): 4134. doi: 10.3390/nu13114134
Beitrag im Einzelnen :

Die Themenvergabe und die Konzeptualisierung erfolgten durch Prof. Dr. Lutz Schomburg, sowie Dr. Michael Schenk. Bezüglich der Methodik erfolgten die Spurenelementmessungen in den Follikelflüssigkeiten und Seren durch Lilly Johanna Schmalbrock unter Anleitung durch Vartitér Seher am Institut für Experimentelle Endokrinologie. Die Aktivitätsbestimmungen der Glutathionperoxidase 3 in Follikelflüssigkeiten und Seren wurden von Qian Sun und Lilly Johanna Schmalbrock am Institut für Experimentelle Endokrinologie durchgeführt. Die sich darauf beziehenden Abbildungen 5 und 6 in der Methodik im Manteltext wurden von Lilly Johanna Schmalbrock angefertigt. Der qualitative Nachweis des Selenoprotein-P in Follikelflüssigkeiten und Seren erfolgte durch Lilly Johanna Schmalbrock unter Anleitung von Anja Fischbach am Institut für Experimentelle Endokrinologie. Die sich darauf beziehende Abbildung 13 im Manteltext und Abbildung 6 im Paper entstand durch Lilly Johanna Schmalbrock, unter Hilfe im Umgang des Bildbearbeitungsprogrammes durch Julian Hackler.

Die 440 Proben wurden durch Dr. Michael Schenk und Dr. Gregor Weiss aus dem Kinderwunschinstitut Dobl und der Biobank Dobl gestellt. Die Rekrutierung der Frauen, das Einholen der Einverständniserklärung und Zustimmung der Ethikkommission, die Durchführung der Hormontherapie, die transvaginale Follikelpunktion und Probengewinnung, sowie die Befruchtung der Eizellen und der Embryotransfer wurde von den Kolleg:innen Dr. Michael Schenk, Dr. Gregor Weiss und Nina Reinschissler durchgeführt. Die dazu angefertigten Abbildungen 1, 2, 3 und 4 im Methodik-Teil im Manteltext und entsprechenden Abbildungen 1 und 2 im Paper, wurden von Lilly Johanna Schmalbrock erstellt. Die Rohdaten zu Morphologie und Morphokinetik wurden ebenfalls von Dr. Gregor Weiss und Nina Reinschissler generiert.

Die statistischen Aufarbeitungen der morphokinetischen und morphologischen Parameter bezüglich der Spurenelementkonzentrationen, sowie die Statistik zu den komplementären Biomarkern des Selen-Status erfolgten durch Lilly Johanna Schmalbrock und Dr. Eddy Rijntjes. Auch die Auswertung der klinischen, demografischen und morphokinetischen Rohdaten erfolgte durch Lilly Johanna Schmalbrock und Dr. Eddy Rijntjes. Die dazu gehörigen Abbildungen 9-14 im Manteltext, sowie die Abbildungen 3 – 7 erstellte Lilly Johanna Schmalbrock. Die Tabellen 1- 5 im Manteltext und 1-3 im Paper wurden von Lilly Johanna Schmalbrock und Dr. Eddy Rijntjes im Rahmen der statistischen Auswertung und Aufarbeitung erstellt. Die kontinuierliche Datenpflege und Rücksprache zu demographischen sowie klinischen Daten erfolgte durch Dr. Gregor Weiss, Nina Reinschissler, Dr. Eddy Rijntjes und Lilly Johanna Schmalbrock. Die Validierung der statistischen Resultate erfolgte durch alle Autor:innen.

Die Ressourcen zu den klinischen Arbeitsschritten und den Laborbestimmungen stellten Prof. Dr.

Lutz Schomburg und Dr. Michael Schenk. Das Schreiben und die Vorbereitung des ursprünglichen Entwurfes erfolgte durch Lilly Johanna Schmalbrock gemeinsam mit den beiden Hauptbetreuern Prof. Dr. Lutz Schomburg und Dr. Eddy Rijntjes. Die inhaltliche und formale Überprüfung des Textes erfolgte durch alle Autor:innen.

Die im Diskussionsteil des Manteltextes angefertigte Abbildungen 15 und 16 erfolgte durch Lilly Johanna Schmalbrock, die Idee zu Abbildung 15 stammt von Dr. Gregor Weiss, die Anpassung und Erstellung erfolgte durch Lilly Johanna Schmalbrock. Die Überwachung und Projektverwaltung erfolgten durch Prof. Dr. Lutz Schomburg und Dr. Michael Schenk. Die Beschaffung von Finanzmitteln erfolgte durch Prof. Lutz Schomburg.

Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskriptes und den Manteltext gelesen und diesen zugestimmt.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2021** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"NUTRITION and DIETETICS"** Selected Category
 Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 90 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
1	PROGRESS IN LIPID RESEARCH	7,982	14.673	0.00444
2	Advances in Nutrition	11,981	11.567	0.01334
3	CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION	31,262	11.208	0.02478
4	Annual Review of Nutrition	7,215	9.323	0.00335
5	Obesity	25,762	9.298	0.02427
6	FOOD CHEMISTRY	189,508	9.231	0.08940
7	International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity	16,438	8.915	0.01650
8	AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION	68,739	8.472	0.03128
9	Hepatobiliary Surgery and Nutrition	1,647	8.265	0.00234
10	NUTRITION RESEARCH REVIEWS	3,782	8.146	0.00184
11	Current Obesity Reports	3,004	8.023	0.00444
12	Food Science and Human Wellness	2,006	8.022	0.00162
13	CLINICAL NUTRITION	23,957	7.643	0.02320
14	NUTRITION REVIEWS	12,365	6.846	0.00620
15	Nutrients	94,031	6.706	0.11554
16	Frontiers in Nutrition	6,265	6.590	0.00791
17	PROCEEDINGS OF THE NUTRITION SOCIETY	8,177	6.391	0.00431
18	JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY	15,277	6.117	0.00837
19	FOOD POLICY	11,047	6.080	0.00834
20	FOOD REVIEWS INTERNATIONAL	4,176	6.043	0.00190

Druckexemplar der Publikation



Article

Pronounced Trace Element Variation in Follicular Fluids of Subfertile Women Undergoing Assisted Reproduction

Lilly Johanna Schmalbrock ¹, Gregor Weiss ² , Eddy Rijntjes ¹, Nina Reinschissler ², Qian Sun ¹ , Michael Schenk ^{2,*} and Lutz Schomburg ^{1,*}

¹ Cardiovascular–Metabolic–Renal (CMR)—Research Center, Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt Universität zu Berlin, Hessische Straße 3–4, D-10115 Berlin, Germany; lilly.schmalbrock@charite.de (L.J.S.); eddy.rijntjes@charite.de (E.R.); qian.sun@charite.de (Q.S.)

² Das Kinderwunsch Institut Schenk GmbH, Am Sendergrund 11, A-8143 Dobl, Austria; gregor.weiss@kinderwunsch-institut.at (G.W.); nina.reinschissler@gmx.at (N.R.)

* Correspondence: m.schenk@kinderwunsch-institut.at (M.S.); lutz.schomburg@charite.de (L.S.)

Abstract: Female subfertility is a growing concern, especially in view of an increasing prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS). Assisted reproductive technologies (ART) offer a perspective for pregnancy, but the outcome rate is still suboptimal. The trace elements (TE), copper (Cu), selenium (Se), and zinc (Zn) are essential for fertility and development. We hypothesized that TE concentrations are related to oocyte quality and growth and affect pregnancy outcomes in women undergoing ART. Concentrations of TE were measured by total reflection X-ray fluorescence. Extracellular glutathione peroxidase 3 (GPX3) and selenoprotein P (SELENOP) were determined as additional Se biomarkers. Corresponding serum and follicular fluid (FF) samples were available from women with ($n = 20$) and without ($n = 20$) PCOS diagnosis undergoing hormone treatment within the ART procedure, respectively, and FF samples were classified into five groups based on morphological assessment. Serum showed higher TE concentrations than FF, and TE levels correlated positively between both matrices. Individual FF from the same women showed surprisingly high variability in TE concentration, and follicles without oocytes displayed the lowest TE concentrations. Both Se biomarkers GPX3 and SELENOP were present in FF and correlated positively to Se concentrations. Some notable relationships were observed between morphokinetic parameters, TE concentrations, and GPX3 activity. A slightly depressed serum Zn concentration was observed in PCOS. Our results indicate a direct relationship between TE in serum and FF, positive correlations between the three Se biomarkers in FF, and high variability between the FF from the same woman with the lowest TE concentrations in the follicles with the poorest quality. The differences observed in relation to PCOS diagnoses appear relatively minor. Collectively, the data support the notion that TE assessment of follicles may contribute to optimal oocyte selection and subsequently influence ART success.

