

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



6. DVR-Kongress 2015, 3.-5.12.2015, Hamburg
(Poster-Abstracts)

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2015; 12 (5), 455-479

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz



ENDO FERTI FORUM

ENDOKRINOLOGIE & FERTILITÄT
FÜR KLINIK & PRAXIS

20.-21. März 2026

Universitätsmedizin Mainz

Einladung zu unserer wissenschaftlichen Veranstaltung Endo-Ferti-Forum

Brücke(n) zwischen Unikliniken und Praxen an Rhein und Main(z)

– die aus dem bisherigen Format „Ferti Forum“ ab 2026 hervorgeht –



Freuen Sie sich auf spannende Vorträge und den lebendigen Austausch mit Kolleg:innen und Expert:innen aus Klinik und Praxis. Freitagabend laden wir Sie herzlich zu einem entspannten Empfang ein – eine perfekte Gelegenheit, Kontakte zu knüpfen und den Tag genussvoll ausklingen zu lassen.

Wissenschaftliche Leitung: Univ.-Professorin Annette Hasenburg, Dr. Susanne Theis, Universitätsmedizin Mainz, Sanitätsrat Dr. Werner Harlfinger, BVF Rheinland-Pfalz Dr. Rüdiger Gaase, BVF Hessen Dr. Klaus J. Doubek

Schirmherrschaften: Prof. Nicole Sänger, Uniklinik Bonn, Prof. Jan-Steffen Krüssel, Uniklinik Düsseldorf, Dr. Annette Bachmann, Uniklinik Frankfurt am Main, Prof. Christine Skala, Uniklinik Köln

Weitere Informationen
& Anmeldung unter



6. DVR-Kongress 2015

3.–5.12.2015, Hamburg

Poster-Abstracts*

■ Reproduktionsbiologie 1

P01

Histological Evaluation confirms testicular Vascularization to be affected during Development in 41,XX^Y* mice, a Model for Klinefelter Syndrome

C. Brand¹, A.-S. Warmeling¹, R. Sandhowe-Klaverkamp¹, S. Werler¹, K. Körner¹, M. Zitzmann¹, F. Tüttelmann², J. Gromoll¹, J. Wistuba¹, O. S. Damm¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Institute for Human Genetics, Münster, Germany

Background Testosterone deficiency in Klinefelter Syndrome (KS) was thought to result from disturbed Leydig cell (LC) function. However, in a KS mouse model (41,XX^Y*), LCs were found to be hyperplastic and hyperreactive [1]. Furthermore, intratesticular testosterone (ITT) concentrations were comparable to controls with normal karyotype. We confirmed this finding in a cohort of patients, excluding insufficient ITT levels as the cause of hypogonadism [2]. It was reported that in KS patients arteries are altered and circulation impaired [3]. Changes in testicular vascularization were also found previously in the 41,XX^Y* mouse model.

Aim We hypothesize that disturbed testicular blood supply might be involved in the pathological endocrine phenotype of KS.

Material and Methods We performed a study in which the distribution and size categories of testicular blood vessels in juvenile (1, 3, 5, 7, 10, 21dpp) and adult (15wpp) 40,XY* and 41,XX^Y* mice (n ≥ 5 per group and developmental stage) were analyzed. Blood vessels were detected and assigned to size categories (I < 80 µm², II = 80–272 µm², III = 273–411 µm², IV = 412–574 µm², V = 575–661 µm², VI = 662–2052 µm², VII = 2053–5062 µm², VIII ≥ 5062 µm²) each representing maximum values of sizes found in the respective developmental stage in 41,XX^Y* animals. In addition, for each size category the blood vessel / testis surface ratio was determined to correct for the smaller testes of 41,XX^Y* mice.

Results Differences in size of the largest noticeable vessels were observed in all stages. The largest blood vessels found in 41,XX^Y*

were always smaller than those of 40,XY*. From 1dpp to 5dpp differences appeared to be constant (for 41,XX^Y*, one to three categories smaller in vessel size than 40,XY*) and from 7dpp to 15wpp increasing differences were noted; blood vessels were covering significant larger testicular areas at ages of 10 dpp (p < 0.05) and 15wpp (p < 0.001). Calculated blood vessel/testes ratios did not show any significant differences in the juveniles. In adult males (15 wpp) a significant higher number of smaller blood vessels (< 1000 µm²; p < 0.0001) in KS mice was detected whereas the littermates showed higher numbers of larger vessels (> 1000 µm²; p < 0.05). As a consequence, more testicular area was covered by those blood vessels in 40,XY* mice.

Conclusion Our data indicate an impaired vascularization in testes of males with a supernumerary X chromosome already during juvenile development; a feature which might contribute to the pathological endocrine phenotype of KS.

References:

1. Wistuba J, et al. Endocrinology 2010; 51: 2898–910.
2. Tüttelmann F, Damm OS, et al. Andrology 2014; 2: 275–81.
3. Foresta C, et al. Int J Androl 2012; 35: 720–5.

Acknowledgment: The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant NO WI 2723/4-1).

P02

Examination of the Sulfatase Pathway in the Human Testis and possible Implications for Male Fertility – Project 2 within the framework of DFG Research Group FOR1369 “Sulfated Steroids in Reproduction”

D. Fietz¹, K. Bakhaus², B. Wapelhorst¹, K. Hartmann¹, G. Grosser², B. Döring², S. Kliesch³, W. Weidner⁴, A. Sanchez-Guijo⁵, M. F. Hartmann⁵, S. A. Wudy⁵, J. Geyer², M. Bergmann¹

¹Institute for Veterinary Anatomy, Histology and Embryology; ²Institute for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Justus-Liebig-University Gießen; ³Department of Clinical Andrology, Centre for Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital Münster; ⁴Clinic for Urology, Pediatric Urology and Andrology; ⁵Steroid Research and Mass Spectrometry Unit, Division of Paediatric Endocrinology and Diabetology, Center of Child and Adolescent Medicine, Justus-Liebig-University Gießen, Germany

Free steroids play an important role in reproduction of mammalian species. Their sulfoconjugated metabolites are biologically inactive

and are excreted via bile or urine. But these steroid sulfates can be re-activated by steroid sulfatase into biologically active free steroids, which can accomplish regulatory function via nuclear steroid receptors. A prerequisite for a functional sulfatase pathway is a carrier-mediated import and/or a transporter-mediated efflux of hydrophilic sulfated steroids into specific target cells within the testis.

Within the first funding period of DFG FOR1369 “Sulfated Steroids in Reproduction”, we evaluated the predominant expression of the Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT) in human testis biopsies and localized its expression in germ cells (zygotene spermatocytes to step 1 and 2 round spermatids) in normal spermatogenesis. Interestingly, SOAT mRNA showed significantly lower or even absent expression in severe disorders of spermatogenesis. Furthermore, SOAT transport function for steroid sulfates was analyzed with a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry procedure. With this technique, the cellular inward-directed SOAT transport was verified for the established substrates dehydroepiandrosterone sulfate and estrone-3-sulfate. Additionally, β-estradiol-3-sulfate and androstenediol-3-sulfate were identified as novel SOAT substrates.

During the second funding period, we focused on the involvement of somatic Sertoli cells within the putative sulfatase pathway. As SOAT is not expressed in Sertoli cells and a passage into these cells is a prerequisite for any metabolites to overcome blood-testis barrier, we examined the expression of organic anion transporting polypeptides (OATP2B1, OATP3A1, uptake carrier), multi drug resistance protein 1 (MRP1, efflux carrier) as well as steroid sulfatase via RT-PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Uptake carrier as well as efflux carrier are expressed in Sertoli cells on mRNA and protein level, which indicates a functional sulfatase pathway within the Sertoli cells in the human testis. By this, a transport of sulfated steroids from blood vessels through the Sertoli cells towards germ cells is possible as well as a de-sulfonation within the Sertoli cells. This hints to a possible significance of sulfated steroid in the local supply with steroids in the testis.

Acknowledgment: Research was funded by DFG-FOR1369.

* Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee.

Ein alphabetisches Verzeichnis der präsentierenden Autoren finden Sie auf Seite 479.

P03

Impact of Piwi-like Gene knock-down on Spermatogenesis-related Gene Expression

M. Giebler, T. Greither, H. M. Behre
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie,
MLU, UKH, Halle, Germany

Background Differentiation of human germ cells involves multiple processes, including conservation of pluripotency but also controlled cell division, meiosis and differentiation. This is accompanied by repression of somatic genes, as well as a unique epigenetic reprogramming. The Piwi gene family (P-element induced wimpy testis) is the germline expressed sub-clade of the Argonaute proteins. Piwi genes are expressed in pre-pachytene and pachytene stages of spermatogenesis where they act in germ cell development and silencing of retrotransposons to maintain genomic integrity and stem cell character. Their expression is typically repressed in late stages of spermatogenesis. In this study, we analyze the impact of the specific knockdown of Piwi-like 1 and Piwi-like 2 in cell systems with stem cell properties.

Methods For analysis we used TCam2, a cell line derived from a human seminoma, which shows significant similarities to PGCs and the germ cell lineage. NT2D1 cells display characteristics of embryonal pluripotent stem cells. 4×10^5 TCam2 and NT2D1 cells were reverse transfected with 6nM siRNA pool of Piwi-like 1 or Piwi-like 2 (siTools Biotech) using Lipofectamine RNAiMAX according to manufacturer's instructions. After 48h cells were harvested and used for either RNA or protein isolation. RNA was isolated using TRIzol method. After reverse transcription of total RNA, mRNA amounts of Piwi-like genes and 23 genes related to various differentiation lineages were examined via quantitative real-time-PCR. mRNA expression was quantified relative to GAPDH transcripts using $\Delta\Delta C_T$ method. For protein detection cells were lysed with RIPA and investigated in Western Blot analysis. GAPDH protein served as reference.

Results siRNA-mediated knockdown of Piwi-like 1 led to a 60% reduction of Piwi-like 1 mRNA levels in TCam2 and NT2D1 cells. In addition, mRNA expression of genes important for early germ cell development like *Blimp1* and *Tcfap2c* was reduced about 30% and *Nanos3* was decreased about 40% in TCam2 cells while the expression of pluripotency genes (*Nanog*, *Oct3/4*, *Stella* and *Prdm14*) remained unaffected. mRNA expression of *Sox2*, a marker of primary germ cells responsible for self-renewal, was also 40% reduced. No upregulation of mesoderm or endoderm markers could be detected after downregulation of Piwi-like 1, as well as any morphological changes.

Next we established siRNA-mediated knockdown of Piwi-like 2 in TCam2 and NT2D1 cells. Piwi-like 2 mRNA expression was reduced up to 70%. Using conventional RT-PCR, a 20% reduction of *Tnap* could be detected in NT2D1. The expression levels of other mRNAs were not significantly altered.

Expression of Piwi-like interaction partners in retrotransposon silencing like *Trdr1* and *Trdr5* as well as *LINE-1* mRNA or Piwi-like 3 and 4 was not affected.

Conclusion Aim of the study was to investigate the role of Piwi-like 1 and 2 genes in association with germ cell development. TCam2 and NT2D1 are models to study mechanisms that control differentiation and maintenance of stem cell character. Based on our data we suggest that Piwi-like genes 1 and 2 play an essential role in early germ cell development in humans. We propose that they are acting upstream of genes which are expressed in the early germ line. Recent results suggest that repressing somatic differentiation occurs in a Piwi-like-independent pathway. Concordantly, the expression levels of *LINE-1* and *Trdr1* and *Trdr5* mRNA remained unaffected, supporting the idea that transient Piwi-like knockdown is not enough to obtain effects on transposon silencing. In summary, we propose a model wherein early stem cell genes are downstream effectors of Piwi-like mediated repression of somatic differentiation.

P04

Characterization of the Purinergic Receptor P2X7 in human Testicular Peritubular Cells

L. Glashauser¹, K.-G. Dietrich¹, A. Tiefenbacher¹,
J. U. Schwarzer², F.-M. Köhr³, A. Mayerhofer¹
¹Biomedical Center, Anatomy III – Cell Biology, LMU München, Martinsried; ²Andrologie Centrum München;
³Andrologikum München, Germany

Introduction/Objective Testicular peritubular cells (TPCs) are contractile, smooth muscle-like cells, which form the wall of seminiferous tubules and transport sperm. Their importance for male fertility is not fully understood. Yet, evolving data, namely the repertoire and nature of the secreted products on one side, and changes associated with male infertility on the other side, indicate important roles that go beyond sperm transport. The data imply that TPCs may be involved in the regulation of several testicular functions and inflammatory processes.

The regulation of both secretory and contraction/relaxation-related events in TPCs likely depends on the activity of ion channels, as well as intracellular Ca^{2+} . To our knowledge, the nature of the ion channels expressed by TPCs is not known. This study focuses on the purinergic receptor P2X7 in human testicular peritubular cells (HTPCs). This ligand-gated ion channel is regulated by extracellular ATP (released from cells via hemi-channels or liberated upon cell death) and has been linked to inflammatory and pro-apoptotic signaling as well as phagocytosis of non-opsonized particles. Furthermore, inhibition by 17β -estradiol has been described.

Methods *In vivo* expression of the P2X7 receptor was studied by immunohistochemical staining of human testicular sections. At the mRNA level all P2X receptor subtypes of human TPCs (HTPCs) were analyzed by RT-PCR and sequencing. Functionality of the

P2X7 receptor was examined by measuring intracellular Ca^{2+} levels (using the fluorescent calcium indicator Fluo-4) in response to its agonist, the potent ATP-derivative 2'-(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)ATP (BzATP) and antagonists (AZ11645373, 17β -estradiol). Cell death events of HTPCs upon stimulation were determined live cell imaging.

Results Immunohistochemical staining of testicular sections revealed P2X7 receptor protein in human testes. Blood vessels as well as TPCs stained positively for P2X7. The distribution of P2X7 in TPCs was heterogeneous and not all cells were positive. Robust immunoreactivity of TPCs was however associated with tubules presenting signs of fibrotic remodeling. In cultured HTPCs, P2X7 mRNA expression was confirmed by RT-PCR and sequencing, as was P2X4, P2X5 and P2X6 mRNA expression. Stimulation of HTPCs with BzATP evoked an increase of intracellular Ca^{2+} levels. Pre-incubation of the cells with the P2X7-specific antagonist AZ11645373 reduced or inhibited the BzATP-induced Ca^{2+} increase. Moreover, 17β -estradiol acted as physiological inhibitor of BzATP-induced Ca^{2+} fluxes, whereas 17α -estradiol (used as a control) was not able to block the effect. BzATP stimulation, at concentrations increasing intracellular Ca^{2+} levels, did not result in cell death as indicated by live cell imaging.

Conclusion HTPCs express the purinergic receptor P2X7, which causes transient elevations of intracellular Ca^{2+} concentrations. Acute inhibition by the physiological inhibitor 17β -estradiol was observed. Whether the changes in intracellular Ca^{2+} levels may be related to contractility of HTPCs remains to be studied. Signs of inflammation and fibrotic remodeling are often discovered in testes of infertile men. The increased levels of P2X7 immunoreactivity in the walls of seminiferous tubules with such signs indicate a contribution to inflammatory events.

Acknowledgment: Supported by DFG MA 1080/23-1.

P05

B Cells, IL-6 and Testicular Cancer – Identification of a new Key Network?

B. Klein¹, H.-C. Schuppe², W. Weidner³, S. Kliesch³,
S. Indumathy^{4,5}, B. Loveland⁶, M. Hedger⁶, K. Loveland^{4,5,7}, M. Bergmann⁸

¹Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology; ²Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig-University Gießen; ³Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster, Germany; ⁴Department of Anatomy and Developmental Biology; ⁵Hudson Institute of Medical Research, Monash Medical Centre, Clayton; ⁶Burnet Institute, Melbourne; ⁷School of Clinical Sciences, Monash University, Clayton, Australia; ⁸Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig-University Gießen, Germany

Human testicular germ cell tumours commonly feature abundant infiltrating immune cells, most previously identified as T cells

and macrophages. But what consequences come along with these changes within the tumour environment? In our study, in addition to immune-morphological analysis, the cytokine microenvironment of testicular cancers has been surveyed for the first time, performing RT-qPCR on human testicular biopsy samples. The results reveal significantly increased expression of pro-inflammatory cytokines in cancer samples relative to healthy tissue, as well as cytokines associated with B cells, whose presence can further be confirmed by immunohistochemistry. These *ex vivo* results suggest an exceptional involvement of B cells and pro-inflammatory cytokines in the immunopathology of testicular cancer.

Having identified the significantly different cytokine profile associated with testis cancer, which cell type might be mainly responsible for its establishment? For addressing this question, an *in vitro* model was developed to assess the interactions and single contributions of immune and testicular cancer cells to the tumor environment in more detail. TCam2 cells (human seminoma-derived cell line) were co-cultured with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to interrogate responses to their co-localization.

Data from nine independent experiments using PBMCs from eight different donors indicate that seminoma cell growth is unaffected by direct or indirect contact with PBMCs, at least in short-term. However, cytokine expression profiles of cell-to-cell co-cultured TCam2 cells show significantly increased mRNA levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , TGF- β 1 and CCL-5 compared to mono-cultured controls. These outcomes resemble the *ex vivo* data and highlight the potential of neoplastic human germ cells to promote immune cell infiltration and to actively shape their cytokine microenvironment. Furthermore, three co-culture setups with monocyte- or leucocyte-enriched fractions rather than PBMCs further defined that testicular cancer cells show a stronger immunological response after interaction with leucocyte-enriched samples.

Moreover, TCam2 cells were identified to naturally produce higher levels of IL-6 compared to PBMCs, both on an mRNA as well as protein level, which could have major contributions to specifically enhancing B cell viability.

Taken together, all these results suggest a major involvement of IL-6 in testis cancer. In line with knowledge on ovarian cancer, prostate cancer and breast carcinoma, further investigations on the potential of IL-6 as a predictive marker and the potentially beneficial effects of an anti-IL-6 therapy in testis cancer patients would be of great value.

P06

Germ cell-specific DNA Methylation is established in common Marmosets during Postnatal Development and is maintained during *In vitro* Culture

D. Langenstroth¹, I. Tröndle, J. Gromoll, J. Wistuba, S. Schlatt, N. Neuhaus
Center of Reproductive Medicine and Andrology, Münster, Germany

Introduction Methylation of cytosines within CpG islands is one of the epigenetic mechanisms which can modulate gene expression, and thus, have a phenotypical impact without changing the DNA sequence. During germline development, DNA methylation is depleted globally at the primordial germ cell stage and is subsequently reestablished in a germ cell-specific manner. Disruption of *de novo* methyl transferases 3a and 3l in mouse germ cells leads to meiotic arrest and successive loss of germ cells indicating that DNA methylation is important for germ cell maintenance and differentiation. In mice, the germ cell-specific DNA-methylation pattern is established until the perinatal age. In humans, very limited and contradictory information is available suggesting that DNA methylation patterns are either set peri- or postnatally or that they are only established during spermatogenic germ cell differentiation. In addition, it remains unclear, whether the germ cell-specific methylation pattern is stable once established or whether it is dynamically changed *in vivo* and *in vitro*. We used the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model to investigate when the germ cell-specific DNA methylation is established in primates and whether the methylation status in promoter regions of specific genes remains stable.

Materials and Methods Testicular tissues of 18 marmosets were used. 5-methyl-cytosine (5-mC) stainings were performed on cross-sections to detect global DNA-methylation in germ cells of neonatal, 4-months-old, 8-months-old and adult marmosets (n = 3 each). In addition, bisulfite-DNA pyrosequencing was used to determine DNA methylation values in promoter regions of *H19* and *MEST* within testicular tissues of the same animals. Furthermore, enzymatically dissociated testicular cells from adult marmoset monkeys (n = 6) were cultured for up to 3 weeks after differential plating and the germ cell enriched supernatant (SN) fraction was used for bisulfite-DNA pyrosequencing of *H19* and *MEST* promoter regions.

Results The average labeling index of 5-mC positive germ cells was low in neonatal marmosets (13.8%), but increased progressively (4-months-old: 26.3%, 8-months-old: 70.0%) to 80.6% in adult marmosets. No significant differences were observed with regard to the different germ cell types in testes of the same age groups. In testicular tissues from the same animals the CpG methylation increased for *H19* and decreased for *MEST*. The calculation of the *H19* methylation for the germ cell fractions from these tissues revealed a

progressive increase during maturation (Neonatal 0%; 4-months-old 45%; 8-months-old 81.5%; and adult 91.7%). In germ cell enriched culture fractions, the DNA methylation patterns for *H19* and *MEST* were germ cell-specific and remained stable throughout the whole culture period of 3 weeks.

Conclusion This is the first study which systematically investigated the DNA methylation status during postnatal germ cell development of primates. We found that the majority of germ cells from neonatal marmosets is unmethylated and that the germ cell-specific DNA-methylation is progressively established during postnatal and pubertal development until adulthood. This process seems to be independent of specific events like the gonocyte migration to the basement membrane or the onset of puberty. How the process of *de novo* DNA methylation is regulated in primate germ cells and how aberrant DNA methylation patterns, which can be pathogenic for offspring, can occur during this process remains to be elucidated. In addition, we found that the germ cell-specific DNA methylation pattern remains stable in cultured germ cells. This finding indicates that *in vitro* conditions only have limited impact on germ cell DNA methylation and emphasizes the importance and reliability of DNA-methylation as a marker to confirm the germ cell identity during *in vitro* studies.

Acknowledgment: This study was funded by the DFG FOR 1041 „Germ cell potential“ project 3 (SCHL394/11-2).

■ Reproduktionsbiologie 2

P07

Approaches for *In vitro* Differentiation of Primate Germ Cells in an Organ Culture System

D. Langenstroth¹, J. Wistuba¹, K. Redmann¹, J.-B. Stukenborg², S. Schlatt¹, N. Neuhaus¹

¹Center of Reproductive Medicine and Andrology, Münster, Germany; ²Karolinska Institutet and University Hospital, Department of Women's and Children's Health, Pediatric Endocrinology Unit, Stockholm, Sweden

Introduction In 2011, Sato and colleagues succeeded in producing spermatozoa from neonatal mouse testes in organ cultures. However, *in vitro* production of primate spermatozoa has not yet been achieved. Since the spermatogonial stem cell system in non-human primates and men differs from that in mice, we used the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) to evaluate whether this organ culture system supports the differentiation of immature primate testicular cells.

Materials and Methods Testicular fragments ($\leq 1 \text{ mm}^3$) from three pre-pubertal (4-months-old) and three pubertal (8-months-old) marmosets were cultured at 35 °C for 1, 2, 4 and 6 weeks on 0.35 % soft agar placed in culture medium. Three different medium conditions were applied: 1) MEM α + 10% KSR + 1% Pen/Strep + 1 μM Melatonin, 2)

medium 1 + 1 μ M retinoic acid, 3) medium 2 + 500 IU/l rhFSH + 500 IU/l hCG + 2 mM glutamine. Real-time quantitative PCR (qPCR), immunohistochemical (IHC) and ploidy analyses were performed to evaluate the differentiation status of germ cells within initial tissues and cultured fragments.

Results Analyses before culture revealed, that testicular tissues of 4-months-old marmosets did not contain any meiotic cells, while the tissues of the 8-months-olds were heterogeneous. One animal did not exhibit any meiotic germ cells, a second showed meiotic differentiation up to spermatocytes and the third up to round spermatids.

Irrespective of the age group and the medium conditions, MAGE-A4+ spermatogonia were detected for up to 42 days of culture by IHC and qPCR analyses. Only in cultured fragments from two animals indications for progressing meiotic differentiation were observed. In fragments of one 4-months-old animal an increase in *BOLL*, *SYCP3* and *ACRV1* mRNA expression could be detected after 2 weeks of culture in medium 3. However, this increase was not accompanied by an increase of 4C or haploid cells. The analyses of cultured fragments from the 8-months-old animal which did not contain meiotic cells before culture revealed irrespective of the medium condition a strong increase in *BOLL* and *SYCP3* mRNA expression, as well as in the number of 4C cells in ploidy analyses after 1 week of culture. In addition, high numbers of spermatocytes were detected in fragments cultured for 7 days. However, during subsequent culture mRNA levels of meiotic marker genes, the number of 4C cells and the number of spermatocytes decreased, the expression of *ACRV1* and *CREM* mRNA remained low and round spermatids could not be detected. In line with that, an increase of cells with fragmented DNA in ploidy analyses indicated increasing levels of apoptotic or necrotic cells during prolonged culture.

Conclusion The organ culture system established by Sato et al. (2011) for mouse *in vitro* spermatogenesis, can be used to maintain MAGE-A4+ marmoset spermatogonia for at least 6 weeks. Moreover, in one case meiotic differentiation of spermatogonia into spermatocytes was observed. However, the system was not sufficient to induce further differentiation into haploid cells and to induce meiotic differentiation in all cases. Most likely, additional factors are essential to trigger germ cell differentiation. Since in our experiments all medium conditions revealed similar results, it might also be possible that either blood supply which provides optimal amounts of nutrients and oxygen or an intact compartmentalization are more relevant for the induction of spermatogenesis in primate testicular fragments than specific molecules.

