

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



7. DVR-Kongress 2017, 07.–09.12.2017, München
(Poster-Abstracts)

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2017; 14 (5), 221-249

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



7. DVR-Kongress 2017

07.–09.12.2017, München

Poster-Abstracts*

■ Infertilität

P01

Effects of Low-Level-Laser-Therapy LLLT on human spermatozoa and its future perspective for reproductive medicine

B. T. Espey¹, K. Kielwein¹, J. Liebenthron¹, H. van der Ven¹, K. Steger², A. Pardowska-Dogan¹, K. van der Ven¹

¹Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Clinic, Bonn;

²Section Molecular Andrology, Biomedical Research Center Seltersberg, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Introduction & Objectives Diminished sperm motility is very often a reason for a failed natural conception as well as unsuccessful intrauterine insemination and IVF procedure. In this study, we investigated LLLT *Low-level-laser-therapy* (LLL) towards improvement of sperm motility. LLLT works with monochromatic or coherent light in conjunction with a cold-laser, causing insignificant heating of tissue. It has been shown that LLLT mainly affecting the respiratory chain in the mitochondria leading to an increase of ATP (adenosine-tri-phosphate) thus increase of energy. The increase of sperm motility after laser radiation has been demonstrated in animal models and in human sperm; however there is a lack of data concerning long time and potential side effects of laser treatment on spermatozoa. Therefore, the aim of the study was to define the optimal laser radiation dose and treatment duration for sperm of healthy donors and asthenozoospermic patients. Furthermore, the degree of sperm DNA fragmentation after laser treatment was investigated.

Material and Methods The study was performed on semen samples of asthenozoospermic (n = 42) and normozoospermic (n = 22) patients attending the Department of Endocrinology and Reproductive Medicine at the University of Bonn after obtaining informed consent from every participant.

For LLLT radiation, a pulsed laser-probe (Reimers & Jansen, Germany) with a wavelength of 655 nm, output-power of 25 mW/cm² and an impulse duration of 200 ns was used.

Native fresh liquefied semen samples underwent radiation with energy doses from 0 (control group), to 4, 6 and 10J/cm². Sperm parameters were assessed according to WHO 5 manual for the examination of human semen at 0, 30, 60, 90 and 120 min after radiation using a SCA® CASA System (MICROPTIC S.L., Barcelona). The following sperm motility parameters were analyzed: Velocity; VCL = curvilinear velocity; VSL = straight-line velocity; VAP = average path velocity; ALH = amplitude of lateral head displacement, BCF = beat-cross frequency and Hyperactivity.

The amount of DNA-strand breakage was analyzed with the „Ligation-Mediated Real-Time Polymerase Chain Reaction“ (LM-RT-PCR) in 22 patients with asthenozoospermia and 3 normozoospermic controls. Statistical analysis was performed by using matched-paired one-way-ANOVA in combination with Dunnett's multiple comparison tests (Graph-Pad Prism 7); p-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results We could demonstrate that the laser energy-dose of 4 and 6J/cm² had the greatest effect on asthenozoospermic sperm's motility and velocity parameters.

A significant increase of the progressive sperm motility (PR) with laser intensity of 6J/cm² (3.562% ± 1.105; p = 0.0069) and decrease of non-progressive (NP) sperm motility of 4J/cm² (-3.25% ± 1.325; p = 0.0477) and immotile (IM) sperm by 6J/cm² (-6.517 ± 1.824; p = 0.0026) could be observed. Furthermore, similar positive effects were detected for velocity parameters. Significant increase of VCL by 4J/cm² (2.835 µm/s ± 1.065; p = 0.029). For the normozoospermic group only minor statistically significant changes for motility (6J/cm²: PR 6.125% ± 2.063; p = 0.0195; NP -3.123% ± 1.004; p = 0.0142) or velocity (6J/cm²: ALH 0.1286 µm ± 0.05075 p = 0.0496) has been found. The LM-RT-PCR results show no significant DNA fragmentation level after laser exposition as compared to the control group (Ct-values for 6J/cm²: 23.24 ± 0.9779 vs. 0J/cm²: 22.63 ± 1.033 p = 0.9268).

These results could be confirmed when DNA defragmentation has been analyzed parallel by HALO assay in combination with CASA software.

Conclusion Based on our results, LLLT treatment of spermatozoa may represent a new technique for reproductive medicine. In particular, for asthenozoospermic patients, the improvement of sperm motility after laser therapy may raise a chance for successful intrauterine insemination, before patients parti-

cipate in an IVF or ICSI programme. However, more studies on sperm fertilizing ability and physiology are needed to exclude possible yet unknown side effects of LLLT.

There is no conflict of interest for this study.

P02

Varicocelectomy improves the sperm capacity to induce optimal embryonic development post-fertilization, in the Surrogacy Program

I. Giakoumakis¹, D. Daphnis¹, N. Sofikitis²

¹Mediterranean Fertility Institute, Chania; ²University of Ioannina, Andrology, Ioannina, Greece

Objective Left varicocele has a detrimental effect [Eur Urol Suppl. 2014; 3: 89–99] on the sperm ability to induce optimal early embryonic development post-fertilization. Our objective was to evaluate the effects of varicocelectomy on early embryonic development of oocytes recovered from female donors.

Participants and Methods ICSI procedures using female donor oocytes were performed with spermatozoa from 13 men (group A) with left varicoceles. The female partners of the latter men could not produce oocytes of appropriate quality for participating in assisted reproductive technology (ART) programs. Injected oocytes were cultured for 96 hours. The fertilization rate (FR) (100% fertilized oocytes/injected oocytes) and the blastocyst development rate (BDR) (100% developed blastocysts/fertilized oocytes) were recorded. Developed blastocysts were transferred to surrogate females. Another group of nine men with left varicoceles (group B) whose wives could not produce oocytes of appropriate quality for ART programs underwent microsurgical left varicocelectomy. Six to 12 months later ICSI cycles were performed using female donor oocytes. FR and BDR were recorded, as well. Developed blastocysts were transferred to surrogate females.

Results BDR was significantly larger (p < 0.05) in group B than in group A (Chi-Square test – Yates correction).

Conclusions Microsurgical left varicocelectomy improves the ability of the male gametes to trigger the cascade of ooplasmic events that lead to early embryonic development up to the blastocyst stage. In the current study the injected donor oocytes had been recovered from normal young females thus any female infertility factor is excluded. It appears that left varicocelectomy improves the

*Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee.

Ein alphabetisches Verzeichnis der präsentierenden Autoren finden Sie auf Seite 249

DNA integrity, the male gamete nucleus protein matrix quality and/or the centrosomic integrity/function allowing more optimal embryonic development. The current study indicates an important role of the male gamete beyond fertilization. Such results have clinical significance in a Surrogacy Motherhood Program whereby global legislation requires either of the intended parents to provide (in most cases the male partner) their own genetic material. Consequently, it is imperative to increase quality of the sperm in order to achieve high pregnancy rates.

P03

Die Leihmutterchaft als Option zur Kinderwunscherfüllung in einem EU-Land mit entsprechender Gesetzgebung: Ein kritischer Überblick unserer Erfahrung in Griechenland

I. Zervomanolakis, E. Nikitos, K. Agapitou, S. Kallergi, M. Mpotzaki, C. Makri, K. Diamantopoulou, D. Pappa, E. Nikolopoulou, T. Mantzavinos
Institute of Life, IASO Klinik, Marousi, Athen, Greece

Fragestellung Aufgrund der Gesetzgebung ist die Leihmutterchaft aus medizinischer Indikation als Option zur Kinderwunscherfüllung in Griechenland möglich. Infolgedessen entscheiden sich viele Paare aus anderen EU-Ländern für die Behandlung in diesem Land. Ziel unserer retrospektiven Studie ist die Untersuchung der Ursachen, die zur Behandlung führen bzw. des Ablaufs und der Behandlungsergebnisse.

Methodik In einer retrospektiven Studie wurde Google Analytics Solutions (Google Inc, 2017) als analytische Methode verwendet, um die Besuche unserer Webseite aus Deutschland bzw. Österreich zu dokumentieren. Des Weiteren wurden sowohl die Patientenfragen über E-Mail, Skype-Konferenzen bzw. Beratungsgesprächen als auch der Behandlungsausgang ausgewertet.

Ergebnis Von September 2015 bis September 2017 haben 10.493 Besucher aus dem deutschsprachigen Raum die Webseite www.womancenter.gr über das Schlüsselwort „Leihmutterchaft“ aufgerufen. Es wurden 149 Patientinnen zwischen 30 und 50 Jahren mit einem Durchschnittsalter von $39,69 \pm 5,76$ Jahren in unsere Studie eingeschlossen. 46,9 % leiden an wiederholten erfolglosen IVF-Versuchen, während sich 12,7 % einer Hysterektomie unterzogen, 10,1 % an MRKH-Syndrom leiden und jeweils 11 % eine internistische Erkrankung bzw. Abortus habitus aufweisen. 8,3 % der Anfragen kamen aus homosexuellen Paaren. Nach einer Skype-Konferenz mit 32,9 % der Patientinnen wurde mit 26 % von ihnen in der Klinik ein Beratungsgespräch durchgeführt. Infolgedessen entschieden sich 24 % für die Behandlung. Die Verfügbarkeit der Embryonen vor der Behandlung wurde durch die Follikelpunktion zur Gewinnung von eigenen oder fremden Eizellen und anschließenden Embryonenkryokonservierung gewährleistet. Bei 40 % der behandelten Frauen wurde eine

Follikelpunktion durchgeführt. Die Fertilisierungsrate lag bei 67,2 %. 36,2 % der Patientinnen wurden über eine Eizellspende behandelt, während bei 23,8 % der Patientinnen im Heimatland bereits eingefrorene Embryonen zur Verfügung standen. Bisher wurden 13 Embryotransfers durchgeführt. Daraus resultierten 5 Einlingsschwangerschaften, 2 Zwillingschwangerschaften, 7 Entbindungen bzw. eine Fehlgeburt und eine biochemische Schwangerschaft.

Schlussfolgerung Die Leihmutterchaft ist in den meisten EU-Ländern aus medizinischen, ethischen bzw. rechtlichen Gründen nicht erlaubt. Die Erfahrung in Griechenland zeigt, dass die Behandlung erfolgreich abgeschlossen werden kann, vorausgesetzt, die ausführliche Rechtsberatung zum Schutz aller beteiligten Seiten bzw. der Respekt vor der Würde der Leihmutter, des Kindes und der Eltern sind gewährleistet. Nichts desto trotz bleibt die Frage über die Rechte des Kindes, der Eltern und der Leihmutter bei Komplikationen während der Schwangerschaft eine große Herausforderung.

P04

Höhere Sensitivität und Genauigkeit – Wird die neue automatisierte AFC-Messung an 3D-Volumina der Ovarien eine neue Standardmethode werden?

R. Menkhaus¹, B. Heidecker¹, O. Sauzet²

¹Zentrum für Kinderwunschbehandlung und Pränatalmedizin, Minden; ²Universität Bielefeld, Zentrum für Statistik, Bielefeld, Deutschland

Fragestellung Der Antralfollikelcount (AFC) ist neben dem AMH-Wert prädictiv für die ovarielle Reserve und damit für die Planung einer ovariellen Stimulation wichtig.

Die exakte Messung der Anzahl der Antralfollikel (Summe der Follikel beider Ovarien mit einem Durchmesser von 2–10 mm) ist mit der 2D-Sonographie sehr aufwendig. Die vaginalsonographische 3D-Volumenaufnahme der Ovarien mit dem neuen GE Sono AVC antral und anschließender Offline-Messung ergibt deutlich höhere Durchschnittswerte in den einzelnen Altersklassen als bisher in der Literatur angegeben.

Methodik Wir haben bei 100 Patientinnen 0–4 Tage vor Beginn einer IVF/ICSI-Behandlung eine AFC-Messung mit der neuen Methode (GE Sono AVC antral, RIC 5–9Mhz, Voluson E8 RSA und E10) durchgeführt. Acht Patientinnen durchliefen im Beobachtungszeitraum 2 Behandlungszyklen, dementsprechend wurden jeweils 2 Messungen durchgeführt. Drei Patientinnen durchliefen 3 Therapiezyklen, sodass hier jeweils 3 Messungen erfolgten. Es lagen somit 112 Messwerte vor. Die Altersgruppe „< 25 Jahre“ und die Gruppe „> 40 Jahre“ war nur mit 2 bzw. 3 Patientinnen besetzt und konnte statistisch nicht ausgewertet werden.

Die automatische Zählung wurde manuell nachbearbeitet. Zusätzlich wurden Alter, AMH-Wert, Gonadotropingestamtdosis,

BMI und Zahl der gewonnen Eizellen erfasst (Abb. 1).

Ergebnis Es ergaben sich in den einzelnen Altersgruppen folgende Durchschnittswerte (Standardabweichung) für den AFC:

26–30 Jahre: 42,9 (24,5); n = 30 Messwerte
31–35 Jahre: 37,9 (20,2); n = 36 Messwerte
36–40 Jahre: 29,5 (13,6); n = 41 Messwerte (Abb. 2).

Die Bereinigung des Kollektivs um PCO-Patienten verändert die Durchschnittswerte nicht. Die Abnahme des AFC mit dem Alter folgt einer quadratischen Gleichung. In einem kombinierten Modell aus AFC und AMH zur Vorhersage der gewonnenen Eizellen bleibt nur der AFC statistisch signifikant. Der AFC erklärt 20 % der Varianz der gewonnen Eizellen.

Die Gonadotropingestamtdosis und der BMI korrelieren nicht mit der Zahl der gewonnenen Eizellen. Der BMI korreliert nicht mit dem AFC.

Es gibt, wie erwartet, eine positive Korrelation zwischen AMH und AFC. Bei einer kleinen Anzahl an Patientinnen erfolgten in verschiedenen Zyklen 2 bzw. 3 Messungen des Antralfollikelcounts. Dabei zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit des jeweils ermittelten AFC-Wertes. Wegen der geringen Anzahl wird jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

Schlussfolgerung Die 3D-AFC-Messung zeigt wesentlich höhere Durchschnittswerte in den einzelnen Altersklassen als bislang publiziert. Möglicherweise ist dies durch eine höhere Bildauflösung und exaktere Erfassung der Anzahl sämtlicher Antralfollikel an einem fixen Volumen im Vergleich zu einem 2D-Liveschall bedingt.

Die altersbedingte Abnahme des AFC in unserem Kollektiv ist nicht linear, sondern quadratisch. Dies sollte bei der Beratung von Kinderwunschpaaren berücksichtigt werden.

Der AFC ist in unserem Kollektiv ein wesentlicher Prädiktor für die zu erwartende Zahl an gewonnen Eizellen.

Die Daten sollten durch Folgestudien bestätigt werden.

P05

Protecting fertility: Effect of additive anti-inflammatory treatment in epididymitis

B. Klein¹, R. Wijayarathna^{1,2,3}, R. Middendorff¹, D. De Kretser^{2,3}, K. Loveland^{2,3}, M. Hedger^{2,3}, A. Meinhardt^{1,2,3}, IRTG 1871 "Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders"

¹Institute of Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ²Centre for Reproductive Health, Hudson Institute of Medical Research, Clayton; ³Department of Anatomy & Developmental Biology, Monash University, Melbourne, Australia

Bacterial epididymitis is a frequent disorder in men. Despite effective elimination of causative bacteria by antibiotic treatment, epididymitis can result in fertility prob-

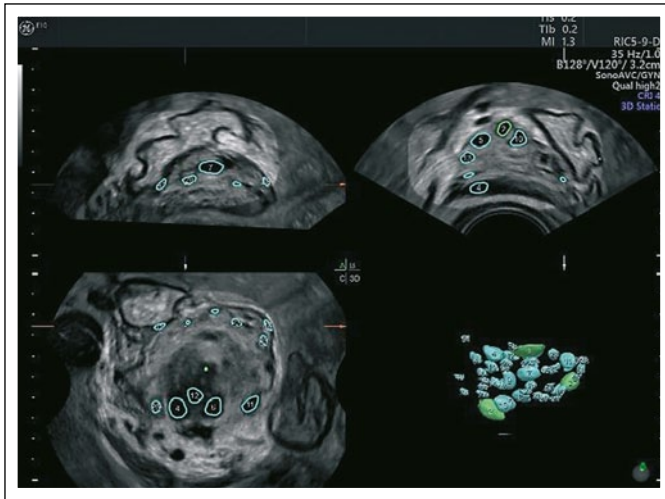


Abbildung 1: R. Menkhaus, et al. (P04). Sono AFC.