Keywords: infertility; PCOS; trace elements; selenium



Citation: Schmalbrock, L.J.; Weiss, G.; Rijntjes, E.; Reinschissler, N.; Sun, Q.; Schenk, M.; Schomburg, L. Pronounced Trace Element Variation in Follicular Fluids of Subfertile Women Undergoing Assisted Reproduction. *Nutrients* **2021**, *13*, 4134. <https://doi.org/10.3390/nu13114134>

Academic Editor: Sara Della Torre

Received: 6 October 2021

Accepted: 16 November 2021

Published: 19 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

An estimated 48 to 72 million couples worldwide suffer from infertility, around half of which lack an explanation for their failure in conceiving. Among the reasons leading to female subfertility are primary and secondary ovulatory dysfunction, such as ovarian insufficiency or polycystic ovary syndrome (PCOS) [1,2]. PCOS is one of the most common hormonal disorders of women of reproductive age, negatively affecting fertility in about 75% of patients [3]. PCOS is associated with low-grade inflammation and metabolic comorbidities [4]. There are indications that lifestyle modifications with weight loss prior to assisted reproductive technologies (ART) show benefits compared to immediate treatment in obese women with PCOS [5]. Yet, ART is a promising option

with suitable interventions for the clinical management of infertility, including in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) [6]. With a steadily rising demand over the past decades, it is essential to understand which factors may optimize the outcome of ART treatment, as live birth rate (LBR) is still observed in around 36% to 50% of attempts only [7,8]. One challenging step during ART is the selection of the optimal embryo for transfer. This is traditionally performed using microscopic evaluation of morphological parameters at predefined time points (“Gardner Schoolcraft criteria”) [9]. The inclusion of additional parameters determined by modern time-lapse imaging (TLI) of the blastomere and embryo developmental kinetics (“morphokinetics”) are increasingly used during quality assessment of preimplantation embryos [9,10]. As in the case of conventional assessment, TLI is also somewhat limited in selecting the optimal embryo for a high chance of successful pregnancy and live birth [11]. The follicular fluid (FF) surrounding the oocyte creates a special microenvironment for oocyte maturation and development [12]. Alterations in the microenvironment of oocytes in the FF have been suggested to influence oocyte quality from maturation to fertilization, early embryo development, and subsequent pregnancy course [13]. Experimental and clinical studies indicate that growth and fertility are strongly affected by trace element (TE) supply, and deficiencies are known to impair both male and female gametogenesis as well as embryonic development [14–18]. In particular, the trace elements copper (Cu), selenium (Se), and zinc (Zn) have emerged as the most essential micronutrients for both female and male fertility [19–23].

The effects of TE deficiencies on spermatogenesis and sperm characteristics have been studied in large detail. The selenoenzyme glutathione peroxidase 4 (GPX4) is synthesized in spermatids and becomes transformed into a structural protein of the mitochondrial sheath of spermatozoa [24]. The supply of Se to testes is mediated by the Se transport protein selenoprotein P (SELENOP). Genetic inactivation of *Selenop* causes male infertility, and recombinant expression of a *SELENOP* transgene in the liver restores Se supply and male fertility [25]. A specific receptor in testes mediates the directed and efficient uptake of SELENOP and thereby maintains Se supply to growing sperm, namely the apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) [26]. In addition, high concentrations of SELENOP have been detected in seminal fluid, likely for protecting sperm on their journey toward fertilization [27]. Collectively, a tightly regulated and complex system has been developed in the male to enable and maintain Se supply for fertility, involving SELENOP as a specific transport molecule and APOER2 as an efficient receptor for Se uptake. In comparison, our understanding of the molecular details of Se supply to follicles is limited, and the interaction of the essential micronutrients with oocyte maturation is poorly understood, especially in relation to PCOS. Improved knowledge and a better database may be of immediate relevance for ART and support the attempts to improve the selection of the optimal oocyte for fertilization. In order to close some aspects of the research gap, we determined Cu, Se, and Zn along with additional informative protein biomarkers of Se status in FF of women with or without a diagnosis of PCOS undergoing ART and compared the results to corresponding serum concentrations to identify potential interactions. We hypothesized that the TE status in serum and FF may correlate to the quality characteristics of an oocyte.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Serum and FF samples from women undergoing ART at the Kinderwunsch Institut Schenk GmbH in Dobl, Austria, were collected, stored, and retrieved from the Biobank Graz of the Medical University of Graz, Austria. All women agreed to sampling, storage, and later retrospective scientific analysis, and written informed consent was obtained from each woman prior to sampling. Sample collection and research were approved by the ethical committee of the Medical University of Graz (approval # 20–492 ex08/09). The collection of biosamples was established under the highest quality standards and transparency [28]. Serum samples from twenty women with a diagnosis of PCOS (PCOS

group) and from a further twenty women without PCOS (subfertile group) along with up to ten FF per patient were included in the analyses. PCOS was diagnosed according to the Rotterdam criteria as described [29,30], and a set of relevant clinical characteristics were determined (Table 1). At the time of sampling, 8 women in the subfertile and 15 in the PCOS group were diagnosed as primary infertile. A prior pregnancy or a known and diagnosed infertility of the male partner were not applied as an exclusion criterion. Women in the PCOS group were, on average, slightly younger than those in the subfertility group, BMI was similar, and only a small number of women were active smokers (Table 1). Serum anti-Mullerian hormone (AMH) concentrations were higher in the PCOS group than in the subfertile group, whereas estradiol (E2) concentrations were similar. Both hormones were determined using fully automated electrochemiluminescence immunoassays (ECLIA) for quantitative determination (Cobas-e411, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the women undergoing assisted reproduction.

Parameter	Subfertile		PCOS		p-Value *
	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	
Age (year)	35 ± 3	20	29 ± 4	20	<0.0001
BMI (kg/m ²)	22 ± 3	20	23 ± 3	20	n.s.
Smoker/non-smoker	-	2/18	-	4/16	
Hormonal status					
FSH (mIU/mL)	6.4 ± 1.6	19	6.6 ± 2.0	19	n.s.
AMH (ng/mL)	3.5 ± 2.2	19	8.2 ± 4.6	17	0.0004
E2 (pg/mL)	38.0 ± 15.1	19	38.3 ± 15.5	19	n.s.
Newborn height and weight					
Newborn height (cm)	48 ± 4	7	50 ± 5	5	n.s.
Newborn weight (g)	2994 ± 863	7	3001 ± 809	5	n.s.
ICSI/IVF/missing data		19/1/0		15/3/2	

* unpaired *t*-test. n.s.; not significant.

2.2. Sample Preparation and Characterization of Oocytes

The samples were obtained following a standardized protocol (Figure 1). Controlled ovarian hyperstimulation was initiated by the administration of follicle-stimulating hormone (FSH) at days 2–4 of the menstrual cycle, and a GnRH antagonist was applied on days 5–6. Ovulation was induced by chorion gonadotropin (hCG) injection 35 h before transvaginal puncture of mature follicles (diameter >15 mm) under ultrasound control at day 12–16. Ten FF were collected per woman and preserved individually, as described [28]. Briefly, follicles larger than 10 mm in diameter were aspirated under transvaginal ultrasound guidance (GE Healthcare Austria GmbH, Pfaffing, Austria) with a Steiner-Tan needle 17 gauge and a Steiner flush/valve (IVFETFLEX.com HandelsgmbH & Co KG, Graz, Austria). Follicular fluid was examined for oocytes in an IVF workstation L24E with the heating stage (K-SYSTEMS Kivex Biotec A/S, Birkerød, Denmark) under constant conditions of 37 °C and subsequently individually stored at −80 °C. Fertilization was performed 1–4 h after oocyte retrieval. Embryos were cultured in time-lapse systems and transferred (or cryopreserved) on day 3 or 5 after fertilization. A pregnancy test was carried out 10 days after embryo transfer (ET).

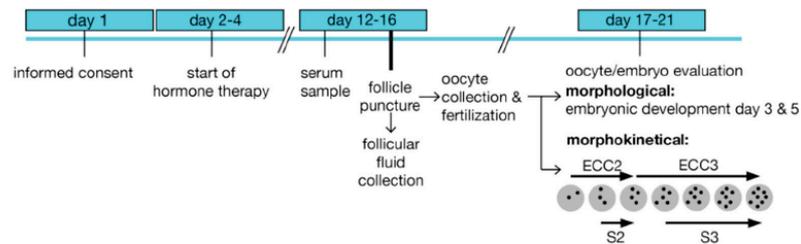


Figure 1. Treatment scheme and sample preparation. Enrolment started on day 1 before the initiation of hormone treatment. A serum sample was prepared prior to follicular puncture and follicular fluid collection. Oocytes and embryos were evaluated based on morphological characteristics, and embryos were cultured in time-lapse systems after fertilization for recording morphokinetic times. ECC; embryo cell cycle, s; synchronization within an ECC.

Embryo quality was evaluated at development day 3 with regards to the symmetry of the cells and the percentage of fragmentation. The expansion of the blastocyst, the quality of the inner cell mass (ICM), and the quality of the trophectoderm were determined on embryonic day 5 as described [31]. According to these characteristics, the corresponding FF were divided into five groups (Figure 2). Seventy follicular fluid samples were excluded as no clear allocation to one group was possible due to the presence of more than one oocyte in the corresponding follicle or due to missing information (oocyte sharing), including all the FF samples from two women.