Reference:

Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, et al. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471: 504–7.

Acknowledgment: This study was funded by the „Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen“ (PtJ-Az.: z1403ts006)

P08

Immunolocalization of Annexin A5 Expression in human Testis and Epididymis

H. L. Lavorato¹, A. Markoff², S. Kliesch¹, S. Schlatt¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology;

²Institut für Humangenetik, University Münster, Germany

Introduction Annexin A5 is a member of a family of calcium dependent phospholipid binding proteins with a high affinity for phosphatidylserine. Various studies described physiological roles of annexin A5 in coagulation, membrane repair and immune modulation. In the reproductive field, annexin A5 is widely used to assess apoptosis in ejaculated sperm samples. It is known that during apoptosis phospholipid asymmetry is lost and phosphatidylserine is exposed at the outer cell membrane. Despite evidence from proteomic studies revealing the presence of annexin A5 in human testis homogenates, epididymosomes, prostasomes and sperm, the cellular protein expression patterns in testes and epididymis are unknown.

Aim Evaluate and localize the protein expression of annexin A5 in human testes and epididymides.

Methods Testicular biopsies from men with different histopathologies and normal epididymal tissue from reassigned transgender patients was available for research after patients provided signed consent. The tissues were fixed in Bouin's solution and were routinely paraffin embedded. Immunohistochemistry was performed on 5 μ m sections. Samples were immunostained using two antibodies: mouse monoclonal anti human annexin A5 antibody (1:100 AbD Serotec), rabbit monoclonal anti human annexin A5 antibody (1:1000 OriGene). Indirect immunohistochemical staining was performed using biotinylated secondary antibodies and horseradish peroxidase-Streptavidin as system to generate a brown DAB precipitate as signal. Adjacent sections of the biopsies were analyzed by light microscopy.

Results and Discussion Both antibodies revealed identical protein expression patterns in both organs. Omission controls revealed method specificity of the staining procedure. In testicular tissue the immunostaining for annexin A5 expression was observed in the cytoplasm of Sertoli cells and in clusters of interstitial cells, independent of the spermatogenesis status. Germ cells were unlabeled. In epididymal tissue, Annexin V staining showed diversity in regard to the different epithelia in the corpus, caput and cauda regions. This finding is in accordance with published localization patterns of annexin A5 in rat testes.

Conclusions Annexin V is present in the human testis and epididymis. The cell specific localization pattern in epithelial cells of the testis and epididymis reveals an important role of this protein in both organs.

Financial Support: CNPq/CsF 206742/2014-2 to HLL, DFG PI grant MA-6288/1-1 to AM

P09

Dose-dependent Stimulatory effect of Leptin on Leydig cell Steroidogenesis in Leptin-deficient obese Mice

G. M. Manjow¹, I. V. Wagner^{1,2}, A. Hoffmann³,

N. Klötting^{1,3}, T. Ebert^{1,3}, B. Jessnitzer³, U. Loessner^{1,3},

R. Burkardt⁴, M. Stumvoll⁴, O. Söder², K. Svechnikov²,

J.-B. Stukenborg², M. Fasshauer^{1,3}, S. Kralisch-Jäcklein^{1,3}

¹IFB Adiposity Diseases, Leipzig, Germany; ²Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; ³Department of Endocrinology and Nephrology, University of Leipzig;

⁴Institute of Laboratory Medicine, University Leipzig, Germany

Background and Aims Over the last decade, the evidence linking obesity to impaired male reproductive function has grown. Leptin is a known mediator and modulator of the hypothalamus-pituitary-testes axis, dysregulated in obesity; however, data have been inconsistent. The aim of the study was to elucidate the dose-dependent impact of leptin on male reproductive function and Leydig cell steroidogenesis in a mouse model of obesity.

Material and Methods Leptin-deficient obese (ob/ob) male mice on a C57BL/6J LDLR^{-/-} background were treated with 0.1, 0.5, or 3 mg/kg body weight/d murine recombinant leptin or saline for 12 weeks starting at 8 weeks of age. The effect of leptin on testicular weight, spermatogenesis, intratesticular testosterone, Leydig cell morphology, and macrophages was elucidated.

Results Testis weight which is mostly indicative of overall spermatogenic activity was significantly and dose-dependently up-regulated between control (saline-treated; 1.69 mg/g bodyweight [BW]) and leptin-treated animals (2.56, 2.76, and 3.28 mg/g BW at 0.1, 0.5, or 3 mg/kg body weight/d, respectively) ($p < 0.001$). Moreover, intratesticular testosterone content was restored dose-dependently after leptin treatment (314.4, 497.2, and 526.3 ng/g tissue at 0.1, 0.5, or 3 mg/kg body weight/d, respectively) compared to saline-treated mice (212.7 ng/g tissue) ($p < 0.001$). Restoration of intratesticular testosterone in leptin-treated animals was associated with a significant up-regulation of the steroidogenic enzymes Cyp11a1 and Cyp17. Testicular histology indicated that Leydig cells dose-dependently regain their usual morphology and clustering characteristic after leptin-treatment as compared to saline-treated animals. Furthermore leptin treatment improved spermatogenesis in a dose-dependent manner. We found an increasing amount of tubuli in spermatogenesis stages I-VIII and a strong reduction of tubuli with an abnormal structure. In contrast, macrophage markers were not different between leptin-treated and control mice.

Conclusion Leptin treatment in Leptin deficient animals significantly improved Leydig cell steroidogenesis, intratesticular testosterone and spermatogenesis in a dose-dependent manner. Hence the adipocytokine Leptin seems to be an important player in reproductive function and treatment might recover fertility problems in patients.

P10

Morphogenetic Dynamics of *In vitro* cultured Primary Testicular Cells from Transsexual Men

M. Mincheva¹, R. Sandhowe-Klaverkamp¹, J. Wistuba¹, N. Neuhaus¹, J.-B. Stukenborg², S. Kliesch¹, S. Schlatt¹
¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital of Münster, Germany; ²Karolinska Institutet and University Hospital, Department of Women's and Children's Health, Stockholm, Sweden

Introduction Development of an optimal *in vitro* culture system that allows for propagation and full differentiation of spermatogonia to spermatozoa with a subsequent auto-transplantation or assisted conception treatment would be powerful tool for male infertility treatment and fertility preservation. Sertoli and peritubular cells comprise the somatic microenvironment which supports germ cell self-renewal and differentiation, providing physiological and structural support. Prevailing *in vitro* culture approaches focus on germ cell expansion and differentiation but only rarely on the somatic cell microenvironment. Few studies, using rodent models, have demonstrated the ability of enzymatically dispersed somatic cells to form testicular cords *in vitro* by following a distinct cascade of morphogenetic events [1, 2]. So far, studies for human *in vitro* seminiferous tubulogenesis have not been published. As the access to normal human tissue is limited, the development of *in vitro* culture approaches using tissue from transsexual men in order to study *in vitro de novo* testis morphogenesis would provide a more relevant experimental model.

Aim Establish a primary testicular cell culture from transsexual patients and investigate the potential of testicular cells to reorganize and undergo seminiferous cord morphogenesis *in vitro*.

Methods Upon informed consent, signed on the date of sex reassignment surgery, tissue samples from testes of 16 transsexual men were subjected to two different protocols for sequential enzymatic digestion in order to obtain a single-cell suspension of testicular cells. Freshly isolated testicular cells were seeded onto glass inserts placed in culture plates and incubated over a two week period. Morphological analysis of morphogenetic changes during cell culture was performed daily by light phase-contrast microscopy, following previously described sequence of events [1, 3]. To account for the change in cell type distribution and cell interactions, immunocytochemistry and immunofluorescence for Sertoli and peritubular cell marker (vimentin, VIM), Sertoli cell specific marker (SOX9) and peritubular cell marker (alpha smooth muscle actin, α SMA) were performed. Mitotic cells were detected after 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation.

Results Phase-contrast microscopy revealed that cells, morphologically resembling Sertoli cells, organized in monolayers 24h after plating. VIM-positive Sertoli-like cells migrated and formed sphere-shaped plaques or aggregates by day 5, which were enclosed by strands of elongated cells with morphology

similar to that of peritubular myoid cells. By day 7 aggregates acquired elongated profiles and formed highly regular spatial arrangements. By day 10 elongated cords formed anastomoses with neighboring nodules of densely packed cells. α SMA BrdU-positive peritubular cells were observed at day 13. By day 14 adjacent nodules had merged to form multi-layered cord-like structures. Immunohistochemistry experiments are still in progress.

Conclusion In this study we describe a culture system that allows the investigation of interactions between different testicular cell types. We also demonstrate a similar pattern as previously reported in rodent *in vitro* models of morphogenetic changes that resulted in formation of cord-like structures. Immunostaining further supports phase-contrast microscopy observations and revealed that the dynamic changes of *in vitro* tubule formation were attributed to the peritubular and Sertoli cells. Further expected results would help elucidate important aspects of somatic cell-germ cell interactions during testis morphogenesis which are pre-requisite for efficient spermatogenesis. They would also add to the efforts to establish and implement in a clinical setting an *in vitro* testicular microenvironment in which full spermatogenesis can be achieved.

References:

1. Gassei K, et al. Reproduction 2008; 136: 459–69.
2. Zhang J, et al. Gen Comp Endocrinol 2014; 205: 121–32.
3. Schlatt S, et al. Biol Reprod 1996; 55: 227–235.

Funding: Marie Curie Initial Training Network "GROWSPERM" (FP7-PEOPLE-2013-ITN)

P11

The Testicular Expression of KAT-NB1 during the Human Spermatogenesis

C. Pleuger¹, D. Fietz¹, K. Hartmann¹, W. Weidner², S. Kliesch³, M. O'Bryan⁴, A. Dorrestijn⁵, M. Bergmann¹
¹Institute for Veterinary Anatomy, Histology and Embryology; ²Department of Urology, Children's Urology and Andrology, Justus-Liebig-University Gießen; ³Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster, Germany; ⁴Department of Anatomy and Developmental Biology, Monash University, Clayton, Australia; ⁵Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie, Justus-Liebig-University, Gießen, Germany

The process of male germ cell differentiation depends on rapid transformation of the microtubule scaffold to change its organisation during mitosis (spermatogonia) and meiosis (spermatocytes). Additionally, the modification of microtubules is essential for the formation of the flagellum and manchette, a temporary microtubule-based structure that determines the sperm head shape and assists in tail formation and elongation [1]. Many defects of spermatogenesis are caused by failure of microtubule re-arrangement. One regulator of microtubule scaffold and dynamics is the severing of microtubule whereby

the microtubule re-configuration needs to be ensured.

Katanin, a well-characterized protein, named after the Japanese samurai, consists of an enzymatic p60 subunit (encoded by the *Katn1* gene) and a regulatory p80 subunit (encoded by the *Katnb1* gene). The p80 subunit binds specifically to the p60 subunit as well as to motor proteins like dynein or dynein-regulating proteins and components of the spindle apparatus (e.g. the centrosome). Katanin p80 prefers the p60-mediated severing caused by the increased number of binding sites to the microtubules and is responsible for targeting the p60-mediated severing of specific sites. A missense mutation in the highly conserved WD40 domain of the *Katnb1* gene causes defects in spermatogenesis. Homozygous Taily males are characterized by infertility in consequence of a decreased sperm production, sperms with abnormal head shape and an absence of progressive motility. This phenotype is similar to the human oligoasthenoteratozoospermia syndrome (OAT). The Taily mouse showed an influence of Katanin p80 to the formation of the meiotic spindle, especially during metaphase-to-anaphase progression. Furthermore, the formation of microtubule-based structures during spermiogenesis shows defects in the head and flagellum region [1].

Due to the influence of *Katnb1* to the spermatogenesis of the Taily mouse we characterized the expression pattern of *Katnb1* in human testicular biopsies.

Therefore, we analysed the expression pattern of the p80 regulatory subunit during human spermatogenesis on mRNA level (RT-PCR and *in situ*-hybridization) and on protein level (immunohistochemistry). Furthermore, we performed RT-qPCR in order to quantitatively compare the *Katnb1* expression during normal and impaired spermatogenesis.

We showed that *Katnb1* mRNA was exclusively expressed in germ cells, not in Sertoli cells or interstitial components. During normal spermatogenesis (n = 43, score: 10) the mRNA was localized in the cytoplasm of pachytene spermatocytes. In contrast to normal spermatogenesis, *Katnb1* was quantitatively reduced in maturation arrests on the level of primary spermatocytes (n = 7) and spermatogonia (n = 4).

The *Katnb1* protein was detected in the Golgi complex of pachytene spermatocytes, co-localized with Golgin A2 (a Golgi-specific protein). Additionally a co-localisation with pericentrin was detected in the cleaving centrosome immediately before the first meiotic division. The p80 subunit was also detected in early round spermatids in the dictyosome above the acrosome-cap.

Our results correspond to the investigations of O'Donnell et al. [1] in the 'Taily' mice. The localisation during human spermatogenesis in the centrosome of the pachytene spermatocytes suggests an influence to spindle formation during meiosis. The presence of p80 in the prospective head and flagellum areas of spermatids indicates an impact on the formation of these microtubule-based struc-

tures, especially the manchette, and therefore on correct sperm morphology. This suggests the Taily mouse to be a suitable model to analyse the human OAT phenotype.

Reference:

1. O'Donnell L, Rhodes D, Smith SJ, Merriner DJ, Clark BJ, et al. An Essential Role for Katanin p80 and Microtubule Severing in Male Gamete Production. *PLoS Genetics* 2012; 8: e1002698.

P12

Studying Spermatogonial Stem Cell Propagation potential of pre-pubertal Marmoset Testicular Tissue using Xenografting Approach

S. Sharma, S. Reinhold, B. Westernstroer, S. Schlatt
Center of Reproductive Medicine and Andrology,
Muenster, Germany

Introduction Infertility in pre-pubertal male cancer survivors gives rise to a clinical urgency to explore alternate spermatogonial stem cell (SSC) propagation, transplantation and cryobanking strategies for sperm development. Due to limited availability of normal pre-pubertal human testicular tissue, non-human primates are used as a pre-clinical model for SSC research. Common marmoset (*Callithrix jacchus*), a new world monkey share close resemblance to humans. They exhibit similar testicular development, fetal and neonatal germ cell stages and organization of seminiferous epithelium as observed in humans. Features like testicular quiescence period during infantile stage, early sexual maturity and high fertility rate make them an interesting model to study various aspects of spermatogenesis.

Aim This research study aims to investigate SSC propagation potential of pre-pubertal marmoset testicular tissue by employing an ectopic xenografting model. We also evaluate efficiency of various cryopreservation protocols for maintenance and preservation of testicular tissue. Role of current reproductive state of the hosts on graft survival will be investigated by comparing graft survival efficiency in intact and castrated hosts.

Methodology Three pre-pubertal male marmosets (6-months old) with mean body weight 233.5 ± 39.84 g and mean testicular weight 42.175 ± 12.005 g were used as testicular donors. While 30 nude male mice aged between 6–8 weeks were used as hosts for this xenografting study. Five intact and 5 castrated mice were used as sham grafted con-

trols, whereas 10 intact and 10 castrated mice were grafted with fresh and cryopreserved marmoset testicular tissue. Comparison of spermatogonial progression in fresh and cryopreserved testicular xenografts, grafted in intact and castrated mice for various time points will be performed using immunohistochemistry, morphometric and molecular biology tools.

Results Out of 20 grafted male mice, graft retrieval was performed from the 14 grafted mice which survived throughout the 5 month grafting period. Out of 30 grafted fragments in each of the fresh castrated (NP), cryo castrated (NP), fresh intact (NP), cryo intact (NP) groups, 13, 10, 8 and 18 grafts were retrieved respectively from each of the mice groups. Around 58.3% of the testicular grafts were retrieved from all the grafted fragments. Graft retrieval efficiency from the castrated group was around 47.5%, while efficiency from the intact host group was around 72.2% (Tab. 1).

Conclusion From the preliminary observations of retrieved grafts, we deduce that intact male mice show better graft survival efficiency compared to castrated male mice. Therefore intact mice may serve as better hosts compared to castrated male mice for pre-pubertal marmoset testicular tissue. We also observe differences in graft survival among fresh and cryopreserved grafts; graft weight of the cryopreserved tissue appears to be higher compared to the fresh tissue. Further histological analysis of the retrieved grafts will provide more insight on this aspect.

Funding: GrowSperm Consortium, EU funded Marie Curie International Training Network.

P13

Influence of Childhood Obesity on Reproductive Function and Androgen Status in Male Rats

I. V. Wagner^{1,2}, N. Klötting^{2,3}, W. Kiess^{2,4}, O. Söder¹, K. Svechnikov¹

¹Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; ²Integrated Research and Treatment Center (IFB Adiposity Diseases); ³Department of Medicine, Division of Endocrinology; ⁴Center for Pediatric Research Leipzig, Department of Women's and Child Health, University Hospital for Children & Adolescents, Leipzig, Germany

Background Childhood obesity is a global health problem and co-morbidities develop already during childhood and adolescence.

Male obesity impacts negatively on the reproductive function. Testosterone is decreased, sperm quality reduced, and the physical and molecular structure of germ cells altered in obese males. However, less is known about the role of prepubertal obesity on future reproductive function. We therefore explored Leydig cell function and reproductive potential in a rat model with prepubertal onset of obesity.

Objective and Hypotheses To explore the influence of prepubertal obesity on reproductive potential and Leydig cell capacity to produce testosterone (T) in adult male rats.

Method Lewis male rats were exposed to high fat diet (HFD) and standard chow (SC) from day 21 until 3 (group 1) and 9 months (group 2). Various anthropometric data including fat mass and adipocyte diameter were analyzed. Mating studies and semen analyses were performed. Sex steroids and gonadotropin levels were determined by immunoassays. Testis morphology was evaluated by microscopy. Expression of Leydig cell specific genes was analyzed at the transcriptional (q-PCR) level.

Results HFD increased body fat by 3 and 10% ($p < 0.001$) in group 1 and 2, respectively. The ratio testis/body weight was reduced by 6% in group 1 but significantly (by 22%, $p = 0.008$) in group 2 compared to SC control. Serum levels of T were reduced in obese rats from group 2 (by 29%), while estradiol (E2) was elevated in both groups of obese animals (by 44% $p = 0.018$ and 40% $p = 0.005$, respectively). The decline in serum levels of T in obese rats with the longest period of HFD exposure was associated with a marked suppression of the expression of Leydig cell-specific genes (e.g., StAR, Cyp11a1, Hsd3b1, Hsd17b3 and Ins13). Sperm analysis revealed a lower number of motile and progressive sperm and a higher number of static sperm. The track speed and progressive velocity was reduced by 17.9% and 16.6% respectively (group 1).

Conclusion Long-term obesity developed in the prepubertal period significantly affected Leydig cell capacity to produce T and altered the T/E2 ratio in obese rats. Furthermore steroidogenic enzymes were downregulated and sperm motility negatively affected. The observed perturbations of sex hormone levels may disturb normal spermatogenesis and attenuate reproductive potential and fertility in obese males.

Table 1. S. Sharma et al. (P12). Details of Grafted Mice and Retrieved Grafts.

	Castrated Group			Intact Group		
	Sham grafted	Fresh grafted	Cryo grafted	Sham grafted	Fresh grafted	Cryo grafted
Mice no	3	4	4	4	3	3
Mean Bodyweight (g)	38.4 ± 6.7	37.9 ± 1.4	34.3 ± 3.4	40 ± 2.9	38 ± 3.9	40.4 ± 1.8
Seminal vesicle weight (g)	20.4 ± 17.6	16.8 ± 2.3	15.5 ± 5.9	478.2 ± 91.8	406.4 ± 136.7	553.6 ± 75
Testicular weight (g)	–	–	–	103.3 ± 1.5	105.2 ± 4.7	110.9 ± 1.3
Total no. of grafts retrieved	–	13	10	–	8	18
Graft weight (mg)	–	1.7 ± 0.7	2.4 ± 1.8	–	1.8 ± 0.9	5.7 ± 2.6

■ Assistierte Reproduktion

P14

Konservative Behandlung vs. DMW – Was hilft bei der älteren Patientin? Retrospektive Fallanalyse an 200 Patientinnen des größten universitären Kinderwunschzentrums (UniKiD) aus den Jahren 2010–2012

*D. Baston-Büst, T. Kliebisch, J.-S. Krüssel, A. P. Bielfeld
UniKiD, Frauenklinik, Universitätsklinikum Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland*

Fragestellung Im europäischen und internationalen Vergleich scheinen deutsche Kinderwunschpatienten aufgrund der strikten Vorgaben des Embryonenschutzgesetzes (ESchG) und des ärztlichen Berufsrechts hinsichtlich der mangelnden Selektion des besten Embryos zum Transfer benachteiligt. Insbesondere ältere Patientinnen > 35 Jahre mit abnehmender ovarieller Reserve benötigen eine zügige Realisierung ihres Kinderwunsches. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit die liberale Auslegung des ESchG in Form des Deutschen Mittelwegs (DMW), wie er von der Ärztekammer Nordrhein seit 2011 geduldet wird, zur Verbesserung der Situation der älteren Kinderwunschpatientin und zu einer möglichen Erhöhung der Baby-take-home-Rate im Vergleich zum konservativen Vorgehen beiträgt.

Methodik Eingeschlossen wurden 200 Patientinnen zwischen 21 und 45 Jahren, die im Rahmen einer assistierten Reproduktion (IVF oder ICSI) mindestens zweimal in den Jahren 2006 (vor Einführung des DMW) bis 2013 behandelt wurden. Voraussetzung war außerdem, dass der betrachtete Behandlungszyklus nicht abgebrochen wurde. Es wurden die beiden letzten Behandlungen derselben Patientin (1. Zyklus = konventionell, 2. Zyklus = DMW) betrachtet. Ausgeschlossen wurden Patientinnen, die nur im Sinne des DMW behandelt wurden.

Folgende Parameter wurden bei den Patientinnen betrachtet: Alter, Dauer Kinderwunsch, BMI, Anzahl bereits geborener Kinder, Aborte und Abrasio, die Andrologie des Partners, IVF oder ICSI, TESE, das Punktions- und Transferdatum und die Protokollart. Zusätzlich E₂ und LH bei Gabe von hCG zur Ovulationsinduktion; die Medikamente der Stimulation (rFSH, rLH, rhCG, Urofollitropin und Lutropin, Corifollitropin alfa, hCG, GnRH-Agonisten und -Antagonisten), LH/FSH-Quotient, AMH, TSH, Testosteron, Prolaktin, FSH, LH, DHEA. Zudem wurden die Anzahl der punktierten Eizellen und deren Qualität im Verlauf der Behandlung (defekte Eizellen, GVs, MI, nachgereifte Eizellen [N], MII, 2PN und das Z-Scoring nach Scott [Z1 bis Z4]), die Anzahl der kryokonservierten 2PNER, der kultivierten 2PNER, der geplanten und transferierten Eizellen und die Qualität der Embryonen erfasst. Es wurden im Abstand von einer Woche die ersten beiden hCG-Werte erhoben,

das Ergebnis des ersten Ultraschalls, eine eventuelle Gemini-Anlage mit ihren Besonderheiten wie „vanishing twins“ und schließlich die Einzelheiten der Geburt (Schwangerschaftsdauer, Geschlecht, Gewicht, Auffälligkeiten, Modus) evaluiert.

Statistische Analyse: Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 22.0.0.0 durchgeführt und fachlich von der .05 Statistikberatung Düsseldorf unterstützt. Zur statistischen Auswertung wurden der T-Test und der Levene-Test (Vergleich von Mittelwerten) verwendet, außerdem der Qui-Quadrat-Test nach Pearson, Mann-Whitney-Test und Wilcoxon-Test (Gruppenanalysen) und ANOVA-Analysen (lineare Regressionsanalysen) bzw. der Omnibus-Test (logistische Regressionsanalysen). Zusätzlich wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Als signifikant galt ein Wert von $p < 0.05$.

Ergebnisse Vor allem die ältere Patientin (1. Zyklus konservative Behandlung $35,43 \pm 3,99$ Jahre, 2. Zyklus DMW = $36,45 \pm 3,86$ Jahre, $p = 0,0001$) profitiert von der Anwendung des DMW in Bezug auf höhere Schwangerschaftsraten (+18,5 %), höhere Geburtenraten (+25,5 %) und eine höhere Baby-take-home-Rate (+65 %) bei gleichzeitigem Transfer von signifikant weniger Embryonen (1. Zyklus konservativ = $1,97 \pm ,46$, 2. Zyklus DMW = $1,83 \pm 0,38$, $p = 0,0001$).

Schlussfolgerung Gerade für die ältere Patientin stellt eine Behandlung im Sinne des DMW und somit einer liberalen Interpretation des ESchG große Vorteile hinsichtlich der zeitnahen Verwirklichung ihres Kinderwunsches dar. Daher wäre es dringend notwendig, dass alle deutschen Ärztekammern unter Berücksichtigung der bislang erzielten Daten nach Behandlung mit dem DMW oder im Vergleich mit dem europäischen und internationalen Ausland im Sinne der Patientinnen dem DMW zustimmen würden.