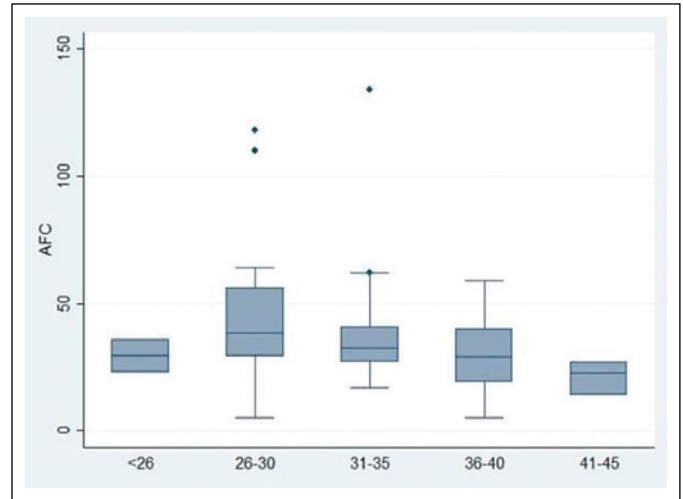


Abbildung 2: R. Menkhaus, et al. (P04). Verteilung AFC in den verschiedenen Altersklassen (Gesamtkollektiv).

lems. Possible reasons are obstruction of the epididymal duct and/or vas deferens, as well as scarring and fibrosis of the infected tissue.

The present study was undertaken in order to evaluate whether in addition to the bacterial challenge, the associated inflammatory response impacts on severity and persistence of epididymal tissue damage.

By using a murine model of induced bacterial epididymitis with uropathogenic *E. coli* (UPEC) as common causative pathogen, the effects of an antibiotic (levofloxacin) and/or anti-inflammatory (dexamethasone) treatment on the pathogenesis of epididymitis was assessed. UPEC-infected mice received levofloxacin and/or dexamethasone, starting on day 3 after infection, for 7 consecutive days. Mice were sacrificed at day 10 after infection and tissue was collected for histological (Azan stain, Sirius Red stain, H&E stain) and molecular analyses (RT-qPCR). Control animals were infected with UPEC but did not undergo any interventional treatment. A further group of control animals was injected with saline instead of bacteria.

Epididymal morphology of saline-injected animals indicates that ligation of the vas deferens (essential to this model to prevent downstream spread of infection) leads to mild histopathological changes, potentially due to changes in fluid flow and intra-organ pressure, nevertheless, with concurrent preservation of the epididymal cauda profile. Dexamethasone treatment fully re-stored tissue integrity and reduced transcript levels of pro-inflammatory markers (IL1-alpha, IL1-beta, TNF-alpha) in the cauda epididymis.

With regards to histopathological changes, treatment of UPEC-infected mice with levofloxacin or dexamethasone alone failed to clearly prevent tissue damage when compared to untreated UPEC-infected mice. Notably, cauda epididymal histopathology showed gross remodeling in both treatment groups, with ductal cross sections indicating ductal discontinuity due to granuloma formation. In that regard, sole antibiotic treatment seems to increase the number of granulomas, with the number of spermatogenic

ulomas being reduced. Nonetheless, dexamethasone treatment lead to a marked decrease of transcript levels of pro-inflammatory cytokines (IL1-alpha, IL1-beta, IL-6, TNF-alpha, Inhba) and neutrophil chemoattractants (CXCL-1 and -2), which, in comparison, were unchanged in antibiotic treated mice, i.e. similar to the respective levels in untreated UPEC animals.

Notably, despite a less prominent reduction in inflammation markers compared to dexamethasone-only treated animals, mice undergoing a combined treatment with levofloxacin as well as dexamethasone showed a clear improvement of epididymal integrity. Tubule cross sections suggest distinct preservation of ductal continuity with no granulomas as obstructive structures present.

In general, the use of anti-inflammatory drugs in infectious diseases is contraindicated. These preliminary data show that following sole dexamethasone or sole antibiotic treatment of bacterial epididymitis, similar histopathological changes are being induced. In contrast, the current data supports the possible benefits of an adjuvant anti-inflammatory intervention in addition to standard antibiotic therapy to preserve fertility following bacterial epididymitis.

P06

Gabe von Lenogastrim (Granocyte®) bei Frauen mit habitueller Abortneigung oder Implantationsversagen: Günstige Effekte auf Schwangerschafts- und Geburtenrate

B. Wetzka, A. Hanjalic-Beck
CERF, Freiburg, Deutschland

Fragestellung Bei habitueller Abortneigung (RSA) und Implantationsversagen nach assistierter Reproduktion (RIF) werden ähnliche Pathomechanismen vermutet. Die bisher empfohlenen Untersuchungen auf Thrombophilie, Auto-Antikörper und chromosomale Aberrationen beider Partner ergeben nur in

ca. 25 % der Fälle eine Pathologie. Weiterhin haben die sich daraus ergebenden therapeutischen Interventionen wie eine niedrig dosierte Heparin-Gabe nicht zu einem signifikanten Anstieg der Erfolgsrate geführt mit Ausnahme beim Vorliegen eines Antiphospholipidsyndroms [1].

Im Bereich der Implantationsstelle sind in der Decidua auffällig viele, spezielle natürliche Killerzellen (uNK) zu finden, die CD56-positiv sind, d. h., eher proliferationsfördernde Wirkung haben, und deren Aktivität u. a. durch „killer cells immunglobulin-like receptors“ (KIR) in Reaktion auf fetales HLA-C gesteuert wird. In aktuellen Studien wurden bei Frauen mit Fertilitätsstörungen wie RSA aktivierende KIR wie 2DS1 signifikant seltener gefunden [2]. Eine Unterstützung mit Wachstumsfaktoren wie „granulocyte colony-stimulating factor“ (G-CSF, z. B. Lenogastrim) kann hier zu einer Erhöhung der Geburtenrate führen [3, 4]. Unsere retrospektive Analyse soll den Effekt von Lenogastrim (Granocyte®) auf die klinische Schwangerschafts- und Geburtenrate bei 170 Frauen mit RSA bzw. RIF zeigen.

Methoden Zwischen 2014 und 2016 wurden 90 Frauen mit RSA (> 2 spontane Aborte, Ø 3,4 Aborte) und 80 Frauen mit RIF (Embryotransfer von > 5 gut entwickelten Embryonen nach IVF bzw. IVF-ICSI, Ø 7,9 Embryonen) in die Analyse aufgenommen. Das mittlere Alter beider Gruppen lag bei $36,5 \pm 3,9$ Jahren. Zunächst erfolgte die Standarddiagnostik (Ausschluss von Thrombophilie bzw. Antiphospholipidsyndrom, Schilddrüsenabklärung, Zytogenetik, bei uteriner Auffälligkeit Hysteroskopie). Bei unauffälligen Befunden bzw. im Falle von ausbleibender Schwangerschaft oder erneutem Abort trotz therapeutischer Maßnahmen wie z. B. prophylaktischer Antikoagulation oder Optimierung der Schilddrüsenfunktion wurde eine Analyse der KIR-Expression veranlasst (Labor Klein, Martinsried). Beim Fehlen mindestens einer der aktivierenden KIR (2DS1, 2DS3 und 3DS5) wurde Lenogastrim 13 Mill. Einheiten 2x/Woche subkutan appliziert („off label“). Die Gabe erfolgte bei RIF

ab Embryotransfer, bei RSA ab positivem Schwangerschaftstest bis zur 12. Schwangerschaftswoche. Eine kombinierte Therapie mit prophylaktischer Heparin-Gabe und Lenogastrim wurde bei 14 Frauen mit RSA und 4 Frauen mit RIF durchgeführt.

Ergebnisse Die aktivierenden KIR fehlten bei 69 % der untersuchten Patientinnen, eine Thrombophilie fand sich bei 16 %, autoimmune Antikörper wurden bei 29 % (ANA, TPO-AK, Cardiolipin-AK u./o. β -Mikroglobulin) und eine auffällige Zytogenetik bei 2,5 % der Frauen gefunden. Die klinische Schwangerschaftsrate nach der Gabe von Lenogastrim lag bei 87 % (RSA) bzw. bei 63 % (RIF), die aktuelle Geburtenrate (15.09.2017) liegt bei 63 % (RSA) bzw. bei 41 % (RIF). Die beobachteten Nebenwirkungen waren eine vorübergehende Leukozytose ohne klinische Symptomatik, selten traten vermehrtes Schwitzen oder Schwindel auf. Die bis jetzt geborenen Kinder zeigten ein normales Geburtsgewicht und waren bislang klinisch unauffällig.

Schlussfolgerung Die hier beschriebene Gabe von Lenogastrim beim Fehlen von aktivierenden KIR scheint die Schwangerschafts- und die Geburtenrate von Frauen mit RSA und RIF zu verbessern bei gleichzeitig guter Verträglichkeit. Weitere, möglichst randomisierte und prospektive Studien, insbesondere zur Dosierung und Applikationsdauer von Lenogastrim, sind dringend notwendig.

Literatur:

1. Diagnostik und Therapie beim wiederholten Spontanabort. Leitlinie der DGGG, 31.12.2013.
2. Hiby SE, et al. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2008; 23: 972–6.
3. Santjohanser C, et al. Granulocyte-colony stimulating factor as treatment option in patients with recurrent miscarriage. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013; 61: 159–64.
4. Scapellini F, et al. Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Hum Reprod* 2009; 11: 2703–8.

P07

Spontaneous contractions of the immature epididymal duct drive directional movement of exfoliated epithelial cells - protection against luminal obstruction?

D. Beyer¹, A. Mietens¹, D. Müller¹, D. Ježek², G. Schuler³, R. Middendorff¹

¹Institute of Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University Giessen, Germany; ²Institute of Histology and Embryology, Medical Faculty University of Zagreb, Croatia; ³Veterinary Clinic for Obstetrics, Gynaecology and Andrology, Justus-Liebig-University Giessen, Germany

Contractions of the adult epididymal duct are well known in the context of sperm transport. Some reports also described the presence of spontaneous contractions during development, but their function, regulation and relevance for fertility during adulthood are unknown.

We investigated tissue of the human prenatal epididymis and found cellular structures in the lumen of the epididymal duct. Using antibodies against neutral endopeptidase specific for epididymal epithelial cells [Thong et al., 2014] we could identify these structures as exfoliated epithelial cells. Such exfoliated cells were also found in the epididymal duct after birth. Time lapse imaging [Mietens et al., 2014] revealed directional movement of these luminal cells. The smooth muscle cell contracting agent noradrenaline accelerated the transport, whereas the relaxing drug sildenafil decelerated it. These transport effects correlated with spontaneous contractions of the ductal smooth muscle cell layer. As shown above for the cell transport, contractility also increased by noradrenaline and was diminished by sildenafil. Systematic functional, biochemical and morphological analyses revealed similar mechanisms underlying contractile activity within the immature and adult epididymal duct.

In summary, our data, showing directional movement of exfoliated cells by spontaneous contractions of the epididymal duct, might be responsible for organized waste disposal. This is of special importance during development to avoid infertility by luminal obstruction of the duct as seen in cystic fibrosis patients.

P08

IL-6 Receptor (CD126) expression on human spermatozoa

A. Djourabchi¹, G. Haid², J.-P. Allam²

¹Andrologie; ²Dermatologie, Universitätsklinikum Bonn, Germany

Subfertility in male is a frequent disorder which has many causes including sexual disorders, reduced spermatogenesis, genitourinary traumas, and testicular dysfunctions. Several studies investigated the cytokine levels in seminal plasma of men with fertility disorders. A major role in this process seems to be the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6). Little is known about its receptor the CD126 expression on human spermatozoa.

We analyzed semen samples of 140 patients (mean age 37.6; SD $\pm$ 7.73) with unexplained subfertility, presenting to the Department of Dermatology and Allergology Section Andrology at the Academic Hospital of Bonn. We performed flow cytometry (FACS) to obtain the CD126 expression level. Following, CD126+ cells were used for immunofluorescence staining to identify the location of CD126 expression on human spermatozoa.

FACS staining revealed that significant numbers of spermatozoa express CD126. Further on, in semen samples with high seminal plasma IL-6 significant higher expression of CD126 on spermatozoa could be detected. By means of immunofluorescence staining, we could identify the exact location of CD126 on a human spermatozoa. All experiments were performed at least three times. CD126 was clearly localized on the midpiece of a human spermatozoa.

To our knowledge, no group before investigated the CD126 expression on human spermatozoa. In addition, the exact location of CD126 on human spermatozoa has not been previously investigated. With this result, we showed that CD126 is expressed in the midpiece region of human subfertile men. The results show that CD126 may play an important role either in the motility or can have apoptotic impacts of human spermatozoa.

P09

Spontankonzeption vor geplanter Assistierter Reproduktionstechnik: Inzidenz und Outcome

S. Fill Malfertheiner^{1,2}, H. Class¹, D. Gutknecht¹, M. Bals-Pratsch¹

¹Zentrum für Fruchtbarkeitsmedizin, Profertilita, Regensburg; ²Klinik St. Hedwig – Barmherzige Brüder – Universitätsklinik Regensburg, Deutschland

Fragestellung Sterilität betrifft zwischen 8 und 12 % aller Paare im fortpflanzungsfähigen Alter. Ein gestörter Glukosestoffwechsel stellt einen wichtigen Sterilitätsfaktor dar. Eine optimale Einstellung des Glukose-/Insulinstoffwechsels und eine zielgerichtete Fertilitätsdiagnostik können in vielen Fällen noch vor einer geplanten Assistierten Reproduktionstechnik (ART) zur Spontankonzeption führen. Das orale Antidiabetikum Metformin stellt laut aktueller Studienlage eine wirkungsvolle Ergänzung oder Alternative zur Insulintherapie bei Gestationsdiabetes (GDM) dar, ist ein Standardmedikament in der Sterilitätstherapie bei Patientinnen mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom (PCOS) und weist ein fachübergreifendes vielfältiges Potential auf.

Ziel der retrospektiven Untersuchung war die Analyse des Risikoprofils von Frauen mit primärer/sekundärer Sterilität mit Spontankonzeption vor geplanter ART nach durchgeführter Sterilitätsdiagnostik Stufe III sowie präkonzeptioneller Optimierung bei auffälligem Glukose-/Insulinstoffwechsel. Zudem erfolgte die Gegenüberstellung der Studienpopulation mit Lebendgeburt versus Abort.

Methodik Eingeschlossen in die Studie wurden 129 Frauen (primärer/sekundärer Sterilität) mit Spontankonzeption vor geplanter ART. Alle Frauen hatten sich im Zeitraum vom 01.07.2011 bis zum 31.12.2013 zur Durchführung einer ART im Kinderwunschzentrum Profertilita vorgestellt. Bei allen Patientinnen wurde präkonzeptionell ein 75-g-oraler Glukosetoleranztest (oGTT) mit Insulin- und Glukosemessung durchgeführt. Bei Auffälligkeiten im Glukose-/Insulinstoffwechsel oder anamnestischen Risikofaktoren für einen GDM wurde die Behandlung mit Metformin als „off-labe-use“ begonnen. Im Verlauf der Schwangerschaft erhielten alle Frauen einen zweiten diagnostischen 75-g-oGTT zum Abschluss oder Nachweis eines Gestationsdiabetes (GDM). Der Schwangerschaftsverlauf sowie das Outcome (Lebendgeburt/Abort) wurden zusätzlich erhoben.

Ergebnis Die Spontankonzeptionsrate vor geplanter ART nach Vordiagnostik und so-

wie Vorbehandlung lag bei 21,9 % (n = 129). Bei 86 der 129 Patientinnen (66,7 %) kam es zur Entbindung eines gesunden Kindes. 32 Frauen erlitten einen Abort. 98 Frauen (76 %) wurden aufgrund eines PCOS (gesamt 51,2 %), einem hohen Risikoprofil für GDM oder Auffälligkeiten im Glukose/Insulinstoffwechsel mit Metformin behandelt. 55,8 % der Patientinnen (n = 72) entwickelten während der Schwangerschaft einen GDM. Die Unterschiede bezüglich der Geburten- und Abortrate mit und ohne Metformin waren nicht signifikant. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Gruppe der GDM-Patientinnen hinsichtlich der Entwicklung des Insulinbedarfs in Abhängigkeit zu der Metformineinnahme. 24,6 % der GDM-Patientinnen unter Metformintherapie entwickelten einen insulinpflichtigen GDM, während die Rate des insulinpflichtigen GDM ohne Metforminmedikation bei 53,8 % lag. Die Merkmale „Alter < 35 Jahre“ und „Ausschluss habituelle Aborte in der Vorgeschichte“ waren prädiktive Merkmale, um spontan zu konzipieren und ein gesundes Kind zur Welt zu bringen. Die PCOS-Rate war, in der Population der Frauen mit Lebendgeburt, signifikant höher (57 %) als bei den Abortpatientinnen (31,3 %). Es ergab sich insgesamt kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines GDM und einem PCOS sowie dem Auftreten eines GDM und der Metformineinnahme. 90 % der Geburten waren Termingeburten und 10 % Frühgeburten, 66,7 % der Kinder wurden vaginal entbunden, während 33,3 % per *Sectio caesarea* zur Welt kamen.

