

Anti-Müller-Hormon (AMH) kann zur Vorhersage des Follikelwachstums bei Stuten dienen

Andreas Vernunft, Falk Schneider, Armin Tuchscherer, Frank Becker und Wilhelm Kanitz

Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie; Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

Zusammenfassung

Seit langem ist das Anti-Müller-Hormon (AMH) als testikulärer Faktor bekannt, der die maskuline Differenzierung während der Embryogenese steuert. Aber auch bei adulten weiblichen Individuen wird AMH von den Granulosazellen der primären und frühen sekundären Follikel sezerniert. Dieser Pool an potentiell reifungsfähigen Follikeln wird in der Humanmedizin als ovarielle Funktionsreserve bezeichnet. Seine Größe wird über eine Serum-AMH-Bestimmung in der Reproduktionsmedizin geschätzt. In der Veterinärmedizin wird dieser Parameter bislang nicht genutzt. Mit den eigenen Untersuchungen sollte der Frage nachgegangen werden, ob Serum-AMH-Konzentrationen mit einem kommerziellen ELISA bei der Spezies Pferd bestimmt werden können und ob diese in Zusammenhang mit der Follikelentwicklung stehen. Dazu wurden Daten von Stuten ausgewertet, die wöchentlich einer ultraschallgeleiteten Follikelaspiration zur Eizellengewinnung unterzogen wurden. Ausgewählt wurden vier Stuten, die vergleichsweise konstant viele Follikel anbildeten ($11,1 \pm 1,1$ Follikel) und vier Stuten, die konstant weniger neue Follikel anbildeten ($6,2 \pm 0,51$ Follikel). Analysiert wurden Serumproben, die bei jeweils fünf aufeinander folgenden Aspirationssitzungen gewonnen wurden. Stuten mit durchschnittlich vielen aspirierbaren Follikeln hatten gegenüber den Tieren mit wenigen Follikeln signifikant höhere Serum-AMH-Konzentrationen ($1,2 \pm 0,05$ ng/ml vs. $0,6 \pm 0,04$ ng/ml, $p < 0,001$). Weiterhin beobachteten wir, dass die AMH-Konzentrationen über den Auswertungszeitraum individuell konstant blieben. Es bestand eine signifikante, positive Korrelation zwischen der Anzahl der wöchentlich aspirierten Follikel und der Höhe der Serum-AMH-Konzentration ($r=0,67$). Damit kann gezeigt werden, dass Serum-AMH-Konzentrationen bei Stuten geeignet sind, um das Follikelanbildungsvermögen während eines Ovum-Pick-Up-Programms vorher zu sagen. AMH könnte somit auch bei Stuten ein Marker zur Abschätzung der ovariellen Funktionsreserve sein.

Schlüsselwörter: Pferd, AMH, Follikelentwicklung; ovarielle Funktionsreserve, assistierte Reproduktion

Anti-Muellerian Hormone (AMH) can help to predict follicular growth in mares

Anti-Muellerian hormone (AMH) is a glycoprotein that is expressed only in the gonads. While secretion of AMH from the testicular Sertoli cells is essential for male fetal sex differentiation during embryonic development, in adult females it is produced only from granulosa cells of small and preantral follicles. Therefore it is used as an endocrine marker for this pool of small gonadotropin responsive follicles, which are also termed the ovarian follicular reserve in humans. Woman with high AMH plasma levels (great ovarian follicular reserve) can get lower FSH doses for and have a better ovarian response after a stimulatory treatment. The aim of our study was to determine AMH levels in equine plasma and to describe their relationship to follicular growth in mares. After weekly repeated ultrasound guided follicles aspiration sessions, we chose 4 mares, out of 12 oocyte donor mares, which had constantly a high number of follicles between the aspiration sessions (11.1 ± 1.1 follicles) and 4 mares, which showed constantly low numbers of new grown follicles (6.2 ± 0.5 follicles). Plasma AMH levels were measured with an ELISA (DSL-10-144400; Beckman Coulter, USA) in blood samples, which were taken from each mare at five consecutive follicle aspiration sessions. Mares with many new grown follicles between consecutive follicle aspirations had significant higher plasma AMH levels (1.2 ± 0.05 ng/ml) compared to mares with a lower number of new grown follicles (0.6 ± 0.04 ng/ml; $p < 0.001$). Individual AMH levels remained at a constant level during the observed period in each mare. While we found a significant positive correlation between AMH levels and the number of weekly new grown follicles ($r=0.67$), the number of recovered oocytes per aspiration session showed no relationship to plasma AMH levels. In conclusion, plasma AMH levels can be used to predict the number of available follicles in a follicle aspiration program in mares and therefore it could be also an important marker to calculate the ovarian follicular reserve in mares with regard to a superovulation program in the future.