P15

Risikofaktoren für einen Abort nach IVF oder ICSI

*D. Fehr, C. Pallacks, J. Hirschhain, J.-S. Krüssel
UniKiD, Frauenklinik, Universitätsklinikum Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland*

Fragestellung Jedes siebte Paar ist mittlerweile auf eine assistierte Reproduktionstechnik (ART) angewiesen – die Enttäuschung bei einem Abort nach zunächst erfolgreicher Behandlung ist umso größer. Eine Auswertung der im UniKiD durchgeführten IVF- und ICSI-Zyklen mit nachgewiesener klinischer Schwangerschaft soll einen Beitrag bei der Identifizierung von Risikofaktoren für Fehlgeburten nach ART liefern. Das Ziel ist eine verbesserte und individualisierte Beratung der Paare hinsichtlich einer realistischen Erwartungshaltung und möglichen Präventionsmaßnahmen.

Methodik Alle klinischen Schwangerschaften nach IVF oder ICSI der Jahre 2007–2011 im UniKiD wurden retrospektiv erfasst und in zwei Gruppen (Frischzyklen/Kryo-

zyklen) aufgeteilt. Bei den folgenden Parametern wurde mithilfe einer logistischen Regression der Zusammenhang zur Entwicklung eines Aborts getestet. Von insgesamt 790 Schwangerschaften nach Frischzyklen konnten 665 Fälle mit vollständigen Angaben aller Variablen in die Analyse einbezogen werden. Bei den Kryozyklen konnten 157 von 220 Schwangerschaften berücksichtigt werden.

Frischzyklen (665 Fälle):

- Alter der Frau
- Alter des Mannes
- Parität
- Nikotinabusus
- IVF oder ICSI
- BMI
- TSH
- Endometriose
- Endometriumdicke
- Estradiol

Kryozyklen (157 Fälle):

- Alter der Frau (bei Eizellentnahme)
- Alter der Frau (bei Transfer)
- Alter des Mannes
- Parität
- Nikotinabusus
- IVF oder ICSI
- BMI
- TSH
- Endometriose
- Endometriumdicke
- Estradiol
- Lagerungsdauer der Eizellen

Ergebnisse Nach einem frischen Embryotransfer waren das Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Eizellentnahme ($p < 0,01$) und die operativ bestätigte Diagnose einer Endometriose ($p = 0,02$) signifikante Einflussfaktoren für die Entwicklung eines Abortes. Nach einem Kryozyklus zeigte die Lagerungsdauer der eingefrorenen Vorkernstadien einen signifikanten Zusammenhang mit dem Abortrisiko ($p = 0,04$).

Schlussfolgerung Die Diagnose einer Endometriose, auch nach laparoskopischer Resektion, verdoppelt bei einer sonographisch nachgewiesenen, intrauterinen Schwangerschaft nach ART das Risiko für einen Abort. Damit stellt die Endometriose den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung einer Fehlgeburt neben dem Alter der Frau dar. Dies sollte bei Beratungen von betroffenen Patientinnen vor Beginn einer IVF- oder ICSI-Therapie berücksichtigt werden.

Die Wertigkeit des in dieser Studie errechneten, leicht erhöhten Abortrisikos durch eine verlängerte Lagerungsdauer der Vorkernstadien ist noch unklar und bedarf weiterer Abklärung. In der Beratungssituation müsste dieses Risiko dann bei einer erneuten Eizellentnahme gegen das parallel zur Lagerungsdauer gestiegene Alter der Frau abgewogen werden.

P16

Auswirkung des relativen und absoluten Serum-Estradiolspiegels auf die Schwangerschaftsrate nach assistierter Reproduktion

D. Fehr, A. P. Bielfeld, J.-S. Krüssel
UnikID, Frauenklinik, Universitätsklinikum Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland

Fragestellung Der Estradiol- (E_2 -) Serumspiegel ist ein wichtiges Kontrollinstrument unter der hormonellen Stimulation in Vorbereitung auf eine Eizellentnahme. Die absolute Höhe und der Anstieg des Serum- E_2 werden hierbei in Bezug zur Anzahl und Größe der reifenden Follikel gesetzt, um die weitere Stimulationsdosis festzulegen. Für jeden Graaf-Follikel kurz vor der Ovulationsinduktion wird eine durchschnittliche E_2 -Expression von 212,7 pg/ml erwartet, da dies dem mittzyklischen Serumspiegel im natürlichen, unstimulierten Zyklus entspricht [Stricker et al., 2006]. Auch erheblich hiervon abweichende Expressionen pro Eizelle werden beobachtet, wobei Ursache und Auswirkung z. B. auf das Endometrium noch nicht vollständig geklärt sind. Die folgende Auswertung der relativen und absoluten E_2 -Expression soll einen möglichen Einfluss auf die Erfolgsaussicht einer künstlichen Befruchtung untersuchen.

Methodik 2833 Follikelpunktionen mit anschließender IVF oder ICSI und Embryotransfer aus den Jahren 2012–2014 in unserem Zentrum wurden hinsichtlich der absoluten E_2 -Expression ausgewertet. Der Serumwert wurde dann in Relation zu den aufgefundenen Germinalvesikel, Metaphase-I- und Metaphase-II-Oozyten gesetzt, um die relative E_2 -Expression zu ermitteln. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden nur Patientinnen < 35 Jahren berücksichtigt, denen jeweils zwei Embryonen transferiert wurden. Als niedrige bzw. hohe relative E_2 -Expression wurden alle Werte unter der 5. Perzentile (131,3 pg/ml) und oberhalb der 95. Perzentile (388,3 pg/ml) der Verteilungskurve festgelegt [Stricker et al., 2006]. Die statistische Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Unabhängigkeitstest, zweiseitigem t-Test und einfaktorieller Varianzanalyse.

Ergebnisse Bei den ausgewerteten 630 Fällen kam es zu 52 biochemischen und 215 klinischen Schwangerschaften (gesamt 42,15 %). Bei den 172 Fällen mit niedriger E_2 -Expression wurde eine Schwangerschaftsrate von 44,77 % erzielt. Unter normaler E_2 -Expression wurden 41,81 % der 409 behandelten Patientinnen schwanger. Bei den 49 Fällen mit hoher E_2 -Expression lag die Schwangerschaftsrate bei 38,78 %. Die relative E_2 -Expression unterschied sich somit nicht signifikant voneinander ($\chi^2 = 0,7167$, $p = 0,70$). Auch bei der Auswertung der relativen E_2 -Serumwerte unterhalb der 5. Perzentile (74,8 pg/ml) und oberhalb der 95. Perzentile (428,6 pg/ml) des untersuchten Patientenkollektivs ergaben sich keine signifikanten Abweichungen ($\chi^2 = 0,8524$, $p = 0,65$).

Das Alter der Patientinnen in den drei Gruppen unterschied sich ebenfalls nicht signifi-

kant ($F = 1,8737$, $p = 0,15$). Der absolute E_2 -Serumspiegel wies dagegen hochsignifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen auf (Mittelwerte 1192,45 vs. 1885,34 vs. 2732,92 pg/ml, $F = 75,7485$, $p < 0,0001$). Der Vergleich der absoluten E_2 -Serumspiegel bei den Patientinnen mit und ohne positivem Schwangerschaftsnachweis ergab jedoch weder global ($t = 0,5477$, $p = 0,58$) noch in einer der drei Gruppen eine signifikante Abweichung ($t = 1,6297$, $p = 0,11$ vs. $t = 1,2667$, $p = 0,21$ vs. $t = -1,3664$, $p = 0,18$).

Schlussfolgerung Die E_2 -Expression in Relation zu den aufgefundenen Germinalvesikel, Metaphase-I- und Metaphase-II-Oozyten hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Schwangerschaftsrate. Auch der absolute E_2 -Serumwert beeinflusste im Vergleich der drei Gruppen die Erfolgsaussicht nicht, wobei jeweils deutlich supraphysiologische E_2 -Serumwerte im Rahmen der hormonellen Stimulation erzielt wurden. Ein direkter Zusammenhang zwischen Effektstärke der Stimulation und der Schwangerschaftsrate scheint damit zunächst nicht gegeben. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um eine mögliche kritische Obergrenze der E_2 -Expression im Hinblick auf den Behandlungserfolg und im Vergleich zum natürlichen Zyklus zu ermitteln.

P17

A multivariate Analysis of pre-treatment Semen Parameters and their Ability to Predict *In vitro* Fertilization Outcome

A. Vogel¹, C. Mallidis¹, M. Zitzmann¹, A. N. Schüring², S. Kliesch¹, V. Nordhoff¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie;

²Universitäres Kinderwunschzentrum, Universitätsklinikum Münster, Münster, Germany

Introduction German legislation has set criteria for the indication and reimbursement of an IVF or ICSI cycle based on conservative semen parameters as concentration, motility and morphology either in the native semen or the swim-up preparation. However, although semen samples might be in the normal IVF-compatible range, unpredicted total fertilization failure (TFF) may occur. For these patients it would be beneficial to identify parameters in the classical and extended semen analysis to predict TFF and to perform ICSI in the first place. Patients would benefit instead of wasting time, resources and extra

emotional stress. In literature there are hints that classical semen analysis parameters like normal morphology as well as parameters gained by a computer assisted sperm analysis (CASA) are correlated to IVF results. Therefore we aimed at investigating whether results of semen analysis including e.g. curvilinear velocity (VCL) measured by CASA, might help predicting IVF TFF and thus aid in circumventing it by highlighting cases where ICSI should be performed primarily.

Material and Methods We retrospectively analyzed our IVF data from the years 2000–2012 and included all semen parameters (e. g. concentration, motility, morphology in native and swim up, VCL and 24-hour-survival-rate) assessed on the day of oocyte retrieval as well as all data from the IVF itself (fertilization rate). Receiver operating characteristics (ROC) curves and their associated area under curve (AUC) were created using SPSS 22.0 (Ehningen, Germany). They were analysed as measure of the predictive value and of the sensitivity and specificity of all possible threshold values of the different parameters. Threshold values for the different parameters at a sensitivity of > 100 %, ≥ 80 % and ≥ 70 % were determined.

Results Of 23 ROC curves drawn 13 had an AUC with an asymptotic significance of $p < 0,005$; 8 of these 13 gave reasonable p-values above 0.650 (Tab. 2). Highest predictive values were obtained for sperm concentration in swim up preparation and native ejaculate, the 24-hour survival test, the percentage of grade a motile sperm in swim up and also for VCL values measured by CASA. Threshold values for these parameters were calculated for 100%, 80% and 70% specificity displaying also their respective sensitivity. However, for nearly all parameters the 100% specificity resulted in less than 35% sensitivity. At 70% specificity most parameters gave reasonable sensitivity values of above 45% with sperm morphology before 2002 giving the highest sensitivity value of 73.6%.

Discussion and Conclusion In conclusion, single parameters of semen analysis can be helpful to predict IVF fertilization success or failure. Although each of them has a limited predictive value on its own, ways have to be found to find a combination of those, which can be used in combination for the prediction of fertilization (e.g. using a decision tree). When assessing sperm parameters, careful standardization should be exercised to enhance their value for prediction of ART outcome.

Table 2. V. Nordhoff et al. (P17). Area under ROC-Curve and Significance.

Parameter	AUC
Normal morphology native before 2002	0.814
Sperm concentration in swim up	0.749
24-hour survival	0.691
Percentage of grade a-motile spermatozoa in swim up	0.682
Sperm concentration in native semen	0.676
VCL	0.659
Progressive motility native	0.658
Number of oocytes inseminated	0.656

P18

Clinical evaluation of Self-Operated Endovaginal Telemonitoring

L. Pereira, K. von Horn, M. Depenbusch, A. Schultze-Mosgau, C. Meyer, G. Griesinger
 Sektion für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Germany

Introduction The self-operated endovaginal telemonitoring (SOET;SONAURA™) system consists of a tablet with a USB connected vaginal probe that can be used by the patient to self-record ovarian follicular growth at home. A specific website application allows the doctor to retrieve the records and to perform measurements on the images recorded. This study explored the correlation between SOET and conventional 2D transvaginal sonography (TVS) findings during ART treatment. Furthermore, the concordance between the systems in detecting pre-defined criteria usually employed for clinical decisions during treatment, such as the follicular size to trigger final oocyte maturation and the total number of follicles to estimate the risk of ovarian hyperstimulation syndrome, was tested.

Methods Between May and June 2015 a prospective, observational cohort study comparing SOET with conventional 2D TVS monitoring during natural cycles, ovulation induction cycles and controlled ovarian stimulation cycles was performed. Patients first underwent conventional TVS monitoring with endometrium thickness and follicle measurements, respectively, by an experienced operator on a Voluson™ S6 2D (GE Healthcare). After this examination an explanation of the SOET system and training of self-scanning were provided. Inclusion criteria: two ovaries present, BMI ≤ 40 kg/m², willingness to use SOET. Patients were then transferred to a separate room and self-recorded the uterus and both ovaries. If the patient considered the images inappropriate, another recording could be made. The videos were then transmitted to imaging software to perform 2D-measurements by a different operator who was unaware of the conventional sonography measurements. A recording was considered unsuitable if the endometrium or one of the ovaries were not visualized.

Follicles were divided into four categories: 10–14 mm, 15–17 mm, 18–20 mm and ≥ 20 mm. Follicles < 10 mm were not included in the analysis. The primary outcome was the correlation of the total number of follicles > 10 mm measured by SOET vs conventional TVS. Secondary outcomes were: correlations in different follicle categories; correlation of endometrial thickness (mm) measured in a sagittal view; concordance if hCG criterion, defined as one follicle ≥ 18 mm for IUI or timed intercourse and ≥ 3 follicles ≥ 18 mm for IVF or ICSI, was reached; concordance if more than 19 follicles > 10 mm or more than 25 follicles > 10 mm were present; incidence of videos not suitable for analysis as judged by the operator. Agreement between the methods was assessed with Pearson correlation

and Cohen's kappa coefficients using SPSS.

Results 60 patients underwent SOET. In 16/60 (26.7%) the images were judged unsuitable. In these excluded cases, the mean BMI was significantly higher (29.3 vs 24.4 kg/m², $p < 0.0001$). In the remaining 44 cases, the mean age of the participants was 33.9 ± 4.6 years. The total number of follicles was highly similar with SOET and conventional TVS ($r = 0.91$, $p < 0.0001$). Furthermore, the following significant correlations were found: endometrial thickness ($r = 0.77$, $p < 0.0001$); follicle size categories 10–14 mm: $r = 0.72$, $p < 0.0001$; 15–17 mm: $r = 0.68$, $p < 0.0001$; 18–20 mm: $r = 0.54$, $p < 0.0001$ and > 20 mm: $r = 0.49$, $p = 0.001$. In the 10–14 mm category, the SOET follicle count was lower than conventional TVS count by 0.68 on average. The mean differences between number of follicles in the 15–17 mm, 18–20 mm and > 20 mm categories were +0.18, +0.07 and +0.04 respectively. For concordance between SOET and conventional TVS whether more than 19 follicles > 10 mm were present we found agreement in 43/44 cases ($\kappa = 0.88$, $p < 0.0001$). When analyzing if more than 25 follicles > 10 mm were present we found agreement in 43/44 cases ($\kappa = 0.85$, $p < 0.0001$). For concordance on hCG criterion reached, we found agreement in 39/44 cases ($\kappa = 0.734$, $p < 0.0001$).

Conclusions The incidence of SOET videos not suitable for analysis seems to be associated with higher BMI. SOET showed good agreement with conventional TVS both for follicle and endometrium measurements. More importantly we also found good concordance at cut-offs relevant for clinical decisions.

P19

Einfluss der Dauer der Metforminvorbehandlung auf die Qualität der Präimplantationsembryonen

K. Pohl¹, D. Gutknecht¹, A. Eder², M. Bals-Pratsch²
¹ART Labor, profertilita² profertilita, Regensburg, Germany

Fragestellung Metformin zählt weltweit zu den IVF-Medikamenten [1] und wird vor allem bei Risikofaktoren für Gestationsdiabetes mellitus (GDM) wie Insulinresistenz, Glukosestoffwechselstörung, Polyzystisches Ovar-Syndrom, Übergewicht, habituelle Aborte oder Implantationsversagen und Diabetes mellitus (DM) bei Eltern oder Geschwistern eingesetzt. Bei ART-Patientinnen konnten wir ab der Implantationsphase eine hohe Inzidenz erhöhter Glukosewerte über die Grenzwerte für GDM feststellen, obwohl ein DM vor der ART-Behandlung ausgeschlossen wurde [2]. Mit der Metforminvorbehandlung soll der Glukosestoffwechsel vor und während der gesamten ART-Behandlung optimiert werden. Dazu gehört auch die FSH-unabhängige Phase der Follikulogenese, die drei Monate oder länger dauern kann [3]. Ziel der Studie war es, den Einfluss der Dauer der Metforminvorbehandlung auf die Stimula-

tionsdauer, die Anzahl reifer Eizellen (MII), die Rate morphologisch idealer Embryonen und die fortlaufende Schwangerschaftsrate bei IVF- und ICSI-Behandlungen zu untersuchen.

Methodik 2013 wurden 125 Patientinnen (≤ 34 Jahre) mit Risikofaktoren für GDM in 142 IVF- oder ICSI-Zyklen mit Metformin als individueller Heilversuch („off-label-use“) vor, während und nach der ART-Therapie behandelt. Dafür wurden schriftliche Einverständniserklärungen eingeholt. Die Dauer der Metforminvorbehandlung wurde in die vier Gruppen I–IV eingeteilt (I: 0 Monate, II: ≤ 3 Monate, III: 4–6 Monate und IV: > 6 Monate). Es wurden die Stimulationsdauer, die Anzahl reifer Eizellen (MII), die Rate morphologisch idealer Embryonen und die fortlaufende Schwangerschaftsrate berechnet (Mittelwerte $\pm$ SD). Ein positives Ethikvotum der Universität Regensburg zur retrospektiven Auswertung des Datensatzes sowie die schriftliche Einwilligung der Patientinnen lagen vor.

Ergebnisse Nach Metforminvorbehandlung erhöhte sich die Stimulationsdauer um einen Tag: von $10,1 \pm 1,5$ Tage in der Gruppe I (kein Metformin) auf $11,1 \pm 1,3$ Tage in den Metformin-Gruppen II–IV. Die Anzahl reifer Eizellen (MII) nahm ebenfalls zu und stieg von $11,4 \pm 8,3$ MII in Gruppe I auf $14,6 \pm 5,5$ MII in Gruppe III (Metformin 4–6 Monate). Die Rate morphologisch idealer Embryonen stieg von 21,1 % ohne Metformin (Gruppe I) auf 25,1–30,5 % nach Metforminvorbehandlung (Gruppen II–IV) und die fortlaufende Schwangerschaftsrate stieg von 22,2 % (Gruppe I) auf maximal 40,7 % (Gruppe II). Der stärkste Effekt der Metforminvorbehandlung wurde bei einer Behandlungsdauer von 1–6 Monaten erzielt (Gruppen II–III).

Schlussfolgerung Unsere Daten zeigen, dass die mehrmonatige Metforminvorbehandlung von Patientinnen mit Risikofaktoren für GDM zu höheren Schwangerschaftsraten führt, wahrscheinlich aufgrund einer optimierten Eizellreifung.

Literatur:

1. IVF worldwide – Metformin. <http://www.ivf-worldwide.com/education/ivf-drug-in-use.html> (zuletzt gesehen: 22.10.2015)
2. Schindler M, et al. Gestationsdiabetes nach künstlicher Befruchtung als Risiko für Implantationsversagen und Aborte. Geburtshilfe Frauenheilkd 2014; 74 – FV_02_03. DOI: 10.1055/s-0034-1388547
3. Erickson GF, et al. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. Fertil Steril 2001; 76: 943–9.

P20

Follikelspülung mit der STEINER-TAN Needle® bei „poor response“: eine randomisierte Studie

K. von Horn, M. Depenbusch, A. Schultze-Mosgau, C. Meyer, B. Schöpfer, G. Griesinger
 UKSH, Campus Lübeck, Universitäres Kinderwunschzentrum, Lübeck, Germany

Fragestellung Bei der IVF-Behandlung werden pro aspiriertem Follikel im Mittel 0,7–0,8 Oozyten gewonnen. Theoretisch könnte

die Anzahl gewonnener Eizellen bei Eizellpunktion mittels mehrmaligem Spülen und Absaugen der Follikel („follicular flushing“) erhöht werden. Bisherige Studien wurden mehrheitlich an Normo-Respondern und mit konventionellen doppel-lumigen Nadeln durchgeführt. Das primäre Ziel der vorliegenden Studie ist die Überlegenheit eines neuen Follikel-Spülsystems gegenüber der Verwendung einer ein-lumigen Aspirationsnadel in Bezug auf die Anzahl der gewonnenen COCs (Cumulus-Oocyte-Complexes) bei „poor responders“ zu demonstrieren. Sekundäre Zielsetzungen sind die Untersuchung auf Unterschiede hinsichtlich der Anzahl reifer Oozyten (MII), der Anzahl an Patienten mit Embryoübertragung (ET), der Schwangerschaftsrate, der Dauer des Eingriffs der Eizellentnahme, sowie des subjektiven Empfindens und der Schmerzbelastung der Patientinnen im Rahmen der Behandlung und der Eizellentnahme.

Methodik Es handelt sich um eine prospektive, monozentrische, offene, kontrolliert-randomisierte, 2-armige Studie zum Vergleich einer ein-lumigen 17G Aspirationsnadel (Gynetics®) mit einem Follikel-Spülsystem (STEINER Flush/Valve®) mit modifizierter doppel-lumiger Punktionsnadel (STEINER-TAN Needle®) (Studienregistrierung: NCT02365350). Die Randomisierung in die jeweilige Behandlungsgruppe mit ein- oder doppel-lumigem Punktionsystem erfolgt nach ovarieller Stimulation am Tag der Ovulationsinduktion mit hCG. Bei den randomisierten Patientinnen handelt es sich um Frauen mit Indikation zur IVF oder ICSI im Alter von 18–45 Jahren, mit einem Bodymass-Index (BMI) von 18–35 kg/m², mit zwei vorhandenen Ovarien sowie einem sonographischen Befund von ≤ 5 Follikel > 10 mm bei hCG-Gabe. Die Erfassung des subjektiven Empfindens und der Schmerzbelastung nach der Eizellentnahme erfolgt mittels Depression Anxiety Stress Scale-21 (DASS 21) und dem German Pain Questionnaire Score. Achtzig Patientinnen werden benötigt, um ein Plus von zumindest einer COC im Studienarm nachweisen zu können (erwartete mittlere Zahl an Eizellen im Kontrollarm der Studie = 3, erwartete Standardabweichung = 1,5, alpha = 0,05, beta = 0,20).

Ergebnisse Ausgewertet wird die Interimsanalyse nach 50 % Rekrutierung (n = 19 STEINER-TAN Needle® und n = 20 Gynetics® Aspirationsnadel per Intention-to-treat; n = 17 STEINER-TAN Needle® und n = 18 Gynetics® Aspirationsnadel per-protocol). In der STEINER-TAN-Gruppe bzw. der Gynetics-Gruppe wurden 4,0 ($\pm 2,3$) vs. 4,4 ($\pm 2,0$) Follikel punktiert. In der STEINER-TAN-Gruppe bzw. der Gynetics-Gruppe wurden im Mittel per ITT 2,4 ($\pm 2,0$) vs. 2,8 ($\pm 1,7$) COCs (p = 0,42), 1,6 ($\pm 1,5$) vs. 1,9 ($\pm 1,3$) MII-Oozyten (p = 0,49) und 1,0 ($\pm 1,2$) vs. 1,3 ($\pm 1,0$) 2PN-Oozyten (p = 0,42) gewonnen. Die mittlere Zahl an gewonnenen COCs pro punktiertem Follikel war 0,6 ($\pm 0,4$) vs. 0,6 ($\pm 0,3$) (p = 0,62) in der STEINER-TAN-Gruppe bzw. der Gynetics-Gruppe. Das Alter und der BMI waren 38 (± 5) vs. 38 (± 5) Jahre und 24 (± 4) vs. 23 (± 3) kg/m² in der STEINER-

TAN-Gruppe bzw. der Gynetics-Gruppe. Die mittlere Zeitdauer für den Eingriff war 4,1 ($\pm 2,3$) vs. 2,05 ($\pm 1,2$) Minuten (p = 0,04) in der STEINER-TAN-Gruppe bzw. der Gynetics-Gruppe. Die Ergebnisse des DASS-21-Fragebogens waren hochgradig ähnlich zwischen den Gruppen.

Schlussfolgerung Die vorliegende Interims-Analyse zeigt bei „poor responders“ keinen Trend zu einer höheren Zahl an gewonnenen Eizellen mit dem STEINER-TAN-Needle®-System. Für eine weitergehende Beurteilung muss allerdings eine Zahl von zumindest 80 Patientinnen randomisiert und ausgewertet werden.