Schlussfolgerung Bei Kinderwunschpatientinnen sollte der Glukosestoffwechsel bereits präkonzeptionell untersucht und optimal eingestellt werden, um die Einnistungsbedingungen für den Embryo zu optimieren. Eine hyperglykämische Stoffwechsellaage mit Insulinresistenz kann zur Sterilität oder einem Frühabort führen. Deshalb ist bei Sterilitätspatientinnen mit einem Hochrisikoprofil für GDM eine frühzeitige Erkennung einer Glukose-/Insulinstoffwechselstörung wichtig. Die Ergebnisse der Studie zeigen den Erfolg der präkonzeptionellen Stoffwechseloptimierung durch die hohe Rate an Spontan- und Konzeptionen vor ART. Zudem unterstreicht die enorm hohe Rate an GDM bei Schwangeren mit Sterilitätsanamnese die Wichtigkeit, den Fokus in der Sterilitätsdiagnostik gezielt auch auf den Glukosestoffwechsel zu erweitern. Möglicherweise profitierten zudem gerade die PCOS-Patientinnen enorm von der Metforminmedikation, was die hohe Lebendgeburtenrate in dieser Patientinnengruppe erklärt.

Tabelle 1: M. Schütt, et al. (P10).

	Gesamt (n = 273)	Vaginale Applikation (n = 197)	Subkutane Applikation (n = 76)
Alter	35,9 (4,07)	36,2 (4,21)	35,2 (3,63)
Gewicht in kg	68,5 (14,0)	68,1 (14,2)	69,8 (13,6)
Größe in cm	167 (6,66)	167 (6,59)	168 (6,85)
BMI	24,5 (4,61)	24,4 (4,48)	24, (4,4)
Anzahl gewonnener Eizellen	7,95 (4,55)	7,71 (4,69)	8,58 (4,14)
Anzahl befruchteter Eizellen	6,26 (3,81)	6,09 (3,90)	6,70 (3,56)
Transfer			
Transfer Tag 2/3	111 (40,7 %)	87 (44,2 %)	24 (31,6 %)
Blastozystenkultur	162 (59,3 %)	110 (55,8 %)	52 (68,4 %)

Tabelle 2: M. Schütt, et al. (P10).

Anzahl übertragener Embryonen			
1	106 (38,8 %)	79 (40,1 %)	27 (35,5 %)
2	167 (61,2 %)	118 (59,9 %)	49 (64,5 %)
Stimulationsmedikation			
Rekombinantes FSH	210 (77,5 %)	146 (74,9 %)	64 (84,2 %)
FSH + LH	42 (15,5 %)	30 (15,4 %)	12 (15,8 %)
Sonstige	19 (7,01 %)	19 (9,74 %)	0 (0,00 %)
LH-Suppression			
Ganirelix	169 (62,8 %)	125 (64,8 %)	44 (57,9 %)
Nafarelinacetat	100 (37,2 %)	68 (35,2 %)	32 (42,1 %)

■ Assistierte Reproduktion (IUI, IVF, ICSI)

P10

Lutealphasensubstitution in der ART – vaginale Progesteronsubstitution versus subkutane Applikation in der täglich klinischen Anwendung

M. Schütt¹, B. Greene², M. Kalff-Suske³, U. Wagner⁴, V. Ziller³

¹Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Giessen;

²Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Marburg; ³Abteilung für gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Osteologie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Marburg; ⁴Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Marburg, Deutschland

Fragestellung Die Lutealphasensubstitution mit Progesteron stellt einen etablierten Bestandteil der ART-Behandlung dar. Seit Markteinführung einer subkutan injizierbaren, wässrigen Lösung besteht eine weitere alternative Applikationsform zur vaginalen Anwendung in Gel- oder Kapselform. Zulassungs- und Non-inferiority-Studien belegen in einem hoch vorselektierten Kollektiv die äquivalente Wirkung der subkutanen Injektion im Rahmen der Therapie. Offen blieb bislang die Frage einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den klinischen Alltag in einer nicht normierten Population.

Ziel der Untersuchung war daher der Vergleich der klinischen Schwangerschaftsraten pro Embryotransfer bei einer IVF- oder ICSI-Therapie im Frischzyklus unter Anwendung konventioneller, transvaginaler Progesterongabe im Vergleich zu subkutaner Progesteronapplikation an einer klinischen Alltagspopulation.

Methodik Die Auswertung erfolgte als retrospektiver Parallelgruppenvergleich. eingeschlossen wurden alle Patienten des Zentrums, die von August 2015 bis März 2017 eine künstliche Befruchtung erhielten und einen Frischtransfer bekamen. Im Rahmen der klinischen Routine wurden den Patienten beide Applikationsformen der Lutealphasensubstitution erläutert und die Patienten konnten sich frei für eine Therapieform entscheiden. Die prospektiv erfassten Daten zu den einzelnen IVF-Zyklen wurden nach dem Beobachtungszeitraum aus der klinischen Dokumentationssoftware Meditex® anonymisiert, exportiert, aufbereitet und retrospektiv mittels „R“ (<https://www.R-project.org>) statistisch ausgewertet.

Ergebnisse Es wurden insgesamt 273 IVF-Zyklen von 195 Patientinnen, welche im Zeitraum 01.08.2015–28.02.2017 am UKGM (Universitätsklinikum Giessen und Marburg) durchgeführt wurden, analysiert. Die Basisdaten zeigten ein für Deutschland typisches Kollektiv, das mit den Daten des IVF-Registers vergleichbar war (**Tab. 1, 2**).

Die klinischen, fortlaufenden Schwangerschaftsraten waren mit 36,5% (CI 29,6–44,0) in der vaginalen Progesteron-Gruppe und 39,9% (CI 28,7–52,3) in der subkutanen

Gruppe nicht signifikant unterschiedlich (OR 1,155, $p = 0,630$). Auch nach Adjustierung für die inkludierten Störfaktoren ergab sich kein Unterschied in den Schwangerschaftsraten (OR 0,956 [0,512, 1,786]; $p = 0,888$)

Schlussfolgerung Auch im klinischen Alltag zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der klinischen Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer im Vergleich zur Anwendung von herkömmlicher vaginaler Progesteron-Applikation und subkutaner Gabe. Für die Entscheidung der Therapieoptionen können damit Faktoren wie Anwendungsfreundlichkeit, Compliance, ökonomische Faktoren und individuelle Verträglichkeit in Betracht gezogen werden.

P11

Intracytoplasmic injection of bovine or equine sperm induces paternal pronuclear formation in in vitro matured bovine oocytes

L. Maurer, M. Schlipf, F. Kotarski, C. Wrenzycki
Clinic for Veterinary Obstetrics, Gynecology and Andrology, Chair for Molecular Reproductive Medicine, Giessen, Germany

Introduction Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is a successful method of assisted reproduction technology to treat male factor infertility. In addition to its clinical usefulness, ICSI is also a valuable research tool for studying fundamental aspects of gamete interaction during fertilization. When oocyte availability is limited, interspecies intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has been applied to study early events of fertilization. In all cases, oocyte activation is a prerequisite for decondensation of the sperm head and formation of the male pronucleus regardless of whether the spermatozoon enters the oocyte by injection or by fertilization. In contrast to humans and horses, additional oocyte activation is necessary for embryonic development after ICSI in cattle. However, this oocyte activation might also increase the number of parthenotes.

Objectives The objective of the present work was to establish a reliable method to generate bovine embryos via ICSI and to study male pronuclear formation after interspecies ICSI of equine sperm into matured bovine oocytes.

Materials and Methods Cow ovaries were obtained from a local abattoir. Cumulus-oocyte complexes isolated via the slicing method were matured for 22 hours in TCM199 supplemented with BSA and eCG/hCG. Oocytes for the ICSI experiments were mechanically denuded of their cumulus cells and selected for the presence of the first polar body. ICSI was performed in 10 µl droplets of TCM199 using frozen-thawed semen.

Bovine ICSI: Motile sperm with normal morphology were immobilized by tail scoring with the tip of the injection pipette before being aspirated into it. After ICSI, the oocytes were activated by incubation in 5 µM ionomycin for 5 min and subsequently cul-

tured for 3 h in TALP medium. The oocytes were then incubated in 2 mM 6-DMAP for 3 h. Sperm-injected and control oocytes which were only activated (CA) or sham-injected and activated (SHAM+CA; parthenogenetic controls) were cultured in SOF medium. IVF-derived zygotes generated via a standard protocol were also analyzed.

Interspecies ICSI: Stallion sperm used for ICSI was stained with MitoTracker® Green FM to visualize the midpiece. A single sperm was immobilized by the application of several piezo impulses and then injected into a matured oocyte, also using electric pulses to draw a whole in the zona pellucida, open the oolemma and to activate the oocyte. Parthenogenetic (sham-injected) controls were included.

After the ICSI procedure with sperm of both origins, the injected oocytes were cultured for 18 hours in SOF medium. To identify the success of activation and pronuclear formation they were stained with Hoechst 33342.

Results *Bovine ICSI:* A correct pronucleus formation (2PB/2PN) rate of 20.9% (27/129) was determined in the zygotes out of the ICSI group. After 18 hours of conventional IVF, 50.7% (35/69) zygotes did show 2 polar bodies and 2 pronuclei. In the zygotes of the parthenogenetic control groups, rates of chemical activation or CA and sham-injection indicated by the generation of haploid embryos (2PB/1PN) were 48.7% (56/115, CA) and 47.3% (43/91, SHAM+CA).

Interspecies ICSI: A paternal pronuclear formation rate of 23.5% (16/68) was detectable in zygotes stemming out of the ICSI group. No pronuclear formation could be observed (0/65) after sham-injection.

Conclusion Bovine embryos can be generated via ICSI in a reasonable number. Furthermore, equine sperm cells can also decondense and form paternal pronuclei in bovine oocytes after ICSI.

Acknowledgements The authors are grateful to Dr. Dorothee Weiß for her assistance to set up the ICSI procedure.

First both authors contributed equally.

P12

Klinefelter syndrome and fertility – Impact of X-chromosomal inheritance on spermatogenesis

S. Franik¹, D. Smeets², G. van de Zande², I. Gomes², K. D'Hauwers³, D. Braat¹, K. Fleischer¹, L. Ramos¹
¹Radboudumc, Obstetrics and Gynaecology;
²Radboudumc, Human Genetics; ³Radboudumc, Urology, Nijmegen, Netherlands

Background With the use of testicular sperm extraction (TESE), spermatozoa can be retrieved in about 50% of men with KS. In combination with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) they can potentially still father their own children. The reason for absence or presence of spermatozoa in half of men with KS remains unknown. There, the objective of this study is to determine if paternal or maternal inheritance of the additional X-chromo-

some can predict the absence or presence of spermatogenesis in men with Klinefelter syndrome (KS).

Study Design All patients with KS who have had a TESE at our university medical centre were eligible for inclusion in this study. Buccal swabs were taken to compare X-chromosomal markers to determine the parental origin of both X-chromosomes in the males with KS.

Results The results of our analysis show that in 8 of 35 (23%) patients spermatozoa were retrieved by single or double TESE. Different levels of spermatogenesis appeared to be present in 19 of 35 (54%) participants by combining the results of spermatozoa retrieval, and cytological as well as histological analysis of the retrieved testicular tissue, meaning that spermatogonia are present but not always can mature up to spermatozoa. From the 9 KS-trios that were further genetically analyzed for inheritance origin, no evidence of a correlation between the maternal or paternal origin of the extra X-chromosome and the presence of spermatogenesis was found. There was no evidence for a difference of hormonal levels (testosterone, LH and FSH) measured prior to the TESE between the TESE positive and negative subgroups.

Conclusion In conclusion, the maternal or paternal origin of the additional X-chromosome in men with KS does not predict the presence or absence of spermatogenesis.

■ Klinische Embryologie

P13

Die Re-Vitrifikation von Embryonen hat keinen Einfluss auf die fortlaufende Implantationsrate im Vergleich zu einfach vitrifizierten Embryonen

K. Pohl, C. Kraus, D. Gutknecht
profertilita, ART Labor, Regensburg, Deutschland

Fragestellung Nach der Kultur aufgetauter Vorkernstadien und dem Embryotransfer können planwidrig Embryonen übrig bleiben. Paaren wurde angeboten, diese Embryonen erneut zu vitrifizieren. Obwohl die Methode der Vitrifikation eine sehr schonende Methode der Kryokonservierung, mit hohen Überlebensraten ist [1–5], gibt es nur sehr wenige Daten zum Überleben und zur Implantation re-vitrifizierter humaner Embryonen: es wurde keine Abnahme der Überlebensrate [6] bzw. der Schwangerschafts- und Implantationsrate [7, 8] re-vitrifizierter Embryonen vs. einfach vitrifizierter Embryonen festgestellt. Mit dieser Studie wollen wir die Frage beantworten, ob die Re-Vitrifikation humaner Embryonen deren Entwicklungsfähigkeit bzw. Implantationsfähigkeit beeinträchtigt.

Methodik Es wurden 1333 Auftauzyklen nach Vitrifikation (Kitazato, Cryotop) zwischen 01.10.2011 und 01.08.2017 retrospek-

tiv ausgewertet. In 133 Auftauzyklen (92,5 % nach Auftauen im PN-Stadium, 7,5 % nach Auftauen im Embryo-Stadium) wurden 249 Embryonen erneut vitrifiziert (Re-Vitrifikationsrate von 13,8 % aller aufgetauten PN). Davon wurden 98 Re-Vit-Embryonen erneut aufgetaut und transferiert. Die fortlaufende Implantationsrate (IR) der Re-Vit-Embryonen wurde mit der IR von 737 aufgetauten Embryonen nach einfacher Vitrifikation (Vit) verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test für relative Werte und mit dem t-Test für numerische Daten.

Ergebnisse Die Patienten der Vit- und der Re-Vit-Gruppe sind vergleichbar hinsichtlich Alter der Frau, BMI und die Überlebensrate nach dem Auftauen (99 % Vit vs. 100 % Re-Vit, $p > 0,9$). Die Anzahl der aufgetauten und der transferierten Embryonen ($1,5 \pm 0,5$ Vit vs. $1,4 \pm 0,5$ Re-Vit, $p < 0,04$) war signifikant kleiner in der Re-Vit-Gruppe. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der fortlaufenden Schwangerschaftsrate (Herzaktivität 7. SSW) (29,1 % Vit vs. 26,0 % RE-Vit; $p > 0,6$) oder in der fortlaufenden Implantationsrate (22,4 % Vit vs. 21,4 % Re-Vit, $p > 0,8$) gefunden.

Schlussfolgerung In dieser retrospektiven Studie konnte kein Effekt der zweifachen Vitrifikation auf die Überlebensrate, die Implantationsrate und damit auf die Entwicklungsfähigkeit zweifach vitrifizierter Embryonen nachgewiesen oder angedeutet werden. Damit stützen unsere Daten die Studie von Kumasako et al. [7], die ebenfalls keine Abnahme der Schwangerschafts- und Implantationsrate feststellen konnten. Obwohl die Fallzahlen beider Studien klein sind, deuten beide darauf hin, dass die Not-Re-Vitrifikation aufgetauter Embryonen eine sinnvolle Alternative zur Verwerfung dieser Embryonen darstellt.

Literatur:

1. Isachenko V, Folch J, Isachenko E, Nawroth F, Krivokharченко A, et al. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology* 2003; 60: 445–52.
2. Sheehan CB, Lane M, Gardner DK. The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum Reprod* 2006; 21: 2978–84.
3. El-Gayar M, Gauly M, Holtz W. In vitro and in vivo survival of mouse blastocysts after repeated vitrification with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo Letters* 2010; 31: 454–9.
4. Fathi R, Valojerdi MR, Yazdi PE, Ebrahimi B, Alipour H, Hassani F. Development of 4-cell mouse embryos after re-vitrification. *Cryobiology* 2012; 64: 23–6.
5. Shibao Y, Fujiwara K, Kawasaki Y, Matsumura K, Hyon SH, et al. The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated α -poly-L-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage. *Cryobiology* 2014; 68: 200–4.
6. Lierman S, Van den Abbeel E, De Sutter P. Vitrification of human blastocysts previously cryopreserved by slow controlled-rate freezing at the cleavage stage. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31: 447–51.
7. Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril* 2009; 91: 383–6.
8. Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, Kort HI, Nagy ZP. Two successful pregnancies obtained following oocyte vitrification and embryo re-vitrification. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 346–9.