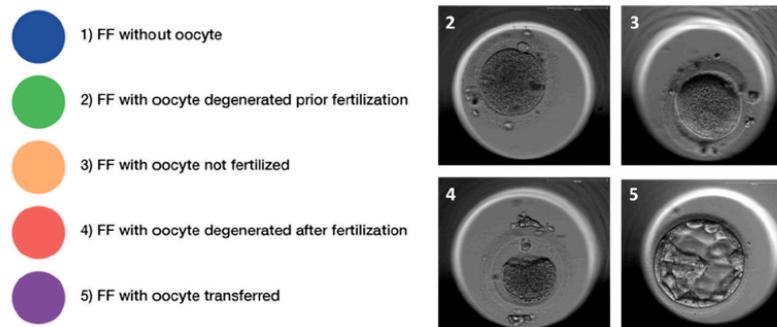


Figure 2. Classification of follicular fluid samples. Follicular fluids (FF) were retrospectively classified according to morphological characteristics of the oocyte and/or embryo and classified into five distinctive quality classes, i.e., (1) FF without an oocyte, (2) FF with an oocyte, which degenerated prior to fertilization, (3) FF with an oocyte that could not be fertilized, (4) FF with an oocyte, which degenerated after fertilization, and (5) FF with a successfully fertilized oocyte and transferred or frozen embryo. Representative pictures of oocytes (class 2–4) and a blastocyst (class 5), respectively, are provided in the panel to the left.

Complementary to morphological variables, morphokinetic parameters were collected by time-lapse technology (embryoscope), as described [32]. The duration of embryo cell cycles (ECC), i.e., doubling of the cell number of blastomeres, was recorded and annotated using the proposed guidelines and terminology [33]. ECC2 describes the duration of the second cell cycle, which results in the doubling from two to four cells (t_4-t_2), and ECC3 describes the third cell cycle (t_8-t_4), t_n describing the time point of the first observation of the respective numbers (n) of discrete cells. Synchronization (s) describes the time between the next geometric sequence within an ECC, with s_2 as the synchronicity time of the sisters'

blastomere division within EEC2, calculated as t_4-t_3 . Analogously for s_3 , the synchronicity of the four blastomere divisions within ECC3, calculated as t_8-t_5 [33].

2.3. Trace Element (TE) Analysis in Serum and FF Samples

The laboratory analyses of TE status were conducted at a remote site from the biobank (Institute for Experimental Endocrinology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany) by scientists blinded to the clinical data. Concentrations of TE in serum and FF were determined by total reflection X-ray fluorescence (TXRF) analysis using a benchtop TXRF analyzer (S4 T-STAR, Bruker nano GmbH, Berlin, Germany), as described [34,35]. Briefly, serum or FF samples were diluted with an equal volume of a gallium standard (1000 µg Ga/L), mixed thoroughly, and applied to polished quartz glass disks. Samples were dried overnight, and a standard sample from a pool of 25 healthy donor sera served as a control in each analysis run. The inter-assay coefficient of variation was below 10%.

Enzymatic activity of GPX3 was determined in serum and FF samples by a coupled optic test procedure monitoring glutathione reductase-catalyzed consumption of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm and 25 °C [36,37]. Briefly, samples of 5 µL were applied to 96-well plates, and a reaction mixture (200 µL) of 1 mM NaN_3 , 3.4 mM reduced glutathione, 0.3 U/mL glutathione reductase, and 0.27 mg/mL NADPH was added. The test was started with 10 µL of hydrogen peroxide (0.00375%). The decrease in NADPH absorbance at 340 nm is proportional to GPX3 activity. A constant serum sample was included in each assay run for quality control and yielded an inter- and intra-assay CV below 20%.

The concentration of SELENOP was determined by a commercially available sandwich ELISA (selenOtest, selenOmed GmbH, Berlin, Germany) as described earlier [38]. SDS-PAGE was performed with serum and FF samples using 12.5% Bis-Tris gels in combination with a Tris/SDS running buffer as described [38]. The proteins were blotted onto a 0.2 µm PVDF membrane (Thermo Fisher Scientific) in transfer buffer (250 mM Tris, 1.92 M glycine, 1% SDS, pH 8.3) containing 20% methanol. PonceauS (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Germany) was used for protein visualization after transfer. SELENOP was detected by Western blot using anti-human SELENOP antibodies (selenOmed GmbH, Berlin, Germany) and an anti-mouse IgG-HRP from sheep (Amersham BioSciences UK Ltd., Amersham PI, Little Chalfont Buckinghamshire, U.K.) in combination with the ECL Western Blotting Detection Reagents and Hyperfilm™ (GE Healthcare GmbH, Solingen, Germany). Quantification of relative SELENOP expression was achieved by using the image-processing program ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA, version 1.53i).

2.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics 25, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Parametric tests were used since TE concentrations are usually normally distributed. Interrelations between parameters were analyzed by Pearson correlation test. Differences in morphokinetic times were tested using paired *t*-test. Differences between the PCOS and subfertile groups were tested using an unpaired *t*-test or a linear mixed model test. The linear mixed models included age as covariate and group (PCOS/subfertile) and follicular quality (when studying FF) as fixed effects of testing the interaction. The subjects were included as random effects. Bonferonni post-hoc tests were used to correct for multiple testing.

3. Results

3.1. Patient Characteristics

A total of $n = 20$ women with POCS (PCOS) and $n = 20$ women with other reasons for reduced fertility (subfertile) were included in this observational study. Women in the PCOS group were on average significantly younger as compared to the subfertile group. Eight women of the subfertile and seven women of the PCOS group achieved pregnancy,

and seven in the subfertile versus five in the PCOS group achieved a successful live birth (Table 1), which resembles a pregnancy rate of 40% and 35%, respectively.

3.2. Trace Element Status in Serum and Follicular Fluids (FF)

The concentration of Cu, Se, and Zn were determined in the serum and FF samples. The direct comparison indicates that all three TE are on average considerably lower in the FF than in the serum samples (Figure 3A–C). Evaluating the interrelation between TE concentrations in the matrices, i.e., serum and FF, strong positive correlations for Se and Cu and a less stringent correlation for Zn were detected (Figure 3D–F).

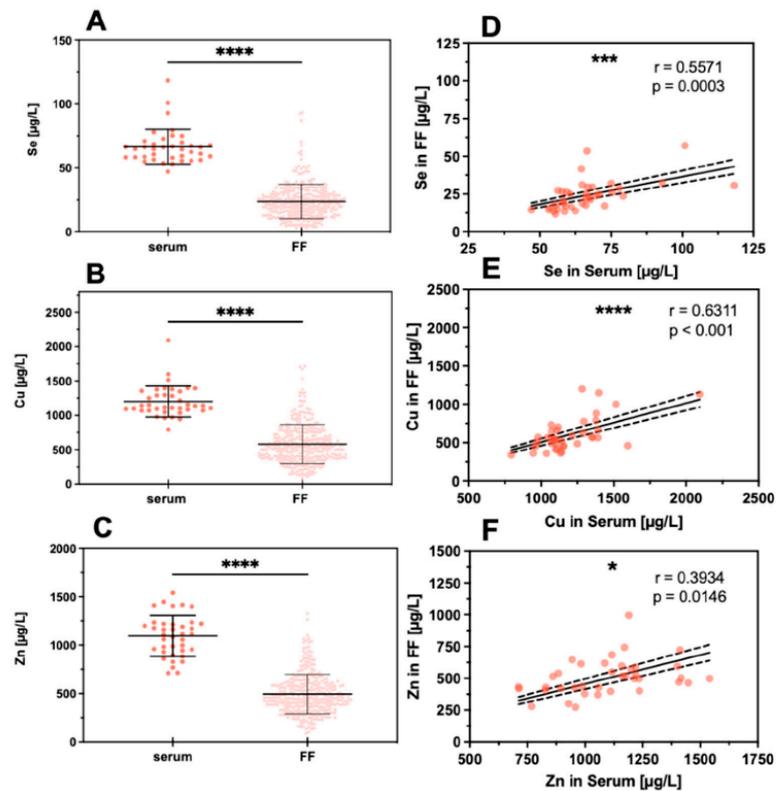


Figure 3. Comparison of TE concentrations in serum and FF samples. Trace elements were determined in serum samples (serum, $n = 38$) and follicular fluids (FF, $n = 324$ for Se, $n = 330$ for Cu, $n = 330$ for Zn). On average, the concentrations of (A) Se, (B) Cu, and (C) Zn were significantly lower in FF as compared to serum. Despite this difference, a significant linear positive correlation was observed between the FF and serum samples for (D) Se, (E) Cu, and (F) Zn. Samples were compared by paired t -test, and the significance shown for (A–C) was calculated based on the means of TE concentrations in the FF from the same woman; significance is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

3.3. Strong Variability of Trace Element Status in Follicular Fluids versus Corresponding Serum

One serum sample and up to ten corresponding FF per woman were available for analysis. The direct comparison of the TE indicates a wide variety of concentrations in the different FF obtained from the same woman (Figure 4). The variation in TE concentrations of the FF within one woman can be higher than the variation between all the serum samples

analyzed across the women. Notably, some FF are almost reaching serum concentrations (e.g., samples #8, #12, #26, #27, or #36 in case of Se), while other FF sample sets from a particular woman show a more uniform and relatively low trace element status (e.g., samples #2, #6, #11, #35, or #37 in case of Se) (Figure 4A). The same pronounced variation of concentrations and differences also applies to Cu and Zn (Figure 4B,C).