■ Reproduktionsbiologie 3

P21

Strong Cytotoxic effects of Methotrexate on human Leukemia T Cells but small effects on human Granulosa Cells

B. Al-Kawlan¹, J. Pastuschek¹, W. Chaiwangyen¹, A. Fritzsche², S. Winkler², U. Markert¹

¹Placenta Lab, Department of Obstetrics, University Hospital; ²Center for Reproductive Medicine Jena and Erfurt, Jena, Germany

Background The most common type of cancer diagnosed in children is acute lymphoblastic ALL. After successful treatment, young female cancer survivors still have an elevated risk for late effects of chemotherapy treatments, such as a possible premature ovarian failure and infertility. The main goal of the present study was to determine the association of different chemotherapeutic agents as part of childhood cancer treatment with infertility in adults who survived pediatric cancer, where the concentration-dependent cytotoxicity doxorubicin (DOX); vincristine (VIN); methotrexate (MTX) and cyclophosphamide (CYC), was assessed against of human luteinized granulosa cells (LGCs) and human granulosa cell lines in comparison with Jurkat T lymphocyte cell line.

Methods Luteinizing granulosa cells (LGCs) were collected from the FF aspirates, which obtained from women receiving assisted reproduction treatment at the Reproductive Medicine Center in Jena. LGCs were cultured for 72 h and then incubated with different doses of DOX (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 µg/ml), VIN (0.01, 0.1, 1, 5, and 10 µg/ml), MIX (0.1, 1, 5, 10, and 50 µg/ml) and CYC (1, 10, and 100 µg/ml) for 48 h. Simultaneously, the granulosa cell lines (KGN and COV434) and the leukemia T cell line (Jurkat) were treated for 12, 24 and 48 h with the same doses of DOX, VIN, MTX and CYC. Subsequently, cell viability was determined by MTS assay. Student's-T-tests were used for statistical analyses and considered statistically significant when p < 0.05.

Results The results show that both granulosa cell lines, KGN and COV434 had a similar reduction of cell viability when treated with

DOX; VIN and CYC. Interestingly, Jurkat cells exhibited the highest sensitivity to all of the tested anticancer substances and cell viability was decreased dose and time-dependently. VIN significantly inhibited cell viability on KGN, COV434 and Jurkat cells, while DOX and CYC decreased cell viability on human isolated luteinized granulosa cells. Treatment with MTX induced cell death in Jurkat cells in a dose-dependent fashion, while it had no effect in LGCs; KGN and COV434.

Conclusion The effect of MTX on granulosa cells in children and its potential impact leading to infertility is still poorly understood. Our studies provide comparative results for cytotoxicity of different cytostatic drugs frequently applied in ALL in childhood. MTX showed strong cytotoxic effects on human leukemia T cells but very little effects on human granulosa cells. These findings may useful to improve the treatment of MTX for childhood cancers.

P22

Es gehören immer zwei dazu – Die Etablierung eines neuen *In-vitro*-3D-Modells zur menschlichen Implantation

D. Baston-Büist¹, S. J. Boddicker, J.-S. Krüssel, A. P. Bielfeld

UniKid, Frauenklinik, Universitätsklinikum Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland

Fragestellung Die Einnistung eines menschlichen Embryos in das mütterliche dezidualisierte Endometrium lässt noch viele molekular- und zellbiologische Fragen offen. *In-vivo*-Untersuchungen sind aufgrund ethischer Aspekte in Deutschland nicht durchführbar, ebenso wenig wie ein Hybridmodell mit menschlichen Embryonen. Aktuell verfügbare Modelle bestehen aus adhärennten ein- oder mehrschichtigen Zellkulturen entweder aus Primärzellen oder Zell-Linien des mütterlichen Endometriums, die mit Embryosurrogaten, Säugetierembryonen oder Sphäroiden aus Chorionkarzinom-Zell-Linien (z. B. JEG-3, BeWo) kultiviert werden. Als mögliche Unterschichtung, um die Bildung von 3D-Strukturen zu fördern, kommt häufig Matrigel® zum Einsatz, ein gelatinöses Proteingemisch, das kommerziell erwerblich ist. Die große Herausforderung besteht deshalb in einem zellbiologischen Ansatz, der nur aus humanen Komponenten zusammengesetzt sein soll und den embryonalen und mütterlichen Zellen Platz für die 3D-Ausdehnung lässt, um die Vorgänge der menschlichen Implantation auch über mehrere Tage verfolgen zu können.

Methodik Zur Imitation des mütterlichen Endometriums wurden St-T1-Zellen verwendet, die unter Zusatz von cAMP und Progesteron dezidualisierbar sind. Auf embryonaler Seite wurden HTR8/SVneo-Zellen [2], transformierte extravillöse Trophoblastzellen, kultiviert. Beide Zellarten wurden zunächst über mehrere Passagen einschichtig kultiviert und dann über 48 h entweder im hängenden Tropfen oder auf einer nicht-adhärennten Zell-

kulturplatte zur Sphäroidbildung angeregt (finale Größe ~300–500 µm). Vor der Konfrontation mütterlicher und embryonaler Zellen wurden diese mit verschiedenen farbigen MitoTrackern® zur späteren Identifikation gefärbt. Die Messung der Konfrontation im hängenden Tropfen erfolgte zunächst mittels konfokaler Laserscanmikroskopie in einem Zeitraum von 72h mit nachfolgender Bestimmung der Mittelpunktdistanzen. In einem anderen Ansatz erfolgte die Konfrontation in einem konventionellen Zellkulturansatz mit anschließendem Einbetten in Paraffin zu unterschiedlichen Zeitpunkten von 6–120h. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels Vimentin und Cytokeratin7 Antikörpern (AK) mit Aufnahme im Hellfeld.

Ergebnisse Nach erfolgreicher Generierung sowohl endometrialer als auch embryonaler Sphäroide konnte die Konfrontation über 72h nach MitoTracker®-Färbung bzw. 120h in der konventionellen Zellkultur durchgeführt werden. Die gemessenen Mittelpunktsdistanzen als Maß der Interaktion im Laserscanmikroskop zwischen mütterlichen und embryonalen Zellen nahmen von ~400 µm auf ~300 µm binnen 48h ab. Der Messpunkt 72h entfiel aufgrund mangelnder Fluoreszenz nach 72h bei 37°C Zellkulturbedingungen. Eine deutlich längere Kultivierung bis 120h war in der konventionellen Kultur möglich. Anhand der verwendeten AKs konnten beide Zellarten diskriminiert werden.

Schlussfolgerung Mit dem Sphäroidmodell aus mütterlichen und embryonalen Zellen steht ein neues Modell zur Verfügung, um die Interaktion dieser Zellen im frühen Dialog sehr nah an der *In-vivo*-Situation zu untersuchen. Weitere Untersuchungen fokussieren nun auf die für die Implantation wichtigen Signalkaskaden, z. B. MAPK und JNK.

P23

Die molekulare Charakterisierung des reproduktiven Phänotyps und der Nachkommen der Syndecan-1-Knock-out-Maus

A. P. Bielfeld¹, C. Gougoula², S. J. Böddeker¹, W. P. M. Benter², J.-S. Krüssel¹, D. M. Baston-Büst¹
¹UnikID, Frauenklinik, Universitätsklinikum Heinrich-Heine-Universität; ²Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland

Fragestellung Die Syndecan- (Sdc-) Familie besteht aus 4 transmembranen Heparinsulfatproteoglykanen. Obwohl Sdc-1 eine zyklusspezifische Expression im humanen Endometrium zeigt, ist bisher kein Zusammenhang zur Reproduktion bekannt [1]. Da Sdc-1 jedoch ein Rezeptor für das in der Implantation nachgewiesene wichtige Chemokin CXCL-1 ist, kann eine Funktion bei der Implantation vermutet werden. Um die Frage zu klären, ob die Sdc-1-Knock-out- (KO-) Maus einen reproduktiven Phänotyp zeigt und ob der Sdc-1-KO eine Rolle in der frühen Embryonalentwicklung spielt, haben wir Verpaarungsverhalten, Zeitintervall bis zum Eintritt einer Schwangerschaft, Implantationsstellen, Ge-

wicht der Mütter, Wurfgröße und die individuelle embryonale Entwicklung ab Geburt untersucht.

Methodik Wildtyp (WT) B6J und homozygote Sdc-1-KO-Mäuse wurden zeitlich geplant verpaart, das Verpaarungsverhalten mittels Feststellung von Vaginalpropfen untersucht, die Uteri am Tag 6 der Schwangerschaft zur Untersuchung der Implantationsstellen entnommen oder die schwangeren Mäuse 3-tägig gewogen und mit Geburt der Nachkommen diese 3-tägig bis Entwicklungstag 200 gewogen. Überdies wurden die Organgewichte adulter Tiere und der Nachkommen bestimmt. Ebenso wurden die männlichen Nachkommen mit 6 Monaten einem Spermogramm unterzogen. Zur Determinierung der einflussnehmenden Variablen (Endometrium oder Embryo) wurde ein *Vice-versa*-Versuch durchgeführt, bei dem 2-Zeller von WT-Mäusen auf Sdc-1-KO-Ammen und Sdc-1-KO-2-Zeller auf WT-Ammen transferiert wurden.

Ergebnisse Die Beobachtungen bezüglich des Phänotyps zeigten, dass die Sdc-1-KO-Maus ein längeres Zeitintervall bis zum Eintritt einer Schwangerschaft benötigt und auch im Vergleich zur Züchterangabe für die WT-Maus (C57Bl6) eine signifikant geringere Schwangerschaftsrate (17,02 % vs. 88 ± 6 %) aufweist [2]. Hingegen zeigte sich, dass, wenn eine Schwangerschaft eingetreten ist, mehr Implantationsstellen im Vergleich zur WT-Maus vorhanden sind. Interessanterweise ist die Wurfgröße zwar direkt nach Geburt größer, allerdings verstirbt eine signifikant höhere Anzahl an Sdc-1-KO-Nachkommen binnen der ersten 3 Tage *post partum* (45 % vs. 33 %). Zudem sind die Sdc-1-KO-Nachkommen bis zum Ende des Beobachtungszeitfensters nach 6 Monaten zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant leichter. Die Untersuchung der einzelnen Organe zeigte, dass bei männlichen Sdc-1-KO-Nachkommen das Gehirn und der Hoden signifikant leichter waren, bei den weiblichen Sdc-1-KO-Nachkommen waren es das Gehirn und die Nieren im Vergleich zu WT-Mäusen. Daraufhin wurde bei 6 Monate alten Sdc-1-KO-Nachkommen ein Spermogramm durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Sdc-1-KO-Mäuse statistisch signifikant weniger Spermien aufwiesen und signifikant mehr morphologische Auffälligkeiten im Mittelstück- und Schwanzbereich zeigten.

Die *Vice-versa*-Ammentierversuche zeigten bezüglich des Ausgangs der Schwangerschaft keinen signifikanten Unterschied.

Schlussfolgerung Unsere Untersuchungen zeigen, dass Sdc-1, wie vermutet, eine Rolle bei der murinen Implantation spielt, da die Sdc-1-KO-Maus einen differenzierten reproduktiven Phänotyp aufweist, der sich vor allem durch längere Zeit bis zur Trächtigkeit, eine deutlich schlechtere Schwangerschaftsrate und eine hohe Rate an versterbenden Nachkommen auszeichnet. Darüber hinaus hat sich ein Einfluss auf die Embryonalentwicklung gezeigt, der sich durch ein konstant niedrigeres Gewicht sowohl bei den Jungtieren als auch später bei den adulten Nachkommen manifestierte. Hier bleibt die Frage aller-

dings noch offen, ob der Sdc-1-KO einen direkten Einfluss auf den Metabolismus hat oder ob eine veränderte embryo-maternale Kommunikation die Ursache ist, was derzeit durch immunhistochemische Untersuchungen beantwortet werden soll.

Literatur:

1. Inki P. Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured keratinocytes. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 299–305.
2. Persönliche Kommunikation mit Janvier Laboratories.

P24

ROS-generating Nox Enzymes in human ovary: The role of Nox4

T. Buck¹, K.-G. Dietrich¹, J. Blohberger¹, C. Herrmann¹, A. Tiefenbacher¹, D. Berg², U. Berg², A. Mayerhofer¹
¹Lehrstuhl Zellbiologie/Anatomie III, LMU, Planegg-Martinsried; ²A. R. T. Bogenhausen, München, Germany

Introduction Reactive oxygen species (ROS) are often regarded as damaging molecules causing oxidative stress and have been implicated in pathophysiological processes. However, ROS are now being recognized to play essential roles in signal transduction, hormone synthesis/signaling, and fundamental female reproductive processes. Thus, ROS were shown to be crucial for ovulation in rats. How ROS are generated in the human ovary and what their roles may be is not well known.

The NADPH oxidase (Nox) family of superoxide and hydrogen peroxide- (H₂O₂-) producing proteins has emerged as an important source of ROS. It consists of seven members, Nox1–5 and Duox1/2. The presence of Nox4/5 in human granulosa cells (GCs) was confirmed by identification of the appropriate mRNA in a previous study. In the present study we explored the expression of all Nox family members in human GCs from IVF-patients. We attempted to verify specifically the expression of Nox4 and studied its presence *in vivo*, in human and non-human primate ovarian samples. Since Nox4 activity results in the generation of H₂O₂, we were interested in the formation of this specific ROS in GCs. The influence of follicle-stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on the ability of GCs to produce ROS and H₂O₂, in particular, was explored.

Methods We studied human IVF-derived GCs as a cellular model and used ovarian sections for immunohistochemical observations. Nox4/5 and Duox1/2 mRNA levels of luteinized GCs (24h stimulation) were analyzed by RT-PCR. Generation of ROS by luteinized GCs was determined fluorimetrically with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH₂-DA) as an indicator dye after 1–5 days of cultivation. H₂O₂ production was determined using an Amplex Red Enzyme Assay. The specific Nox4 blocker GKT137831, recombinant FSH and hCG were used for the cellular studies. Cell viability was monitored.

Results RT-PCR and sequencing confirmed the expression of Nox4/5 by human GCs and identified the expression of Duox1/2. The

other Nox family members were not found. Immunohistochemical analyses revealed Nox4 in GCs of antral follicles. Nox4 was also found in cultured human GCs by immunocytochemistry to be mainly associated with the cell membrane. All controls were negative. Cultured human GCs actively produce ROS and H₂O₂ was identified specifically. The Nox4 blocker GKT137831 reduced basal ROS/H₂O₂ production by about 50% but did not affect the viability of GCs. Basal ROS levels of GCs were increased when FSH was added to the medium for 24h over the levels in treated control cultures, implying that FSH may regulate Nox4 levels and/or activities. The regulation of Nox enzymes at the mRNA level was explored upon addition of recombinant human FSH and hCG to GCs. We found that both hormones affected the mRNA levels of Nox4, Nox5, Duox1 and Duox2, albeit in a complex time-dependent manner. Additional experiments are being performed to examine the changes at the protein level and to explore, whether H₂O₂ may mediate some of the FSH/hCG actions.

Conclusion The results reveal that Nox4 is expressed by the somatic cells of the large antral follicle in human ovary. GCs produce ROS, including H₂O₂ and Nox4 is identified as major contributor to the ROS/H₂O₂ environment of the follicles. The absence of toxic effects suggests that H₂O₂ may serve as an intercellular signaling molecule within the follicle.

Acknowledgement: Supported by DFG MA 1080/26-1.

P25

Wiederholte Reifung von Eizellen in nicht-stimuliertem xenotransplantiertem Eierstockgewebe eines präpubertären Mädchens

R. Dittrich¹, S. Findeklee¹, L. Lotz¹, J. Liebenhron², I. Hoffmann¹, M. W. Beckmann¹

¹Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Erlangen; ²Frauenklinik, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland

Fragestellung Die einzige realistische Möglichkeit zum Fertilitätsersatz bei an Krebs erkrankten Mädchen vor der Pubertät ist die Kryokonservierung von Ovargewebe. Bis heute ist noch nicht eindeutig bewiesen, dass vor der Pubertät entnommenes Ovargewebe nach einer Transplantation nach Abschluss der onkologischen Therapie Funktionszeichen wie das Eierstockgewebe von fertilen Frauen aufweist. Unser Ziel war der Nachweis der wiederholten spontanen Bildung antraler Follikel und reifer Eizellen in der immundefizienten Maus nach Xenotransplantation von Ovargewebe, das einem Mädchen vor Beginn der Pubertät entnommen wurde.

Methodik Eingefrorenes Eierstockgewebe von einem 6-jährigen Kind, das an einem Neuroblastom erkrankt war, wurde in eine intramuskuläre Tasche im Bereich des Nackens einer bilateral oophorektomierten SCID-Maus transplantiert. Die Überwachung des Folli-

kelwachstums erfolgte durch eine Palpation des Nackens. Antrale Follikel wurden mit einer sterilen Nadel aspiriert, ohne die Maus zu töten. Gewonnene Follikel platzierten wir in Kulturmedium ohne Zusatz von Gonadotropinen für eine *In-vitro*-Kultur.

Ergebnisse Am 122. Tag nach Transplantation konnte eine Eizelle im Germinalvesikel-Stadium aus einem antralen Follikel des transplantierten Gewebes gewonnen werden. Die Eizelle reifte bis zum MII-Stadium 22h nach Beginn der *In-vitro*-Kultur. Vier Wochen später konnte ein weiterer antraler Follikel im transplantierten Gewebe gefunden werden und es ließ sich aus diesem Follikel direkt eine reife Eizelle generieren.

Schlussfolgerung Nach der Xenotransplantation von humanem präpubertärem Ovargewebe können ovarielle Follikel und Eizellen ohne exogene hormonelle Stimulation reifen. Diese Technik besitzt das Potenzial, wiederholt zyklisch Eizellen zu generieren. Die Kryokonservierung von vor der Pubertät entnommenem Ovargewebe kann die Fertilität junger Frauen nach Abschluss der onkologischen Behandlung erhalten. Es ist der erste Bericht über eine wiederholte Gewinnung reifer Metaphase-II-Oozyten in einer einzelnen Maus nach Transplantation von humanem präpubertärem Eierstockgewebe.

P26

Whole ovary Cryopreservation for Fertility Preservation – Which is the optimal Slow-freeze Protocol?

I. Hoffmann, L. Lotz, S. Findeklee, M. W. Beckmann, R. Dittrich

Frauenklinik Erlangen, Germany

Introduction Whole ovary cryopreservation and retransplantation with microvascular anastomosis holds great potential for fertility preservation because revascularization is rapid, hormonal cyclicity can be reestablished and functional longevity is prolonged. The success of this method depends on the efficacy of a cryopreservation protocol to retain the organ's viability. Therefore the current study attempted to establish an optimal slow-freeze cryopreservation protocol for whole ovaries using a large mammal model whose ovaries approximate the size, volume, structure and appearance of follicle in the cortex of human ovaries.

Method Whole pig ovaries were randomly assigned to A) fresh control, B) traditional slow freeze (TF) or C) uni-directional slow freeze (UF). Ovaries were perfused with 10% DMSO in Krebs Ringer. For TF whole ovaries were placed in specimen jars containing 10% DMSO and placed into a specialized container for freezing filled with Propan-2-ol. For UF whole ovaries were placed within a specially designed container containing 10% DMSO and transferred to a specialized freezing machine (CTE 920).

Results Histological evaluation demonstrated intact morphology of follicles in all groups; however an overall decrease of folli-

cle numbers in TF (46%) and UF (50%) compared to fresh control. The live/dead assay indicated significantly lower populations of live cells in both TF (60%) and UF (58%) compared to fresh tissue (74%). The TUNEL assay confirmed a difference in percentage of apoptotic follicles between fresh and TF, but there was no significant difference between fresh and UF.

Conclusions Although there were no significant differences in basic morphology and live/dead cell populations between our cryopreserved groups, there was a difference in the rate of apoptosis seen in ovarian follicles and the UF group was comparable to the fresh control. Based on this finding and on results in similar studies on whole ovary preservation, it is felt that further investigation into directional freezing is warranted to establish an optimal slow-freeze cryopreservation protocol for whole ovaries. Whole ovary cryopreservation could provide opportunities for women facing fertility loss due to chemo- or radiotherapy treatment.

■ Genetik 1

P27

Identification of Genes regulated by the Human RHOX Cluster

J. Borgmann¹, M. F. Wilkins², S. Kliesch¹, J. Gromoll¹, S. Laurentino¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster, Germany; ²Department of Reproductive Medicine, University of California San Diego, La Jolla, United States

Background Homeobox genes encode transcription factors and share a unifying 60 amino acid helix-turn-helix DNA motif called homeobox domain. A recently discovered subfamily is clustered together on the X chromosome and is selectively expressed in the male and female reproductive tract. These reproductive homeobox (*Rhox*) genes were identified in several species as having important roles in reproductive tissues, notably in testis. *Rhox* knockout mice display a wide range of reproductive abnormalities but less is known about their human counterparts [1]. The human *RHOX* cluster is composed of three genes: *RHOXF1* and two copies of *RHOXF2* (*RHOXF2* and *RHOXF2B*). Previous data show that *RHOX* proteins are expressed exclusively by germ cells in human testis and that aberrant *RHOX* methylation is associated with several sperm parameters [2, 3].

Aim The study aimed at identifying target genes of the human *RHOX* cluster by transcriptional profiling to understand the importance of *RHOXF1* and *RHOXF2/2B* to cell physiology and, moreover, to investigate functional consequences of genetic alterations in *RHOX*.

Material and Methods HEK293 cells were transiently transfected with either *RHOX* expression (*RHOXF1*; *RHOXF2*) or an empty

control vector (OriGene), RNA was isolated 48h after transfection and overexpression of *RHOX* was confirmed by qPCR and western blot. Human Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix) were used to evaluate changes in mRNA expression (biological triplicates). Variant expression vectors bearing *RHOX* sequence modifications were constructed using site-directed mutagenesis (Life technologies).

Results In total, 49 (4) and 87 (15) genes were differentially expressed in response to *RHOXF1* and *RHOXF2* overexpression, respectively (fold change ≥ 1.5 ; $p \leq 0.05$; number of genes with known connection to spermatogenesis or reproduction are given between brackets). Most *RHOX* regulated genes are involved in protein metabolism and modification (41%), immunity and defense (18%), sexual reproduction (18%) and endocytosis (14%). Further, *RHOXF1* was identified as a potential target of *RHOXF2* (fold change: 3.31) but not *vice versa*. Differential regulation of *DNAJB1*, *HSPA6*, *MSH5* (by both *RHOXF1* and *RHOXF2/2B*), *ANKPD1* and *RHOXF1* (by *RHOXF2/2B*) was confirmed on transcriptional level. Four out of five potential target genes showed significantly increased expression levels in response to *RHOX* transfection compared to control vector transfection, whereas *MSH5* displayed decreased expression level. Moreover, first data indicated that several sequence variations in *RHOX* genes affect the regulation of target gene expression.

Conclusion Overexpression of both *RHOXF1* and *RHOXF2* lead to differential expression of genes with known connection to spermatogenesis or reproduction. The finding that *RHOXF2* seems to regulate *RHOXF1* is in agreement with the expression of *RHOXF2* protein in earlier stages of germ cell development (spermatogonia and early spermatocytes) compared to *RHOXF1* expression which occurs in later stages (pachytene spermatocytes and round spermatids) [1]. The identified *RHOX*-target gene interaction fulfills the purpose of a functional assay and enables the investigation of sequence variations in *RHOX* functions and target gene expression. In fact, preliminary results indicate that proper function of *RHOX* is impaired by sequence variations. This approach provided a first view of the function of human *RHOX* genes, suggesting that abnormal *RHOX* action might be a cause for male infertility.

References:

1. MacLean JA^{2nd}, et al. RhoX: a new homeobox gene cluster. *Cell* 2005; 120: 369–82.
2. Song HW, et al. The RHOX homeobox gene cluster is selectively expressed in human oocytes and male germ cells. *Human Reproduction* 2013; 28: 1635–46.
3. Richardson ME, et al. Epigenetic regulation of the RHOX homeobox gene cluster and its association with human male infertility. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 12–23.

Acknowledgement: The study was supported by the German Research Foundation (DFG) collaborative grant (GE1547/15-1) and by Innovative Medizinische Forschung (IMF, I-LA121315).

P28

Couples affected of severe Male Factor and synaptic Chromosome Anomalies can improve their Clinical Outcomes of IVF-ICSI Cycles with Preimplantation Genetic Screening by array-CGH

L. Coll, M. Parriego, S. Mateo, J. M. Vendrell, M. Boada, P. N. Barri
Hospital Universitari Quirón Dexeus, Dexeus Woman's Health, Barcelona, Spain

Introduction The incidence of meiotic chromosome anomalies limited to the germ cell line in patients with severe low sperm counts ($< 5 \cdot 10^6$ sperm/ml) increases with decreased sperm count. On the other hand, oligozoospermic patients have a significant increase in de-novo sex chromosome and autosomal aneuploidies in a series of children born after IVF-ICSI. Preimplantation Genetic Screening by aCGH (PGS-CGH) can alternative management for IVF-ICSI cycle in male factor with synaptic chromosome anomalies?