■ Reproduktionsbiologie/Grundlagenforschung

P14

Idiopathic male infertility: LINE-1 suppression and nucleosome preservation patterns in human sperm

S. Gies¹, N. Öztürk¹, S. W. Kürschner¹, K. Steger², H.-C. Schuppe³, K. Ni¹, N. Rogenhofer⁴, U. Schagdarsurengin¹

¹Section Epigenetics of the Urogenital System;

²Section Molecular Andrology; ³Section Conservative Andrology/Cryobank, Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Giessen;

⁴Department of Gynecology and Obstetrics, Division of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, Clinical Centre of Ludwig-Maximilians-University München, Germany

Aberrations in the sperm epigenome are associated with idiopathic male infertility. Pathological changes were observed at imprinting genes and developmental promoters at DNA methylation and histone-modification levels. During spermiogenesis a nucleosome-to-protamine exchange occurs to compact and protect the paternal DNA. In human, approximately 5% of the nucleosomes remain unexchanged. Our previous work revealed that the majority of sperm nucleosomes retained in sperm chromatin associated with repetitive DNA elements like LINEs (long interspersed nuclear elements) and SINEs (short INEs). LINE-1 (L1) is a retrotransposon, which is normally suppressed by DNA methylation, and that makes up to 17 % of the human genome. Therefore, it can be used as a surrogate for global DNA methylation levels and a marker for epigenetic impairments, respectively. Changes in L1 methylation can lead to an increased L1 activity and have serious consequences on the function of sperm chromatin. DNA methyltransferases (DNMTs) regulate the maintenance (DNMT1) and de novo methylation (DNMT3A/3B). In somatic cells, trimethylation of Lysine 20 at Histone 4 (H4K20me3), a marker of constitutive heterochromatin, is associated with repression of LINEs and SINEs. The first aim of this study was to analyse if spermatozoa of subfertile patients and healthy donors differ in DNMT1/3A mRNA, L1 mRNA, and L1 methylation levels (Mann-Whitney U-test [MWU] or Spearman rank correlation [SRC]). The second aim was to investigate the presence of H4K20me3 in mature sperm and healthy human testis tissue.

For epigenetic studies, ejaculates from 91 donors and 48 subfertile patients, who underwent an ICSI procedure, were collected. Through the swim-up technique patients' motile and donors' motile (M) as well as immotile (IM) spermatozoa were separated and analyzed individually. DNA and RNA were isolated using TriFast followed by Phenol-Chloroform Extraction. Isolated DNA was used directly for Elisa (Global DNA Methylation – LINE-1 Kit, Active Motif) and bisulfite con-

verted (EZ DNA Methylation™ Kit, Zymo Research) prior pyrosequencing (PyroMark Q24 CpG LINE-1, Qiagen) in order to analyse the global L1 methylation status. RNA was reverse transcribed (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega) in cDNA and subsequently quantified by qPCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Biorad). Human testis tissue samples exhibiting normal spermatogenesis were used for immunohistochemistry staining with hematoxylin-eosin. Sperm protein samples were isolated using a Tris-Urea lysis buffer and sonication. Specific proteins were identified by western blot analysis.

DNMT1/3A mRNA levels were significantly reduced in patients (0.92 ± 0.47 , $p = 0.001$ and 0.44 ± 0.67 , $p < 0.001$, respectively; MWU) compared to donors' M (1.27 ± 1.50 and 1.80 ± 2.61 , respectively). In donors' IM, L1 methylation and mRNA levels ($55.90 \% \pm 11.57$, $p < 0.001$ and 2.18 ± 2.70 , $p = 0.002$, respectively; MWU) were significantly increased compared to patients' (44.29 ± 12.52 and 0.10 ± 1.96 , respectively; MWU) and donors' M (42.60 ± 14.80 and -0.84 ± 1.94 , respectively; MWU). Among M, high L1 mRNA levels were significantly correlated to L1 demethylation ($p = 0.014$, $r = -0.317$; SRC). Interestingly in the patient subgroup, showing a positive pregnancy ($n = 21$), the fertilization rate was significantly positive correlated to L1 methylation ($p = 0.009$, $r = 0.555$; SRC). H4K20me3 was detectable in spermatogonia, preleptotene and leptotene spermatocytes, round spermatids and early elongating spermatozoa. Western blot confirmed the presence of H4K20me3 in mature sperm of healthy donors.

Our study shows that DNMT1/3A mRNA levels are significantly reduced in subfertile patients' motile spermatozoa. Moreover, in motile spermatozoa L1 methylation is significantly correlated to L1 inactivation. In contrast, immotile spermatozoa possess significantly increased L1 mRNA and L1 methylation levels. Furthermore, the fertilization rate after ART is significantly positive correlated to global L1 methylation of utilized sperm. At various stages of human spermatogenesis the heterochromatin marker H4K20me3 is present and retained in spermatozoa of healthy donors.

P15

Effects of ageing on the testis – Constant spermatogenic output appears to be maintained by enhanced spermatogonial proliferation in elderly men

E. Pohl, J. Wistuba, S. Kliesch, J. Gromoll
Centre of Reproductive Medicine and Andrology,
University Hospital of Münster, Germany

Introduction First-time parenthood occurs increasingly delayed to later life period in western societies, mainly for socio-economic reasons. Several studies report abnormalities in sperm parameters of aged men such as decreased sperm counts and sperm motility [1–

3]. Consequently, the risk of fertility decline has increased in parents of advanced age. It is generally assumed that increasing paternal age is associated with elevated risk of congenital disorders in the offspring attributed to point mutations in the male germ cells [4]. How ageing affects the testis and the testicular germ cells, e.g. spermatogonia, has been poorly examined so far. Therefore, we aimed at determining age-dependent changes in human testis with regard to overall testicular architecture and spermatogonial dynamics.

Material and Methods Testicular biopsies exhibiting normal spermatogenesis were obtained from men undergoing surgery either due to obstructive azoospermia or because of early stages of prostate cancer and assigned according to age: groups (1) 28.8 ± 2.7 ; (2) 48.1 ± 1 , and (3) 71.9 ± 6.8 years ($n = 8$; mean $\pm$ SD). Samples were histologically approved for normal spermatogenesis.

Results Morphometric analyses revealed no differences in tubular structure between the different age groups. We observed no quantitative changes in the MAGE A4- (melanoma antigen family A4-) expressing spermatogonia and in the A-dark subpopulation. Testes from elderly men exhibit an increased proportion of PCNA-positive spermatogonia with $35.4\% \pm 7$ (age group 3) versus $21.3\% \pm 11.3$ (age group 1) and $25.8\% \pm 8$ (age group 2), respectively. However, the relative number of CREM positive spermatids in relation to proliferating spermatogonia is decreased with 1.76 ± 0.51 (age group 3) versus 3.82 ± 2.4 (age group 1) and 4.5 ± 4.24 (age group 2), respectively (median $\pm$ IQR; Kruskal Wallace: $p < 0.05$).

Conclusion In testes with normal spermatogenesis we observed no age-related quantitative effects on the overall testicular architecture or on the two distinct spermatogonial populations; with A-dark representing reserve spermatogonia. In the group of elderly men enhanced proliferation of spermatogonia was detected. In line with that, the number of round spermatids in relation to proliferating spermatogonia decreases in the cohort of aged men indicating that more proliferating spermatogonia are required to maintain spermatogenic efficiency. Since the number of round spermatids is not affected, meiosis seems not to be impaired during ageing. Whether the higher proliferation activity of spermatogonia is associated with a risk of impaired germ cell quality possibly due to increased mutational rate remains to be elucidated.

References:

1. Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, et al. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2003; 18: 447–54.
2. Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 327–39.
3. Begueria R, García D, Obradors A, Poisot F, Vassena R, et al. Paternal age and assisted reproductive outcomes in ICSI donor oocytes: is there an effect of older fathers? *Hum Reprod* 2014; 29: 2114–22.
4. Kovac JR, Addai J, Smith RP, Coward RM, Lamb DJ, et al. The effects of advanced paternal age on fertility. *Asian J Androl* 2013; 15: 723–8.

P16

The role of the cilia-related gene *CBE1* in spermatogenesis

C. Pleuger^{1,2}, D. Fietz¹, K. Hartmann¹, H.-C. Schuppe³, W. Weidner³, S. Kliesch⁴, M. Baker⁵, M. O'Bryan², M. Bergmann¹

¹Institute for Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ²School of Biological Sciences, Monash University, Clayton, Australia; ³Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, University Hospital Giessen; ⁴Centre of Reproductive Medicine and Andrology University Hospital Münster, Germany; ⁵School of Environmental and Life Science, University of Newcastle, Australia

Male germ cell differentiation is a highly dynamic process whereby undifferentiated spermatogonial stem cells undergo many modifications to become highly polarized spermatozoa which are able to fertilize the egg. One of the key factors in spermatogenesis are microtubules which provide not only a high cytoskeletal dynamic during cell division processes but also function as „highway“ for intracellular transport mechanism in the remodelling phase of haploid germ cells.

CBE1 (ciliated bronchial epithelium 1), named after its expression in ciliated cells within the respiratory tract, is a largely uncharacterised protein which was identified in haploid germ cells as well. Previous investigations in mice showed that *CBE1* is clearly co-localised with alpha-tubulin at microtubules of the spermatid manchette [1]. Preliminary investigations showed that it is significantly reduced in sperm of infertile men. We hypothesize that *CBE1* has a role in protein transport mechanisms during spermiogenesis and therefore to sperm motility.

Firstly, we have analyzed the precise expression pattern of *CBE1* in human spermatogenesis on mRNA (RT-qPCR and *in situ* hybridisation) and protein level (Western blot, immunohistochemistry, immunoelectron microscopy) using testicular biopsies showing normal ($n = 10$) and impaired spermatogenesis such as an arrest at the level of primary spermatocytes ($n = 8$) and round spermatids ($n = 8$). Using CRISPR-Cas9 technology, we knocked out the testis-specific isoforms of *CBE1* in mice to analyze the particular influence of these variants to spermatogenesis male fertility.

In the human testis, *CBE1* mRNA is expressed in pachytene primary spermatocytes and the protein is clearly associated with microtubules of the manchette, the HTCA (head tail coupling apparatus) as well as the flagellum during spermiogenesis and absent, or significantly reduced, in human mature spermatozoa indicating that *CBE1* is important for spermatid development but not for the maintenance of mature sperms as a structural component of the flagellum.

Specimen showing an arrest at level of spermatids showed a reduced mRNA expression and immuno-negative elongating spermatids supporting a function of *CBE1* in the development of sperm motility [2].

The generated mutation in the testis-specific variants of *CBE1* in mice did not lead to infertility or subfertility. Gene analysis showed different protein coding variants. Although the testis-specific variants are significantly down-regulated, the short forms are not affected by the mutation site and seem to compensate the loss of function of the long forms. Therefore, we are analyzing the full knock-out of all variants in IMCD3 cells (CRISPR-Cas9) to analyze the molecular function and interaction partner (BioID technology) of *CBE1* in ciliogenesis.

Research funded by DFG GRK1871/1.

References:

1. Matsuoka Y, Miyagawa Y, Tokuhiko K, Kitamura K, Iguchi N, et al. Isolation and Characterization of the Spermatid-Specific Smrp1 Gene Encoding a Novel Manchette Protein. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 967–75.
2. Pleuger C, Fietz D, Schuppe HC, Weidner W, Kliesch S, et al. Expression of *CBE1* (Ciliated Bronchial Epithelium 1) during human spermatogenesis. *Fertil Steril* 2017; 108: 47–54.

P17

A NanoString analysis of human granulosa cells, granulosa cell tumours and KGN cells

K. Bagnjuk¹, H. Bartsch², T. Straub³, U. Berg⁴, D. Berg⁴, L. Kunz⁵, D. Mayr², A. Mayerhofer¹

¹Anatomie III – Zellbiologie, Planegg-Martinsried; ²Pathologie; ³Core Facility Bioinformatik, Planegg-Martinsried, LMU München; ⁴Gemeinschaftspraxis Reproduktionsmedizin, München-Bogenhausen; ⁵Biologie II – Neurobiologie, Planegg-Martinsried, LMU München, Germany

Granulosa cell tumours (GCTs) of the ovary are sex cord stromal tumours and much less common than epithelial ovarian cancer. These tumours account for about 1% of all ovarian neoplasms and for 5% of malignant ovarian tumours. 95% of these tumours occur in women with an average age of 55 years (adult type), 5% in children and young adults (juvenile type). In more than 90% of the adult subtype a missense somatic point mutation in the *FOXL2* gene is found. GCTs of the ovary are considered a low-grade malignancy with recurrence rate between 20–30%, including metastases. The biological factors that determine tumour behavior and prognosis are largely unknown and do not correlate with microscopic findings. Tumour stage (analog to carcinomas) and proliferation rate (Ki-67) are the only prognostic factors. The KGN cell line [Nishi et al., *Endocrinology* 2001] is being widely used as a model for the study of human adult GCTs. KGN cells are steroidogenic and express follicle-stimulating hormone receptors. However, they have an abnormal karyotype and are heterozygous for the *FOXL2* mutation C134W, which is representative for adult GCTs [Schrader et al., *PLOS ONE* 2009; Jamieson et al., *Modern Pathology* 2010]. A recent transcriptomic analysis of adult type GCTs and KGN cells, employing Agilent Whole Human Genome Microarrays [Alexiadis et al., *Oncotarget* 2016], indicated that substantial differences exist between KGN cells and primary ad-

vanced stage 3 adult GCTs. KGN cells are derived from an aggressive form of recurrent metastatic cancer. To take into account proliferative behavior, we divided human primary GCTs into groups with a proliferative index Ki-67 < 1% (n = 3), Ki-67 = 10% (n = 2) and Ki-67 > 10% (n = 3) and compared these groups with KGN cells, using the NanoString technology. This multiplex gene analysis system gives users the ability to examine and to relatively quantify 770 genes from 13 cancer-associated pathways. The results obtained indicate that GCTs with a Ki-67 = 10% are closest related to KGN cells. In this group only 18% of examined genes vary significantly with FoldChange ≥ 2 compared to the other GCTs (Ki-67 < 1%, 25% with FoldChange ≥ 2 and Ki-67 > 10%, 23% with FoldChange ≥ 2). In a next step we used pools (at least two patients per group) of IVF-derived human primary granulosa cells (GCs, n = 3), cultured them for three and seven days and compared these pools to KGN cells and GCTs, using the same technique and a Principle Component Analysis (PCA). Although the method we used was biased (only cancer pathways), we found that KGN cells resemble GCs more than they resemble GCTs. To gather unbiased data we are planning to carry out a mass spectrometry analysis of KGN cells and GCs. In summary, the gene profile of KGN cells differs substantially, i.e. up to 25 %, from the one of primary adult GCTs. On basis of our PCA we hypothesize that KGN cells are close to primary GCs and may therefore serve as a model for proliferating pre-ovulatory human GCs.

Supported by DFG MA 1080/1 and MA 4790/4-2

P18

Cellular senescence in human testicular peritubular cells

N. Schmid¹, F. Flenkenthaler², K.-G. Dietrich¹, F.-M. Köhn³, J. U. Schwarzer⁴, T. Fröhlich², G. J. Arnold², A. Mayerhofer¹

¹Biomedizinisches Centrum München, Lehrstuhl Zellbiologie – Anatomie III, Planegg-Martinsried; ²Gene Center, Laboratory for Functional Genome Analysis LAFUGA, LMU München; ³Andrologikum München; ⁴Andrologie Centrum München, Germany

Reproductive functions in men are reported to decline with increasing age, resulting in reduced spermatogenesis and lower testosterone production. The biological mechanisms of this complex ageing process are poorly understood, yet. Whether and to what degree the human testes may age structurally and functionally, is also not well known. However, among others, age-related alterations of the tubular wall in testes of old men were reported with respect to fibrotic changes. Human testicular peritubular cells (HTPCs), build this wall, can be isolated and cultured and are thus accessible to investigation. Cultured HTPCs can be passaged several times until signs of cellular senescence occur. They include a reduced ability to proliferate and a co-incident, significant increase in cell size. Fur-

thermore, senescent HTPCs also express senescence-associated β -galactosidase (SA- β -GAL). To explore consequences of cellular senescence further, we compared early passages of HTPCs with late passages of HTPCs derived from 7 identical donors, aged between 39–55. To study known peritubular factors, a qPCR and a proteome analysis were implemented. Both were performed with old, senescent (high passages, 9–14) and young, pre-senescent (low passages, 4–7) HTPCs. Results showed that characteristic markers for HTPCs, namely smooth muscle actin and androgen receptor, also pro-inflammatory factors, including COX2, IL-6, IL1b, MCP-1 and PTX3 were not significantly altered. Likewise, the levels of the growth factor GDNF was not changed. The LC-MS/MS revealed, however, that the proteome of young and old HTPCs showed a considerable altered abundance of nuclear and mitochondrial proteins. The secreted proteins (“secretome”) were also strikingly different. Interestingly, for example higher levels of macrophage inhibiting factor (MIF) were found and this pro-inflammatory cytokine could contribute to an inflammatory testicular environment. If applicable to the in vivo situation, the results imply that human peritubular cells may age in a particular way, change their cellular phenotype and thereby may contribute to testicular ageing.