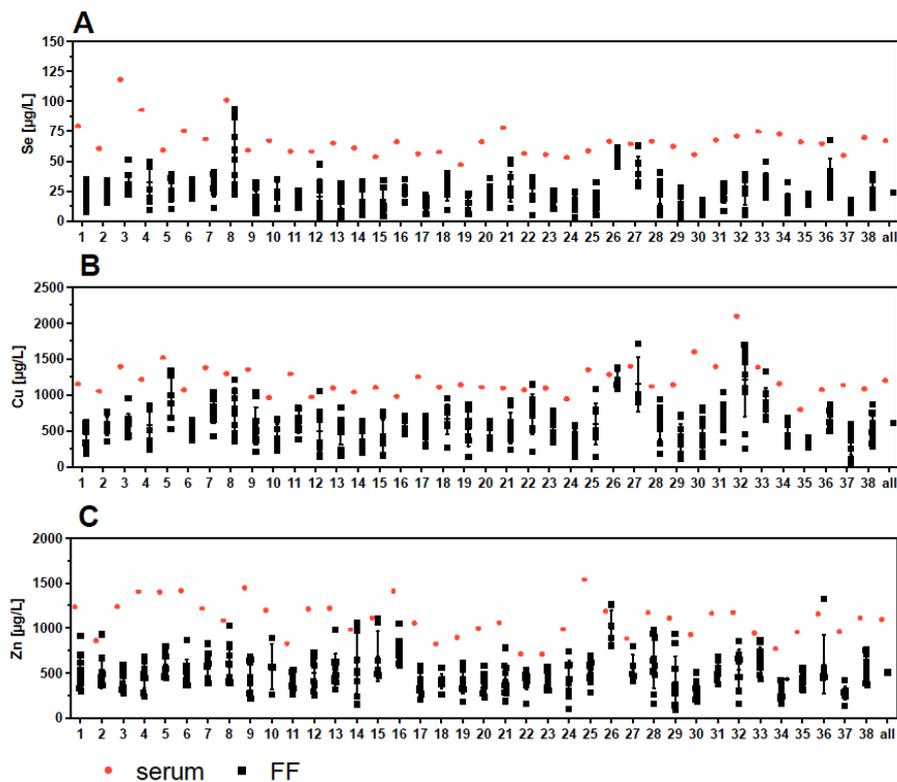


Figure 4. Comparison of TE concentrations in serum and corresponding follicular fluids (FF). Trace element concentrations of one serum sample with up to 10 corresponding FF were compared per patient. The results indicate a wide variation in TE concentrations in the different FF with regards to (A) Se, (B) Cu, and (C) Zn. Samples 20–37 correspond to women with PCOS.

To analyze the strong variability of TE concentrations in the FF further and to relate it to follicle quality, the samples were divided into five groups of different characteristics, based on morphological quality as described above (Figures 2 and 5A–C). The TE concentrations in group 1 (FF without an oocyte) were used as reference. Mean differences (MD) in TE concentrations between follicles in group 2–5 with group 1 were calculated and denoted as Δ groups ($\Delta 2-1$, $\Delta 3-1$, $\Delta 4-1$ or $\Delta 5-1$) (Figure 5D–F). The Se concentrations showed a significant difference when comparing the FF of the highest quality (group 5) with group 1 of follicles without an oocyte, denoted as “ $\Delta 5-1$ ” (Figure 5D). For Cu, three quality groups showed higher concentrations as compared to group 1 (Figure 5E), whereas Zn concentrations were significantly higher in groups 2 and 4 as compared to group 1 (Figure 5F). Collectively, the data indicate that the FF with poor quality (group 1) showed generally lower TE concentrations than the FF with better oocytes in groups 2–5. However,

the trends of higher TE concentrations with FF quality were not uniformly observed across all sample sets.

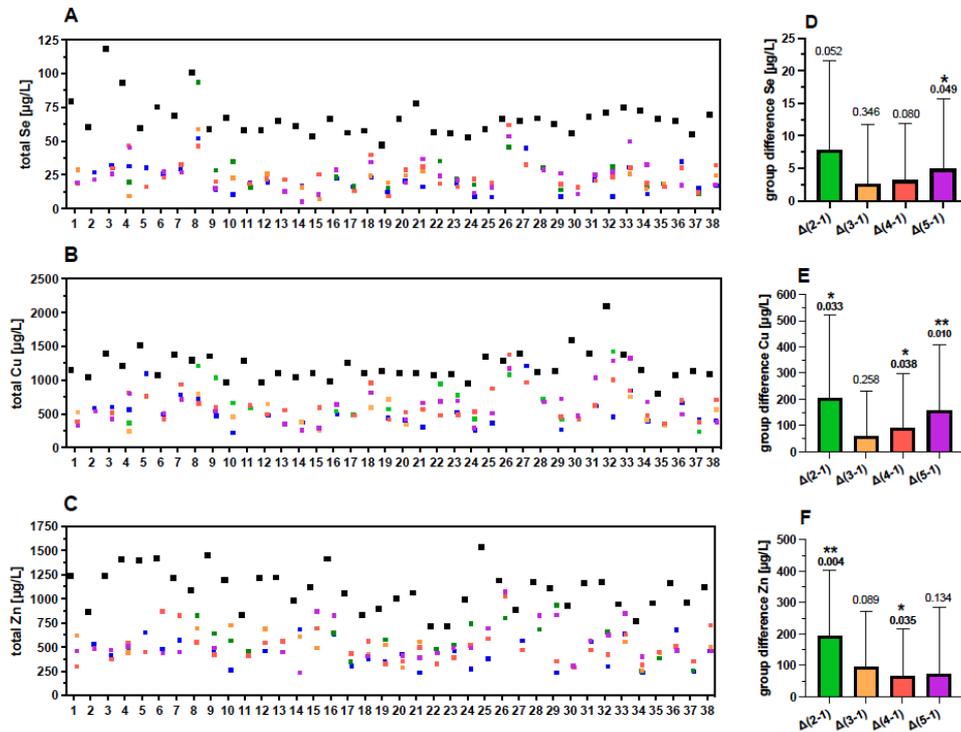


Figure 5. TE concentrations in FF in relation to quality characteristics. The FF are color-coded according to quality characteristics; group 1 (blue, poor quality), group 2 (green), group 3 (orange), group 4 (red), and group 5 (purple, highest quality), as described above (Figure 2). Strong differences between corresponding serum and FF samples and between the different FF of varying quality from the same woman are observed for (A) Se, (B) Cu, and (C) Zn. The mean differences in TE concentrations of the groups of FF with different quality (group differences) with respect to group 1 as reference (poor quality) are indicated for (D) Se, (E) Cu, and (F) Zn. In general, higher TE concentrations are observed in serum than in FF and among the FF with increasing quality. Samples 20–37 correspond to women with PCOS. Statistical significance is indicated by * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$.

3.4. Protein Biomarkers of Se Status in Follicular Fluids and Corresponding Serum Samples

The nutritional supply with the trace element Se can be assessed by different selenoproteins as additional biomarkers of Se status [39,40], and a combination of these biomarkers may provide particularly meaningful prognostic information [41]. In this study, two complementary biomarkers were determined in addition to total Se in the serum and FF samples, i.e., extracellular glutathione peroxidase (GPX3) enzymatic activity and the concentration of the extracellular Se transporter selenoprotein P (SELENOP). In line with the findings of reduced total Se in FF compared to serum, also significantly lower GPX3-activity was observed in FF as compared to serum (Figure 6A). Notably, a linear positive correlation was observed for GPX3 activity in serum and in the corresponding FF samples from the same woman (Figure 6B). The GPX3 activity in serum of the different women was relatively constant and poorly related to serum Se (Figure 6C), whereas a strong and linear correlation was observed between GPX3 activity and Se concentrations in FF (Figure 6D). This finding raises the question of whether Se in FF is controlled and dominated by GPX3, with no or only minor contribution from the Se transporter

SELENOP. However, Western blot analysis detected immunoreactive SELENOP at the expected size of 50–55 kDa in FF, and the quantitative analysis showed a strong positive linear correlation between SELENOP concentration in FF and total FF Se concentrations (Figure 6E–G).