Keywords: horse, AMH, follicular development, ovarian reserve, assisted reproductive technology

Einleitung

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) ist bereits seit 1947 als testikulärer Faktor bekannt, der während der Embryonalentwicklung durch Unterdrückung der Müllerschen Gänge die Ausprägung des männlichen Geschlechts steuert. Das Glykoprotein ist auch unter dem Begriff „Muellerian Inhibiting Substance“ (MIS) bekannt und wird einer Subfamilie des Transforming growth factor beta (TGF- β) zugeordnet, deren Mitglieder inhibierend in der Regulation von Gewebewachstum und Differenzierung wirken (Teixeira et al. 2001). AMH wird ausschließlich in den Gonaden exprimiert (Cate et al. 1986), im männlichen Organismus von Sertolizellen und im weiblichen Organismus von Granulosazellen (Rajpert-De et al.

1999). Das Hormon wird von primären und frühen sekundären Follikeln während der präantralen Phase der Follikulogenese sezerniert, nicht jedoch von Primordial- oder großen Antralfollikeln (Durlinger et al. 2002a). AMH wirkt dabei als inhibierender Faktor sowohl auf die Follikelrekrutierung als auch auf das präantrale Follikelwachstum. Da AMH nur von diesem Pool von Follikeln gebildet wird, gilt es als Marker der ovariellen Funktionsreserve. Unter der ovariellen Funktionsreserve wird der Pool an potentiell reifungsfähigen Follikeln verstanden (Visser et al. 2006). In der Humanmedizin wird bereits regelmäßig vor der Anwendung einer assistierten Reproduktionstechnik die ovarielle Funktionsreserve über eine Serum-AMH-Bestimmung eingeschätzt. Niedrige Serum-AMH-Konzentrationen weisen auf eine eingeschränkte ovarielle Funk-

tionsreserve und eine damit verbundene geringe Reaktion auf eine Hormonbehandlung hin. Um gleiche ovarielle Reaktionen zu erzielen, benötigen Patientinnen mit niedrigen AMH-Werten signifikant höhere rFSH-Dosen als Frauen mit hohen oder normalen Werten (La Marca et al. 2007). AMH unterliegt zudem keinen zyklusabhängigen Schwankungen und gilt gegenüber Inhibin B und FSH als zuverlässigerer Parameter zur Abschätzung der ovariellen Funktionsreserve (De Vet et al. 2002). Darüber hinaus wird die AMH-Bestimmung zur Vermeidung eines Hyperstimulationssyndroms durch FSH-Überdosierung genutzt, sie kann zur Vorhersage der Menopause dienen, oder wird zur Diagnostik von ovariellen Pathologien, wie einem Granulosazelltumor oder dem polyzystischen Ovarsyndrom (PCOS) eingesetzt (Visser et al. 2006, La Marca et al. 2010). In der veterinärmedizinischen Diagnostik findet der Parameter bisher jedoch kaum Beachtung. Erste Untersuchungen an Rindern zeigten, dass hohe Serum-AMH-Konzentrationen positiv mit der Anzahl der 3-7mm großen Follikel zu Beginn und der Anzahl Ovulationen am Ende einer Superovulationsbehandlung korreliert waren (Rico et al. 2009). Die Autoren resümieren, dass auch bei Rindern AMH-Konzentrationen im Plasma ein Indikator für ihr Reagieren auf Superovulationsprogramme sind. Bei Stuten ist das Auslösen von Superovulationen im Rahmen der assistierten Reproduktion nach wie vor schwierig. Mit den zur Zeit auf dem Markt verfügbaren Hormonpräparaten lässt sich bei Stuten weder zuverlässig eine Superovulation auslösen, noch eine aufgrund der anatomischen Verhältnisse besonders unerwünschte Hyperstimulation vermeiden (Allen 2009). Anhaltspunkte zur individuellen Dosisbemessung sind nicht bekannt. Bei der Spezies Pferd ist zum AMH bislang nur bekannt, dass equine Granulosazelltumore AMH exprimieren, und dass das Serum von Stuten mit einem Granulosazelltumor einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von müllerschen Gängen von Rattenfeten *in vitro* ausübt (Ball et al. 2008).