Supported by DFG (MA 1080/27-1; AR 362/9-1

P19

NLRP3 is expressed by somatic cells of the testis

L. Walenta¹, N. Schmid¹, A. Tiefenbacher¹, J. U. Schwarzer², F.-M. Köhn³, L. Strauss⁴, M. Poutanen⁴, A. Mayerhofer¹

¹Biomedical Center, Cell Biology – Anatomy III, Planegg-Martinsried, LMU München; ²Andrologie Centrum München; ³Andrologikum München, Germany; ⁴Turku Center for Disease Modeling and Department of Physiology, University of Turku, Finland

As a crucial part of the innate immune system the NLRP3 inflammasome is involved in pathogen and damaged cell removal, as well as the regulation and modulation of the immune response. NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) is known as sensory part of the multimeric inflammasome complex that forms in the cytosol of immune cells in response to various exogenous and endogenous stimuli. There are few reports on NLRP3 expression in non-immune cells, but recently mouse Sertoli cells were discovered to harbor a functional NLRP3 inflammasome.

In this study we investigated NLRP3 expression in murine and human testis sections using immunohistochemistry. We further studied expression on transcription level via RT-PCR of whole testis lysates and lysates from human testicular peritubular cells (HTPCs) and compared expression levels by quantitative RT-PCR.

NLRP3 was found in mouse Sertoli cells, distinctly stretching from the basal to the luminal side of the seminiferous tubule, but sparing the perinuclear area. Unexpectedly, staining was seen in peritubular myoid cells of the seminiferous tubules, albeit at lower intensity and distributed heterogeneously among sectors of the tubular wall. To study the possible involvement of NLRP3 in subfertile or infertile pathologies, a systemic mouse model of infertility was used, the *AROM+* mouse line. These transgenic mice overexpress human aromatase and with age develop phenotypic characteristics resembling human male infertility. When comparing NLRP3 staining in testicular sections from young wild type (WT) to *AROM+* mice, differences between staining location, i.e. Sertoli cells, and intensity did not become evident even though phenotypic changes in the mutant were already emerging. In contrast, in old *AROM+* with an obvious pathology NLRP3 expression was more pronounced and additionally present in interstitial cells (presumably macrophages and Leydig cells). The levels of *NLRP3* transcripts in whole testis lysates were significantly increased in young *AROM+* and further increased with age compared to WT. Elevated *Nlrp3* levels in *AROM+* testes were reduced when mice were treated with an aromatase inhibitor. This links the hormonal situation to activation of NLRP3 in mice.

To explore the possible association of NLRP3 to infertility in men, human testicular sections were investigated. NLRP3 staining, in general, paralleled the pattern detected in mouse testes. Sertoli cells and specifically peritubular cells were immuno-positive. In infertility patients suffering from Sertoli cell only syndrome or mixed atrophy, NLRP3 expression appeared more prominent, especially in fibrotically thickened sectors of the tubular wall. In addition, NLRP3 as well as the adaptor and effector component of the NLRP3 inflammasome were verified on transcript level in isolated human peritubular cells.

In conclusion, Sertoli and peritubular cells express the global damage sensor NLRP3. Both cell types are involved in immune surveillance of the testis. NLRP3 expression in the testis intensified with the severity of phenotypic infertility hallmarks in mice and men. Thus, NLRP3 also appears to play a role in male infertility. Yet, its functions and regulation in the testicular immune response and in infertility remain to be investigated.

Supported by DFG MA 1080/23-1 and MA 1080/27-1 and the DAAD/Academy of Finland

P20

Membrane-bound steroid hormone-receptors and their expression pattern in testis tissue of the human and different domesticated species

K. Hartmann¹, D. Fietz¹, S. Kliesch², F. Wagenlehner³, M. Bergmann¹

¹Institute for Veterinary-Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig-University, Giessen;

²Department of Clinical Andrology, Centre for Reproductive Medicine and Andrology, Münster;

³Clinic for Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig-University, Giessen

There is a growing body of evidence that steroid hormones not only act via classical nuclear receptors (androgen receptor AR, estrogen receptors α ESR1 and β ESR2). Additionally they are able to bind to membrane-bound receptors leading to a more rapid cell answer and non-genomic effects via pathways involving G proteins and classical second messengers such as Ca^{2+} , cAMP and nitric monoxide (NO) (reviewed in [1, 2]). The aim of our study was to investigate the presence and localization of four known membrane-associated receptors for different types of sex steroids in the testicular tissue of humans and compare it to the distribution pattern in domesticated species including bull, stallion, boar, and dog.

We chose G protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER-1) for estrogens, ZIP-9, a member of the Zinc transporting protein family and G protein coupled receptor C6A (GPR-C6A) for androgens, and progesterone receptor α (PAQR7) for progesterone. RT-PCR revealed the mRNA expression of all receptors in human and animal testis tissue. Subsequently, we performed immunohistochemical analysis (IHC) using antibodies generated against human antigens to localize the expression patterns on protein level. We were able to detect a common expression pattern for GPER-1 in contractile cells like smooth muscle vascular cells, peritubular myoid cells (PTMC), and some interstitial cells. In contrast, the detection of GPER-1 inside the seminiferous tubules differed between species. Whereas no staining was detected in human tubules, Sertoli cells (SCs) of the boar were immunopositive with a stage-specific signal intensity. All other examined species showed a stage-specific staining of haploid germ cells (GCs) starting with a low staining intensity in early round spermatids and the strongest signal in elongating and elongated spermatids. GPER-1 signal vanished stage-specifically before sperm release. GPRC6A was located in the cytoplasm and cell membranes of a subpopulation of spermatogonia, all pachytene spermatocytes and also haploid spermatids. SCs and Leydig cells (LCs) were immunonegative. ZIP-9 was detected in LCs and step 8 elongated spermatids exclusively. PAQR7 showed a positive signal in SCs, which was further supported by an additional positive immunostaining of SCs in a patient with Sertoli cell only syndrome and by RT-PCR using two different human Sertoli cell

lines (FS1, HSEC). GCs displayed no immunoreactivity for PAQR7.

Expression patterns of GPRC6A, ZIP-9 and PAQR7 were rather similar in testicular biopsies of all examined species supporting an overall or common biological function of these membrane-associated receptors in spermatogenesis. In contrast to that, there could be an additional function for GPER-1 in haploid GCs of animals examined or SCs of boars in contrast to men. Quantitative analysis of receptor expression as well as functional assessment are needed to further elucidate the biological significance of membrane-bound steroid receptors for spermatogenesis in humans and animals.

References:

1. Walker WH. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365: 1557–69.
2. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 389: 71–83.

P21

Effect of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on early embryo development

T. Pockl¹, S. Schlatt¹, M. Boian², V. Nordhoff¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital of Münster; ²Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Germany

Introduction Growth factors as Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) are found in the reproductive tract of several species including mice and men. In the reproductive tract they are involved in the maternal-fetal interface, ovulation, embryo development, embryo implantation and placental growth. The supplementation of media with GM-CSF leads to an increased cell proliferation and a reduced apoptosis rate in pre-implantation embryos. GM-CSF supplemented media are also used in human assisted reproductive techniques (ART). Incubation of early human embryos in a GM-CSF containing medium results in increased life birth rates in patients with recurrent miscarriages. It is not known how GM-CSF influences pre-implantation development and especially which cell lineage, the trophectoderm (TE) or the inner cell mass (ICM) may be affected by this growth factor. Therefore we wanted to study the effects of GM-CSF on total cell numbers and cell lineages of pre-implantation embryos.

Material and Methods Five to ten weeks old female mice (B6C3F1) were superovulated by injection of 5 IU PMSG and 10 IU hCG. Females were mated to males from the C57BL/6J strain immediately after hCG injection. Resulting oocytes were isolated at the zygote stage on day 0.5 *post coitum*, pooled and randomly distributed to three different media: 1) KSOM(aa), an optimized medium for mouse embryos; 2) CleaveTM/BlastTM (Origio), a human sequential medium; and 3) EmbryoGen[®]/BlastGenTM (Ori-

gio), a GM-CSF containing sequential medium based on the second culture medium. Embryos were cultured *in vitro* until the blastocyst stage on day 4.5. As control fertilized oocytes were not retrieved at day 0.5, but instead were allowed to develop to blastocysts *in vivo* until day 3.5 before they were flushed from the uterus. The blastocysts of all groups were fixed and the three cell lines trophectoderm (CDX2), epiblast (NANOG) and primitive endoderm (SOX17) were stained by performing immunohistochemistry staining.

Results Total cell numbers showed significant differences between KSOM(aa) and CleaveTM/BlastTM (mean: KSOM(aa): 68.63 cells; CleaveTM/BlastTM: 75.66 cells; $p < 0.05$), but not in comparison to EmbryoGen[®]/BlastGenTM (mean: 70.47 cells). *In vivo* blastocysts had significantly less total cell numbers compared to the human culture media (mean: 62.65 cells; $p < 0.001$), but increased numbers of epiblast cells (mean: KSOM(aa): 4.3 cells; CleaveTM/BlastTM: 4.5 cells; EmbryoGen[®]/BlastGenTM 5.0 cells; *in vivo*: 10.2 cells; $p < 0.001$).

Conclusion The supplementation of GM-CSF had no effect on total cell numbers of mouse pre-implantation embryos in different optimized *in vitro* culture media. Differences were found in total cell numbers and numbers of epiblast cells between embryos cultured *in vitro* and *in vivo*. Recently it was shown that in suboptimal culture conditions, the supplementation of GM-CSF leads to an increase of total cell numbers. Our further studies will investigate how different concentrations of GM-CSF may influence embryo development and how this may change in non-optimized media. This is of special interest for clinical ART applications, as culture media supplemented with GM-CSF are already in clinical use, but the exact effects are not yet fully understood.

P22

Activation of TRPV2 induces IL-8 expression in human testicular peritubular cells

K. Eubler¹, C. Herrmann¹, A. Tiefenbacher¹, F.-M. Köhr², J. U. Schwarzer³, A. Mayerhofer¹

¹BioMedizinisches Centrum, LMU München, Planegg-Martinsried; ²Andrologikum, München; ³Andrology-Center, München, Germany

Several layers of peritubular cells form the wall of seminiferous tubules in the human testis. Their contractile abilities are important for the transport of immotile sperm, yet these cells also secrete numerous factors that are involved in regulation of testicular function, including inflammatory processes. A previous proteomic study of isolated human testicular peritubular cells (HTPCs) revealed that they express a member of the transient receptor potential family of ion channels, TRPV2. TRPs, in general, are involved in a wide range of cellular processes, such as thermo-, osmo- and mechano-sensation, pain perception and inflammation. TRPV2, in particular, was previously described in several immune cells and can be activated by tempera-

tures > 52 °C, hypo-osmolarity or mechanical stress. However, TRPV2 represents the least known member of this family. TRPV2 expression in HTPCs was confirmed by RT-PCR and sequencing, as well as by Western blot, which showed a single band of the expected size. Using the same antibody in an immunohistochemical approach, the channel was localized to peritubular cells, but also to Sertoli cells in human testicular sections. Functionality of TRPV2 in HTPCs was examined by monitoring intracellular Ca^{2+} levels. Acute application of the known TRPV2 activator cannabidiol (CBD) resulted in a robust increase in intracellular Ca^{2+} , which was completely blocked by the non-selective Ca^{2+} channel blocker ruthenium red (RR). Prolonged exposure of HTPCs to CBD for 24–48 h caused a marked expression of several inflammatory factors. Notably, the chemokine interleukin-8 (IL-8; CXCL8) was markedly elevated both on mRNA and protein level (ELISA measurements). This pro-inflammatory chemokine functions as a chemoattractant for leukocytes and as an activator for neutrophils. In addition, it has pro-angiogenic abilities. Our results implicate TRPV2 in the regulation of the human testis. However, additional studies are required to further elucidate the role of this ion channel in the human testis in health and disease.

Supported in part by DFG MA1080/27-1.

P23

Selection for a primarily female trait of high-fertility also effects gonadal gene expression in male animals in two high-fertility mouse lines

M. Michaelis¹, A. Sobczak¹, D. Koczan², M. Langhammer³, N. Reinsch³, J. Schön¹, J. M. Weitzel¹

¹Institute of Reproductive Biology, FBN Dummerstorf;

²Institute of Immunology, University of Rostock;

³Institute of Genetics and Biometry, FBN Dummerstorf, Germany

Question Fertility research is largely depending on informative animal models. Most of these animal models are transgenic or knockout mouse models. Approximately 99% of those animal models used in the field of reproductive biology show an infertile or subfertile phenotype. Only ~ 1% of mouse lines have an increased fertility phenotype. At the FBN in Dummerstorf we established two mouse models which have been selected for the phenotype “high fertility” for more than 40 years and > 170 generations. The selection criteria are (i) the number of offspring per litter as well as (ii) the total birth weight of the entire litter – both primarily female traits. The two mouse lines almost doubled both fertility traits during the selection period. Even so both mouse lines are originally derived from the same founder population the fertility lines developed different physiological and behavioral characteristics in order to warrant the improved fertility phenotype [1]. The question of the current study was to clarify whether these differences are also vis-

ible in gonadal gene expression patterns and whether a putative differential gene expression is detectable in gonads of both sexes.

Methods We performed microarray analysis from testis of the two high fertility mouse lines (fertility line [FL] 1 and FL2) and compared these expression patterns to those from testis of unselected control mice (Ctrl). Microarray data have been verified using a second microarray hybridization using pooled probes of biological replicates and selected genes have further been verified by q-PCR.

Results Gene expression patterns are clearly distinguishable between FL1, FL2 and Ctrl. Although originally selected from the same founder population, testicular gene expression patterns from FL1 and FL2 are diverse. In FL1 testis components of the renin-angiotensinogen system are upregulated compared to FL2 and Ctrl. Interestingly, these genes are also differentially regulated in ovaries of FL1 females, suggesting a functional importance. Other examples of differently regulated genes in FL1 animals are components of the steroid synthesis pathway; e.g. Hsd3b1. FL1 and FL2 testicular gene expression patterns show different and partly overlapping patterns. E.g. some genes which are responsible for synthesis of steroid hormones are also upregulated in FL2; e.g. Cyp11b1. Furthermore, corticosterone and progesterone concentrations are upregulated in male FL1 animals but none of the androgens ([2] and unpublished data).

Conclusions Our data demonstrate that the phenotype ‘high fertility’ is warranted using different molecular, physiological and endocrine pathways. Both mouse lines are derived from the same starting founder population and have been selected for a primarily female trait (high litter size and high total birth weight). Although selected for a female trait also male animals of the two high fertility lines developed a differential phenotype. The question remains whether selection for high-fertile females also leads to high-fertile male animals in the mouse lines. Currently we have no indication supporting this hypothesis. However, it needs to be tested whether the differential gene expression patterns observed in the testis of male animals of the high fertility mouse lines are beneficial for the improved fertility phenotype.

References:

1. Langhammer M, Michaelis M, Höflich A, Sobczak A, Schön J, et al. High-fertility phenotypes: two outbred mouse models exhibit substantially different molecular and physiological strategies warranting improved fertility. *Reproduction* 2014; 147: 427–33.
2. Langhammer M, Michaelis M, Hartmann MF, Wudy SA, Sobczak A, et al. Reproductive performance primarily depends on the female genotype in a two-factorial breeding experiment using high-fertility mouse lines. *Reproduction* 2017; 153: 361–8.

P24

Prostaglandin E₂ receptor 3 (EP3) Signaling is induced in placentas of patients with unexplained recurrent pregnancy losses (uRPL)

Y. Ye¹, A. Vattai¹, N. Ditsch¹, C. Kuhn¹, M. Rahmeh¹, S. Mahner¹, M. Rippahnn², R. Immler², C. J. Thaler¹, M. Sperandio², U. Jeschke¹, V. von Schönfeldt¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology;

²Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, Department of Cardiovascular Physiology and Pathophysiology, Biomedical Center, LMU München, Germany

Background An inflammatory microenvironment is required for successful implantation, but an inflammatory overreaction is one of the main causes for unexplained recurrent pregnancy losses (uRPL). Prostaglandin E₂ (PGE₂) activates mast cells via PGE₂ receptor 3 (EP3) to induce vascular permeability and edema formation in inflammation. We aimed to investigate whether EP3 signaling is involved in the mechanism of uRPL.

Methods We analyzed the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), EP3 and G protein alpha inhibitor 1 (G_{i1}) in first trimester placentas of women with uRPL and healthy pregnancies via immunohistochemistry and double immunofluorescence. For *in vitro* studies, JEG-3 and HTR-8/SVneo cells were used and stimulated by PGE₂, sulprostone (an EP1/EP3 agonist) and L-798,106 (an EP3 antagonist) with different concentrations. The production of β -hCG, progesterone and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells was examined by ELISA. The expression of EP3 and G_{i1} was evaluated by western blotting.