Material and Methods Observational study performed in a private IVF clinic, from January 2010 until March 2014. One hundred and nine couples with severe male factor and synaptic anomalies (abnormalities in chromosome pairing) undergoing an IVF-ICSI cycle were included. CGH-PGS was offered to these couples, and they decided whether to undergo PGS or not. Synaptic anomalies were diagnosed by FISH in severe (oligozoospermia $< 5 \cdot 10^6$ sperm/ml) or by testicular biopsy in azoospermia. We compared the fertilization, implantation, ongoing pregnancy, miscarriage and live birth rates between both groups.

Clinical outcomes are presented. The objective of this study was to evaluate if Preimplantation Genetic Screening by aCGH (PGS-CGH) can be an alternative management for IVF-ICSI cycle in male factor with synaptic chromosome anomalies.

Results A total of 129 IVF-ICSI cycles were analyzed: 60 underwent PGS and 69 did not. No statistically significant differences were observed between PGS and non-PGS groups in maternal age (34.6 ± 2.8 years vs 34.5 ± 5.8 years), number of inseminated oocytes (14.0 ± 3.7 vs 13.0 ± 5.8), sperm concentration (3.1 ± 3.9 million/ml vs 2.2 ± 2.7 million/ml) and fertilization rate (67.7% vs 70.6%).

One hundred and thirty three embryos were chromosomally normal (25.6% of the biopsied embryos and 28.3% of the diagnosed embryos).

Significant differences were observed in the number of transferred embryos (1.27 ± 0.80 vs 2.17 ± 0.54) ($p < 0.0001$) and in the number of transfers (48 [80%] vs. 69 [100%]) ($p < 0.0001$).

No differences between groups were observed regarding ongoing pregnancy rate (51.7% vs 40.8%) and miscarriage rate (12.9% vs 32.1%). Significant clinical differences were observed in implantation rate

(56% vs 24.7%) ($p < 0.05$) and in live birth rate (45% vs 27.5%) ($p < 0.05$).

Conclusions:

- PGS-CGH increases clinical outcomes by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos despite off risk of no embryo transfer.
- Selection of chromosomally normal embryos by CGH-PGS improve implantation rate and live birth rate in couples affected by severe male factor and synaptic chromosome anomalies.
- Further randomized studies are needed in order to confirm the results obtained by embryo screening of all 24-chromosomes in PGS.

P29

Lebendgeburt eines gesunden Kindes nach Re-Biopsie und Re-Vitrifikation im Blastozysten-Stadium

D. Gutknecht¹, U. Schoen², E. Holinski-Feder², A. Eder³, K. Pohl¹, M. Bals-Pratsch³
¹ART Labor, profertilita, Regensburg; ²Medizinisch-Genetisches Zentrum, München; ³profertilita, Regensburg, Deutschland

Fragestellung In 7 % der Trophektoderm-Biopsien ist entweder keine DNA nachweisbar oder das Ergebnis der humangenetischen Analyse ist nicht eindeutig interpretierbar [McArthur et al. 2005]. Paare haben dann die Wahl aus drei Möglichkeiten: 1. Transfer des ungetesteten Embryos, 2. Verwerfung des Embryos oder 3. die Re-Biopsie, eventuell mit nachfolgender erneuter Vitrifikation, nach der humangenetischen Befundung. Daraus stellt sich die Frage, ob Blastozysten nach wiederholter Trophektoderm-Biopsie und erneuter Vitrifikation ihr Implantationspotenzial erhalten und zur Geburt gesunder Kinder führen können.

Methodik Bei einer primiparen, 33-jährigen Anlageträgerin für Mukoviszidose wurden bei sieben Blastozysten eine Trophektoderm-Biopsie und eine Präimplantationsdiagnostik (PID) durchgeführt. Danach waren fünf Blastozysten auffällig und nicht transferierbar, bei zwei Blastozysten war keine DNA-Amplifikation möglich. Diese beiden Blastozysten wurden mit dem Einverständnis des Paares aufgetaut. Danach fand tagesgleich (Tag 5) erneut eine Trophektoderm-Biopsie statt. Die endgültige, humangenetische Befundung erfolgte am nächsten Tag: beide Blastozysten waren genetisch unauffällig für die familienspezifischen CFTR-Mutationen. Die Patientin wünschte den Transfer von nur einem Embryo. Dieser wurde im artifiziellen Zyklus durchgeführt. Die zweite Blastozyste wurde nach 26-stündiger Kultur erneut vitrifiziert.

Ergebnisse Der Transfer der ersten re-biopsierten Blastozyste führte zu einer biochemischen Schwangerschaft. Für den zweiten Transfer wurde die re-biopsierte und re-vitrifizierte Blastozyste erneut aufgetaut und ohne erkennbare morphologische Auffälligkeiten

im Spontanzyklus transferiert. Die Patientin wurde fortlaufend schwanger. In Schwangerschaftswoche 42 fand nach Sectio die Geburt einer gesunden Tochter statt (Geburtsgewicht 3590 g; Körperlänge 52 cm; Zustand unauffällig).

Schlussfolgerungen Dieses Fallbeispiel zeigt, dass die Re-Biopsie vitrifizierter und aufgetauter Blastozysten und deren erneute Vitrifikation das Implantationspotenzial der Embryonen erhält und zur Lebendgeburt gesunder Kinder führen kann. Andere Fallbeispiele zeigten, dass klinische Schwangerschaften oder Lebendgeburten erzielt werden können, wenn entweder der Zeitpunkt der erneuten Vitrifikation oder der Re-Biopsie mindestens zwei Kulturtage auseinander lagen [Wininger et al. 2011; Taylor et al. 2014].

Dies ist der erste Bericht einer gesunden Lebendgeburt nach einer primären Trophektodermbiopsie und Vitrifikation in Kombination mit einer Trophektoderm-Re-Biopsie und Re-Vitrifikation. Dieser Fall, zusammen mit oben genannten Publikationen, zeigt, dass die Trophektoderm-Re-Biopsie und Re-Vitrifikation im Blastozystenstadium eine wertvolle Alternative für die Verwerfung von Embryonen ist, bei denen das erste Ergebnis der Embryobiopsie zu keiner Empfehlung für einen Transfer führte.

P30

Präimplantationsdiagnostik: Methodische Optionen zur Trophektodermbiopsie und Array-CGH: Blastocoelflüssigkeit und Next-Generation-Sequencing

U. Köhler¹, K. Sendelbach¹, A. Baumgartner¹, A. Benet-Pages¹, B. Paulmann², B. Kwiatkowski², D. Seifert¹, C. Gaßner², B. Seifert², E. Holinski-Feder¹
¹MGZ – Medizinisch-Genetisches Zentrum, München;
²KITZ – KinderwunschTherapie im Zentrum, Regensburg, Deutschland

Fragestellung Trophektodermbiopsie differenzierter Blastozysten und Array-CGH-Analyse sind die Standardmethoden im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik (PID) für Chromosomenveränderungen. Beide Methoden haben wesentlich zur Verbesserung der diagnostischen Sicherheit einer PID beigetragen. Mittlerweile erkennen die meisten Zentren an, dass zur Untersuchung des Genoms eines Embryos die Blastomeren einer Morula nicht die geeigneten Zellen sind. Hingegen ist die Untersuchung von Polkörpern insbesondere für die Diagnostik maternal vererbter monogener Erkrankungen nach wie vor eine sehr gute Alternative zur PID aus Trophektodermzellen. Neben den embryonalen Trophoblastzellen und den Polkörpern kann die Blastocoelflüssigkeit, die sich während der Differenzierung der Blastozyste bildet und die im Rahmen der Vitrifikation der Blastozysten routinemäßig entnommen wird, ein geeignetes Material sein, das Genom eines Embryos zu untersuchen. D'Allessandro et al. [2012] und Palini et al. [2013] zeigten, dass die Blastocoelflüssigkeit DNA enthält,

die im Rahmen einer PID untersucht werden kann. Seitdem wurden weitere Arbeiten dazu veröffentlicht [Gianaroli et al. 2014, Tobler et al. 2015], die die Applikation des Blastocoels im Rahmen einer PID kontrovers diskutieren. Auch die Methoden im genetischen Labor von der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) über Microarray-basierte Techniken, quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR), dem Karyomapping (einer Einzel-nukleotidpolymorphismus- [SNP-] basierten Microarray-Plattform) bis zu neuen Sequenzierungstechniken (Next-Generation-Sequencing, NGS) sind im Wandel begriffen. Dieser Beitrag vergleicht die Ergebnisse der Präimplantationsdiagnostik mittels Array-CGH und NGS nach Trophektodermbiopsie und Blastocoelflüssigkeitpunktion.

Methodik Die Standardmethode zur Untersuchung von Aneuploidien und strukturellen Chromosomenveränderungen eines Embryos aufgrund einer beim Paar vorliegenden balancierten Chromosomenveränderung ist die Array-CGH (24sure+, Illumina) an Trophoblastzellen nach Trophektodermbiopsie (= Blastozystenbiopsie). Da im Präimplantationsdiagnostikgesetz ein Interpretationsspielraum besteht, wann embryonale Aneuploidien untersucht werden können, finden für diese Fragestellung auch Polkörper Verwendung. Auch aus der Blastocoelflüssigkeit kann nach „Whole Genome Amplification“ (WGA, SurePlex, Illumina) ausreichend DNA für eine genetische Diagnostik vervielfältigt werden. Für den vorliegenden Beitrag wurden Amplifikationsprodukte (SurePlex, Illumina) mittels Array-CGH und NGS (VeriSeq, Illumina) hinsichtlich numerischer und struktureller Chromosomenveränderungen sowie chromosomaler Mosaikie untersucht.

Ergebnisse Insgesamt wurden bis August 2015 50 amplifizierte DNA-Proben von Blastocoelflüssigkeiten mittels Array-CGH (24sure) und NGS (VeriSeq) untersucht (35 Proben mit Array-CGH, 12 mit NGS und drei mit Array-CGH und NGS). Mit NGS wurden bis zum August 2015 insgesamt 48 amplifizierte DNA-Proben untersucht, davon 28 Trophektodermproben, fünf Polkörperproben und 15 Blastocoelflüssigkeitproben. Ein Vergleich der Array-CGH-Ergebnisse mit den NGS-Ergebnissen erfolgte an 16 Trophektodermproben und fünf Polkörpern. Die Ergebnisse zeigen, dass NGS im Vergleich zur Array-CGH eine sensitivere Darstellung der chromosomalen Kopienzahl erlaubt, was besonders für die Beurteilung von chromosomalen Mosaiken von Bedeutung ist. Hingegen ist die Array-CGH für die Analyse kleiner struktureller Chromosomenveränderungen (< 5 Megabasen) dem NGS bisher überlegen.

Schlussfolgerung Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Blastocoel für eine genetische Diagnostik eine ausreichende DNA-Menge enthält. Inwieweit das Erbgut des Blastocoels das tatsächliche Erbgut des Embryos repräsentiert und ob es eine Alternative zur Trophektodermbiopsie im Rahmen einer PID darstellt, muss erst durch weitere Studien belegt werden.

P31

Zellfreie DNA in der Blastocoelflüssigkeit – Möglichkeiten einer ergänzenden Diagnostik

B. Kwiatkowski¹, B. Paulmann¹, D. Seifert¹, C. Gaßner¹, U. Köhler², A. Baumgartner², K. Sendelbach², E. Holinski-Feder², B. Seifert¹
¹KITZ – KinderwunschTherapie im Zentrum, Regensburg;
²MGZ – Medizinisch-Genetisches Zentrum, München, Deutschland

Fragestellung Eine Steigerung der Schwangerschaftsraten in der Reproduktionsmedizin wird weltweit durch Aneuploidiediagnostik angestrebt. Präimplantation Genetic Screening (PGS von Blastomeren oder Trophektodermzellen) ist mit Ausnahme der Polkörperdiagnostik (PKD) nach dem Präimplantationsdiagnostikgesetz (PID) in Deutschland verboten.

Zur Prophylaxe einer Überstimulation (überstimulationsfreie Praxis) werden vorübergehend Blastozysten eingefroren, denen zur Verhinderung einer Eiskristallbildung und damit besserer Ergebnisse vor der Vitrifikation die Blastocoelflüssigkeit (BCP) entfernt wird. Dieses „Abfallprodukt“ kann auf zellfreie DNA untersucht werden [1]. Eine PID-Gesetzeskollision ist ausgeschlossen, da es sich nicht um eine Untersuchung von Zellen eines Embryos handelt. Damit besteht neben morphokinetischen Parametern ein additives Kriterium zur retrospektiven Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit von Blastozysten.

Methodik Im Zeitraum von 08/2014–08/2015 wurden von 41 Patientinnen nach Aufklärung insgesamt 76 expandierte Blastozysten im Rahmen einer Validierungsstudie punktiert. Es wurde etwa 0,1 µl Blastocoelflüssigkeit über eine ICSI-Pipette gewonnen und sofort eingefroren. Die Aufbereitung erfolgte im MGZ durch vergleichende Genomhybridisierung (Array-CGH, 24sure+, Illumina) bzw. Next-Generation-Sequencing (NGS, VeriSeq, Illumina) nach Amplifikation (SurePlex, Illumina) zum Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenveränderungen sowie chromosomaler Mosaikie. Die Erfolgsrate der Amplifikation erhöhte sich mit steigender Lernkurve und beträgt aktuell 90 %.

Ergebnisse Das mittlere Alter der Studiengruppe von 41 Patientinnen einer IVF/ICSI-Behandlung betrug 32,4 Jahre. Der AMH-Wert von diesen Frauen ist im Durchschnitt mit 4,93 ng/ml ermittelt worden. Die Stimulation erfolgte in 11 Fällen nach dem langen Protokoll, bei 29 Frauen durch ein Antagonistenprotokoll sowie einmal im Rahmen einer ultralangen Downregulation. Die Ovulation wurde bei einem Estradiol-Wert von durchschnittlich 2875,7 pg/ml ausgelöst, pro Punktion wurden 16,4 Eizellen gewonnen. Es konnte eine fortbestehende Schwangerschaftsrate pro Single-Embryotransfer von 80,5 % erzielt werden. Blastozysten nach unauffälligem Ergebnis in der Array-CGH-Untersuchung führten nach Single-Embryotransfer ebenfalls in 80 % der Fälle zu fortbestehenden Einlingsschwangerschaften.

Schlussfolgerung Die Untersuchung von zellfreier DNA aus der Blastocoelflüssigkeit

von expandierten Blastozysten stellt wie die Untersuchung der Kulturflüssigkeit [Feichtinger, persönliche Mitteilung] durch die Anwendung moderner, molekulargenetischer Verfahren, vor allem durch NGS, eine mögliche Alternative zur PKD und Trophoblastbiopsie dar. Neben der Aneuploidiediagnostik könnte dieses Verfahren auch für PID-Fragestellungen genutzt werden.

Literatur:

1. Gianaroli L, et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril* 2014; 102: 1692–9.

P32

Single-cell Gene Expression Analysis reveals an Unprecedented Diversity among Human Spermatogonia

N. Neuhaus¹, J. Yoon², N. Terwort¹, S. Kliesch¹, J. Seggewiss³, A. Hüge⁴, R. Voss⁵, S. Schlatt¹, H. R. Schöler², R. V. Grindberg²

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital of Münster; ²Department of Cell and Developmental Biology, Max-Planck-Institute for Molecular Biomedicine, Münster; ³Institute for Human Genetics, University Hospital Münster; ⁴Core Facility Genomics, Medical Faculty of Münster; ⁵Interdisciplinary Centre for Clinical Research in the Faculty of Medicine, Münster, Germany

Introduction Spermatogonial stem cells (SSCs) can self-renew, as well as give rise to progenitor cells thereby maintaining spermatogenesis. These processes of cell proliferation and differentiation occur in the form of clonal divisions. Detailed analysis of these clones and individual spermatogonia in rodents has revealed an unexpected degree of heterogeneity [1, 2].

Aim The aim of this study was to compare the expression profiles of individual human spermatogonia arranged in clusters and to assess the potential of single-cell RNA-seq analysis for identifying novel SSC markers and the spermatogonial fingerprint.

Methods Human testicular biopsies with qualitatively normal spermatogenesis (n = 7) and spermatogonial arrest (n = 1) were selected. Short-term cultures of human spermatogonia were established following differential plating. On days 3–4, qPCR analyses of cell populations were performed in parallel with single-cell gene expression analysis following micromanipulation of spermatogonial clusters. Analyses were performed for eight target loci, including marker genes for undifferentiated (*OCT4*, *UTF1*, *MAGE A4*) and differentiating germ cells (*DDX4*, *BOLL*) as well as somatic marker genes (*ACTA2*, *VIM*). Additionally, two individual cells were selected for global transcriptional capture using shallow RNA-seq.

Results Morphological evaluation of cultures showed the presence of typical germ cell clusters in the supernatant cell fraction after short-term culture. Population analyses confirmed a significantly higher expression of the spermatogonial marker genes *UTF1*, *FGFR3* and *MAGE A4* in those cells located

in the supernatant fraction compared to the attached cells, demonstrating the successful enrichment of human spermatogonia. Single-cell PCR results were obtained from 20 individual cells from the patient tissue with spermatogonial arrest. Distinct expression profiles of somatic cells and spermatogonia were detected. Furthermore, 4 subpopulations of spermatogonia could be identified. From patients with qualitatively normal spermatogenesis, single-cell expression data from 13 spermatogonial clusters with 85 individual cells showed a heterogeneous expression pattern of undifferentiated (*UTF1* and *MAGE A4*) and differentiated marker genes (*BOLL* and *PRM2*) within each cluster. Finally, RNA-seq analysis of individual human spermatogonia was validated, as the reads mapped solely to exonic regions of the germ cell marker gene *DDX4*. Interestingly, validated results were also obtained for genes including *DDX5*, *TSPY1*, and *EEF1A1*, which have been detected in mouse spermatogonia.

Conclusion We conclude that single-cell expression analysis of human spermatogonia facilitates the identification of distinct spermatogonial subpopulations that were masked by traditional cell population analyses. Furthermore, combining this approach with single-cell RNA-sequencing presents a powerful tool for the identification of spermatogonial fingerprints in the future. Our data also strongly suggests that transcriptional heterogeneity among individual spermatogonia may be a hallmark of this cell population, making the identification of general markers unlikely.

References:

1. Suzuki H, et al. The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Dev Biol* 2009; 336: 222–31.
2. Hermann BP, et al. Transcriptional and translational heterogeneity among neonatal mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 2015; 92: 54.

■ Genetik 2

P33

Epigenetic Heterogeneity in Sperm of Infertile Men

S. Laurentino¹, B. Jasmin², V. Nordhoff¹, S. Kliesch¹, J. Wistuba¹, J. Borgmann¹, K. Buiting², B. Horsthemke², J. Gromoll¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Institute of Human Genetics, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany

Background Imprinted genes are expressed either from the maternal or the paternal allele due to parental-specific silencing by methylation at CpG sites. Paternally imprinted genes are typically methylated in sperm and unmethylated in the oocyte, being expressed from the maternal allele in the offspring. In contrast, maternally imprinted genes are expressed from the paternal allele due to being methylated in the oocyte and unmethylated in

sperm. This parental-specific methylation pattern is maintained in the somatic lineages of the offspring but requires erasure and reprogramming in the germline. Recent studies have associated aberrant methylation of imprinted genes in sperm DNA with abnormal sperm parameters, male infertility, and assisted reproductive techniques (ART) outcome. These studies did not account for possible epigenetic heterogeneity in sperm, therefore our aim was to investigate whether aberrant sperm DNA methylation levels in infertile males are caused by widespread errors affecting all sperm produced by an individual or by the concomitant existence of sperm populations with different methylation patterns within the ejaculate.

Materials and Methods Swim-up sperm was obtained from 45 men with normal (n = 19) and abnormal (n = 26) sperm parameters. DNA was isolated from either pools containing 10 spermatozoa or the whole swim-up fraction and treated with sodium bisulfite. DNA methylation of the imprinted gene *KCNQ1OT1* was measured in fractions of 10 spermatozoa using the pyrosequencing-based Oligo-Sperm Methylation Assay (OSMA). DNA methylation levels of maternally (*KCNQ1OT1* and *MEST*) and paternally (*H19* and *MEG3*) imprinted genes were measured using deep bisulfite sequencing (DBS), which allows analysis at single-sperm resolution.

Results Using OSMA, an increased variation in the DNA methylation values of the maternally methylated gene *KCNQ1OT1* was found in samples with abnormal sperm parameters (such as those with a combination of oligo-, terato- and asthenozoospermia) but not in normozoospermic samples. DBS showed that normozoospermic samples had a homogenous pattern of DNA methylation (*KCNQ1OT1*: 3.78 ± 5.29 ; *MEST*: 0.76 ± 0.27 ; *H19*: 93.40 ± 2.49 ; *MEG3*: 0.88 ± 0.19), while oligoasthenoteratozoospermic samples showed discrete populations of spermatozoa with either normal or abnormal methylated patterns, resulting in aberrant average methylation values (*KCNQ1OT1*: 29.38 ± 7.49 ; *MEST*: 26.18 ± 4.65 ; *H19*: 24.48 ± 6.71 ; *MEG3*: 69.50 ± 10.13). Moreover, aberrant methylation of *H19* appears to occur preferentially on the maternally inherited allele.

Conclusion The results presented herein demonstrate for the first time the existence of sperm populations with different imprinting status, ranging from normal to aberrant DNA methylation levels, coexisting in the semen of oligoasthenoteratozoospermic men, therefore providing an explanation for the findings of previous studies. These men produce portions of normally methylated sperm which, in the future, might be targeted and selectively used to improve ART outcome.

Funding: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG FOR1041/2) and Bundesministerium für Bildung und Forschung (Network Imprinting diseases, 01GM1114A).

P34

Mutations in WNT9B are associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome

S. Ledig¹, D. E. J. Waschk¹, A.-C. Tewes¹, T. Römer², J. Hücke³, K. Kapczuk⁴, C. Schippert⁵, P. Hillemann⁵, P. Wieacker

¹Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Münster; ²Klinik für Gynäkologie, Evangelisches Krankenhaus Köln Weyertal; ³Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Agaplesion Bethesda Krankenhaus Wuppertal, Germany; ⁴Division of Gynecology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland; ⁵Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Medizinische Hochschule Hannover, Germany

Background Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKHS), which is found in approximately 1 out of 4,500 women, is a complex malformation pattern of the Müllerian ducts (MDs) characterized by congenital absence of the uterus and vagina. Mutations in *LHX1*, *TBX6* and *WNT4* have been reported in a minority of patients with MRKHS. However, most cases still remain unexplained at a molecular level. Since female *Wnt9b*^{-/-} mice show a MRKHS-like phenotype, *WNT9B* has emerged as a promising candidate gene for this disease.

Patients and Methods We performed retrospective sequence analyses of *WNT9B* in 226 female patients with disorders of the MDs including 109 patients with MRKHS, as well as in 135 female controls. 14 patients with signs of hyperandrogenism were additionally screened for *WNT4* mutations.

Results One nonsense mutation and five likely pathogenic missense mutations were detected in *WNT9B*. Five of these mutations were found in cases with MRKHS accounting for 4.6% of the patients with this phenotype. No pathogenic mutations were detected in the control group ($p = 0.017$). Interestingly, all of the MRKHS patients with a *WNT9B* mutation were classified as MRKHS type 1, representing 8.5% of the cases from this subgroup. No mutation in *WNT4* was detected. In previous studies, two of the patients with a *WNT9B* mutation were found to carry either an additional deletion of *LHX1* or a missense mutation in *TBX6*.

Conclusions Mutations in *WNT9B* were frequently associated with MRKHS in our cohort. Some of the cases with MDs anomalies may be explained by a digenic disease-model.

P35

CAG-repeat Length is not Associated with Heterogeneous Suppression of Spermatogenesis in Testes from Patients with Sex Reassignment Therapy

A. Merklingshaus¹, N. Neuhaus¹, F. Schneider¹, J. Wistuba¹, J. Gromoll¹, M. Zitzmann¹, J. Heß², S. Furchert³, H. van Ahlen⁴, S. Kliesch¹, S. Schlatt¹
¹Center of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Department of Urology, University Hospital Essen; ³Department of Urology, Asklepios Westklinikum Hamburg; ⁴Department of Urology, Klinikum Osnabrück, Germany

Introduction The CAG repeat polymorphism (CAG[n]) of the androgen receptor (AR) is linked to androgen sensitivity. Infertile patients show higher repeat numbers in the AR. The AR polymorphism was also discussed as a possible biological cause of gender dysphoria. Specifically, an effect of reduced androgen sensitivity due to higher CAG(n) in brain development was suggested. However, no association was found in comprehensive studies [1].

In patients suffering from gender dysphoria, cross-sex hormone therapy is performed to achieve a match between the gender identification and physical appearance. Patients are under hormonal treatment for at least 6 months before sex reassignment surgery. Male-To-Female (MtF) patients receive estrogens and in most cases antiandrogens like cyproterone acetate, both medicaments should heavily impair spermatogenesis in the testis. However, we found in a previous study that at least 24% of patients have tubules with elongated spermatids. Potential reasons for this can be an insensitivity of the testis to the hormonal treatment.