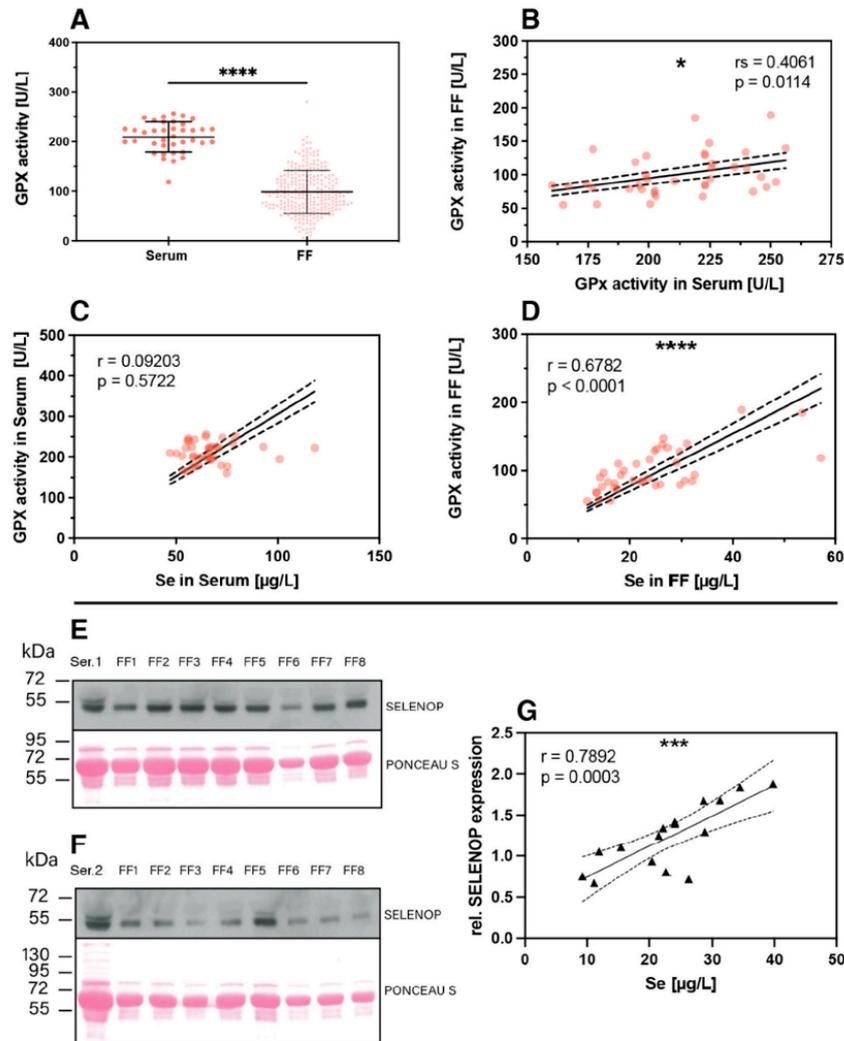


Figure 6. Protein biomarkers of Se status in FF and serum. (A) Expression of the extracellular glutathione peroxidase (GPX3) was analyzed in the serum and FF samples and showed lower and very variable enzymatic activity in FF. Analysis of significance was conducted with the mean FF GPX3 activity from the same woman with the corresponding serum by paired *t*-test. (B) The GPX3 activities in serum and corresponding FF samples from the same woman showed a linear and positive correlation. (C) The correlation between serum GPX3 activity and total serum Se was poor, whereas (D) GPX3 activity and total Se concentration in the FF correlated strongly and linearly. (E,F) Western blot analysis indicates SELENOP expression in the FF samples at the same size and band pattern at 50–55 kDa as in the corresponding serum sample; analysis was conducted in the sample sets of one subject selected from the group of subfertile (E) and PCOS (F) women each. Ponceau S staining illustrates the loading of the lanes for improved comparison of signal strengths. (G) A positive linear correlation is observed for SELENOP and total Se in the FF samples. Statistical significance is indicated by * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

3.5. Trace Element Status in Patients in Relation to a Diagnosis of PCOS

Next, differences in TE concentrations were analyzed between the subfertile women with respect to a diagnosis of PCOS. A direct comparison of the serum samples indicated a slightly lower Zn concentration in PCOS (PCOS; $1029 \pm 195 \mu\text{g/L}$ vs. Subfertile; 1159 ± 203 , $p = 0.046$, Figure 7A). No significant differences were observed for serum Se (Figure 7B), serum Cu (Figure 7C), or serum GPX3 activity (Figure 7D).

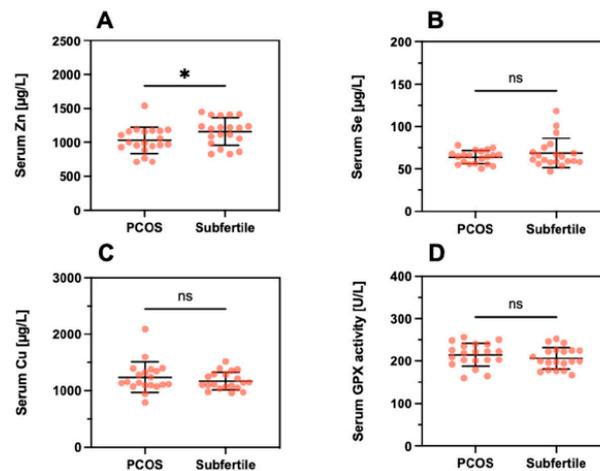


Figure 7. Serum trace element concentrations and GPX3 activity in relation to PCOS. The direct comparison of serum (A) Zn, (B) Se, (C) Cu, and (D) GPX3 activity indicates minor differences only, with the notable exception of a slightly suppressed serum Zn concentration in PCOS. Tested with a linear mixed model; * indicates $p < 0.05$. ns indicates no significant difference.

Regarding the TE concentrations in relation to quality characteristics of the FF, the data were compared per woman according to the differences in relation to group 1 (poor quality) serving as a reference. Conducting these analyses, few significant differences were noted (Table 2). The FF samples from the group of women with PCOS showed slightly lower Zn concentrations in group 3 (PCOS; 419 ± 142 vs. Subfertile; 571 ± 111 ; $p = 0.029$) and elevated Cu concentrations in group 5 (PCOS 742 ± 318 vs. Subfertile; 507 ± 190 ; $p = 0.039$). No other significant differences were observed. The differences in trace element concentrations and GPx activity were tested using a linear mixed model. Delta groups, based on the means per woman, were tested using unpaired t -tests.

A slightly lower Zn and an elevated Cu concentration were detected in groups 3 and 5, respectively, of samples from the women with a PCOS diagnosis in comparison to the other group of subfertile women. With regards to differences between the quality characteristics of FF, significantly elevated Cu and Zn concentrations were observed in the high-quality group (group 5) compared to TE concentration in FF without an oocyte (group 1) in the samples from women with PCOS as compared to the samples of subfertile women (Table 2). This result indicates that the observed differences between group 5 and group 1 for the Zn and Cu concentrations mainly refer to PCOS women or are at least more pronounced in PCOS than in FF from women with other reasons for subfertility.

Table 2. TE concentrations in FF of different quality from women with or without PCOS.

Group		Subfertile		PCOS		p-Value
		Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	
1	Se (µg/L)	23 ± 10	17	19 ± 11	13	n.s.
	Cu (µg/L)	555 ± 191	17	518 ± 267	13	n.s.
	Zn (µg/L)	474 ± 118	17	402 ± 164	13	n.s.
	GPX3 (U/L)	96 ± 33	17	96 ± 49	13	n.s.
2	Se (µg/L)	31 ± 26	8	24 ± 11	10	n.s.
	Cu (µg/L)	683 ± 289	8	682 ± 381	10	n.s.
	Zn (µg/L)	569 ± 144	8	572 ± 231	10	n.s.
	GPX3 (U/L)	103 ± 25	8	102 ± 42	10	n.s.
3	Se (µg/L)	24 ± 14	10	22 ± 5	5	n.s.
	Cu (µg/L)	516 ± 185	10	479 ± 179	5	n.s.
	Zn (µg/L)	571 ± 111	10	419 ± 142	5	0.039
	GPX3 (U/L)	86 ± 35	10	75 ± 12	5	n.s.
4	Se (µg/L)	26 ± 11	16	24 ± 11	17	n.s.
	Cu (µg/L)	619 ± 176	16	652 ± 276	17	n.s.
	Zn (µg/L)	536 ± 170	16	467 ± 174	17	n.s.
	GPX3 (U/L)	111 ± 36	16	103 ± 40	17	n.s.
5	Se (µg/L)	22 ± 11	13	27 ± 12	15	n.s.
	Cu (µg/L)	507 ± 190	13	742 ± 318	15	0.028
	Zn (µg/L)	503 ± 167	13	591 ± 220	15	n.s.
	GPX3 (U/L)	97 ± 38	13	105 ± 38	15	n.s.
Δ (2–1)	Se (µg/L)	9 ± 17	8	7 ± 9	6	n.s.
	Cu (µg/L)	179 ± 283	8	236 ± 389	6	n.s.
	Zn (µg/L)	138 ± 120	8	270 ± 285	6	n.s.
	GPX3 (U/L)	21 ± 45	7	8 ± 25	5	n.s.
Δ (3–1)	Se (µg/L)	2 ± 11	8	3 ± 7	4	n.s.
	Cu (µg/L)	75 ± 189	8	28 ± 152	4	n.s.
	Zn (µg/L)	128 ± 167	8	31 ± 205	4	n.s.
	GPX3 (U/L)	0 ± 42	8	−22 ± 13	3	n.s.
Δ (4–1)	Se (µg/L)	2 ± 9	13	4 ± 9	13	n.s.
	Cu (µg/L)	46 ± 190	13	132 ± 223	13	n.s.
	Zn (µg/L)	83 ± 161	13	49 ± 143	13	n.s.
	GPX3 (U/L)	9 ± 39	12	3 ± 26	11	n.s.
Δ (5–1)	Se (µg/L)	1 ± 8	10	9 ± 12	11	n.s.
	Cu (µg/L)	27 ± 141	10	274 ± 277	11	0.02
	Zn (µg/L)	−28 ± 169	10	164 ± 215	11	0.036
	GPX3 (U/L)	3 ± 31	9	10 ± 42	9	n.s.

n.s.; not significant.

3.6. Trace Element Status in Relation to Morphokinetic Variables

Besides the morphological parameters, morphokinetic variables of the oocytes were measured, including the timings of cleavage and specific early developmental endpoints among embryos. Timing of embryo cell cycles two and three (ECC2;ECC3) and times of synchronization (s2,s3) within the ECCs were calculated for groups 4 and 5. The time to reach synchrony after initiation of the second and third cleavage (s2 and s3) was significantly shorter in group 5 vs. group 4 (s2, group 4; 5.2 ± 5.8 vs. group 5; 1.8 ± 2.6 h, $p = 0.023$, and s3, group 4; 15.7 ± 9.1 vs. group 5; 8.7 ± 4.8 h, $p = 0.017$). Times of ECC2 and ECC3 were also shorter in group 5 compared to group 4, but without reaching statistical significance (ECC2, group 4; 13.6 ± 6.0 vs. group 5; 12.6 ± 1.5 h; ECC3, group 4; 22.7 ± 7.3 vs. group 5; 19.1 ± 3.5 h) (Table 3).