Results The expression of COX-2, EP3 and G_{i1} was up-regulated in the placenta of women with uRPL in comparison to healthy controls. Sulprostone reduced the secretion of β -hCG and progesterone of JEG-3 cells and β -hCG of HTR-8/SVneo cells, while it induced the expression of PAI-1 in JEG-3 cells *in vitro*. In addition, PGE₂ stimulated the expression of G_{i1} in JEG-3 cells and sulprostone had the same effect in HTR-8/SVneo cells. L-798,106 suppressed the EP3 expression in both trophoblast cell lines.

Conclusion Elevated expression of EP3 signaling (COX-2-PGE₂-EP3-G_{i1}) in first trimester placentas plays an important role in influencing the inflammatory microenvironment, trophoblast syncytialization and the extracellular matrix (ECM) remodeling in the fetal-maternal interface. L-798,106 might be a “potential therapeutic candidate” to the treatment of uRP.

P25

Delineation of myeloid lineage derived immune cells in the adult mouse testis and during the first wave of spermatogenesis

S. Indumathy^{1,2,3}, B. Klein^{2,4}, H.-C. Schuppe⁵, M. Bergmann⁶, N. Da Silva⁶, M. Hickey⁷, M. P. Hedger¹, K. L. Loveland^{1,3,8}

¹Hudson Institute of Medical Research, Centre for Reproductive Health, Clayton, Australia; ²Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig-University Giessen, Germany; ³Department of Molecular and Translational Sciences, School of Clinical Sciences, Monash University, Clayton, Australia; ⁴Institute of Anatomy and Cell Biology; ⁵Clinic of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ⁶Massachusetts General Hospital (MGH) and Harvard Medical School, Boston, USA; ⁷School of Clinical Sciences; ⁸Department of Anatomy and Developmental Biology, Monash University, Clayton, Australia

Background and Aim The ability of the testis to tolerate germ cell autoantigens is crucial for sperm production and any compromise can lead to male infertility. Although testicular immune cells in the adult have been profiled in the rat testis, the development and characterization of these populations in mice is incomplete. Macrophages are commonly studied in inflammatory diseases; their role in organogenesis is an emerging topic, particularly relating to the testis. In adults, macrophages closely surround Leydig cells, suggesting they communicate directly. Ethane dimethane sulphonate-induced loss of Leydig cells causes macrophage depletion in rats, and macrophage recovery occurred only after Leydig cell repopulation, highlighting the interdependence of these two cell types. Macrophages have also recently been implicated in both fetal testis cord morphogenesis and in adults, with the depletion of macrophages resulting in spermatogonial depletion. This study provides a detailed characterization of immune cell composition in the adult mouse testis and examines the predominant types of leukocytes/macrophages during the first wave of spermatogenesis.

Methodology A CX₃CR₁-GFP mouse model was examined to identify testicular macrophages from 0 days postpartum (dpp), birth to adulthood (50–60 dpp) using fluorescence. Testes fixed in 4% paraformaldehyde were processed through sucrose gradients and snap-frozen in Tissue-Tek OCT. Whole testes were fully sectioned (25–100 µm), and a section from each of 3 regions (top, middle, bottom) was stained with DAPI for confocal imaging and stereological analysis. GFP+ cells were counted and categorised based on morphology and localisation. In addition, flow cytometry was performed with interstitial cells collected from mechanically-dissociated adult testes. Two antibody panels distinguished leukocyte subpopulations of myeloid (CX₃CR₁ [macrophages], F4/80 [macrophages] and CD11c [dendritic cells]) and lymphoid (T cells [CD3] and Natural Killer cells [NK1.1]) lineages. Matched isotype controls,

in a fluorescence-minus-one setup and in single antibody controls, enabled optimization for flow cytometry parameters and post-analysis gating of leukocytes using a BD LSRII flow cytometer.

Results Macrophages (CX₃CR₁-GFP+) are present within the testicular interstitium at 0–2, 8–10, 20–25 and 50–60 dpp. A substantial increase in GFP+ macrophage numbers is evident between 0–2 and 20–25 dpp. In addition, two macrophage phenotypes are readily distinguished at 20–25 and 50–60 dpp. In one, stellate/dendritic cells are widely spaced around the outer tubule surface, while the other appears in interstitial clusters. Flow cytometric analysis of the adult testis revealed heterogeneous macrophage populations based on differential expression of surface markers for CX₃CR₁, F4/80 and CD11c. Macrophages accounted for the majority (80%) of leukocytes. Amongst other subpopulations, a unique myeloid population co-expressing CD11c+F4/80+ (4.3%) was identified for the first time in the mouse testes. The remaining population was of lymphoid lineage and contained a rare CD3+NK1.1+ (14.4%) subset.

Conclusion Utilization of flow cytometry and fluorescence has revealed the heterogeneity of leukocytes populations from both the myeloid and lymphoid lineage in the adult mouse testis. Phenotypic variants documented amongst macrophages may reflect functional differences associated with roles in immune surveillance, testis development, or support of spermatogenesis. Furthermore, documenting the changes in CX₃CR₁+ macrophage population in this study provides a basis for understanding their potential during contributions pre- and post-pubertal testis development.

Supported by DFG IRTG “Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders”, Project P2 (GRK 1871/2).

P26

Targeted disruption of galectin 3 gene in mice causes the delay of the first wave of spermatogenesis

T. Lei¹, N. Freitag², Y. Almousa², M. Bergmann³, S. Bhushan¹, A. C.-C. Huang⁴, H.-L. Chen⁴, F.-T. Liu⁴, S. Blois², A. Meinhardt¹, M. Fijak¹

¹Institute of Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University, Giessen; ²Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Division of Psychosomatic Medicine, Berlin; ³Institute of Veterinary Anatomy, Histology, and Embryology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ⁴Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Republic of China

Galectin 3 (Gal3), a member of the β-galactoside-binding lectin family, is a multifunctional lectin implicated in a variety of biological processes, including cell proliferation and differentiation, modulation of cell adhesion, sustained microglia activation, and regulation of apoptosis. Gal3 is broadly expressed in testicular somatic cells (Serto-

li and peritubular cells) and germ cells. Interestingly, expression of Gal3 is upregulated during testicular development. To characterize the role of Gal3 in testicular physiology (germ cell development, maturation of Sertoli cells and function of the Leydig cells), testes from transgenic mice deficient for Gal3 (Gal3^{-/-}) were analyzed. In adult Gal3^{-/-} mice the testicular weight was significantly decreased at postnatal day 50 (P50) and P100. Moreover, testes from Gal3^{-/-} mice displayed the delay of the first wave of spermatogenesis, as well as decreased number of germ cells in neonatal period (P5) and defects in Sertoli cell maturation. In adult Gal3^{-/-} testes, mRNA expression of Leydig cell marker Insulin-like 3 (Insl3) and enzymes involved in the biosynthesis of steroids (Cyp11a1, HSD3b1 and Cyp17a1) were significantly upregulated as compared to age matched WT control testes. To determine the underlying causes of the testicular atrophy, we used terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay to detect cell apoptosis. Increased apoptosis rate was observed in adult Gal3^{-/-} testes further confirmed by downregulation of anti-apoptotic protein Bcl-2 and upregulation of pro-apoptotic proteins Bax and Bak. Taken together, our results show that Gal3^{-/-} mice display a delay of the first wave of spermatogenesis as documented by the decrease in the number of germ cells during the neonatal period and defects in Sertoli cell maturation. Finally, the defects in testicular development and an increased apoptosis rate in adult testes results in subsequent mild testicular atrophy pointing to an important role of endogenous Gal3 in testicular physiology.

P27

The levels of L-DOPA in human follicular fluid are not correlated with total antioxidant capacity and IVF-outcome: a pilot study

C. T. Hack¹, T. Buck¹, D. Berg², U. Berg², C. Herrmann¹, L. Kunz², A. Mayerhofer¹

¹Biomedical Center (BMC), Cell Biology, Anatomy III, LMU, Planegg; ²A.R.T. Bogenhausen, München;

³Division of Neurobiology, Department Biology II, LMU, Planegg, Germany

Background A previous study [Blohmberger et al., J Ov Res 2016] showed that L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) positively influences the survival of cultured, in vitro fertilization- (IVF-) derived human granulosa cells (GCs) and attenuates the increase of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels after addition of exogenous H₂O₂. This indicated that the amino acid derivative L-DOPA has anti-oxidative capacities and/or may stimulate intracellular anti-oxidative mechanisms. We performed a pilot study aimed to examine, whether L-DOPA levels in follicular fluids, derived from patients undergoing routine IVF, correlate with the total antioxidant capacity and IVF-outcome.

Methods Follicular fluids from a total of 37 women undergoing IVF were examined. The age of the women ranged from 28 to 42 years.

IVF led to pregnancies in 18 cases. All follicular fluid samples were filtered through a cell strainer (40 µm), centrifuged at 16000xg for 3 minutes and the cell-free supernatant was frozen at -20°C until tests were performed. L-DOPA levels were measured using the L-DOPA ELISA Kit (Shanghai Korain Biotech Co.Ltd., Shanghai), total antioxidant capacity was determined by the OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego). Samples containing blood (n = 2, of which 1 IVF led to pregnancy) or exceeding the range of the L-DOPA assay (n = 9, of which 5 IVFs led to pregnancy) were excluded.

Results and Discussion The obtained levels of L-DOPA ranged from 307–1780 pg/ml. TAC values ranged from 507–1227 mM uric acid equivalents. Results of both assays were not correlated (r = 0.176; p = 0.390). Neither L-DOPA levels (r = 0.240; p = 0.237), nor TAC (r = -0.144; p = 0.483) were correlated with pregnancy after IVF or with age (r = -0.144; p = 0.483; respectively r = 0.258; p = 0.204). Our results do not support a protective role of L-DOPA against oxidative damage in the human follicle. However, observed levels of endogenous L-DOPA, while exhibiting high levels of variability, are still very low compared to therapeutical plasma levels measured in patients treated for Parkinson's disease with L-DOPA/Benserazid. Given a protective action of high concentrations of L-DOPA in cultured GCs, additional studies will be required to explore the potential of L-DOPA in the human follicle and reproductive medicine.

Supported by DFG MA1080/26-1 and KU1282/7-1.

P28

Immunopathology of human testis cancer – potential role of regulatory T-cells

L. Bertl¹, D. Püschl^{1,2}, S. Indumathy^{1,2}, D. Fietz¹, K. Hartmann¹, S. Kliesch³, B. Loveland⁴, M. P. Hedger⁵, K. L. Loveland^{2,5}, F. Wagenlehner⁶, H.-C. Schuppe⁶, M. Bergmann¹

¹Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ²Hudson Institute for Medical Research, Centre for Reproductive Health, Clayton, Australia; ³Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster, Germany; ⁴Burnet Institute, Melbourne; ⁵Department of Molecular and Translational Sciences, School of Clinical Sciences, Monash University, Clayton, Australia; ⁶Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Introduction In human testicular germ cell neoplasia, i.e. seminoma and pre-invasive germ cell neoplasia in situ (GCNIS), infiltrating immune cells are frequently found and have previously been identified as lymphocytes (T and B cells), macrophages, and dendritic cells, with T cells representing a major component of tumor infiltrating lymphocytes (TIL). Recent studies provide suggestive evidence that functional polarization and

respective subtypes of TIL play an important role in cancer development and surveillance. Notably, high numbers of regulatory T cells (Tregs) in the tumor microenvironment are indicative of a poor prognosis in other cancers. The implications for T cells and their subsets in testis cancer development, however, are not well established to date. Therefore, we aim to identify and characterize subsets of T cells, i.e. Tregs, in seminoma and GCNIS compared to focal inflammatory lesions associated with impaired spermatogenesis and non-inflamed normal testis.

Material and Methods We evaluated Bouin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from human testis including seminoma, pre-invasive GCNIS without/ with accompanying immune cell infiltrates (GCNIS + ly), testis biopsies from infertile men revealing quantitatively reduced spermatogenesis with focal lymphocytic infiltrates (hyp + ly), or normal spermatogenesis (nsp) (n = 10, each). The following markers were used for immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF): CD3, CD4, CD8 (T cells), CD20 (B cells), CD68 (macrophages), CD11c (dendritic cells), CD25, and FOXP3.

Results Our preliminary results show that CD4+FOXP3+ Tregs are located in focal lymphocytic infiltrates in tumor and non-tumor testicular tissue. Single Tregs are present in nsp and show a scattered distribution pattern.

Conclusion Our preliminary data suggest that distribution pattern of Tregs differ from CD20+ B cells and CD11c+ dendritic cells, which are only found associated with tumour bearing testicular tissue. Further studies on the expression pattern of IL10 and TGFβ, cytokines that are known to be expressed by Tregs, will show a possible involvement in the initiation and regulation of tumor growth. Detailed functional characterization of infiltrating immune cells in testicular neoplasia, i.e. TIL, will help to understand the complex mechanisms of “immune editing” during testis cancer development.

Supported by DFG IRTG “Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders”, Project P2 (GRK 1871/2).

P29

The action of steroids and follicular fluid on CatSper channels in human sperm

L.V. Wagner^{1,2}, C. Brenker³, C. Schiffner³, A. Schuering³, P. M. Holterhus⁴, O. Söder², T. Struener¹
¹Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Köln, Germany; ²Karolinska Institute, Pediatric Endocrinology, Stockholm, Sweden; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster; ⁴UKSH, Campus Kiel, Kiel, Germany

Background In human sperm, the female sex hormone progesterone activates the sperm-specific, voltage- and alkaline-activated Ca²⁺ channel CatSper. Progesterone-induced Ca²⁺ influx via CatSper has been implicated in human sperm chemotaxis, hyperactivation, and acrosomal exocytosis. The

molecular identity of steroids in reproductive fluids, i.e. follicular fluid, and their action on CatSper is however ill-defined.

Methods We analyzed the steroid content of follicular fluid using mass spectrometry. Moreover, we studied the action of the identified steroids and follicular fluid itself in human sperm. Changes in intracellular Ca²⁺ levels and pH were measured using the fluorescent indicators Fluo-4 and BCECF, respectively, in 384 multi-well plates in a fluorescence plate reader.

Results We identified the following steroids in human follicular fluid; the order of the steroids indicates their relative abundance: progesterone, 17-hydroxyprogesterone, estradiol, cortisol, cortisone, 11-deoxycorticosterone, corticosterone, androstenedione, testosterone, DHEAs, dihydrotestosterone and 17-hydroxyprogesterone. Each of the steroids, yet, with different potency and efficacy, stimulated Ca²⁺ influx via CatSper in human sperm. Moreover, cross-desensitisation studies showed that the steroids compete for the same binding site to activate CatSper. Furthermore a steroid mix- mimicking the steroid content of follicular fluid- evoked a Ca²⁺ response reminiscent of that induced by progesterone alone, whereas the response by follicular fluid itself was of much higher amplitude.

Conclusion Follicular fluid contains a cocktail of various steroids. The CatSper Ca²⁺ channel in human sperm is promiscuously activated by these steroids, indicating that they act in concert to control sperm function in vivo. Moreover, our data indicate that follicular fluid harbours ligands other than steroids that also target CatSper. The molecular identity of these ligands and factors remains to be identified.

P30

Zelluläre Komposition, Ultrastruktur, Genexpression und Dynamik humaner in vitro-reorganisierter adulter Hodenzellen

K. von Kopylow¹, W. Schulze², A. Salzbrunn³, M. Schaks¹, E. Schäfer⁴, S. Schlatt⁵, B. Roth¹, A.-N. Spiess¹

¹Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Bereich Andrologie, Andrologische Forschung, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; ²MVZ Fertility Center Hamburg GmbH, amedes group, Hamburg; ³Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Bereich Andrologie; ⁴Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg; ⁵Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Fragestellung Ist eine In-vitro-Reorganisation primärer humaner Hodenzellen aus aggregatfreien Zellsuspensionen, die aus kleinen TESE-Biopsien hergestellt wurden, sowie die Langzeit-Zellkultur der reorganisierten Zellen in einem einfachen matrixfreien 2D-System möglich und reproduzierbar? Können die Zellen innerhalb der reorganisierten Formationen anhand morphologischer und mithilfe von Genexpressions-Analysen identifiziert werden?

Hintergrund In Zellkultur reorganisierte Hodenzellen könnten die Basis für eine In-vitro-Spermatogenese sein, eine geeignete Umgebung zur Vermehrung von Spermatozyten/spermatogonialen Stammzellen darstellen sowie Erkenntnisse für die andrologische Grundlagenforschung liefern, und damit insgesamt zur Behandlung männlicher Infertilität beitragen. Morphogenetische Dynamiken von *in vitro* kultivierten Testiszellen sind schon seit Längerem aus Nagerstudien bekannt, wobei die hier entstandenen Zellaggregate sowohl somatische Hodenzellen als auch frühe Keimzellen enthielten [1–6]. Neuere Studien mit in 3D-Systemen kultivierten humanen Hodenzellen [7, 8] belegen, dass diese Zellen ebenfalls die Fähigkeit besitzen, testikuläre Organoide zu bilden.