Zusammenhänge zwischen Serum-AMH-Konzentrationen und dem Follikelwachstum sind nach unserem Wissen bei Stuten bislang nicht untersucht worden. Wir wollten deshalb zum einen der Frage nachgehen, ob sich Serum-AMH-Konzentrationen auch bei Stuten mit einem kommerziellen ELISA quantifizieren lassen und zum anderen ob AMH-Konzentrationen im Serum einen Zusammenhang mit dem Follikelwachstum aufweisen.

Material und Methoden

Für die Untersuchung wurden Daten und Blutproben von 12 Mecklenburger Warmblutstuten im Alter von 10 bis 21 Jahren analysiert, die über eine Zuchtseason zur Eizellgewinnung genutzt wurden. Zur Eizellgewinnung wurden im wöchentlichen Intervall transvaginale, ultraschallgeleitete Follikelpunktionen durchgeführt, bei denen alle Follikel mit einem Mindestdurchmesser von 0,8 cm aspiriert wurden. Die Aspirationen wurden am sedierten, stehenden Tier mit einem Aspirationsystem der Firma VETEC GmbH Rostock vorgenommen, wie von Kanitz et al. (1995) beschrieben. Retrospektiv wurden zwei Gruppen generiert. Ausgewählt wurden vier Stuten, die im wöchentlichen Intervall im Durchschnitt vergleichsweise viele aspirierbare Follikel angebildet hatten (Gruppe A, oberes Drittel) und vier Stuten, die durchschnittlich weniger Follikel aufwiesen (Gruppe B, unteres Drittel). Zur AMH-Analytik wurden Plasmaproben genutzt, die bei den

8 Stuten der zwei Gruppen jeweils während aufeinander folgender Aspirationsitzungen gewonnen wurden. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die AMH-Bestimmung erfolgte im Doppelansatz mit einem ELISA (Active Muellierian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone (MIS/AMH) ELISA Kit; DSL-10-14400, Beckman Coulter, USA), der für die humanmedizinische Diagnostik angeboten wird. Die Eignung von humanmedizinischen AMH-ELISAs zur speziesübergreifenden AMH-Bestimmung (Rind, Labornager) wurde beschrieben (Monniaux et al. 2008). Die Empfindlichkeit des Kits wird vom Hersteller mit 6pg/ml angegeben. Die Analyse wurde gemäß der Herstellerangabe mit einer Einsatzmenge von 20µl durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde mit SAS für Windows, Release 9.2 (SAS Institute Inc. 2008) durchgeführt. Das Merkmal AMH wurde mittels Varianzanalyse mit der SAS-Prozedur MIXED ausgewertet und die wiederholten Messungen am gleichen Tier im „repeated statement“ der Prozedur Mixed berücksichtigt. Das Varianzanalysemodell enthielt den festen Effekt Gruppe (A, B) und die Kovariable Alter. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden zusätzlich LS-Means und deren Standardfehler berechnet. Außerdem wurden Rangkorrelationen zwischen dem Merkmalen AMH, Follikel und Oozyten mit der SAS-Prozedur CORR berechnet und auf Signifikanz geprüft.

Ergebnisse

Bei den Follikelaspirationssitzungen wurden zwischen einem und 24 Follikel pro Stute punktiert (Abb.1). Während der Zuchtseason wurden im Durchschnitt pro Sitzung und Stute minimal $5,8 \pm 0,6$ und maximal $13,0 \pm 3,7$ Follikel aspiriert. Die retrospektive Eingruppierung der Stuten führte dazu, dass