Table 3. Morphokinetic times in oocytes categorized into groups 4 (good quality) and 5 (best quality).

Parameter	Group 4		Group 5		p-Value
	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	
ECC2 (h)	13.6 ± 6.0	19	12.6 ± 1.5	19	n.s.
ECC3 (h)	22.7 ± 7.3	15	19.1 ± 3.5	15	n.s.
S2 (h)	5.2 ± 5.8	20	1.8 ± 2.6	20	0.023
S3 (h)	15.7 ± 9.1	15	8.7 ± 4.8	15	0.017

When correlating TE concentrations with the calculated times, some notable positive and negative correlations for Cu, Zn, Se, and GPx3 activity were observed (Supplementary Table S1). In group 4, Cu and Se correlated with s3 (Cu; $n = 15$, $r = 0.443$, $p = 0.03$, and Se; $n = 15$, $r = 0.476$, $p = 0.016$). In group 5, Zn and Se correlated with ECC2 ($n = 19$, $r = 0.402$, $p = 0.042$, and Se; $n = 19$, $r = 0.39$, $p = 0.049$). A stringent correlation of GPX3-activity in group 4 with s3 was detected ($n = 15$, $r = 0.648$, $p = 0.001$), in line to the correlation of Se in group 4 with s3. In these analyses of TE concentrations with morphokinetic times, no significant differences were found between the women in the PCOS or subfertile group.

4. Discussion

This study reports biomarkers of TE status in matched samples of serum and FF from women undergoing ART, with a focus on the trace element Se. In general, positive correlations between serum and FF were observed, and a tendency of relatively low TE concentrations was noted in FF of the lowest quality (group 1). In view of our standardized and well-controlled sampling [28], the data highlight a hitherto unexpected high variation in TE status between the different follicles of the same woman, verified in the case of Se by three complementary biomarkers including two Se-dependent proteins. The molecular reasons for this diversity in TE biomarkers are unknown but support the notion that the FF composition is controlled by follicle cells and the extent of exchange with the circulation and degree of plasma transudate. In view of the positive correlation of TE biomarkers in serum and FF, deficiencies in intake seem to be translated directly into the FF, and an improved TE supply would thus not only raise serum TE concentrations but likely also the TE status in the FF as a promising adjuvant measure during ART. In contrast to our expectations, there were no strong differences in serum and FF when separating the patients according to PCOS, but the decreased Zn concentration in serum and FF of group 3 and the elevated Cu levels in FF of oocytes of the highest quality from PCOS women warrant further analyses. Moreover, a decreased Zn concentration had been described before in PCOS, potentially related to insulin resistance and hyperandrogenemia [42].

Our data accord well with previous studies describing relatively low concentrations of Cu and Zn in FF as compared to serum [43]. Similarly, total average Se concentrations and GPX3 activity were reported to be lower in FF as compared to serum [44,45]. However, the average differences reported vary, and in the recent analysis of $n = 103$ couples from China, serum Se was about 50% higher in serum than in FF (108 ± 21 vs. 71 ± 15 $\mu\text{g/L}$) [44], whereas this difference was much more pronounced in our samples from Austrian women (serum; 67 $\mu\text{g/L}$ vs. FF; 24 $\mu\text{g/L}$, Figure 3). This finding may relate to the relatively poor Se status in Austria and other areas of central Europe [46] and points to a Se-dependent gradient from serum to FF. In serum, it is known that the two major circulating selenoproteins, namely GPX3 and SELENOP, are reaching certain saturated expression levels upon sufficient Se intake that are even used to define an optimal Se status [34,47,48]. It can be assumed that there are similar mechanisms operating in FF in order to tightly control and limit Se status and selenoprotein levels, as both GPX3 and SELENOP were successfully detected in FF and correlated linearly to serum levels. However, the optimal concentrations in FF are unknown, as the samples analyzed were derived from European women with insufficient habitual intake, much in contrast to, e.g., subjects residing in North America where Se intake is higher due to better soil Se status [49,50].

To our surprise, the TE concentrations differed strongly between the FF from the same woman, even more intensively than among all the serum samples from the 40 women analyzed in this study. This result is in some agreement with a recent report on essential and non-essential TE in FF from the United States, where the differences were associated with demographic and clinical parameters, such as age, race, or BMI [51]. Unfortunately, data from matched serum samples of these U.S. American women are currently not available. Alternative influences on TE in FF may be exerted by follicle size and maturity [52]. This parameter is of likely little relevance to the results reported in our study, as follicle size was controlled for, and the follicles chosen displayed uniformly a minimal diameter of 15 mm; smaller follicles were not used for our analysis.

Our results indicate elevated TE concentrations in the groups of follicles with higher quality in comparison to FF without an oocyte, largely in agreement with several prior studies [45]. However, some reports also indicate adverse effects with increasing TE concentrations, e.g., for Cu in FF in relation to ongoing pregnancy [43] or for elevated Cu in PCOS in relation to steroidogenesis [53]. Again, these data support the notion of a tightly controlled and physiological relevant microenvironment for the developing oocyte, including not only the required supply with micronutrients but also protection from surplus and potentially toxic concentrations of TE.

In addition to the traditional scoring and selection of embryos using microscopy on predefined days, we also evaluated through time-lapse imaging the morphokinetic parameters of early embryo development. Several publications have proposed additional morphological evaluations to assess the timing of embryonic cell divisions that appear to be related to embryo viability [54–58]. Especially, the duration of the second cell cycle (cc2) and the synchrony of the second and third cell divisions (s2, s3) were described to be important indicators correlating with the chance of embryo implantation [10]. Here, we observed, as expected, that the morphologically defined oocyte group with the highest quality (group 5) was the one synchronizing the fastest. In addition, the cell cycle duration was considerably shorter. Comparable studies reported similar results, with shorter s2 and s3 in embryos forming blastocysts compared to those with poor quality [59]. On the other hand, an accelerated synchronization without changing morphokinetic dynamics was detected in patients suffering from endometriosis [32].

It is tempting to speculate that a specific time frame for synchronization favors a successful development process in early embryo morphokinetics. Group 4 displayed extended times for cell division, which led to distorted embryo development. A distortion of morphokinetic embryo behavior was also reported for women suffering from PCOS [60]. In our study, no such differences in morphokinetic development were observed between PCOS and the other group, which may be due to the small sample size. The TE determined in our study correlated well with certain morphokinetic variables, especially ECC2, s2, and s3, along with the inverse correlation of Se with ECC2 in embryos degenerated after fertilization. These findings point to an as yet unexplained relevance of TE for successful development and the high importance of an optimal TE status for successful fertilization and embryo development. A dysregulated Se status may hinder the accurate timing of cell division, thereby leading to alterations in optimal morphokinetic cleavage times. The slight but consistently lower Zn concentrations in serum and FF of women with PCOS may warrant attention and further investigation, as suboptimal Zn concentrations negatively affect several aspects of female fertility, including meiosis and fertilization competence of the egg [61]. Observational studies are in agreement with this notion, as Zn deficiency was associated with a longer time to achieve pregnancy in women actively planning to conceive [62]. Animal experiments have indicated some positive effects of Zn supplementation on fertility in a rat model of PCOS, but whether these preclinical results can be directly translated to human patients with PCOS remains to be evaluated [63].

Among the particular strengths of our study are the established and validated technologies used, the high quality of the biobank, and the TE quantifications that were conducted at a remote site from the biobank by scientists blinded to the clinical characteristics. Hereby,

unbiased analysis and interpretation were enabled, and single FF with matched serum samples could be successfully studied without the need for analyzing pooled samples only. The findings indicate that not only do the TE concentrations vary strongly between FF from the same woman, but also the expression of physiological relevant protein biomarkers of TE status such as SELENOP and GPX3 differ. In view of their essential role in controlling redox milieu and oxidative stress, it is conceivable that Se deficiency correlates to poor oocyte quality. Among the limitations of our analyses are the small group sizes of serum samples analyzed. However, relatively suitable matching of the groups and of FF with serum was successfully achieved, and the number of FF analyzed was relatively high.

5. Conclusions

We conclude that there is a direct relationship between TE in serum and FF and that, in particular, the three biomarkers of Se status correlate positively in FF, highlighting their similar suitability for follicle-specific Se status assessment. The mechanisms connecting TE in serum and FF are poorly understood, in particular in view of the high variability between different FF obtained from the same woman at the same time. As the FF with the poorest quality showed a trend to the lowest TE concentrations, we conclude that TE deficiencies should be avoided during ART and oocyte development. It is likely that FF does not control their TE status by simple filtration of serum but rather by highly regulated and feedback-controlled mechanisms likely involving endocrine effects on uptake and maintenance of TE and the TE-dependent proteins and enzymes to ensure an optimal microenvironment for oocyte development.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13114134/s1>, Table S1: Correlation analysis between trace elements and GPx3 activity with morphokinetic parameters.