Methodik Aggregatfreie Zellsuspensionen aus jeweils zwei 30-mg-Biopsien pro Patient von Patienten mit unterschiedlichem Spermatogenesestatus (vollständige Spermatogenese, Hypospermatogenese, Meiose-Arrest, gemischte Atrophie oder Sertoli-cell-only-Syndrom) wurden bis zu 90 Tage in DMEM-Zellkulturmedium unter Zugabe von KO SR und den Cytokinen FGFa (FGF1), FGFb (FGF2), FGF9, GDNF, EGF und IGF in unbeschichteten Plastik-Zellkulturschalen bei 35°C und 5% CO₂ in Kultur genommen. Die entstandenen Hodenzellaggregate (Cluster) wurden hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung mittels Semidünnschnitt-Technik, Transmissionselektronenmikroskopie, qPCR und Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Des Weiteren dienten Time-lapse-Experimente zur Untersuchung der Cluster-Dynamik.

Ergebnisse Die Zellkulturexperimente zeigten, dass die Fähigkeit zur In-vitro-Reorganisation primärer humaner Hodenzellen unabhängig vom Spermatogenese-Status des Patienten ist. Die zelluläre Zusammensetzung der entstandenen Formationen spiegelte jedoch in hohem Ausmaß den Zustand im Hoden des jeweiligen Patienten wider. Detektierte Zelltypen in und um die Cluster waren Sertoli-Zellen, peritubuläre Myoidzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Leydig-Zellen, Makrophagen, Spermatozyten und einige Spermatozyten. Cluster-Fusion und die damit zusammenhängende Cluster-Vergrößerung konnte durch „Time lapse“-Aufnahmen belegt werden. Außerdem konnte die Formation der Hodenzell-Cluster durch die Zugabe eines Tyrosin-Protein-Kinase-Inhibitors (K252a) spezifisch gehemmt werden.

Schlussfolgerung Eine In-vitro-Reorganisation primärer humaner Hodenzellen in einfachen 2D-Zellkultursystemen ist möglich und hoch reproduzierbar. Die Analyse der zellulären Zusammensetzung der Hodenzellcluster sowie der zellulären Morphologie kann zur weiteren Optimierung solcher Systeme beitragen.

Literatur:

1. Gassei K, et al. Initiation of testicular tubulogenesis is controlled by neurotrophic tyrosine receptor kinases in a three-dimensional Sertoli cell aggregation assay. *Reproduction* 2008; 136: 459–69.

2. Pan F, et al. Effects of Nanostructures and Mouse Embryonic Stem Cells on *In Vitro* Morphogenesis of Rat Testicular Cords. *PLoS One* 2013; 8: e60054.

3. Yokonishi T, et al. In Vitro Reconstruction of Mouse Seminiferous Tubules Supporting Germ Cell Differentiation. *Biol Reprod* 2013; 89: 15.

4. Mäkelä JA, et al. Reconstruction of Mouse Testicular Cellular Microenvironments in Long-Term Seminiferous Tubule Culture. *PLoS One* 2014; 9: e90088.

5. Zhang J, et al. Reconstruction of a seminiferous tubule-like structure in a 3 dimensional culture system of re-aggregated mouse neonatal testicular cells within a collagen matrix. *Gen Comp Endocrinol* 2014; 205: 121–32.

6. Alves-Lopes JP, et al. Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system. *Biomaterials* 2017; 130: 76–89.

7. Baert Y, et al. Primary Human Testicular Cells Self-Organize into Organoids with Testicular Properties. *Stem Cell Reports* 2017; 8: 30–38.

8. Pendergraft SS, et al. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biol Reprod* 2017; 96: 720–32.

P31

Ejaculation disorders and treatment of BPH: Disturbed function of prostate ducts by the alpha1-adrenergic receptor blocker tamsulosin but not by PDE5 inhibitors

M. Seidensticker¹, R. Kügler¹, A. Mietens¹, S. Tasch¹, F. M. Wagenlehner², G. P. Risbridger³, B. Exintaris⁴, S. J. Ellem³, R. Middendorff¹

¹Institute of Anatomy and Cell Biology; ²Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ³Department of Anatomy & Developmental Biology; ⁴Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Monash University, Melbourne, Australia

Benign prostate hyperplasia (BPH) is characterized by an enlargement of prostate tissue associated with increased tone of smooth muscle cells (SMCs). Classical treatment option for patients suffering from BPH is tamsulosin, an alpha1-adrenergic blocker used to relax SMCs. Inhibitors of phosphodiesterase type 5 (PDE5) such as sildenafil or tadalafil also relax SMCs and have emerged as alternative treatment options. The prostate consists of single glands which produce the prostatic fluid. Excretory ducts transport the fluid to the urethra during the emission phase of ejaculation. Structural and functional data of glands and ducts as well as information on the response to drugs are sparse. Analyses of PDE5 inhibitors and alpha1-adrenergic blockers on contractility of prostatic ducts have never been performed.

We used time-lapse imaging in combination with classical morphological techniques to visualize and compare the effects of PDE5 inhibitors and alpha1 blockers on intact prostatic ducts.

PDE5 was localized to SMCs of prostate ducts. Effects of PDE5 inhibitors (sildenafil, tadalafil) and alpha1-adrenergic blockers on contractile function could be directly visualized by time-lapse imaging. Excretory ducts, in contrast to glands, did not contract spontaneously. Imitating the contribution to ejaculation by application of noradrenaline, we found that predominantly ductal SMCs ensure expulsion of secretions. Noradrenaline-induced contractions of the isolated duct seg-

ments occurred irrespective of pre-treatment with PDE5 inhibitors. In both cases, the effect of noradrenaline was the same. Pre-treatment with tamsulosin, however, showed a significant reduction of noradrenaline-induced contractions of the duct.

Data help to understand why alpha1-adrenergic blockers different to PDE5 inhibitors disturb prostate secretion during emission.

P32

Leptintherapie beeinflusst positiv die Fertilitätsstörung bei Lipodystrophie

L. Eifler¹, A. Hoffmann¹, I. V. Wagner², B. Jessnitzer¹, U. Lössner¹, M. Fasshauer¹, S. Kralisch-Jäcklein¹
¹Endokrinologie, Universität Leipzig; ²Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Köln, Deutschland

Fragestellung Übergewicht und Adipositas beeinflussen die männliche und weibliche Fertilität negativ. Im Gegensatz zur Adipositas kommt es bei Lipodystrophie (LD) zu einem selektiven Verlust von Fettgewebe. Ähnlich zur Adipositas treten auch bei LD metabolische und vaskuläre Folgeerkrankungen auf. Weibliche LD-Patientinnen leiden im Erwachsenenalter häufig an einem hypogonadotropen Hypogonadismus mit primärer oder sekundärer Amenorrhö.

Patienten mit LD haben signifikant niedrigere Leptinspiegel. Leptin ist ein bekannter Mediator und Modulator der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und beeinflusst somit die Reproduktionsfähigkeit. Inwiefern die Gabe von Leptin die Fertilität bei LD beeinflusst, ist bis jetzt unzureichend untersucht. Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Fertilität im Tiermodell der generalisierten LD und der Einfluss einer Leptintherapie.

Methodik Das Tiermodell der generalisierten LD (Tg[ap2-SREBF1c]9884Reh, The Jackson Laboratory, USA) wurde über 8 Wochen bis zur Aufarbeitung 1× tägl. i. p. mit rekombinantem Leptin (3 mg/kg KG) oder Kochsalzlösung behandelt. Der Einfluss von Leptin auf die Gonadenphysiologie wird bei weiblichen und männlichen LD-Tieren im Vergleich zu mit Kochsalz behandelten LD-Tieren und gesunden Kontrollen untersucht.

Ergebnisse Die durchschnittliche Vaginalöffnung und somit der Pubertätsbeginn lag bei den LD-Tieren im Durchschnitt 5 Tage hinter den gesunden Kontrolltieren.

Die weiblichen LD-Tiere zeigten nach Kochsalz-Behandlung ein signifikant niedrigeres Uterusgewicht im Vergleich zu den Kontrollen. Unter Leptintherapie stieg das Uterusgewicht wieder auf das Niveau der gesunden Kontrollen an. Bei den männlichen Tieren konnte bisher kein signifikanter Unterschied im Hodengewicht, der intratestikulären Testosteronproduktion, Spermienqualität sowie der steroidogenen Enzyme nachgewiesen werden.

Im weiteren Versuchssetting werden morphologisch und auf mRNA-Ebene sowohl gonadal als auch zentral diese Vorergebnisse wei-

ter analysiert, um die Pathologie der weiblichen Fertilitätsstörung bei LD und den Einfluss der Leptinbehandlung darzustellen.

Schlussfolgerung Zusammenfassend zeigen weibliche LD-Tiere Störungen der gonadotropen Achse mit verzögertem Pubertätsbeginn. Erste Untersuchungen geben einen Hinweis auf den positiven Effekt einer Leptinbehandlung auf die weibliche Fertilität bei LD.

P33

Raman Microspectroscopy for sperm analysis: perspectives and challenges

R. Da Costa, K. Redmann, S. Schlatt
Centre of Reproductive Medicine and Andrology,
University Hospital of Münster, Germany

Given its capability to fingerprint the chemical composition of any sample, Raman Microspectroscopy represents an innovative tool for the assessment of sperm biochemical features that otherwise would be undetectable by routine semen analysis. Recently, we showed that experimentally induced sperm DNA damage in smears could be detected [1, 2]. As this approach appears non-invasive and non-destructive, it has the potential to be applied for sperm selection in human assisted reproduction. Since previous studies were carried-out using air-dried sperm, it is required to show successful application in live sperm. The aim of this study was to obtain and evaluate Raman spectra from human sperm DNA in regard to the hydration status.

For this purpose, human sperm from healthy donors were immobilized on poly-L-lysine coated slides. As previously established [2], Raman spectra of sperm nuclei were obtained. Sperm damage was induced experimentally by exposure of washed sperm aliquots to ultraviolet light (UV). Samples mounted onto slides were analyzed in native, air dried and rehydrated conditions following individual sperm. Hydration-dependent differences detected in individual sperm were documented and subjected to PCA analysis.

DNA damage induced by UV exposure was confirmed in dehydrated samples (**Fig. 3a**). Surprisingly in aqueous conditions the spectral features of DNA damage could not be detected (**Fig. 3b**). This loss of spectral signatures for DNA damage was observed in native and rehydrated (data not shown) samples. The successful sperm immobilization method is a valuable tool for the assessment of sperm by Raman Microspectroscopy. The confirmation that sperm DNA damage can be detected in dehydrated samples following individual sperm validated the potential of the technique. However the loss of the damage-dependent spectral features in aqueous conditions presents a new challenge that needs to be overcome before the approach enters the clinic.

References:

- Mallidis C, Wistuba J, Bleisteiner B, Damm OS, Groß P, et al. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. Hum Reprod 2011; 26: 1641–9.

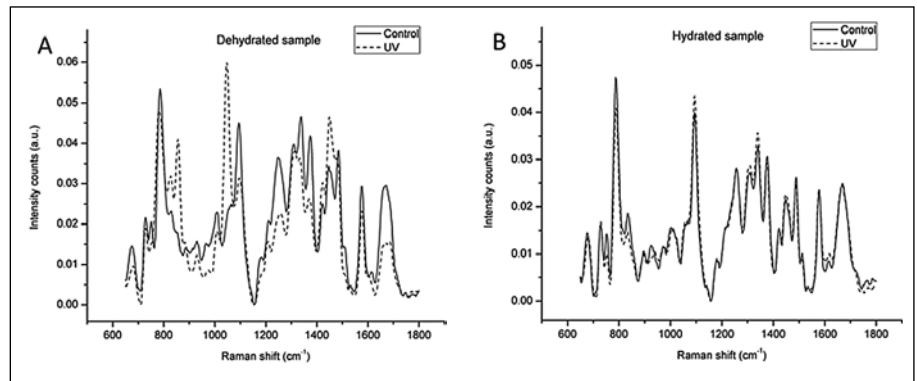


Figure 3. DaCosta R, et al. (P33). Effect of exposure to UV light on sperm DNA displayed in Raman spectra under different hydration conditions.

- Sánchez V, Redmann K, Wistuba J, Wübbeling F, Burger M, et al. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy. Fertil Steril 2012; 98: 1124–9.e3.

P34

The influence of maternal age on superovulation, cytoskeletal morphology and cohesion complex organization during meiosis II using high resolution confocal microscopy

M.-N. Malliou-Becher¹, C. von Kaisenberg²,
C. Schipper³, K. Stah³, G. Tsiavaliaris³

¹Department of Obstetrics and Gynecology, University of Heidelberg Women's Hospital; ²Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine; ³Institute for Biophysical Chemistry, Hannover Medical School, Germany

The incidence of aneuploidy increases with advancing maternal age. The present study aimed to evaluate the effect of increasing maternal age on superovulation efficiency in both mouse and human. Specific alterations of microtubular and actin cytoskeleton in a mouse model during meiosis II were examined using the advantages of high resolution confocal microscopy. Additionally, an option for distance measurement in 3D confocal reconstructions was proposed to examine loss of chromosome cohesion as a cause of age-related aneuploidy in human oocytes.

Ovulated oocytes from C57BL/6J female mice at the age of 8–61 weeks retrieved after exogenous ovarian stimulation and unfertilized oocytes donated from women at the age of 28–41 years undergoing IVF or ICSI treatment, were analyzed. Mouse oocytes were stained with anti- α -tubulin antibody, DAPI, and fluorescently labeled phalloidin antibody for microtubules, chromosomes and actin detection respectively. Human oocytes were stained with fluorescently labeled CREST-FITC antibody and DAPI for kinetochores and chromosomes detection respectively. Secondary antibodies were used for fluorescence detection. Chromosomal distribution, spindle and actin filament morphology in the mouse model, as well as kinetochores in humans were analyzed by confocal microscopy and image J software as image processing program. 3D confocal re-

constructions of the interspace between sister-chromatids were used to determine kinetochore distances.

The age of the mice and the number of extracted oocytes revealed a statistically significant negative linear correlation ($r = -0.727$; $p < 0.001$) with significantly less oocytes extracted from the older mice (median 0.5 oocytes, $p < 0.001$) compared to the number of oocytes extracted from the younger mice (median, 17 oocytes). No statistically significant correlation ($r = -0.439$; $p < 0.102$) was found in human females. However, this could be explained by the small population of the women and the narrow age span in this study. Microtubule morphology abnormalities and misalignment of chromosomes at the metaphase II equator plate were significantly ($p = 0.003$) more frequent in older oocytes compared to younger oocytes. Furthermore, improper cap formation was significantly more frequent in older mice ($p = 0.003$) and in misaligned chromosomes ($p = 0.003$) in mice. It was demonstrated that the introduced method of distance measurement in 3D confocal reconstructions is feasible and could be used for further validation and studies on the hypothesis that deteriorated cohesion is a cause of age-related aneuploidy.

In conclusion, there is an apparent relation between maternal age and superovulation efficiency, frequency of changes in spindle-chromosomes-organization and abnormal actin cap formation in a mouse model. Further analysis of kinetochore distances in correlation with age using a more accurate method proposed in this study needs to be performed in a greater population of human females in order to examine the hypothesis that increasing maternal age is related to loss of cohesion.

P35

Einfluss der In-vitro-Kultur auf die Hormonrezeptorexpression primärer endometrialer Stromazellen

S.-J. Pour, D. Baston-Büst, J. S. Krüssel, A. P. Bielfeld
Universitätsfrauenklinik, UniKID, Düsseldorf,
Deutschland

Fragestellung Forschung im Bereich der humanen Implantation ist auf Zellkulturrex-

perimente limitiert. Die Isolation und Kultur primärer Zellen aus Endometrium als Alternative zu Zell-Linien hat sich in den vergangenen Jahren fest etabliert. Welchen Einfluss die In-vitro-Kultur auf die Eigenschaften der Zellen hat, ist bisher jedoch nicht ausreichend geklärt. Daher stellt sich uns die Frage, inwieweit sich primäre, endometriale Stromazellen von unterschiedlichen Patienten voneinander unterscheiden und welchen Einfluss die In-vitro-Kultur auf die Zellen bezüglich ihrer Hormonrezeptorexpression hat.