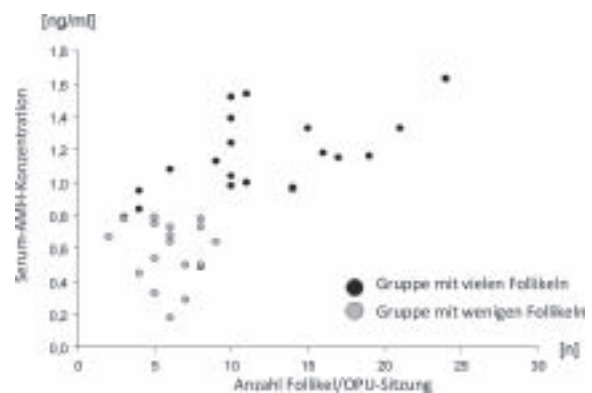


Abb. 1 Anzahl aspirierter Follikel pro Aspirationsitzung und Serum-AMH-Konzentration zum Zeitpunkt der Aspiration von Stuten
Number of aspirated follicles per aspiration session dependent on serum AMH levels at the time of follicle aspiration in mares

die durchschnittliche Anzahl aspirierter Follikel pro Sitzung bei den Stuten in Gruppe A mit $11,1 \pm 1,1$ Follikeln signifikant ($p < 0,01$) höher war als bei den Stuten in Gruppe B ($6,2 \pm 0,51$ Follikel). Im Serum der Stuten wurden AMH-Konzentrationen zwischen $0,18$ ng/ml und $1,63$ ng/ml bestimmt (Abb. 1). Mit $1,2 \pm 0,05$ ng/ml war die durchschnittliche AMH-Konzentration im Serum bei Stuten mit vielen Follikeln (Grup-

pe A) signifikant ($p < 0,01$) höher als bei der Stutengruppe mit wenigen Follikeln (Gruppe B), die eine durchschnittliche AMH-Konzentration von $0,6 \pm 0,04$ ng/ml aufwiesen (Abb.2). In der Abbildung 2 sind die Entwicklungen der Anzahl aspi-

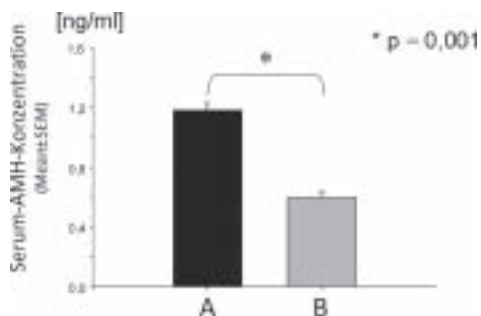


Abb. 2 Serum-AMH-Konzentrationen von Stuten mit vielen Follikeln (A) und wenigen Follikeln (B)
Serum AMH levels in mares with many follicles (A) and few follicles (B)

rierter Follikel und der Serum-AMH-Konzentration über einen Zeitraum von fünf Wochen für die Gruppen dargestellt. Bei der Stutengruppe mit vielen Follikeln wurden über den Beprobungszeitraum von fünf Wochen maximal $15,4 \pm 2,5$ und minimal $11,0 \pm 0,8$ Follikel aspiriert, während in der Stutengruppe mit wenigen Follikeln zwischen $6,8 \pm 0,7$ und $3,6 \pm 0,8$ Follikel in dem Zeitraum aspiriert wurden (Abb.3). Über den Beprobungszeitraum wurden durchschnittliche AMH-Konzentrationen zwischen $1,43 \pm 0,08$ ng/ml und $1,08 \pm 0,07$ ng/ml bei den Stuten mit vielen Follikeln bestimmt, während Stuten mit wenigen Follikeln durchschnittliche AMH-Konzentrationen zwischen $0,69 \pm 0,03$ ng/ml und $0,36 \pm 0,07$ ng/ml aufwiesen (Abb.2). Es bestand eine signi-