Aim We aimed at evaluation of the CAG repeat lengths in patients with gender dysphoria and compared it to the status of spermatogenesis on the day of sex reassignment surgery.

Methods Following informed consent we received testis and in most cases blood samples from 158 patients undergoing sex reassignment surgery from our collaborating clinics in Essen, Hamburg and Osnabrück. In 105 available blood samples, the DNA was isolated from blood, amplified by PCR and fragment length analysis was performed. Corresponding testicular tissues of all patients were assessed following PAS-staining by evaluating 100 tubules for the most advanced germ cell. Finally, blood hormone levels for FSH, LH, estradiol, prolactin and SHBG were measured by immunofluorometric assays and an ELISA for testosterone, respectively.

Data from [2] with CAG repeat lengths from 111 healthy males were used as controls. Statistics were performed using SPSS 22.

Results Histological evaluation revealed that 24% of the 105 patients with complete spermatogenesis, 25% with meiotic arrest, 36% with spermatogonial arrest, 14% with Sertoli cell only tubules and 1 patient with tu-

bular ghosts. These proportions are in accordance with former results published from this patient group. Testis histology correlated with testosterone and LH ($p < 0.01$ and $p < 0.05$), but not with FSH ($p = 0.094$).

No differences in CAG(n) were observed between patients (mean 21.84, sd 3.095) and male controls (mean 21.61, sd 3.134, U-test $p = 0.446$). In gender dysphoria patients, the status of spermatogenesis was not associated with the CAG repeat length (Kruskal-Wallis-test $p = 0.463$). However, hormone analysis revealed a negative correlation between FSH and CAG(n) (Spearman's rho -0.271 , $p < 0.01$), but not in the other hormones.

Conclusion Androgen sensitivity mediated through CAG polymorphism of the AR cannot explain the heterogeneous histological results in testis from MtF transsexuals undergoing hormone replacement therapy.

The correlation between FSH levels and CAG(n) should be further investigated as possible differences in the feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in hormonal treated men from untreated men. As FSH did not properly reflect the stage of spermatogenesis, other markers reflecting spermatogenesis and Sertoli cell functions like InhibinB will be evaluated in the future.

References:

1. Fernández R, et al. Association Study of ERbeta, AR, and CYP19A1 Genes and MtF Transsexualism. *J Sex Med* 2014; 11: 2986–94.
2. Zitzmann M, et al. The CAG Repeat Polymorphism in the AR Gene Affects High Density Lipoprotein Cholesterol and Arterial Vasoreactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4867–73.

Acknowledgement: A. Merklingshaus was supported by a grant of the MedK, the doctoral programme of the Faculty of Medicine, University of Münster.

P36

Bisection of Two-Cell Mouse Embryos followed by Minimal Apoptosis provides an Experimental Model System for Developmental Twinning

K. Schulte¹, E. Casser², S. Schlatt¹, J. Ehmecke³, M. Boiani², V. Nordhoff¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital of Münster; ²Max-Planck-Institute for Molecular Biomedicine, Münster; ³Central Animal Facility of the Medical Faculty, University of Münster, Germany

Introduction Embryo twinning is a common feature in human reproduction. Twinning can occur at different time points during pre- and postimplantation development. The earliest time point is the first mitotic division after fertilization which leads to the formation of a 2-cell embryo. While both cells are still considered totipotent at this stage, full development after experimental bisection was restricted with high pre- and postimplantation losses. We hypothesize that the totipotency of the sister blastomeres may be constrained by apoptosis, whether physiological or induced

by the experimental method. As experiments on this topic are restricted in humans, we aimed at 1) developing an efficient method to produce twins from bisected 2-cell stages in mice, 2) to culture the isolated twin cells to blastocysts and 3) to identify if apoptotic events may play a role in final cell numbers.

Material and Methods Mouse embryos were produced according to the paradigm of in-vivo-fertilization, flushing of zygotes from oviducts, and *in-vitro*-culture in KSOM(aa) medium, using gametes from B6C3F1 females and CD-1 males. Within 12 hours of the first mitotic (1-cell to 2-cell) division, the sister blastomeres were mechanically extracted from the zona pellucida using a 20 µm beveled pipette. Both zona-free twin cells and unseparated controls were cultured individually. Blastocysts were fixed and stained via immunofluorescence to detect cleaved caspase-3. Total cell numbers as well as cells positive for cleaved caspase-3 were counted. Statistical analysis (t-test) was performed using GraphPad Prism and JMP software.

Results After bisection, the naked blastomeres showed recovery of roundness and circularity, whereas the empty zonae were still not round after several hours at the end of the experimental day ($p = 0.004$). Following the literature, we initially used Ca-Mg-free PBS as a micromanipulation medium. We were able to recover two intact blastomeres in each of 169 (60 %) of the cases from 282 manipulated 2-cell embryos. However, we found that a 0.9 % sodium chloride solution (supplemented with 0.5 % w/v albumin, 0.2 mM glucose, 0.2 mM sodium pyruvate and 10 mM calcium lactate) is superior to Ca-Mg-free PBS, and also for subsequent viability. The survival rate after bisection currently exceeds 90 % (both blastomeres alive), and > 80 % of the twin pairs develop to the blastocyst stage. Twin and co-twin blastocysts did not differ from each other in total cell number ($p = 0.61$, $n = 10$), which was the half compared to unmanipulated embryos (23.5 ± 4.6 and 43.1 ± 9.3 , heteroscedastic t-test, $p = 0.002$) as one would expect. Twin and co-twin blastocysts had the same prevalence of apoptotic cells as unmanipulated counterparts, as measured by caspase-3 immunostaining. On average, twin blastocysts and control blastocysts contained 4.14 ± 4.0 % ($n = 15$) and 3.23 ± 4.44 % ($n = 8$; $p = 0.62$) caspase-3 positive cells, respectively.

Discussion and Conclusion The efficient generation of mouse twin embryos via embryo bisection at the two-cell stage is reported here as being a robust method. Both twin blastomeres can be cultured to outwardly normal albeit cell number-reduced blastocysts, which is due to the volume reduction after separation. Apoptosis plays no major role in cell number reduction as it is not more frequent in comparison to control blastocyst. With the fulfilled premise of a robust method for experimental twinning, further studies can now be designed to study epigenetic phenomena in twins, using the mouse model of human reproduction.

Funding: This work was supported by Innovative Medizinische Forschung NO 111212.

P37

Mutationsanalysen im *TBX6*-Gen bei Patientinnen mit Störungen der Müller'schen Gänge

A.-C. Tewes¹, K. K. Rall², T. Römer³, J. Huckle⁴, K. Kapczuk⁵, S. Brucker², P. Wieacker¹, S. Ledig¹
¹Institut für Humangenetik, Münster; ²Universitäts-Frauenklinik, Tübingen; ³Klinik für Gynäkologie, Köln Weytal; ⁴Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Wuppertal, Deutschland; ⁵Klinik für Perinatalogie und Gynäkologie, Poznan, Polen

Einleitung Störungen der Müller'schen Gänge umfassen das sogenannte Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser- (MRKH-) Syndrom (kongenitale Agenesie des Uterus und des kranialen Vaginalabschnitts) sowie Fusionsanomalien. Das MRKH-Syndrom tritt mit einer Inzidenz von 1 auf 4500 Lebendgeburten auf. Die genomweite Analyse von MRKH-Patientinnen zeigt, dass bei ca. 1 % der Patientinnen ein Verlust in der Region 16p11.2 nachzuweisen ist. In diesem Abschnitt sind 26 Gene lokalisiert, unter anderem das T-box Gen *TBX6* (OMIM 602427). Sequenzveränderungen im *TBX6*-Gen sind in der chinesischen Han-Population mit kongenitaler Skoliose sowie mit spondylokokostaler Dysostose assoziiert. Das Maus-Modell *Tbx6^{rv}* (rib-vertebrae), in welchem die *TBX6*-Expression hinunterreguliert ist, zeigt einen hypomorphen Phänotyp mit einer unilateralen Agenesie der Nieren und einer verminderten weiblichen Fertilität. Die Kombination der Phänotypen erinnert an das so genannte MURCS (Müllerian Duct Aplasia, Unilateral Renal Agenesis, and Cervicothoracic Somite Anomalies) beim Menschen.

Methoden Sequenzanalysen bei einem Kollektiv von 167 Patientinnen (116 Patientinnen mit MRKH Syndrom und 51 Patientinnen mit anderen Anomalien der Müller'schen Gänge). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mithilfe des Programms CodonCode®. Detektierte genetische Veränderungen wurden mit dem Programm Alamut® analysiert und auf ihr Risikopotenzial hin überprüft.

Ergebnisse Bei sechs der 167 untersuchten Patientinnen (~ 4%) wurden zwei Sequenzveränderungen im *TBX6*-Gen nachgewiesen, welche zu einem Aminosäureaustausch führen und nach der Software PolyPhen-2 als pathogen einzustufen sind (Score > 0,9). Bei den nachgewiesenen Sequenzvarianten handelt es sich in beiden Fällen um missense Mutationen, wobei eine in der dbSNP-Datenbank für polymorphe Veränderungen gelistet ist, jedoch mit einem MAF-Wert von 0,006. Eine Mutation befindet sich innerhalb der T-Box-DNA-Domäne des Proteins.

Schlussfolgerung In dieser Studie wurde bei ~ 4 % der untersuchten Patientinnen mit Anomalien der Müller'schen Gänge eine Mutation im *TBX6*-Gen nachgewiesen, welche als krankheitsrelevant eingestuft werden kann. Mutationen im *TBX6*-Gen können daher mit Störungen der Müller'schen Gänge assoziiert werden.

P38

Korrelation der MARCH- und HLA-Genexpression in der Plazenta

F. Würfel, P. A. Fasching, R. Strick, M. W. Beckmann, M. Ruebner
 Frauenklinik, Universitätsklinikum Erlangen, Deutschland

Einleitung/Ziel Das Expressionsmuster der fetalen und adulten humanen Leukozyten-Antigen- (HLA-) Gruppen ist entscheidend für den erfolgreichen Verlauf der Schwangerschaft. An der Expression der Major Histocompatibility Complex- (MHC-) Moleküle sind u. a. die Membran-assoziierten RING-CH- (MARCH-) Proteine beteiligt. Die MARCH-Proteine sind intrazelluläre E3-Ubiquitin-Ligasen, welche durch Ubiquitinierung den Abbau von MHC-Molekülen und anderen Glykoproteinen steuern. Bislang sind 11 MARCH-Proteine bekannt, welche unterschiedliche Zielproteine aufweisen. MARCH4 und MARCH9 sind z. B. für die lysosomale Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen, der adulten (HLA-A, -B und -C) verantwortlich, wohingegen MARCH1 und MARCH8 die MHC-Klasse-II-Moleküle HLA-DRA und HLA-DRB ubiquitinieren können. Die MARCH-Gene können damit den immunmodulatorischen Mechanismus in der Schwangerschaft durch die Expression der HLA-Gruppen regulieren und beeinflussen.

Fragestellung Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der MARCH-Proteine im Zusammenhang mit der Expression der klassischen (A, B und C) und fetalen (E, F und G) HLA-Gruppen in der Plazenta zu untersuchen. Der Vergleich der Expression der plazentaren MARCH- und HLA-Expression soll einen Aufschluss über die Rolle der MARCH-Gene in der Plazenta und deren Einfluss auf die Expression der fetalen HLA-Gruppen geben. Dadurch sollen Rückschlüsse auf deren immunmodulatorische Rolle während der Schwangerschaft gezogen werden.

Methode RNA wurde aus fünf humanen Kontrollplazenten isoliert. Mittels cDNA-Synthese und anschließender Sybr-Green-basierter Real-Time-PCR wurde die RNA-Expression der adulten HLA-Gruppen (A, B, C), der fetalen HLA-Gruppen (E, F, G), der HLA-Gruppen Klasse II (DRA, DRB) und der MARCH-Gene (1, 2, 4, 6, 8, 9) untersucht. Die Analyse der Proteinexpression der HLA-Gruppen in der Plazenta erfolgte mittels Immunhistochemie auf FFPE-Schnitten.

Ergebnisse In der Plazenta zeigte HLA-C im Vergleich zu HLA-B eine erhöhte Expression von HLA-C (1,9-fach), HLA-E (1,3-fach) und HLA-G (1,5-fach). Eine verringerte Expression zu HLA-B zeigte HLA-F (0,4-fach). In der Pearsonanalyse zeigte HLA-E eine positive Korrelation mit MARCH1 ($p = 0,09$), MARCH2 ($p = 0,001$) und MARCH9 ($p = 0,019$). HLA-F zeigte eine negative Korrelation mit MARCH 8 ($p = 0,033$) und eine positive Korrelation mit MARCH1 ($p = 0,027$), MARCH2 ($p = 0,002$) und MARCH9 ($p = 0,006$). HLA-C zeigte eine positive Korrelation mit MARCH6 ($p = 0,041$). In der immunhistologischen Färbung zeigten die HLA-

Gruppen C und G eine starke und HLA-E eine schwache Proteinexpression in den extravillösen Trophoblasten (EVT). HLA-F war in den Syncytiotrophoblasten stark exprimiert. MARCH9 zeigte in der Immunhistologie eine erhöhte Anfärbung in den EVTs und SCTs. MARCH1 hingegen nur in den EVTs.

Schlussfolgerung Die u. a. signifikante Korrelation der RNA- und Proteinexpression der klassischen und nicht-klassischen HLA-Gruppen mit den March-Genen zeigt den Einfluss der MARCH-Gene in der Immunmodulation. Durch Regulierung der Proteinexpression der fetalen HLA-Gruppen nehmen die MARCH-Gene einen indirekten Einfluss auf die Immunmodulation während der Schwangerschaft. Dies spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Proteinexpression der MARCH-Gene in der Plazenta wieder. Besonders MARCH9 nimmt Einfluss auf die Expression von HLA-F und E. HLA-G und HLA-C werden vermutlich hauptsächlich über MARCH4 reguliert. Dies wird auch durch die unterschiedliche HLA-Proteinexpression in der Plazenta bestätigt.

■ Infertilität

P39

Cannabinoid-Rezeptor-1 wird unabhängig von Entzündungen des Urogenitaltraktes konstitutiv auf humanen Spermatozoen exprimiert

P. Laghai, I. Oltermann, G. Haidl, J.-P. Allam
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Universität Bonn, Deutschland

Hintergrund Cannabinoid-Rezeptoren (CB) wurden auf einer Vielzahl von Zellen nachgewiesen. Dabei wurden bisher zwei verschiedene Rezeptoren beschrieben, den auf Nervenzellen nachgewiesenen CB1-Rezeptor und den auf Immunzellen nachgewiesenen CB2-Rezeptor. CB spielen bei Entzündungsreaktionen eine Rolle, die wiederum im männlichen Urogenitaltrakt in Zusammenhang mit Subfertilität bzw. Infertilität gebracht werden. Über Expression von CB auf Spermatozoen (SP) ist wenig bekannt. Folglich war das Ziel der Untersuchung, ob und welche CB auf SP exprimiert sind und darüber hinaus, ob es eine Variabilität der Expression von Cannabinoid-Rezeptoren nach Entzündungsvorgängen gibt.

Material/Methodik Durchflusszytometrische Untersuchung der SP aus dem Ejakulat von 50 Patienten mit Subfertilität, der andrologischen Sprechstunde, auf Expression von CB1/CB2. Untersuchung auf Entzündungsfaktoren wie Interleukin 6 (IL-6) / Peroxidase und Motilität/Morphologie, sowie Faktoren wie sexuelle Karenz und Alter der Patienten. Korrelation der verschiedenen Ergebnisse miteinander.

Ergebnis Es zeigt sich ein deutlicher Nachweis von Cannabinoid-Rezeptor CB1 von im Durchschnitt $63,92\% \pm SD 10,72$. Die Streubreite beträgt dabei 49 % bei einem Minimum von 36 % und einem Maximum von 85 %.

Es zeigt sich demnach eine unterschiedliche Expression von CB1-Rezeptoren. Dennoch gibt es keine Korrelation zwischen der Expression an CB1-Rezeptoren und der Ausprägung der Entzündungsfaktoren bzw. Morphologie/Motilität oder aber dem Alter/der sexuellen Karenz. CB2 konnte im Gegensatz zu CB1-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden.

Konklusion Die CB1-Expression scheint konstitutiv, obwohl sich ein deutlicher individueller Unterschied in der Menge der exprimierten CB-1-Rezeptoren findet. Da dieser Unterschied jedoch nicht auf Entzündungen oder aber Alter/Abstinenz bzw. Morphologie/Motilität zurückzuführen ist, müssen weitere Untersuchungen folgen, welche die genaue Ursache und Funktion der unterschiedlichen CB1-Rezeptor-Ausprägung auf den Spermien subfertiler Männer erklärt.

P40

Normalisierung der Schwangerschaftsrate durch Einsatz von Kalzium-Ionophor bei befruchtungsunfähigen Spermien

B. Linek¹, V. Holze¹, M. Schaffrath¹, K. Bockmeyer¹, R. Gomez², G. Hoffmann², R. Seufert¹
¹Abteilung für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin; ²Frauenklinik, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland

Bei ca. 33 % aller Patienten, die sich einer kontrollierten FSH-Stimulation mit anschließender Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) unterziehen, liegt die Befruchtungsrate bei < 50 %. Bei ca. 10 % liegt die Befruchtungsrate sogar < 30 %. Dies minimiert die Erfolgchancen dieser Patienten um ein Vielfaches. Das Fehlen der Phospholipase C ζ (PLC ζ) ist eine mögliche Ursache für derartige Befruchtungsversager. 2009 haben Heytens et al. gezeigt, dass Männer, deren Spermien eine niedrige Fertilisationsrate haben, keine aktive PLC ζ besitzen [Heytens, 2009]. Unter physiologischen Bedingungen dringt die PLC ζ im Spermienkopf in die Eizelle ein und hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ bindet anschließend am endoplasmatischen Retikulum und bewirkt ein Entleeren der Kalzium-Speicher und einen damit verbundenen Kalzium-Einstrom in das Zytoplasma, wodurch die Eizelle aktiviert wird und die Befruchtungskaskade startet. Ohne die PLC ζ bleibt der Kalzium-Einstrom aus und die Eizelle wird trotz eingedringenem Spermium nicht befruchtet und stirbt ab. Seitdem wurde versucht, diesen Defekt zu umgehen und die Eizelle auf anderem Wege zu aktivieren. So wurden z. B. spezielle Techniken bei der ICSI sowie eine Elektrostimulation ausprobiert. Des Weiteren wurden verschiedene chemikalische Reagenzien zur Eizellaktivierung untersucht. Dabei hat sich unter anderem Calcimycin (A23187) als effektiv erwiesen und wird seit 2011 als Ready-to-use-Präparat angeboten. Die Eizellen müssen dabei nach der ICSI für 15 Minuten im

gebrauchsfertigen Medium mit Kalzium-Ionophor inkubiert werden. Das weitere Prozedere erfolgt wie bei einer herkömmlichen ICSI.

Untersucht wurden die Fertilisations- und Schwangerschaftsraten von Patientinnen, die sich im Zeitraum von Januar 2013 bis Dezember 2014 einer ICSI-Behandlung mit anschließender Kalzium-Ionophor-Inkubation unterzogen. Die 54 Behandlungen mit Kalzium-Ionophor (A23187) wurden mit den jeweiligen vorherigen Versuchen ohne Kalzium-Ionophor gegenübergestellt.

Durch den Einsatz von Kalzium-Ionophor konnte die Fertilisationsrate in den meisten Fällen deutlich gesteigert werden und wurde teilweise sogar verdoppelt. Der positive Effekt vom Kalzium-Ionophor ist vor allem sichtbar, wenn die Befruchtungsrate beim vorherigen Versuch < 50 % lag. Jedoch konnte die Befruchtungsrate nicht immer durch den Einsatz vom Kalzium-Ionophor gesteigert werden. Eventuell liegt bei diesen Patientenpaaren kein Defizit an PLC ζ vor. Im Mittel konnte die Befruchtungsrate von 27,7 % auf 56,1 % nahezu verdoppelt werden. Der Unterschied in der Schwangerschaftsrate ist sogar noch deutlicher. Die Schwangerschaftsrate hat sich von 10,5 % auf 35,9 % gesteigert und damit den Wert von Versuchen mit normalen Befruchtungsraten erreicht. Somit wird durch den Einsatz vom Kalzium-Ionophor der PLC ζ -Defekt umgangen, wodurch sich die Erfolgchancen normalisieren. Dies sieht man ebenfalls bei der Abortrate. Bei den Versuchen ohne Kalzium-Ionophor haben wir eine Abortrate von 33 % gefunden, während mit Kalzium-Ionophor die Abortrate auf 17,5 % gesenkt werden konnte.

Durch den Einsatz von Kalzium-Ionophor kann die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate deutlich gesteigert werden. Das betrifft mitunter auch Fälle, in denen die Spermien morphologisch völlig unauffällig sind, sodass man nicht auf eine männlich bedingte Infertilität schließen würde. Wie so häufig kommt es jedoch auf die „inneren Werte“ an. Das Fehlen von PLC ζ im Spermium kann durch den Einsatz von Kalzium-Ionophor behoben werden, weshalb der Einsatz von Kalzium-Ionophor eine effektive Behandlungsoption bei Patientenpaaren mit schlechter Befruchtungsrate darstellt. Neue Erkenntnisse zeigen auch, dass bei eingeschränkter Entwicklung der Embryonen der Einsatz von Kalzium-Ionophor die Erfolgsraten steigern kann [Ebner, 2015].

P41

Cryopreservation of Ovarian Tissue – what do Patients with Hematologic and Ovarian Diseases think about it?

L. Lotz, S. Findeklee, I. Hoffmann, M. W. Beckmann, R. Dittich
Frauenklinik Erlangen, Germany

Introduction Cryopreservation and retransplantation of ovarian tissue has been successfully applied in the clinical setting with over

40 live births thus far. However cryopreservation of ovarian tissue from women with cancer involves a risk that malignant cell clones may be cryopreserved at the same time, potentially inducing a relapse following retransplantation. In patients with leukemia or ovarian tumors, the risk of reintroducing malignant appears to be high. The added value of cryopreserved ovarian tissue in these patients to reproductive outcomes is rare, as there is a lack of follow-up. Therefore the aim of the present study was by doing a survey of our patients, who have ovarian tissue cryopreserved in our department, to obtain the reasons why the patients have opted for a fertility preservation, to get information on current fertility, pregnancy attempts and outcomes, and intended plans for the cryopreserved ovarian tissue. Analysis of clinical outcomes of such patients are essential to identify patients, who would benefit most from the procedure and to improve the technique and its efficacy.

Materials For the group of patients examined, the database of the University Hospital Erlangen was used. Here, all patients are listed since 1998, who have ovarian tissue harvested and frozen for fertility preservation. Medical data on the indication for cryopreservation of ovarian tissue were extracted from medical files. A questionnaire was developed to ask especially the situation in life of the patients prior to removal of the ovarian tissue as well as currently.

Results 78 women participating in the survey (average age 29.5 ± 6.5 ; $n = 60$ hematologic diseases; $n = 18$ ovarian tumors). Ovarian tissue harvesting was uneventful in any cases. None ovarian tissue showed residual malignant disease by microscopic evaluation. 54 patients reported a regular menstrual cycle (21 of them took oral contraceptives), while 24 were amenorrhoea. 30 women had tried to conceive and 18 were able to report from the onset of pregnancy. 14 delivered healthy children by conceiving naturally and 4 had conceived with assisted reproduction (3× egg donation, 1× ovarian tissue autotransplantation). Two patients had their ovarian tissue be retransplanted. No women repent their choice for ovarian tissue cryopreservation.

Conclusion To preserve fertility in young patients facing gonadotoxic therapies, cryopreservation of ovarian tissue is a safe and efficient option. Although in this study many patients retained ovarian function, none of them repent their choice for cryopreservation of ovarian tissue. Furthermore women affected by these indications are aware of this risk of malignant cell contamination and have to be looking for other options, such as egg donation, at the moment; but in the near future alternatives, such as *in vitro* maturation systems or transplantation of isolated follicles will be able to be used for their cryopreserved tissue to achieve pregnancy.

P42

Nicht-obstruktive Azoospermie – Kann eine erfolgreiche Spermien-Gewinnung vorhergesagt werden?

A. Pilatz¹, J. Wolf¹, T. Diemer¹, M. Bergmann², A. Meinhardt³, H.-C. Schuppe¹, W. Weidner¹

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen; ²Institut für Veterinär Anatomie, -Histologie und -Embryologie; ³Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland

Fragestellung Während bei obstruktiver Azoospermie eine erfolgreiche Spermienengewinnung in > 90 % der Fälle gelingt, beträgt die Erfolgsrate bei primär testikulär bedingter Azoospermie nur 50–60 %. Studien zur konventionellen Hodenbiopsie/TESE bei nicht-obstruktiver Azoospermie zeigen, dass nicht-invasive klinische Parameter keine verlässliche Prognose erlauben. Wir haben daher die Ergebnisse der multi-fokal, mikroskopisch gestützten Hodenbiopsie (TESE/M-TESE) ausgewertet.