Author Contributions: Conceptualization, M.S. and L.S.; data curation, L.J.S. and E.R.; formal analysis, E.R. and Q.S.; funding acquisition, L.S.; investigation, L.J.S. and G.W.; methodology, L.J.S., G.W., N.R. and Q.S.; project administration, M.S. and L.S.; resources, M.S. and L.S.; software, G.W. and E.R.; supervision, M.S.; validation, L.J.S., G.W. and N.R.; Visualization, G.W.; writing—original draft, L.J.S. and L.S.; writing—review and editing, G.W., E.R., N.R., Q.S. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), research unit FOR-2558 “TraceAge” (Scho 849/6-2), and CRC/TR 296 “Local control of TH action” (LocoTact, P17). Additional financial support was provided by the Open Access Publication Fund of Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the ethical committee of the Medical University of Graz (approval # 20–492 ex08/09).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects enrolled.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to data safety reasons.

Acknowledgments: The investigators would like to thank Vartitir Seher, Anja Fischbach, Gabriele Boehm, Tabael L. Turan, and Kamil Demircan for excellent technical support during the TE analyses and interpretation, Carlos Serrano Comes for his valuable help and expertise in embryo analysis, and Barbara Obermayer-Pietsch for constructive discussions.

Conflicts of Interest: L.S. holds shares in selenOmed GmbH, a company involved in Se status assessment and supplementation.

References

1. Boivin, J.; Bunting, L.; Collins, J.A.; Nygren, K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 1506–1512. [[CrossRef](#)]

2. Farquhar, C.M.; Bhattacharya, S.; Repping, S.; Mastenbroek, S.; Kamath, M.S.; Marjoribanks, J.; Boivin, J. Female subfertility. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2019**, *5*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Costello, M.F.; Misso, M.L.; Balen, A.; Boyle, J.; Devoto, L.; Garad, R.M.; Hart, R.; Johnson, L.; Jordan, C.; Legro, R.S.; et al. A brief update on the evidence supporting the treatment of infertility in polycystic ovary syndrome. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **2019**, *59*, 867–873. [[CrossRef](#)]
4. Patel, S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *182*, 27–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Legro, R.S.; Dodson, W.C.; Kunselman, A.R.; Stetter, C.M.; Kris-Etherton, P.M.; Williams, N.I.; Gnatuk, C.L.; Estes, S.J.; Allison, K.C.; Sarwer, D.B.; et al. Benefit of delayed fertility therapy with preconception weight loss over immediate therapy in obese women with PCOS. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 2658–2666. [[CrossRef](#)]
6. Drakopoulos, P.; Bardhi, E.; Boudry, L.; Vaiarelli, A.; Makriganakis, A.; Esteves, S.C.; Tournaye, H.; Blockeel, C. Update on the management of poor ovarian response in IVF: The shift from Bologna criteria to the Poseidon concept. *Adv. Reprod. Health* **2020**, *14*, 1–11. [[CrossRef](#)]
7. Saket, Z.; Källén, K.; Lundin, K.; Magnusson, Å.; Bergh, C. Cumulative live birth rate after IVF: Trend over time and the impact of blastocyst culture and vitrification. *Hum. Reprod. Open* **2021**, *2021*, hoab021. [[CrossRef](#)]
8. Yang, R.; Niu, Z.R.; Chen, L.X.; Liu, P.; Li, R.; Qiao, J. Analysis of related factors affecting cumulative live birth rates of the first ovarian hyperstimulation or intracytoplasmic sperm injection cycle: A population-based study from 17,978 women in China. *Chin. Med. J.* **2021**, *134*, 1405–1415. [[CrossRef](#)]
9. Gardner, D.K.; Balaban, B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and ‘OMICS’: Is looking good still important? *Mol. Hum. Reprod.* **2016**, *22*, 704–718. [[CrossRef](#)]
10. Meseguer, M.; Herrero, J.; Tejera, A.; Hilligsøe, K.M.; Ramsing, N.B.; Remohí, J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* **2011**, *26*, 2658–2671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Chen, M.H.; Wei, S.Y.; Hu, J.Y.; Yuan, J.; Liu, F.H. Does time-lapse imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical in vitro fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178720. [[CrossRef](#)]
12. Zakerkish, F.; Brannstrom, M.; Carlsson, E.; Sihlbom, C.; van der Post, S.; Thoroddsen, A. Proteomic analysis of follicular fluid during human ovulation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2020**, *99*, 917–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dumesic, D.A.; Meldrum, D.R.; Katz-Jaffe, M.G.; Krisher, R.L.; Schoolcraft, W.B. Oocyte environment: Follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil. Steril.* **2015**, *103*, 303–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Springman, S.A.; Drewnoski, M.E.; Funston, R.N. Effects of hydroxy trace mineral supplementation on gain and reproductive performance in beef heifers. *Livest. Sci.* **2021**, *245*, 104425. [[CrossRef](#)]
15. Hostetler, C.E.; Kincaid, R.L.; Miranda, M.A. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *Vet. J.* **2003**, *166*, 125–139. [[CrossRef](#)]
16. Capone, K.; Sentongo, T. The ABCs of nutrient deficiencies and toxicities. *Pediatr. Ann.* **2019**, *48*, e434–e440. [[CrossRef](#)]
17. Mirnamniha, M.; Faroughi, F.; Tahmasbpoura, E.; Ebrahimi, P.; Harchegani, A.B. An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization process. *Rev. Environ. Health* **2019**, *34*, 339–348. [[CrossRef](#)]
18. Buhling, K.J.; Grajecki, D. The effect of micronutrient supplements on female fertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2013**, *25*, 173–180. [[CrossRef](#)]
19. Roychoudhury, S.; Nath, S.; Massanyi, P.; Stawarz, R.; Kacaniova, M.; Kolesarova, A. Copper-induced changes in reproductive functions: In vivo and in vitro effects. *Physiol. Res.* **2016**, *65*, 11–22. [[CrossRef](#)]
20. Mintziori, G.; Mousiolis, A.; Duntas, L.H.; Goulis, D.G. Evidence for a manifold role of selenium in infertility. *Horm. Int. J. Endocrinol.* **2020**, *19*, 55–59. [[CrossRef](#)]
21. Mistry, H.D.; Broughton Pipkin, F.; Redman, C.W.; Poston, L. Selenium in reproductive health. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2012**, *206*, 21–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Allouche-Fitoussi, D.; Breitbart, H. The role of zinc in male fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Vickram, S.; Rohini, K.; Srinivasan, S.; Nancy Veenakumari, D.; Archana, K.; Anbarasu, K.; Jeyanthi, P.; Thanigaivel, S.; Gulothungan, G.; Rajendiran, N.; et al. Role of Zinc (Zn) in human reproduction: A journey from initial spermatogenesis to childbirth. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ursini, F.; Heim, S.; Kiess, M.; Maiorino, M.; Roveri, A.; Wissing, J.; Flohe, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* **1999**, *285*, 1393–1396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Renko, K.; Werner, M.; Renner-Muller, I.; Cooper, T.G.; Yeung, C.H.; Hollenbach, B.; Scharpf, M.; Kohrle, J.; Schomburg, L.; Schweizer, U. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-inoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 741–749. [[CrossRef](#)]
26. Olson, G.E.; Winfrey, V.P.; NagDas, S.K.; Hill, K.E.; Burk, R.F. Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12290–12297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Michaelis, M.; Gralla, O.; Behrends, T.; Scharpf, M.; Endermann, T.; Rijntjes, E.; Pietschmann, N.; Hollenbach, B.; Schomburg, L. Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443*, 905–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Schenk, M.; Huppertz, B.; Obermayer-Pietsch, B.; Kastelic, D.; Hormann-Kropfl, M.; Weiss, G. Biobanking of different body fluids within the frame of IVF-a standard operating procedure to improve reproductive biology research. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2017**, *34*, 283–290. [[CrossRef](#)]
29. Lerchbaum, E.; Theiler-Schwetz, V.; Kollmann, M.; Wolfler, M.; Pilz, S.; Obermayer-Pietsch, B.; Trummer, C. Effects of vitamin D supplementation on surrogate markers of fertility in pcos women: A randomized controlled trial. *Nutrients* **2021**, *13*, 547. [[CrossRef](#)]
30. Azziz, R.; Carmina, E.; Chen, Z.J.; Dunaif, A.; Laven, J.S.E.; Legro, R.S.; Lizneva, D.; Natterson-Horowitz, B.; Teede, H.J.; Yildiz, B.O. Polycystic ovary syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2016**, *2*, 16057. [[CrossRef](#)]
31. Gardner, D.K.; Lane, M.; Stevens, J.; Schlenker, T.; Schoolcraft, W.B. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil. Steril.* **2019**, *112*, E81–E84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schenk, M.; Kröpfl, J.M.; Hörmann-Kröpfl, M.; Weiss, G. Endometriosis accelerates synchronization of early embryo cell divisions but does not change morphokinetic dynamics in endometriosis patients. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0220529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ciray, H.N.; Campbell, A.; Agerholm, I.E.; Aguilar, J.; Chamayou, S.; Esbert, M.; Sayed, S.; Time-Lapse User, G. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 2650–2660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hoeflich, J.; Hollenbach, B.; Behrends, T.; Hoeg, A.; Stosnach, H.; Schomburg, L. The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 1601–1604. [[CrossRef](#)]
35. Moghaddam, A.; Heller, R.A.; Sun, Q.; Seelig, J.; Cherkezev, A.; Seibert, L.; Hackler, J.; Seemann, P.; Diegmann, J.; Pilz, M.; et al. Selenium deficiency is associated with mortality risk from COVID-19. *Nutrients* **2020**, *12*, 2098. [[CrossRef](#)]
36. Flohe, L.; Gunzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 114–121. [[CrossRef](#)]
37. Schomburg, L.; Schweizer, U.; Holtmann, B.; Flohe, L.; Sendtner, M.; Kohrle, J. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 397–402. [[CrossRef](#)]
38. Hybsier, S.; Schulz, T.; Wu, Z.; Demuth, I.; Minich, W.B.; Renko, K.; Rijntjes, E.; Kohrle, J.; Strasburger, C.J.; Steinhagen-Thiessen, E.; et al. Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 403–414. [[CrossRef](#)]
39. Combs, G.F., Jr. Biomarkers of selenium status. *Nutrients* **2015**, *7*, 2209–2236. [[CrossRef](#)]
40. Schomburg, L. The other view: The trace element selenium as a micronutrient in thyroid disease, diabetes, and beyond. *Hormones* **2020**, *19*, 15–24. [[CrossRef](#)]
41. Demircan, K.; Bengtsson, Y.; Sun, Q.; Brange, A.; Vallon-Christersson, J.; Rijntjes, E.; Malmberg, M.; Saal, L.H.; Ryden, L.; Borg, A.; et al. Serum selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase 3 as predictors of mortality and recurrence following breast cancer diagnosis: A multicentre cohort study. *Redox Biol.* **2021**, *47*, 102145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nasiadek, M.; Stragierowicz, J.; Klimczak, M.; Kilanowicz, A. The Role of Zinc in Selected Female Reproductive System Disorders. *Nutrients* **2020**, *12*, 2464. [[CrossRef](#)]
43. Tolunay, H.E.; Sukur, Y.E.; Ozkavukcu, S.; Seval, M.M.; Ates, C.; Turksoy, V.A.; Ecemis, T.; Atabekoglu, C.S.; Ozmen, B.; Berker, B.; et al. Heavy metal and trace element concentrations in blood and follicular fluid affect ART outcome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2016**, *198*, 73–77. [[CrossRef](#)]
44. Wu, S.; Wang, M.; Deng, Y.; Qiu, J.; Zhang, X.; Tan, J. Associations of toxic and essential trace elements in serum, follicular fluid, and seminal plasma with In vitro fertilization outcomes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *204*, 110965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Paszkowski, T.; Traub, A.I.; Robinson, S.Y.; McMaster, D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta* **1995**, *236*, 173–180. [[CrossRef](#)]
46. Stoffaneller, R.; Morse, N.L. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. *Nutrients* **2015**, *7*, 1494–1537. [[CrossRef](#)]
47. Hurst, R.; Armah, C.N.; Dainty, J.R.; Hart, D.J.; Teucher, B.; Goldson, A.J.; Broadley, M.R.; Motley, A.K.; Fairweather-Tait, S.J. Establishing optimal selenium status: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 923–931. [[CrossRef](#)]
48. Xia, Y.; Hill, K.E.; Li, P.; Xu, J.; Zhou, D.; Motley, A.K.; Wang, L.; Byrne, D.W.; Burk, R.F. Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: A placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 525–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Laclaustra, M.; Stranges, S.; Navas-Acien, A.; Ordovas, J.M.; Guallar, E. Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004. *Atherosclerosis* **2010**, *210*, 643–648. [[CrossRef](#)]
50. Schomburg, L. Selenium Deficiency Due to Diet, Pregnancy, Severe Illness, or COVID-19-A Preventable Trigger for Autoimmune Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8532. [[CrossRef](#)]
51. Butts, C.D.; Bloom, M.S.; McGough, A.; Lenhart, N.; Wong, R.; Mok-Lin, E.; Parsons, P.J.; Galusha, A.L.; Yuce, R.M.; Feingold, B.J.; et al. Variability of essential and non-essential trace elements in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *209*, 111733. [[CrossRef](#)]
52. Silberstein, T.; Saphier, O.; Paz-Tal, O.; Gonzalez, L.; Keefe, D.L.; Trimarchi, J.R. Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure. *Fertil. Steril.* **2009**, *91*, 1771–1774. [[CrossRef](#)]