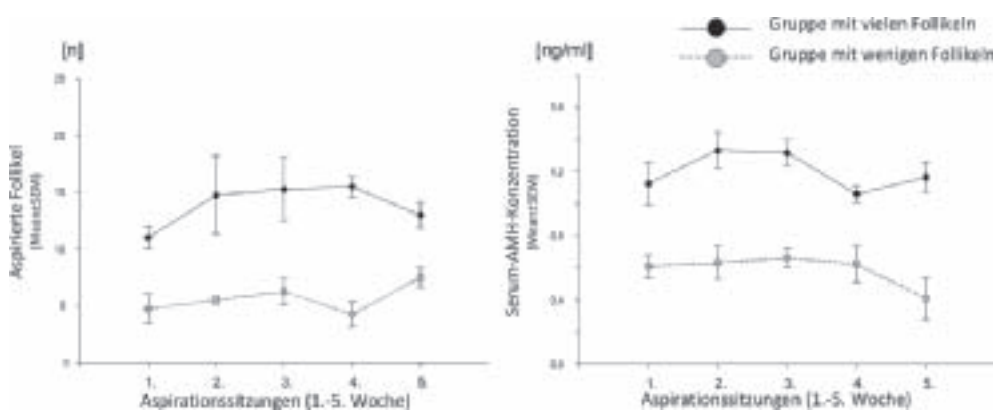


Abb. 3 Anzahl aspirierter Follikel und Serum-AMH-Konzentrationen von Stuten mit vielen und wenigen Follikeln, über einen Zeitraum von 5 Wochen bei wöchentlicher Follikelaspilation
Number of aspirated follicles and serum AMH levels in mares with many and few follicles over a 5 week period in a weekly follicle aspiration schedule

fikante, positive Korrelation ($r = 0,67$, $p < 0,001$) zwischen der Anzahl der wöchentlich aspirierten Follikel und der AMH-Konzentration (Abb.3). Die Anzahl gewonnener Oozyten pro Aspirationssitzung unterschied sich zwischen den Gruppen A und B mit durchschnittlich gewonnenen $1,1 \pm 0,2$ und $0,95 \pm 0,02$ Oozyten nicht.

Diskussion

Mit dieser Untersuchung werden erstmals quantitative AMH-Bestimmungen im Serum von Stuten vorgestellt und

Zusammenhänge zum Follikelanbildungsvermögen aufgezeigt. Die Anzahlen durchschnittlich aspirierter Follikel, die der Gruppeneinteilung dieser Untersuchung zu Grunde liegen, entsprechen den zu erwartenden Anzahlen, die bei Meklenburger Warmblutstuten bei wiederholten Follikelaspilationen veröffentlicht wurden (Kanitz et al. 2000). Bei anderen Rassen, wie dem Norweger Pony (Bruck et al. 1997) oder dem Quarterhorse (Jacobson et al. 2010) werden jedoch selten mehr als 10 Follikel aspiriert, so dass eine Rassenabhängigkeit der vorgestellten Ergebnisse noch zu prüfen ist.

De Vet et al. (2002) veröffentlichte AMH-Konzentrationen im Serum gesunder Frauen im Alter von unter 25 Jahren von ca. 1,9 ng/ml und von 0,8 ng/ml bei Frauen mit einem Alter von mehr als 35 Jahren. Damit ist die Spannweite der von uns gemessenen AMH-Konzentrationen bei Stuten der Spannweite, die bei AMH-Messungen im Serum von Frauen beobachtet wurde, ähnlich. Auf eine Altersabhängigkeit der AMH-Konzentrationen erhielten wir bei der statistischen Auswertung der eigenen Daten (Stuten im Alter zwischen 10 und 21 Jahren) keinen Hinweis. Bei Rindern wurden mit 0,1 ng/ml durchschnittlich wesentlich niedrigere AMH-Konzentrationen festgestellt, obwohl auch AMH-Konzentrationen von 3,8 ng/ml bei einzelnen Kühen gemessen wurden (Rico et al. 2009).

Die Darstellung der Anzahl aspirierter Follikel und der Serum-AMH-Konzentration über einen Beprobungszeitraum von fünf Wochen zeigt, dass sowohl die Anzahlen der Follikel als auch die AMH-Konzentrationen innerhalb der Gruppen konstant hoch bzw. konstant niedrig blieben. Erst die Unabhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt macht die AMH-Konzentration als Parameter interessant, um die Anzahl der zu erwartenden Follikel vorhersagen zu können. In der Humanmedizin wird eine Unabhängigkeit der AMH-Konzentration vom Zyklusstadium beschrieben. Aufgrund dieser Unabhängigkeit wird eine

AMH-Bestimmung zur Vorhersage der ovariellen Reaktion bei hormonellen Vorbehandlungen im Zuge der assistierten Reproduktion einer Bestimmung von FSH, Inhibin oder Östradiol vorgezogen (La Marca et al. 2007).