Methoden Bis 2014 wurde bei 176 Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie eine kombinierte trifokale Hodenbiopsie und Mikrodissektion (M-TESE) durchgeführt. Als prädiktive Marker für den Nachweis elongierter Spermatozoen im Gewebe wurden evaluiert: Alter, Hodenvolumen, FSH, LH, Testosteron, Ejakulatvolumen und α -Glukosidase im Ejakulat. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, ROC-Analyse sowie binär logistischer Regression.

Ergebnisse Bei 91 Patienten (52 %) wurden elongierte Spermatozoen („test. Spermien“) in mindestens einer Hodenlokalisation gefunden. Signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit positivem und negativem Sperm Retrieval ergaben sich bezüglich FSH (18 vs. 21 mU/ml), LH (6 vs. 7 mU/ml) und Patiententalter (36 vs. 34 Jahre) (stets $p < 0,05$). In der multivariaten Analyse ($n = 111$) waren diese drei Parameter ebenfalls signifikant mit dem Erfolg assoziiert (stets $p < 0,05$). In der ROC-Analyse wies jedoch keiner der sieben untersuchten Parameter eine AUC > 0,75 auf.

Schlussfolgerungen Die dargestellte Assoziation klinischer Parameter, insbesondere des FSH, mit dem Spermatozoen-Nachweis im Gewebe bei testikulär bedingter Azoospermie kann auch bei M-TESE nicht herangezogen werden, um einen Erfolg mit ausreichend hoher Wahrscheinlichkeit vorausszusagen.

P43

Nachweis von sexuell übertragbaren Erregern im Ejakulat – ein Fertilitätsrisiko?

A.-M. Falke¹, H. Hossain², T. Diemer¹, F. Wagenlehner¹, W. Weidner¹, A. Pilatz¹, H.-C. Schuppe¹

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie; ²Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen, Deutschland

Fragestellung Sexuell übertragbare Infektionen (STI) werden weltweit zu den Ursachen

männlicher Fertilitätsstörungen gerechnet. Der klinische Stellenwert eines positiven Erregernachweises im Ejakulat wird jedoch kontrovers beurteilt. Anhand eines großen Patientenkollektivs wurde deshalb der Einfluss von STI auf das Ejakulat untersucht.

Methoden Aus dem Zeitraum 06/2011 bis 06/2014 standen Ejakulatbefunde (Spermogramm nach WHO 2010 mitsamt Entzündungsdiagnostik und Biochemie) von 2080 Patienten mit einem medianen Alter von 37 Jahren zur Verfügung, bei denen eine PCR-Analyse auf klassische STI im Ejakulat vorlag. Bei 46 Patienten mit positivem STI-Befund erfolgte nach antibiotischer Paartherapie im Median nach acht Wochen eine Ejakulatkontrolle.

Ergebnisse In 135 Fällen (6,5 %) fand sich ein positiver Befund im STI-Panel (102× *Ureaplasma urealyticum*, 19× *Mycoplasma spp.*, 7× *Neisseria gonorrhoeae*, 7× *Chlamydia trachomatis*). Das Vorhandensein einer STI war signifikant negativ mit der Spermienkonzentration ($p < 0,01$) assoziiert, jedoch nicht mit anderen Spermien-, Entzündungs- (Leukozyten, Elastase) oder Sekretionsparametern (Fructose, α -Glukosidase). Der Follow-up zeigte in 44/46 Fällen (95 %) eine erfolgreiche Eradikation der STI. Jedoch konnte keine statistisch signifikante Verbesserung der Ejakulatqualität nach antibiotischer Behandlung gezeigt werden.

Schlussfolgerung Der negative Einfluss von STI auf die Spermienkonzentration und damit die Fertilität belegt die klinische Relevanz dieser Erreger. Überraschend ist, dass die antimikrobielle Therapie kurzfristig nicht zu einer Verbesserung der Ejakulatqualität führt.

P44

Adipocytokines prevent Pubertal maturation of Human Sertoli cells

I. V. Wagner¹, P. Yang², N. D. Tran², K. Svehnickov¹, O. Söder¹

¹Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; ²Center for Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, United States

Background and Aim Obesity is one of the most important health challenges worldwide and is becoming more prevalent also in adolescents and children. Metabolic syndrome related co-morbidities are increasingly recognized in children, predisposing them to early cardiovascular disease. Reproduction is an important target of obesity complications, including adverse effects on spermatogenesis and steroidogenesis. Adipocytokines secreted from adipose tissue are key factors in various complications of obesity. The aim of the present work was to study the potential of selected adipocytokines to affect Sertoli cell function and possibly link these findings to the observed attenuation of spermatogenesis in obese males.

Material and Methods Testicular biopsies were obtained from healthy middle-aged donors during elective surgery (e.g. hydroceles,

hernia repair). Highly purified adult human Sertoli cells (HSCs) were isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using CD-90 as a sorting marker. Cells were cultured and exposed to various concentrations (10–1000 ng/ml) of 10 different adipocytokines, including Adiponektin, Leptin, AFABP, TNF α , Namp1, Resistin, Progranulin, Irisin, Chemerin and Omentin for two to seven days. Gene expression of the following Sertoli cell genes: GDNF, SHBG, FSHR, BMP-4, LIF and FGF-2 was quantified with qPCR.

Results Exposure to lower concentrations (10–100 ng/ml) of adipocytokines for 48h did not significantly affect the expression of Sertoli cell-specific genes. In contrast, exposure to higher doses of chemerin, progranulin, irisin, Namp1, AFABP, adiponectin, TNF α and leptin for 48h as found in obesity increased FSHR expression. CYP26A1 expression in HSCs was downregulated after exposure to irisin, Namp1 and TNF α . Long term treatment for 7 days of HSCs with higher doses of chemerin, irisin, adiponectin, Namp1, resistin and progranulin significantly suppressed FSHR expression (by 79, 83, 30, 64, 71 and 26%, respectively) as found in the prepubertal state. Further, those adipocytokines significantly attenuated the expression of BMP-4, GDNF, LIF and FGF-2 by HSCs. In contrast, Namp1, irisin, chemerin, resistin and progranulin significantly upregulated CYP26A1 expression (by 126, 90, 48, 126 and 153%, respectively) and reset the Sertoli cells to the prepubertal phase.

Conclusion We propose that adipocytokines at high concentrations, which are often observed in obese children, might lead to a maturation stop of Sertoli cells during the important phase of puberty and keep Sertoli cells in a prepubertal quiescent phase. This could negatively affect spermatogenesis and may lead to severe fertility problems during adulthood.

■ Fertilitätschirurgie & Male Clinical

P45

Operative Komplikationen und Ergebnisse bei der laparoskopischen Entnahme und Transplantation von Ovargewebe: Eigene Erfahrungen im Vergleich mit der Literatur

*S. Findeklee, L. Lotz, I. Hoffmann, R. Dittrich, M. W. Beckmann
Frauenklinik, Universitätsklinikum Erlangen, Deutschland*

Fragestellung Fertilitäts Erhaltende Maßnahmen im Rahmen der onkologischen Therapie erhalten eine zunehmende Bedeutung. Das Langzeitüberleben bei Krebs hat sich in den vergangenen Jahrzehnten verlängert und die Erfüllung des Kinderwunschs wurde in eine spätere Lebensphase verschoben. Das gona-

dotoxische Potenzial der Therapie ging jedoch nicht zurück. Eine zunehmend etablierte Möglichkeit der Fertilitätsprotektion bei onkologischen Patientinnen ist die laparoskopische Entnahme von Eierstockgewebe vor und die Transplantation nach der onkologischen Therapie. Bisher wenig untersucht wurden operative Komplikations- und Schwangerschaftsraten bei diesem Verfahren des Fertilitäts Erhalts. Ziel unserer Arbeit war es, Art und Häufigkeit von operativen Komplikationen und das Auftreten von Schwangerschaften bei den Frauen, denen an unserem Zentrum Ovargewebe entnommen und transplantiert wurde, zu untersuchen und die Ergebnisse mit der bisher dazu veröffentlichten Literatur zu vergleichen.

Methodik Es erfolgte zunächst eine selektive Literaturrecherche in Pubmed zu den bisherigen Veröffentlichungen über operative Komplikationen und Schwangerschaften sowie Geburten bei Entnahme und Transplantation von Ovargewebe mit dem Ziel der Fertilitätsprotektion vor einer die Fertilität beeinträchtigenden Therapie. Gefunden wurden 16 Publikationen zur Entnahme von Eierstockgewebe und 15 Veröffentlichungen zur Transplantation (14 Studien zur Entnahme und Transplantation, drei ausschließlich zur Entnahme, eine Veröffentlichung ausschließlich zur Transplantation). Des Weiteren wurde nach der konsekutiven Schwangerschaftsrate als Erfolgsparameter gesucht.

Danach wurden vergleichend die operativen Ergebnisse und die Schwangerschaftsraten bei 29 Patientinnen aus unserem Zentrum, denen Ovargewebe zum Fertilitäts Erhalt zwischen Mai 2007 und November 2014 entnommen und transplantiert wurde, retrospektiv analysiert.

Ergebnisse Die laparoskopische Entnahme und Transplantation von Ovargewebe sind operative Eingriffe mit niedrigem Komplikationsrisiko. Mögliche Risiken sind eine Nachblutung oder eine Wundinfektion, die in < 1 % der Fälle auftreten. In den meisten Fällen ereignen sich keinerlei Komplikationen. Bisher wurden weltweit 39 Kinder nach Transplantation von Ovargewebe geboren. Diese Zahl wird weiter steigen. Bei den 29 Patientinnen aus unserem Zentrum fand sich keine operative Komplikation. Es kam zu insgesamt neun Schwangerschaften und zu fünf Geburten bei sieben verschiedenen Patientinnen. Die Schwangerschaftshäufigkeit von 24 % nach dem Eingriff an unserem Zentrum ist vergleichbar mit der in der Literatur publizierten Rate an Schwangerschaften.

Schlussfolgerung Die laparoskopische Entnahme und Transplantation von Ovargewebe entwickelt sich neben der schon länger im klinischen Alltag angewendeten Kryokonservierung von fertilisierten und nicht-fertilisierten Eizellen zunehmend zum Standardverfahren im Rahmen der Fertilitätsprotektion bei Krebs. Das Risiko und die Komplikationsrate bei diesen operativen Eingriffen entsprechen den Risiken bei anderen gynäkologischen Operationen. Gegenwärtig wird jede vierte Frau, die sich den Operationen nach Abschluss der Krebsbehandlung unterzogen hat, schwanger.

P46

Bestimmung eines Cut-Off-Wertes der präoperativen Beta-HCG-Serumkonzentration für das Risiko einer Salpingektomie bei Tubar gravidität

*K. Oettler, J. Jimenez-Cruz, A. Mothes, I. B. Runnebaum
Allgemeine Gynäkologie, Universitätsfrauenklinik, Jena, Deutschland*

Fragestellung Ziel der Erhebung ist die Ermittlung eines Cut-Off-Wertes des präoperativen Beta-HCG-Spiegels im Serum von Patientinnen mit einer Extrauterin gravidität zur Vorhersage einer notwendigen Salpingektomie.

Methoden Retrospektive Erhebung konsekutiver Patientinnen mit einer Extrauterin gravidität, welche operativ an der Universitätsfrauenklinik Jena von 07/2010 bis 06/2015 mit dem Ziel des Tubenerhalts versorgt wurden. Alter, Schwangerschaftsalter, Symptome, präoperative Beta-HCG-Konzentration und Risikofaktoren wie Endometriose, Chlamydieninfektion, IVF-Behandlung in Bezug auf die Operationstechnik Salpingotomie/ektomie sollte auf Signifikanz geprüft und ein operationstechnikabhängiger Cut-Off-Wert der Beta-HCG-Konzentration bestimmt werden.

Ergebnisse Insgesamt erhielten 69,4 % der 97 Patientinnen eine Salpingotomie und 29,6 % eine Salpingektomie. Parameter wie Schwangerschaftswoche, Lokalisation der Extrauterin gravidität, Vitalitäts- und Rupturstatus der Schwangerschaft unterschieden sich nicht-signifikant. Die meisten Patientinnen stellten sich initial mit starken Unterbauchschmerzen und vaginalen Blutungen vor. In der Risikoaamnese ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Häufigkeit einer vorbestehenden Chlamydieninfektion, Aborte oder Extrauterin graviditäten in der Anamnese, vorhergehende IVF-Behandlungen oder der Nutzung eines Intrauterinpeppers. Zu den Indikationen der Salpingektomie zählten ein gleichseitiges Extrauterin graviditätsrezidiv, eine Extrauterin gravidität in voroperierter Tube und vor allem unstillbare Blutungen aus dem Trophoblastbett nach Exstirpation.

Patientinnen, welche eine Salpingektomie erhielten, zeigten signifikant häufiger eine präoperativ bekannte Endometriose ($p = 0,05$) und ein deutlich erhöhtes Beta-HCG im Serum (9338 mIU/ml vs. 3278 mIU/ml; $p = 0,01$). In der Gruppe der Patientinnen, welche eine initiale Salpingektomie erhielten, traten signifikant weniger postoperative Komplikationen auf wie anämiebedingte Transfusionen, Methotrexatgabe bei Residuen oder revisionspflichtige Nachblutungen ($p = 0,05$).

Bei einem Cut-Off-Wert der präoperativen Beta-HCG-Serumkonzentration von 775 mIU/ml ergab sich eine Sensitivität einer möglichen Salpingektomie von 86,2 % gegenüber einer Spezifität von 45,6 %. Für diesen Cut-Off-Wert des Beta-HCGs ließ sich eine signifikante 5,2-fach erhöhte Risikowahrscheinlichkeit für eine Salpingektomie berechnen.

Schlussfolgerung Eine bekannte Endometriose sowie eine initiale Beta-HCG-Konzentration im Serum bei Patientinnen mit einer Extrauterin gravidität ab 775 mIU/ml erhöhen signifikant die Wahrscheinlichkeit einer für notwendig gehaltenen Salpingektomie bei operativer Intervention. Diese Risikofaktoren sollen prospektiv validiert werden. Patientinnen können dann präoperativ über das Salpingektomie-Risiko aufgeklärt werden, denn der Organerhalt erhält zwar die Möglichkeit der spontanen Konzeption auf dieser Seite, kann jedoch das Risiko für das Auftreten von Nachblutungen und Residuen sowie das Auftreten von Rezidiven erhöhen.

P47

Management der primären vaskulären erektilen Dysfunktion

K. A. Probst¹, A. Maßmann², C.-H. Ohlmann¹, S. Siemer¹, M. Stöckle¹, M. Janssen¹

¹Klinik für Urologie und Kinderurologie; ²Klinik für diagnostische und interventionelle Radiologie, Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland

Fragestellung Die primäre erektile Dysfunktion (pED) ist eine seltene und wenig beschriebene Erkrankung, die meist organisch bedingt ist (vor allem posttraumatisch und vaskulär). Wir zeigen unser diagnostisches und therapeutisches Vorgehen anhand von zwei Patientenfällen.

Methodik Zwischen 10/2013 und 09/2014 behandelten wir zwei Patienten mit pED in unserer Klinik (Alter bei Diagnose: 18 J bzw. 28 J). Mittels ausführlicher Sexualanamnese, körperlicher Untersuchung, Sonographie, Fragebögen (IPSS, IIEF-5, QLQ-C30), SKAT-Test mit Duplex-Messung und MR-Angiographie wurde die vaskuläre Genese der Erkrankung gesichert. Im Rahmen einer Angiographie erfolgte der Versuch der interventionellen Dilatation der verschlossenen Gefäße.

Ergebnis Beide Patienten zeigten klare Zeichen einer vaskulären pED (Versagen von PDE5-Hemmern, SKAT und Vakuumpumpe bei Erektionsstörungen seit der Pubertät); eine posttraumatische bzw. psychosomatische Genese der Beschwerden konnte ausgeschlossen werden. Die MR-Angiographie ergab jeweils eine unauffällige A. pudenda bei fehlender Darstellung der distalen Anteile. In beiden Fällen zeigte sich im Rahmen der Angiographie ein chronischer Verschluss der A. dorsalis penis und A. profunda penis, eine Intervention war nicht möglich. Ein Patient entschied sich folglich für eine hydraulische Schwellkörperprothese (SKP), der zweite Patient lehnte diese aus Angst vor dem Eingriff und dem Langzeitverlauf ab.

Schlussfolgerung Die Diagnose der pED setzt eine ausführliche und gründliche Diagnostik voraus. Aufgrund des chronischen Verschlusses blieb bei unseren Patienten jegliche Intervention frustan. Nach Versagen aller anderen Therapien ist die SKP die einzige erfolgversprechende Therapieoption.

P48

Die kongenitale unilaterale Aplasie des Vas deferens (CUAVD): Fallbericht, Literaturübersicht und Empfehlungen zum klinischen Management

K. A. Probst, S. Rugge, M. Saar, S. Siemer, M. Stöckle, J. Linxweiler
Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland

Kasuistik Ein 74-jähriger Patient mit stanzbiopsisch gesichertem, lokal begrenztem Prostatakarzinom stellte sich in unserer Klinik zur Durchführung einer laparoskopisch-roboterassistierten radikalen Prostatektomie vor. Als Vordiagnose war unter anderem eine kongenitale rechtsseitige Einzelniere bekannt. Bei Vorliegen eines Low-risk-Karzinoms wurde auf das Durchführen weitergehender bildgebender Untersuchungen zum präoperativen Staging verzichtet.

Intraoperativ konnte auf der linken Seite trotz sorgfältiger Präparation weder eine Samenblase noch ein Ductus deferens identifiziert werden. Die pathologische Begutachtung des Operationspräparates bestätigte eine fehlende Anlage der distalen Samenwege (Ductus deferens, Samenblase, Ductus ejaculatorius) auf der linken Seite. Der Patient berichtete über keinerlei sexuelle Funktionsstörungen oder sonstige Symptome und war Vater zweier gesunder Kinder.

Hintergrund und Literaturübersicht Die kongenitale unilaterale Aplasie des Vas deferens (CUAVD) ist eine bei bis zu 1 % der männlichen Bevölkerung zu beobachtende Anomalie, welche wie die deutlich bekanntere bilaterale Form (CBAVD) mit Mutationen des *CFTR*-Gens („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) assoziiert sein kann. Bei den Patienten mit heterozygoter *CFTR*-Mutation liegt auf der Gegenseite fast immer eine Obstruktion der anatomisch regelrecht angelegten Samenwege vor, was in der Regel mit einer Azoospermie einhergeht. Ebenso kann die CUAVD – besonders bei Fällen mit fehlender *CFTR*-Mutation wie in dem oben beschriebenen Kasus – mit einer ipsilateralen oder kontralateralen Nierenagenesie vergesellschaftet sein (je nach Serie in bis zu 85 % der Fälle). Klinisch werden Patienten mit CUAVD meist aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches urologisch vorgestellt. In den übrigen Fällen der gänzlich asymptomatischen Patienten erfolgt die Diagnosestellung in der Regel als Zufallsbefund im Rahmen bildgebender Untersuchungen des Beckens oder urologischer Eingriffe (Vasektomie, radikale Prostatektomie). Pathogenetisch wird in der Literatur meist eine Unterteilung in zwei Subgruppen vorgenommen: Patienten mit und ohne *CFTR*-Mutation. Bei den Patienten mit *CFTR*-Wildtyp wird ein bisher nicht genau identifizierter Gendefekt vermutet, welcher die Entwicklung des Wolff'schen Ganges einseitig verhindert oder in einer frühen Phase entscheidend stört.

Schlussfolgerung Aufgrund der o. g. Erkenntnisse sollte bei allen Patienten mit diag-

nostizierter CUAVD und deren erstgradigen Verwandten eine Bildgebung der Nieren und ableitenden Harnwege sowie eine Untersuchung auf *CFTR*-Mutationen durchgeführt werden. Auch eine entsprechende Untersuchung der Geschwister und Kinder erscheint sinnvoll. Insbesondere bei noch nicht abgeschlossener Familienplanung ist in Abhängigkeit der Ergebnisse der o. g. Untersuchungen darüber hinaus eine genetische Beratung zu empfehlen.

P49

Bei nicht-obstruktiver Azoospermie aufgrund einer Y-Deletion (AZF) ergibt die Mikro-TESE höhere Spermatozoendetektionsraten als die multilokuläre TESE

J. U. Schwarzer¹, H. Steinfatt¹, M. Schleyer², K. Fiedler², I. von Hertwig², G. Krüsmann², W. Würfel², F. M. Köhn²
¹Andrologie Centrum München; ²Kinderwunsch Centrum München-Pasing; ³Andrologikum München, Deutschland

Fragestellung Eine nicht-obstruktive Azoospermie kann durch Mikrodeletionen des Y-Chromosoms in der Region des Azoospermie-Faktors (AZF) verursacht sein, die in drei nicht überlappende Bereiche (AZFa, AZFb und AZFc) unterteilt ist. Die einzige Therapiechance besteht in der Gewinnung testikulärer Spermatozoen für ICSI.

Methodik Bei 25 Männern mit Mikrodeletionen des Y-Chromosoms wurden die Ergebnisse von zwei verschiedenen Techniken zur chirurgischen Spermatozoengewinnung, die konventionelle multilokuläre TESE und die mikrochirurgische TESE (Mikro-TESE), retrospektiv über einen Zeitraum von 19 Jahren untersucht.

Ergebnisse Von 1996 bis 2015 wurde die multilokuläre TESE bei elf Patienten und die Mikro-TESE bei 14 Patienten durchgeführt. Eine erfolgreiche Spermatozoengewinnung war nur bei den Patienten mit einer isolierten AZFc-Mikrodeletion möglich, sodass auch nur die 20 Patienten mit alleiniger AZFc-Mikrodeletion für den Vergleich der beiden Operationstechniken herangezogen wurden. Die Spermatozoendetektionsrate betrug bei der multilokulären TESE 25 % und bei der Mikro-TESE 67 %. Bei allen Patienten erfolgte eine histologische Untersuchung des Hodenparenchyms, was ein gemischtes Bild ergab, aber in den meisten Fällen ein Sertoli-cell-only-Syndrom. FSH stellte keinen prognostischen Marker für die erfolgreiche Spermatozoengewinnung dar. Bislang kam es bei zwei von sechs Paaren, bei denen die testikulären Spermatozoen für eine ICSI verwendet wurden, zu einer Schwangerschaft.

Schlussfolgerung Die Mikro-TESE ist der multilokulären TESE bei der Gewinnung testikulärer Spermatozoen bei einer Y-Deletion überlegen. Eine Spermatozoengewinnung war nur bei alleiniger AZFc-Mikrodeletion möglich.

P50

miR-130/301 Cluster regulates Adipogenesis-associated Target Genes in a Testosterone-dependent Manner

C. Wenzel¹, M. Kraus¹, M. Wabitsch², T. Greither¹, H. M. Behre¹

¹Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, MLU, Universitätsklinikum Halle (Saale); ²Sektion Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm, Germany

Background Obesity is a growing public health challenge in industrialized nations. Besides supernutrition, one causal cofactor can be late-onset hypogonadism (LOH), which is characterized by a significant decrease in serum testosterone (T) accompanied by clinical symptoms of androgen deficiency. LOH is frequently associated with an increase in visceral adipose tissue mass. Several studies demonstrated that specific miRs are important posttranscriptional gene regulators in the adipogenic differentiation. Androgens in turn may regulate these miRs, resulting in a decreased adipogenic differentiation of precursor cells. The aim of our study was to identify miR-130/301 cluster as a potential gene regulator in adipogenesis and to determine the effect of testosterone and dihydrotestosterone (DHT) on this miR and their specific target genes.

Methods Reporter luciferase assays were performed in human osteosarcoma cells (Saos-2) to validate that AR, leptin, ADIPOQ, PPAR-gamma, ARHGEF 12, RASD 1 and TNF-alpha are regulated by miR-130/301 cluster. The seed region of the miR binding site on the mRNA of these genes was mutated (mt) for the usage in experimental controls. Furthermore, after cultivation and induction of adipogenic differentiation in human SGBS preadipocytes for up to 14 d ± T (100 nM) or DHT (30 nM), miR- and protein expression of the potential target genes was measured.

Results In Reporter Luciferase assays transfection with miR-130a-mimic (50 nM) displayed a decrease of luminescence at the wildtype (wt) 3'UTR of AR, ADIPOQ, PPAR-gamma and TNF-alpha, whereas the luciferase expression of mt constructs was not affected. Furthermore, in luciferase assays facilitating vector constructs containing the RASD 1- or leptin-3'UTR, the luminescence remained stable after cotransfection with miR-130a-mimic. Accordingly, we demonstrated that AR, ADIPOQ, PPAR-gamma and TNF-alpha are direct targets of the miR-130/301 cluster.

In qRT-PCRs miR-130/301 cluster showed a low expression during the adipogenic differentiation, but an increased expression with addition of T or DHT to differentiating adipocytes.