53. Sun, Y.; Wang, W.; Guo, Y.; Zheng, B.; Li, H.; Chen, J.; Zhang, W. High copper levels in follicular fluid affect follicle development in polycystic ovary syndrome patients: Population-based and in vitro studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2019**, *365*, 101–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Shoukir, Y.; Campana, A.; Farley, T.; Sakkas, D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: A novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod.* **1997**, *12*, 1531–1536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lundin, K.; Bergh, C.; Hardarson, T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 2652–2657. [[CrossRef](#)]
56. Ciray, H.N.; Karagöç, L.; Ulug, U.; Bener, F.; Bahçeci, M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil. Steril.* **2006**, *85*, 358–365. [[CrossRef](#)]
57. Lemmen, J.G.; Agerholm, I.; Ziebe, S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod. Biomed. Online* **2008**, *17*, 385–391. [[CrossRef](#)]
58. Mio, Y.; Maeda, K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2008**, *199*, 660.e1–660.e5. [[CrossRef](#)]
59. Desai, N.; Ploskonka, S.; Goodman, L.R.; Austin, C.; Goldberg, J.; Falcone, T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2014**, *12*, 54. [[CrossRef](#)]
60. Wissing, M.L.; Bjerge, M.R.; Olesen, A.I.; Hoest, T.; Mikkelsen, A.L. Impact of PCOS on early embryo cleavage kinetics. *Reprod. Biomed. Online* **2014**, *28*, 508–514. [[CrossRef](#)]
61. Garner, T.B.; Hester, J.M.; Carothers, A.; Diaz, F.J. Role of zinc in female reproduction. *Biol. Reprod.* **2021**, *104*, 976–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Grieger, J.A.; Grzeskowiak, L.E.; Wilson, R.L.; Bianco-Miotto, T.; Leemaqz, S.Y.; Jankovic-Karasoulos, T.; Perkins, A.V.; Norman, R.J.; Dekker, G.A.; Roberts, C.T. Maternal selenium, copper and zinc concentrations in early pregnancy, and the association with fertility. *Nutrients* **2019**, *11*, 1609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Torshizi, F.F.; Chamani, M.; Khodaei, H.R.; Sadeghi, A.A.; Hejazi, S.H.; Heravi, R.M. The effects of zinc methionine on reproductive and thyroid hormones in rats with polycystic ovarian syndrome. *Adv. Biomed. Res. India* **2020**, *9*, 57. [[CrossRef](#)]

Lebenslauf

-

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

-

Komplette Publikationsliste

Lilly Johanna Schmalbrock, Gregor Weiss, Eddy Rijntjes, Nina Reinschissler, Qian Sun, Michael Schenk, Lutz Schomburg

Pronounced Trace Element Variation in Follicular Fluids of Subfertile Women Undergoing Assisted Reproduction

Nutrients. 2021 Nov 19;13(11):4134. doi: 10.3390/nu13114134.

Journal Impact Factor: **6,706** (Journal Citation Report 2021)

Journal Rank: JCR - **Q1** (Nutrition & Dietetics; 15/90) / CiteScore 2021

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei Personen bedanken, ohne deren Unterstützung und Hilfe die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Lutz Schomburg für die Vergabe meines Promotionsthemas, der Möglichkeit Einblicke in die Abläufe im Labor und den wissenschaftlichen Alltag zu bekommen bedanken. Gern erinnere ich mich an viele spannenden Diskussionen sowie motivierende Worte, wenn mal etwas nicht so lief wie geplant. Über eine immer offene Tür und ein offenes Ohr bei Fragen in der Betreuung bin ich sehr dankbar.

Auch möchte ich im Besonderen meinem Zweitbetreuer Dr. Eddy Rijntjes für die stetige Unterstützung entlang des gesamten Entstehungsprozess der Arbeit danken. Die Möglichkeit immer Fragen zu können, egal wie vermeintlich basal - besonders bezüglich Statistik- , hilfreiche Gespräche und viel Zeit in der umfangreichen Betreuung weiß ich sehr zu schätzen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei dem gesamten Team des IEE bedanken. Ich habe mich von Anfang an sehr freundlich und kollegial aufgenommen gefühlt, es gab immer eine helfende Hand bei Fragen und viele wissenschaftliche, aber auch private Gespräche, die ich in sehr guter Erinnerung behalte. Im Besonderen möchte ich dabei Varititér Seher, Gabriele Boehm, Anja Fischer und Dr. Waldemar Minich danken. Sowie Julian Hackler und Qian Sun. Vielen Dank für Eure fachlichen Hilfe und das nette Beisammensein, auch mal bei einem Getränk oder zwei.

Auch bedanke ich mich für die großartige und durchweg angenehme Zusammenarbeit mit dem Kinderwunsch Institut Dobl. Dr. Gregor Weiss, Nina Reinschissler und Dr. Michael Schenk ermöglichten es mir wirklich spannende Einblicke in die Reproduktionsmedizin und Embryologie zu erhalten.

Zuletzt möchte ich auch meinen Freund:innen und meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung, das Mitfiebern und das Dasein danken. Besonders möchte ich mich hier bei Dr. Laura Katharina Schmalbrock, Julia Gingelmaier und Simon Vitus Paul Maria Jenewein für Ihre Unterstützung bedanken.