AMH im Serum gilt als bester Marker der ovariellen Funktionsreserve (Durlinger et al. 2002). Die Größe dieses Pools wird indirekt auch durch die Anzahl antraler Follikel widerspiegelt. De Vet et al. (2002) beschreiben positive Korrelationen ($r = 0,71$ und $r = 0,66$) zwischen Serum-AMH-Konzentrationen und der Anzahl antraler ovarieller Follikel bei Frauen. Das entspricht den von uns bei Stuten gefundenen

Zusammenhängen. Bei Rindern wurde ebenfalls eine positive Korrelation ($r=0,79$) zwischen diesen Parametern beschrieben (Rico et al. 2009). Die Autoren zeigten in Analogie zu humanmedizinischen Studien, dass sich eine hohe Anzahl vitaler, antraler Follikel zu Beginn einer Superovulationsbehandlung positiv auf die Anzahl präovulatorischer Follikel, Ovulationen und gewonnener Embryonen auswirkt. Da bei Stuten Superovulationen nicht sicher auszulösen sind (Allen 2009), könnte die Bestimmung von AMH-Konzentrationen im Serum ein Marker für die Vorhersage des Ergebnisses sein. Auch eine individuelle FSH-Dosisbemessung auf Grundlage der AMH-Konzentration ist, analog zur Humanmedizin (La Marca et al. 2007) denkbar, um eine Hyperstimulation zu vermeiden. Mögliche Beziehungen des Parameters zu Ergebnissen der Oozytengewinnung bei wiederholten Follikelaspilationen sind weiterhin interessant.

Literatur

- Allen W. R. (2009) Historical and modern aspects of equine embryo transfer. Association Europeenne de Transfert Embryonnaire, Conference Proceeding, pp. 7-41
- Ball B. A., Conley A. J., MacLaughlin D. T., Grundy S. A., Sabeur K. und Liu I. K. (2008) Expression of anti-Mullerian hormone (AMH) in equine granulosa-cell tumors and in normal equine ovaries. *Theriogenology* 70, 968-977
- Bruck I., Synnestevedt B. und Greve T. (1997) Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology* 47, 1157-1167
- Cate R. L., Mattaliano R. J., Hession C., Tizard R., Farber N. M., Cheung A. et al. (1986) Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45, 685-698
- De Vet V. A., Laven J. S., de Jong F. H., Themmen A. P. und Fauser B. C. (2002) Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil. Steril.* 77, 357-362
- Durlinger A. L., Visser J. A. und Themmen A. P. (2002) Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124, 601-609
- Jacobson C. C., Choi Y. H., Hayden S. S. und Hinrichs K. (2010) Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 73, 1116-1126
- Kanitz W., Alm H., Becker F., Nuernberg G., Kurth J. und Hinrichs K. (2000) Repeated follicle aspiration in mares: consequences for follicle growth and oocyte quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 463-472.
- Kanitz W., Becker F., Alm H. und Torner H. (1995) Ultrasound-guided follicle aspiration in mares. *Biology of Reproduction Monograph Series* 1, 225-231
- La Marca M. A., Giulini S., Tirelli A., Bertucci E., Marsella T., Xella S. et al. (2007) Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum. Reprod.* 22, 766-771
- La Marca M. A., Sighinolfi G., Radi D., Argento C., Baraldi E., Artensio A. C. et al. (2010) Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 16, 113-130
- Monniaux D., Clemente N., Touze J. L., Belville C., Rico C., Bontoux M. et al. (2008) Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod* 79, 387-396
- Rajpert-De M. E., Jorgensen N., Graem N., Muller J., Cate R. L. und Skakkebaek N. E. (1999) Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3836-3844
- Rico C., Fabre S., Medigue C., di Clemente N., Clement F., Bontoux M. et al. (2009) Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50-59
- SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Teixeira J., Maheswaran S. und Donahoe P. K. (2001) Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.* 22, 657-674
- Visser J. A., de Jong F. H., Laven J. S. und Themmen A. P. (2006) Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131, 1-9

VR Prof. Dr. Wilhelm Kanitz
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie
Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie
18196 Dummerstorf
wkanitz@fhn-dummerstorf.de