Moreover, T or DHT supplementation to differentiating preadipocytes inhibits the protein expression of PPAR-gamma and promotes the protein expression of AR in contrast to differentiating preadipocytes without

androgen supplementation. The protein expression of ADIPOQ did not change with addition of T or DHT to differentiating preadipocytes.

Conclusion We conclude that a decreased serum androgen level is associated with a decreased miR-130/301 cluster expression, leading to a shift of the protein expression of its target genes in human preadipocytes. These genes promote adipogenic differentiation and thereby support the increase of visceral adipose tissue mass. Our results may contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of hypogonadism-associated obesity.

P51

Novel Aspects of Testicular Architecture in Adolescent Klinefelter Patients

B. Sarrazin, M. Zitzmann, J. Wistuba, S. Schlatt, N. Neuhaus, J. Rohayem, S. Kliesch
Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Germany

Introduction Data on testicular architecture of boys with Klinefelter Syndrome (KS) are scarce and it is unclear how hormonal markers and age are related to fertility.

Patients and Methods 82 KS patients (mean age 16.2 ± 2 , range 12–21 y) underwent testicular biopsies including potential sperm retrieval. Testicular histology was assessed by PAS-stainings and using the point counting method in spermatogonia-specific MAGEA4-stainings. Serum hormones were assessed prior to this. Eight young men of normal karyotype and various malignant disease undergoing experimental germ cell preservation served as controls (mean age 14.8 ± 2 , range 11–20 y).

Results Testicular volume in KS was lower vs controls (3 ± 2 vs 12 ± 11 mL) and inversely related to age ($p = 0.04$). The testicular interstitial tissue was prominent in KS vs controls (64% vs 28%, $p < 0.001$) but did not advance with age, while the number of Sertoli-cell-only tubuli (SCO) regressed ($p < 0.001$) and complete degraded tubuli (tubular shadows, TS) increased ($p = 0.007$). FSH and LH related inversely to SCO tubuli ($p = 0.001$) and positively to TS (LH: $p < 0.001$, FSH: $p = 0.04$), while InhibinB levels related positively to SCO ($p < 0.001$) and inversely to TS ($p = 0.007$). InhibinB concentrations were also associated with tubuli containing only spermatogonia ($p < 0.001$) or to the level of spermatocytes ($p = 0.04$). MAGEA4 staining reflected the presence of intact tubuli vs SCO-tubuli or TS (all $p < 0.001$) and was related to LH levels ($p = 0.003$). PAS-staining related to Inhibin B levels ($p = 0.01$) and various types of tubular stages (all $p < 0.003$).

Conclusion Testicular architecture in KS is altered already in (pre-)pubertal age of KS, exhibiting a pronounced proportion of interstitial tissue. InhibinB levels and both PAS- and MAGEA4 stainings reflect this strongly.

■ Varia

P52

Malignancy Potential by Morcellation of Uterine Fibroids

K. Abdissattarova, L. Mettler
Kieler Schule für Gynäkologische Endoskopie, Universitäts-Frauenklinik Kiel, Germany

Aim The research is focused on the usage or non-usage of electric power morcellation in the treatment of uterine fibroids. Moreover, our goal was to determine the incidence of postoperative histological diagnosis of uterine sarcoma among women who underwent myomectomy with their infertility treatment for presumed benign uterine fibroids, and also analyze the general number of uterine sarcomas.

Methods We performed a retrospective study of all myomectomies. Data were collected from 2010 to 2015. Statistical analysis was made using the STATA statistical package. Proportion confidence intervals were calculated using the Wilson method, chosen in the light of the small sample sizes in some analyses. Continuous variable confidence intervals were calculated using Student's t-distribution.

Results The total number of patients with uterine fibroids was 819. In 710 (86.69%) cases minimally invasive surgical approaches to treatment of uterine fibroids were applied. The laparoscopic power morcellator was used in 457 cases (55.8%) from which 250 were Laparoscopic Subtotal Hysterectomy (LASH) and 178 Total Laparoscopic Hysterectomy (TLH). In one patient with presumed uterine fibroids who underwent the LASH operation the histological examination detected endometrial stromal sarcoma. Consequently after a week bilateral salpingo-oophorectomy was performed. Thus, the incidence of postoperative pathological diagnosis of uterine sarcoma is equal to 1/819. Among 819 patients who underwent laparoscopic surgery with morcellation for the treatment of uterine fibroids, only one patient presented a preoperatively not recognised fibroids which became known only with pathohistological examination.

Conclusion Preoperative differential diagnostics between uterine fibroids and uterine sarcoma should be carried out carefully, by means of complex estimation of clinical, ultrasound, radiological, and immune-biochemical factors. The laparoscopic power morcellation especially in infertility patients should be performed only in cases when there is no doubt about the risk about a benign appearance of the fibroids. Modified methods of enclosed specimen extraction, such as endobag, may change the risks of morcellation of the pathologic uterine tissue, but this discussion is at present ongoing.

P53

Ausbildung in der Sexualmedizin – Eine bundesweite Umfrage unter deutschen Urologen

K. Herkommer¹, I. Schlögl¹, H. Schulwitz², A. Dinkef¹, J. E. Gschwend¹, F.-M. Köhn³

¹Klinik und Poliklinik für Urologie; ²Klinik und Poliklinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, Klinikum rechts der Isar der TU München; ³Andrologikum München, Deutschland

Fragestellung Ziel war, die Aus- und Fortbildungssituation in der Sexualmedizin bezüglich sexueller Funktionsstörungen (SF), Geschlechtsidentifikationsstörungen (GIS) und Störungen der Sexualpräferenz (SP) mithilfe eines Fragebogens unter Urologen zu untersuchen. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die besuchten Fortbildungen in den verschiedenen Ausbildungsabschnitten (Studium, Assistenzarzt- und Facharztzeit) und Fortbildungswünsche gelegt. Außerdem wurde die sexualmedizinische Betreuung männlicher Patienten durch den Urologen erfragt.

Methodik Der fünfseitige Fragebogen mit überwiegend geschlossenen Fragen beinhaltete Fragen zur Aus- und Fortbildungssituation in verschiedenen Abschnitten der Weiterbildung bis hin zum Facharzt. Außerdem wurden Fragen zur sexualmedizinischen Tätigkeit, Fortbildungswünschen und Soziodemographie gestellt. Dieser wurde an 5955 deutsche Urologen/Andrologen postalisch versendet. Unterschiede zwischen Älteren und Jüngeren, sowie Männern und Frauen wurden mittels Chi-Quadrat-Test untersucht, wobei die ersten drei und letzten drei Antwortmöglichkeiten von sechs möglichen zusammengefasst wurden. Das Signifikanzniveau lag bei 0,05.

Ergebnisse Rücklaufquote: 16,0 %, n = 955. Auswertung: 905 Fragebögen (Ausschluss 50 Fragebögen von Nicht-Urologen). Durchschnittsalter: 47,7 ± 10,4 Jahre. Männlich: 78,9 %, Fachärzte: 86,7 %, in Deutschland studiert: 97,0 %. Zusatzbezeichnung Andrologie: 37,7 %.

Der Aussage, dass sexuelle Funktionsstörungen im Medizinstudium behandelt wurden, stimmten 57,6 % (voll und ganz/überwiegend/eher) zu. Bezogen auf Geschlechtsidentifikationsstörungen stimmten weniger (31,1 %), bei Störungen der Sexualpräferenz stimmte eine Minderheit zu (21,3 %). Die Themen wurden im Fach Urologie (64,2 %), gefolgt von Psychiatrie (49,8 %) und Psychosomatik (47,8 %) behandelt.

34,6 % bis 76,5 % gaben an, regelmäßig an Fortbildungsveranstaltungen im Bereich sexueller Funktionsstörungen während ihrer Assistenzarztzeit teilgenommen zu haben. Am häufigsten wurden Fortbildungen über Sexualität und urologische Operationen besucht (76,5 % trifft eher/überwiegend/voll und ganz zu), gefolgt von erektiler Dysfunktion (74,5 %). Weniger oft wurden Veranstaltungen über Geschlechtsidentifikationsprobleme (14,2 %) und Störungen der Sexualpräferenz besucht (1,9 %: Frotteurismus bis 3,7 %: Fetischismus).

Bei ähnlichem Trend während der Facharztzeit wurde insgesamt eine vermehrte Teilnahme an Fortbildungen, SF (62,0 %: Orgasmusstörungen bis 89,5 %: Erektile Dysfunktion), GIS (22,3 %) und SP (5,8 %: Frotteurismus bis 7,5 %: Fetischismus), angegeben. Männer gaben signifikant häufiger an, Fortbildungen im Bereich sexueller Funktionsstörungen (Ausnahme: Sexualität und Vorerkrankungen) während der Assistenzarzt- und Facharztzeit besucht zu haben ($p < 0,05$).

89,0 % fühlten sich sicher bei der medizinischen Betreuung von Patienten mit sexuellen Funktionsstörungen (Ältere > Jüngere, $p < 0,0001$; $m > w$, $p < 0,0001$), 25,8 % mit Geschlechtsidentifikationsproblemen (Ältere > Jüngere, $p < 0,0001$; Geschlecht n. s.) und 22,9 % mit Sexualpräferenzstörungen (Ältere > Jüngere, $p < 0,0001$; $m > w$, $p > 0,0001$).

Probleme beim Ansprechen der Sexualität sahen 29,9 % in der fehlenden Notwendigkeit (Geschlecht n. s.), 20,9 % in der unzureichenden Ausbildung ($w > m$, $p < 0,0001$). 20,9 % der Befragten gaben an, sie hätten das Gefühl, der Patient fühle sich unwohl ($w > m$, $p = 0,02$), 3,5 % fühlten sich selbst unwohl (Geschlecht n. s.). Eine unterschiedliche Arzt-Patient-Geschlechterkonstellation gaben in diesem Zusammenhang 8,7 % als Problem an ($w > m$, $p = 0,01$). Die genannten Probleme wurden signifikant häufiger von Jüngeren angegeben ($p \leq 0,01$).

79,8 % bis 83,9 % gaben an, gerne Fortbildungen im Bereich sexueller Funktionsstörungen besuchen zu wollen. Mehr als die Hälfte würde gerne Fortbildungen im Bereich Geschlechtsidentifikationsprobleme (58,2 %) ($w > m$, $p = 0,002$) und Störungen der Sexualpräferenz (56,6 %) (Geschlecht n. s.) besuchen.

Schlussfolgerung Im Medizinstudium werden die Themen sexuelle Funktionsstörungen zum Teil, Geschlechtsidentifikations- und sexuelle Präferenzstörungen kaum behandelt. Während der Assistenzarztzeit werden Fortbildungen zu sexuellen Funktionsstörungen gut besucht, während die beiden anderen Bereiche eine untergeordnete Rolle spielen. Bei ähnlichem Trend während der Facharztzeit wurde eine insgesamt vermehrte Teilnahme angegeben.

Die Mehrheit der Befragten, vermehrt Ältere und Männer, fühlte sich sicher im Umgang mit Patienten mit sexuellen Funktionsstörungen. Im Bereich Geschlechtsidentifikations- und Präferenzstörungen fühlte sich rund ein Viertel sicher, trotz Angabe wenig besuchter Fortbildungen.

Beim Ansprechen der Sexualität wurden v. a. fehlende Notwendigkeit, unzureichende Ausbildung und das Gefühl „der Patient fühle sich unwohl“ als Probleme angegeben. Hier zeigte sich v. a. bei jüngeren Ärzten ein zum Teil mangelndes Problembewusstsein und verbesserungswürdige Kompetenz im Umgang mit dem Thema Sexualität. Frauen gaben insgesamt vermehrt Probleme beim Ansprechen der Sexualität, weniger Teilnahme an Fortbildungen und weniger Sicherheit an. Vermehrte Fortbildungswünsche bestehen in allen drei Bereichen der Sexualmedizin.

P54

Influence of Cross-Sex Hormone Treatment on the Adrenal Gland Hormone Profile in Gender Dysphoria (GD) Patients on the Day of Sex-Reassignment Surgery (SRS)

F. Schneider^{1,2}, J. Wistuba¹, M. Zitzmann², J. Gromoll¹, P.-M. Holterhus³, S. Schlatt¹, N. Neuhaus¹, S. Kliesch²

¹Institute of Reproductive and Regenerative Medicine; ²Department of Clinical Andrology, Center of Reproductive Medicine and Andrology, Münster; ³Department of Pediatrics, Hormone Centre for Children and Adolescents, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

Introduction Gender Dysphoria (GD) is characterized by the urge to live as member of the desired sex, different to natal sex. The goal of medical and surgical treatment is to improve the well-being and quality of life of transpeople [Meriggiola et al. 2015]. Sex reassignment requires a multidisciplinary treatment [Hembree et al. 2009] including cross-sex hormone treatment (CHT) and sex-reassignment surgery (SRS). For male-to-female patients, “devirilization” using cyproterone acetate followed by “feminization” using estrogens combined with antiandrogens is usually given [Gorin-Lazard et al. 2012]. There is no data about suspension of the hormones before surgery [Meriggiola et al. 2010]. Moreover, no controlled clinical trials of any feminizing hormone regimen have been conducted to evaluate safety or efficacy in producing physical transition [WPATH 2011]. The optimum steroid hormone treatment regime for transsexual subjects has not been established [van Kesteren et al. 1997].

Aim To describe the influence of CHT itself and the influence of its different stopping points before SRS on the adrenal gland hormone profile we used mass spectrometry-based methods to compare 3 different treatment regimens in a multi-center study. Clinic A told the patients to stop CHT four to six weeks prior to SRS, in clinic B patients were told to discontinue treatment 2 weeks before and in clinic C patients were told not to stop at all.

Material and Methods Ethical committees of the Ärztekammer Westfalen-Lippe (no. 2012-555-f-S) and the Ärztekammer Hamburg (no. MC-131/13) approved this research. Written informed consent was received from each subject prior to study participation. Paraffin sections were deparaffinized, dehydrated and PAS-stained according to published protocols [Brinkworth et al. 1995]. The spermatogenic state was evaluated with the Bergmann/Kliesch score [Bergmann/Kliesch 1998]. The adrenal-gland hormones were divided in three axes. 1st axis: progesterone, 17-desoxycorticosterone, corticosterone; 2nd axis: 17-hydroxyprogesterone, 11-desoxycortisol, 21-desoxycortisol, cortisol, cortisone; 3rd axis: 17-hydroxypregnenolone, DHEAS, androstendione, testosterone, DHT. They were measured by liquid-chromatography – tandem mass spectrometry.

Results The first 15 subjects from each clinic were included (total 45 subjects). According to the Bergman/Kliesch score, 5 showed complete spermatogenesis, 16 meiotic arrest, 15 spermatogenic arrest, 8 Sertoli-cell-only syndrome and one complete tubular atrophy.

1st axis: Mean 11-desoxycorticosterone levels of clinic B (* $p < 0.05$) were decreased below male and female reference levels. Lowest levels were observed in those patients with complete spermatogenesis. Interestingly, testicular tissue with complete spermatogenesis showed the lowest levels in all three of them.

2nd axis: Mean 21-desoxycortisol was significantly higher in clinic C compared to clinic B (**** $p < 0.00001$). Surprisingly, cortisone levels were significantly lower in clinic A (* $p < 0.05$) than in clinic C.

3rd axis: Mean androstendion of clinic A (mean: 84.42 ng/dl, SD: 64.07 ng/dl) was significantly higher than in clinic C (** $p < 0.005$). Mean DHEAS of clinic B was significantly lower comparing it to clinic A (** $p < 0.005$). Total testosterone was above the female reference, but within the male ranges. Mean testosterone of clinic A was within male ranges, mean testosterone of clinic B and clinic C was above the female and below the male limits. Testicular tissue with complete spermatogenesis showed the highest testosterone levels.

Conclusion In this first descriptive study examining the adrenal gland hormone profile in GD patients undergoing SRS, we could show that CHT and its different stopping points were most effective on the sex-steroid and less effective on the mineralocorticoid axis. Our patient group in general didn't suffer from elevated stress levels. Reduced stress levels were seen in clinic A. Best feminized blood serum levels on the day of SRS can – as expected – only be achieved if CHT is not stopped.

P55

Drei Natural-Cycle-IVF-Behandlungen verursachen weniger psychischen Stress als eine konventionelle IVF

M. von Wolff^{1,2}, G. Alder², M. Fähr¹, S. Rohner¹, K. Hämmerli²

¹Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitäts-Frauenklinik Bern; ²Institut für Psychologie, Klinische Psychologie und Psychotherapie, Freiburg, Schweiz

Fragestellung IVF-Behandlungen sind die am stärksten belastende Sterilitätstherapien. Natural-Cycle-IVF- (NC-IVF-) Behandlungen sind weniger oder gleich teuer pro erzielter Schwangerschaft und weniger risikoreich. Die Schwangerschaftsrate nach drei NC-IVF-Zyklen ist in etwa so hoch wie nach einem Transfer nach einer konventionellen IVF-Behandlung (cIVF) mit Gonadotropinen. Unklar ist jedoch, wie belastend beide Behandlungen im Vergleich sind. Deswegen stellt sich die Frage, ob die psychische Belastung vor, während und nach drei NC-IVF-Behand-

lungen geringer oder höher ist im Vergleich zu einer cIVF mit Gonadotropinen.

Methode Die prospektive Studie wurde mit NC-IVF- (ohne und mit 25 mg Clomifenzitrat pro Tag) und cIVF-Patientinnen von Mai 2013 bis Dezember 2014 durchgeführt. Die psychische Belastung wurde mithilfe validierter Fragebögen analysiert, welche online und zu Hause vor, während (nur NC-IVF) und nach der Behandlung ausgefüllt wurden. Die IVF-Behandlungen mussten – wie in der Schweiz üblich – vollumfänglich von den Patienten selbst bezahlt werden. Untersucht wurden der psychische Stress (BSI GSI), Zwanghaftigkeit (BSI obsession), Depression (BSI and CES depression), Infertilitäts-assoziiierter Stress (IBS), Einfluss von Fertilitätsproblemen auf das tägliche Leben (FertiQoL), Lebensqualität (WHOQOL-Bref) sowie der Behandlungs-assoziierte Stress (FertiQoL treatment).

Ergebnisse Die Daten von 57 NC-IVF- und 62 cIVF-Patientinnen wurden ausgewertet. Die Basis-Charakteristika waren nicht verschieden, inklusive potenziell belastender Faktoren wie die Anzahl an Konsultationen und die Schwangerschaftsraten. NC-IVF-Frauen hatten vor Behandlungsbeginn signifikant höhere psychologische Stress-Werte (BSI GSI) und Symptome von Zwanghaftigkeit (BSI obsession) als cIVF-Patientinnen. Nach der NC-IVF-Behandlung zeigten die NC-IVF-Patientinnen geringere Depressionssymptome (CES depression) und eine höhere Zufriedenheit mit der Behandlung (FertiQoL treatment) als cIVF-Patientinnen. Während der NC-IVF-Behandlung stieg der Behandlungs-assoziierte Stress vor dem ersten Therapiezyklus (nicht-signifikant) an. Im Folgezyklus fiel dieser jedoch wieder (signifikant) ab (FertiQoL) und die Lebensqualität stieg an (WHOQOL-Bref).

Schlussfolgerung NC-IVF-Behandlungen scheinen für Sterilitätspatientinnen psychisch weniger belastend zu sein. Da Studien des Weiteren gezeigt haben, dass eine Behandlung mit modifizierten NC-IVF-Zyklen ähnlich effektiv und weniger risikoreich ist als konventionelle IVF-Behandlungen, stellt eine NC-IVF-Behandlung in bestimmten Fällen eine Behandlungsalternative dar.

P56

Immunhistochemische Analyse von CD56-positiven uNK-Zellen im Endometrium

M. Weber¹, B. Toth², I. Santillan³, E. Schleußner⁴, U. R. Markert¹

¹Geburtshilfe, Placenta-Labor, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena; ²Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörung, Universitätsklinikum Heidelberg, Germany; ³Centro Médico Palencia, Madrid, Spanien; ⁴Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena, Deutschland

Fragestellung Uterine natürliche Killerzellen (uNK-Zellen) stellen einen Großteil der immunologischen Zellen während der Im-

plantation und Frühschwangerschaft dar. Ihre pathophysiologische Bedeutung und Verteilung während des Menstruationszyklus bzw. in der Schwangerschaft ist jedoch nur teilweise erforscht. Zudem gibt es erste Hinweise, dass die Konzentration an uNK-Zellen bei Frauen mit habituellen Aborten (RSA) und Implantationsversagen (RIF) erhöht ist. Ziel unserer Studie ist es, die Bestimmung von uterinen NK-Zellen als potenziellen diagnostischen Marker bei RSA- und RIF-Patientinnen weiter zu etablieren.

Methodik Endometrium-Biopsate von insgesamt $n = 254$ Patientinnen, davon $n = 117$ mit Implantationsversagen und $n = 137$ mit habituellen Aborten, sowie $n = 15$ gesunden fertilen Frauen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Santillan, Madrid/Spain) wurden immunhistochemisch mittels DAB-Nachweis auf CD56-positive uNK-Zellen untersucht. Die Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test ($p = 0,05$).

Ergebnisse Das Endometrium von RIF-Patientinnen ($n = 117$) bzw. RSA-Patientinnen ($n = 137$) wies 275 ± 202 (MW $\pm$ SD) bzw. 233 ± 185 uNK-Zellen auf, wobei 67,5 % der RIF- bzw. 65,7 % der RSA-Proben 40–300 und 30,8 % der RIF bzw. 27,0 % der RSA-Proben 300–600 (oder mehr) uNK-Zellen/cm² zeigten. Im Gegensatz dazu konnten bei den Kontrollen ($n = 15$) 158 ± 70 uNK-Zellen/cm² nachgewiesen werden, davon bei 93 % 40–300 uNK-Zellen/cm². Es zeigte sich ein jeweils signifikante Unterschiede in der uNK-Zell-Expression von RSA-/RIF-Patientinnen und Kontrollen ($p < 0,001$), aber nicht zwischen RSA- und RIF-Patientinnen ($p = 0,763$).

Aufgrund dieser Ergebnisse sowie zahlreicher Vorarbeiten erfolgte die Entwicklung eines Score für die diagnostische Auswertung von uNK-Zellen: 0–40 = geringe Anzahl, 40–300 = normale Anzahl, 300–600 = erhöhte Anzahl und > 600 = deutlich erhöhte Anzahl.

Schlussfolgerungen Die immunhistochemische Analyse von CD56-positiven uNK-Zellen bietet einen neuen diagnostischen Marker für RSA-/RIF-Patientinnen. Insgesamt fanden sich bei 28,7 % der RSA-/RIF-Patientinnen erhöhte uNK-Zellen. Die pathophysiologische Bedeutung erhöhter uNK-Zellen ist Teil der aktuellen Forschung, ebenso mögliche immunmodulatorische Therapieansätze bei RSA-/RIF-Patientinnen.

DVR 2015

Index der präsentierenden Autoren

A

Abdisattarova K. P52..... 476
 Al-Kawlani B. P21..... 464

B

Baston-Büst D. P14, P22..... 461, 464
 Bielfeld A.P. P23..... 465
 Borgmann J. P27..... 466
 Brand C. P01..... 455
 Buck T. P24..... 465

C

Coll L. P28..... 467

D

Dittrich R. P25..... 466

F

Fehr D. P15, P16..... 461, 462
 Fietz D. P02..... 455
 Findeklee S. P45..... 474

G

Giebler M. P03..... 456
 Glashauser L. P04..... 456
 Gutknecht D. P29..... 467

H

Herkommer K. P53..... 477
 Hoffmann I. P26..... 466

K

Klein B. P05..... 456
 Koehler U. P30..... 468
 Kwiatkowski B. P31..... 468

L

Laghai P. P39..... 472
 Langenstroth D. P06, P07..... 457 (2x)
 Laurentino S. P33..... 469
 Lavorato H.L. P08..... 458
 Ledig S. P34..... 470
 Linek B. P40..... 472
 Lotz L. P41..... 472

M

Manjowk G.M. P09..... 458
 Merklingshaus A. P35..... 470
 Mincheva M. P10..... 459

N

Neuhaus N. P32..... 469
 Nordhoff V. P17..... 462

O

Oettler K. P46..... 474

P

Pereira I. P18..... 463

Pleuger C. P11..... 459
 Pohl K. P19..... 463
 Probst K.A. P47, P48..... 475 (2x)

S

Schneider F. P54..... 477
 Schulte K. P36..... 470
 Schuppe H.-C. P42, P43..... 473 (2x)
 Schwarzer J.U. P49..... 475
 Sharma S. P12..... 460

T

Tewes A.-C. P37..... 471

V

von Horn K. P20..... 463
 von Wolff M. P55..... 478

W

Wagner I.V. P13, P44..... 460, 473
 Weber M. P56..... 478
 Wenzel C. P50..... 476
 Würfel F. P38..... 471

Z

Zitzmann M. P51..... 476

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

Impressum

Disclaimers & Copyright

Datenschutzerklärung