Methodik Aus „endometrial scratchings“ (ES) während der Sekretionsphase verschiedener Patienten (fertil, Implantationsversager [RIF], mit habituellen Aborten [RSA] und mit Endometriose) wurden primäre, endometriale Stromazellen isoliert und bis Passage 10 kultiviert. Aus jeder Passage wurde RNA isoliert und die Expression des Progesteronrezeptors (PR), der Östrogenrezeptoren (ER1/2) und der membranständigen Progesteronrezeptoren (PGRMC1/2) per Real-time-PCR untersucht. Weiterhin wurden Zellen verschiedener Passagen mit Progesteron und zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) dezidualisiert und die Prolaktinsekretion mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurden von ES und mit Zellen bewachsene Objektträger immunhisto- bzw. -zytochemisch auf die Hormonrezeptoren gefärbt.

Ergebnisse Generell wiesen die unterschiedlichen Proben, obwohl sie alle zu einem vergleichbaren Zykluszeitpunkt (LH+7) entnommen worden waren, unterschiedliche Eigenschaften auf. So zeigte die Hormonrezeptorexpression in ES unterschiedliche Muster und die isolierten Stroma-Zellen unterschieden sich bezüglich Morphologie, Proliferation und Alter bis zur Seneszenz. Mit zunehmender Passage und somit Alter der Stroma-Zellen wurde ein Abfall in der mRNA-Expression für PR, ER1 und PGRMC2 gesehen. Der ER2 und PGRMC1 konnten nicht in den Stroma-Zellen detektiert werden. Auch die Kultur in hormonfreiem Serum (FBS) verursachte eine Reduktion des PR, sodass von einem additiven Effekt aus Kulturbedingungen und Alter der Zellen ausgegangen wird. Die Prolaktinsekretion als Marker der Dezidualisierung war dagegen nur geringfügig vom Alter der Zellen beeinflusst, was an der kombinierten Behandlung mit Progesteron und cAMP liegen könnte.

Schlussfolgerung Die In-vitro-Kultur von endometrialen Primärzellen ist das Mittel der Wahl, um die Forschung im Bereich Reproduktionsmedizin am ehesten an die In-vivo-Gegebenheiten anzupassen und gilt als bessere Alternative zu Zell-Linien, die aufgrund ihres Tumorphintergrundes oder der Immortalisierung als verändert angesehen werden. Allerdings deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Zellen wie ihre Spenderinnen als Individuen aufzufassen sind, die unterschiedliche molekular- und zellbiologische Eigenschaften aufweisen und dass diese Eigenschaften nochmals durch die Gegebenheiten der In-vitro-Kultur verändert werden.

P36

Analyse von extrazellulären Vesikeln in der humanen Follikelflüssigkeit

R. Togawa¹, R. Nieuwland², C. M. Hau², N. Hajji², T. Strowitzki¹, B. Toth²

¹Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, Germany; ²Department of Clinical Chemistry and Vesicle Observation Center, Amsterdam, Netherlands; ³Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Medizinische Universität Innsbruck, Austria

Fragestellung Extrazelluläre Vesikel (EV) stellen eine heterogene Gruppe von Zelloberflächenabschnürungen dar, die in der Größenordnung zwischen 0,03–1 µm liegen [1]. EV kommen ubiquitär im Körper vor. Ziel dieser Arbeit war es, die Konzentration und Zusammensetzung der EV aus Follikelflüssigkeit (FF) zu analysieren.

Methodik Insgesamt 31 Patientinnen, die im Rahmen ihrer Kinderwunschtherapie zur Durchführung einer IVF/ICSI hormonell stimuliert wurden, konnten in diese Studie eingeschlossen werden. Von ihnen wurde durch die transvaginale ultraschallgesteuerte Follikelpunktion die FF von jeweils 2 führenden Follikeln gewonnen. Im Anschluss wurde analysiert, ob in der FF eine Oozyte enthalten ist. In Abhängigkeit des Ergebnisses erfolgte die Einteilung in die jeweilige Studiengruppe (Studiengruppe 1: mit Eizelle, 2: ohne Eizelle). Nach Aufbereitung wurden die FF durchflusszytometrisch (FACS) analysiert und auf ihre EV-Gesamt- und Subtypenkonzentrationen mithilfe verschiedener Oberflächenmarker (Lactadherin, CD9, CD11b, CD45, CD81 und CD138) untersucht [2].

Ergebnisse Von den 31 Patientinnen, die in die Studie eingeschlossen wurden, konnten 44 FF zur endgültigen Analyse gewonnen werden. Davon enthielten n = 17 FF (39 %) eine Oozyte und n = 27 FF (61 %) keine. Eine durchflusszytometrische Analyse wurde mit allen 44 Proben durchgeführt. Die Gesamtzahl Lactadherin-bindender EV lag im Median bei $1,11 \times 10^9$ EV/mL. FF mit Oozyte enthielten im Median $1,25 \times 10^9$ EV/mL, FF ohne Oozyte $1,04 \times 10^9$ EV/mL. Die Subtypisierung der EV konnte bei allen 44 Proben durchgeführt werden. Dabei ließen sich CD9-, CD45-, CD81- und CD138-positive EV in 98 % der Proben detektieren, während CD11b-positive EV in 41 % der Proben nachgewiesen wurden. Die Gesamtzahl der EV der jeweiligen Subgruppen betrug 10^5 – 10^7 EV/mL. Zwischen den beiden Studiengruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der Gesamtkonzentration der EV in der FF bzw. in der Konzentration der jeweiligen EV-Subtypen in der FF festgestellt werden.

Schlussfolgerung Die Konzentration und Subtypisierung von EV in humaner FF ist möglich. Dabei überwiegt die Konzentration an CD9-, CD45-, CD81- und CD138-positiven EV in der FF, wohingegen CD11b-positive EV nur in 40 % der Proben nachgewiesen werden konnten. Vergleicht man die Zusammensetzung der EV in der FF in Abhän-

gigkeit des Vorliegens einer Oozyte, zeigen unsere ersten Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied.

Literatur:

1. van der Pol E, et al. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 48–56.
2. Otzen DE, et al. Lactadherin binds to phosphatidylserine-containing vesicles in a two-step mechanism sensitive to vesicle size and composition. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818: 1019–27.

P37

Validation of a novel ELISA assay for serum AMH determination

K. Neumann, M. Depenbusch, A. Schultze-Mosgau, G. Griesinger
Sektion für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universität Lübeck, Germany

Background Serum Anti-Müllerian Hormone (AMH) levels correspond to ovarian function and reserve. Clinically, AMH levels are routinely assessed in infertility treatment to estimate the prognosis and risk profile of a given woman. Different AMH ELISA assays have been developed and are available on the market; however, significant inter- and intra-assay variations have been reported. Herein, the novel Euroimmun MRH/AMH ELISA is validated using the Gen II ELISA by Beckmann Coulter (GenII-BC) as a standard.

Methods This was a prospective, single-center study. Frozen serum samples from 121 infertile female patients were analysed by the Euroimmun AMH ELISA and GenII-BC assay, respectively; values were generated with/without buffer pre-mixing. Furthermore, different lots of the GenII-BC were tested as reference. The novel Müllerian-duct repression hormone (MRH/AMH) ELISA from Euroimmun (referred to as EU AMH ELISA herein) is based on the combination of two highly specific antibodies. Quantitative measurement is performed at 450 nm wavelength. Results are expressed as nanogrammes per milliliter (ng/ml). To study assay agreement, a Passing-Bablok regression model and a Bland-Altman analysis were performed.

Results The Passing-Bablok analysis of n = 121 samples ranging from 0.00 ng/ml–17.93 ng/ml – AMH concentration (based on measurements of the GenII-BC ELISA) shows $y = 1.17 - 0.05x$, 95%-CI: 1.12–1.23 and a concordance correlation coefficient $R_c = 0.93$ for the performance of the EU AMH ELISA.

Conclusions The novel EU AMH ELISA achieves adequate performance as compared to the established GenII-BC ELISA and is suitable for broader utilization in clinical and research settings.

■ Hypogonadismus

P38

Assoziation geringer Libido mit aktuellem Sexualverhalten, Körperbild sowie Komorbiditäten und Lifestyle: Eine Querschnittsstudie an 10.962 heterosexuellen 45-jährigen Männern im Rahmen der GMS-Studie

L. Schroeter¹, F.-M. Köhr², M. Kron³, H. Schulwitz¹, C. Arsov⁴, B. Hadaschik^{5,6}, F. Imkamp⁷, J. E. Gschwend¹, K. Herkommer¹

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München;

²Andrologikum München; ³Institut für Epidemiologie und Medizinische Biometrie, Universität Ulm;

⁴Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Düsseldorf; ⁵Klinik für Urologie, Uroonkologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Essen; ⁶Urologische Klinik, Universitätsklinikum Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; ⁷Klinik für Urologie und Urologische Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland

Fragestellung Geringe Libido zählt neben Erektions- und Orgasmus-/Ejakulationsstörungen zu den häufigsten Sexualstörungen des Mannes. Bekannte Risikofaktoren sind neben Testosteronmangel unter anderem Vorerkrankungen wie zum Beispiel Adipositas und Diabetes mellitus. Die vorliegende Studie untersucht die Prävalenz geringer Libido bei 45-jährigen Männern in einer bevölkerungsbasierten Zufallsstichprobe. Ermittelt wurden Assoziationen zu verschiedenen Risikofaktoren (soziodemographisch, Lifestyle, Körperbild, Sexualleben, Komorbiditäten).

Methodik Im Rahmen der German Male Sex-Study (GMS-Study, Teil der PROBAST-Studie) wurden 16.605 45-jährige Männer von April 2014 bis April 2016 bevölkerungsbasiert in den 4 Studienzentren (Düsseldorf, Hannover, Heidelberg, TU München) rekrutiert.

Im jeweiligen Studienzentrum wurden die Probanden nach Aufnahme in die Studie in einem ärztlichen Anamnesegepräch über aktuelle Medikation und Vorerkrankungen befragt. Auch Gewicht und Taillenumfang aller Probanden wurden vor Ort gemessen. Anschließend füllten die Probanden Fragebögen zu soziodemographischen Daten, Lifestyle (sportliche Aktivität, Alkoholkonsum, Rauchen), intrapersonellen Faktoren (Ängstlichkeit: GAD2-Score ≥ 3 ; Depression: PHQ2-Score ≥ 3 ; Körperbild, Maskulinität, sexuelles Selbstbewusstsein, Empfinden sozialen Drucks: jeweils 3 Fragen) sowie Sexualleben (sexuelle Aktivität und Masturbationsfrequenz in den letzten 3 Monaten; Wichtigkeit von Sex; Zufriedenheit mit Partnerschaft; Anzahl der Sexualpartner) aus.

Zur Erfassung des benignen Prostata-syndroms sowie der erektilen Dysfunktion wurden validierte Fragebögen verwendet (International Prostate Symptom Score und International Index of Erectile Function-6 [be-

nignes Prostata-syndrom: IPSS-Score > 7 ; erektile Dysfunktion: IIEF6-Score ≤ 25). Ejaculatio praecox wurde anhand von 2 Fragen erhoben und ist definiert als Samenerguss, der beim Geschlechtsverkehr oft bis fast immer innerhalb der ersten 2 Minuten erfolgte bezogen auf die letzten 6 Monate.

Die Libido wurde mit folgender Frage erhoben: „Wie oft verspürten Sie in den letzten vier Wochen das Verlangen, sexuell aktiv zu sein“? Mögliche Antworten waren: sehr oft, oft, gelegentlich, selten, sehr selten, wobei „selten“ und „sehr selten“ geringer Libido zugeordnet wurde gegenüber keiner geringen Libido (sehr oft, oft, gelegentlich).

In die Untersuchung wurden kaukasische und heterosexuelle Männer eingeschlossen, die weder 5 α -Reduktase-Inhibitoren noch Antidepressiva einnahmen sowie die Frage über das eigene Verlangen nach Sex beantworteten.

Die Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test mit einem Signifikanz-Niveau von 5 %.

Ergebnisse Insgesamt erfüllten 10.962 Probanden die Einschlusskriterien. Die Prävalenz geringer Libido im vorliegenden Kollektiv betrug 4,7 %.

Folgende Assoziationen zwischen geringer Libido und soziodemographischen Faktoren wurden identifiziert: Nicht-Zusammenleben mit Partner, lang andauernde Beziehung, keine Kinder und Arbeitslosigkeit ($p < 0,001$). Bezüglich Lifestylefaktoren zeigten Männer mit geringer physischer Aktivität ebenso wie Männer, die kein/wenig oder exzessiv Alkohol konsumierten, einen signifikanten Zusammenhang zu geringerer Libido ($p < 0,001$).

Probanden, die empfindlicher auf sozialen Druck reagieren, ängstlicher sind und ein geringeres Körperbild haben, zeigten ebenso wie Männer mit niedrigem sexuellen Selbstbewusstsein ein geringeres Verlangen nach Sex auf ($p < 0,001$). Auch bei Männern, die in den letzten 3 Monaten nie/selten masturbieren oder Geschlechtsverkehr hatten, weniger als 11 Sexpartner im bisherigen Leben hatten, Sex als unwichtig und ihre Partnerschaft als unglücklich bezeichneten, konnten signifikante Korrelationen zu geringer Libido dargestellt werden ($p < 0,001$).

Folgende Komorbiditäten zeigten eine Assoziation mit geringer Libido: benignes Prostata-syndrom, erektile Dysfunktion, Hypertonie und Ejaculatio praecox ($p < 0,001$).

Kein statistisch signifikanter Zusammenhang ergab sich zu folgenden Faktoren: Bildung, Rauchen, Fragen zur Maskulinität sowie Diabetes und Taillenumfang.

Schlussfolgerung Knapp 5 % der 45-jährigen Probanden zeigten eine geringe Libido. Es konnte gezeigt werden, dass geringe Libido mit psychologischen (Angst), soziokulturellen (sozialer Druck, Arbeitslosigkeit, keine Kinder) und Beziehungsfaktoren assoziiert war. Darüber hinaus korrelierte eine geringe Masturbations- sowie Geschlechtsverkehrsfrequenz mit geringer Libido. Des Weiteren zeigte die Studie, dass Männer mit moderatem Alkoholkonsum und Männer, die sport-

lich aktiv waren (2–5x/Woche) eine höhere Libido aufwiesen als die jeweiligen Vergleichsgruppen.

Entgegen den Ergebnissen bestehender Studien konnte der Komorbidität Diabetes mellitus kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu geringer Libido nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist das vergleichsweise junge Alter des untersuchten Probandenkollektivs.

■ Erektile Dysfunktion und Ejakulationsstörungen

P39

Association between premature ejaculation (PE) and serum sex steroid concentrations

M. Zitzmann, W. Mousa, S. Kliesch

Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Background PE is a common male sexual disorder, with a worldwide prevalence of approximately 15%. The definition of premature ejaculation according to the Guidelines of the ISSM is: ejaculation which always or nearly always occurs prior to or within about one minute of vaginal penetration and the inability to delay ejaculation on all or nearly all vaginal penetrations as well as negative personal consequences, such as distress, bother, frustration and/or the avoidance of sexual intimacy. Putative imbalances of sex steroid concentrations might contribute to the clinical picture. DHT as the most potent androgen might play a pivotal role in the hormone profile of these patients.

Methods A retrospective study included 48 Patients who visited our outpatient clinic with the complaint of PE according to ISSM criteria. 49 age matched patients, who presented with female factor infertility without any sexual disorder served as controls. Assessment of serum concentrations of FSH, LH, total serum Testosterone, free Testosterone, dihydrotestosterone (DHT), SHBG, estradiol, prolactin and PSA was performed in all subjects.

Results PE patients had higher serum testosterone levels than control patients (21.0 ± 11.3 vs 17.0 ± 6.3 nmol/L, $p = 0.048$) and also higher estradiol concentrations (96.4 ± 43.5 vs 72.2 ± 22.8 pmol/L, $p = 0.001$). Nevertheless, serum DHT concentrations were lower in PE patients (0.70 ± 0.25 vs 0.92 ± 0.42 nmol/L, $p = 0.003$). Correspondingly, the ratio of DHT to estradiol and the ratio of DHT to testosterone were lower in PE patients compared to controls ($p = 0.013$ and $p < 0.001$, respectively).

Conclusion PE patients exhibit a differential sex steroid profile compared to age-matched controls, pointing both towards higher aromatization and less 5- α -reduction of testosterone. The physiological background of this finding and potential treatment options have to be further elucidated.

P40

Assoziation des HIV-Status mit sexuellen Funktionsstörungen, soziodemographischen Faktoren, Lebensstil und Komorbiditäten – Ergebnisse der German Male Sex-Studie

S. Schneider-Wirth¹, M. Kron², H. Schulwitz¹, M. Büttner³, C. Arsov⁴, B. Hadaschik^{5,6}, F. Imkamp⁷, J. E. Gschwend¹, K. Herkommer¹

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München; ²Institut für Epidemiologie und Medizinische Biometrie, Universität Ulm; ³Klinik und Poliklinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München; ⁴Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; ⁵Urologische Klinik, Universitätsklinikum Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; ⁶Klinik und Poliklinik für Urologie, Uroonkologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Essen; ⁷Klinik für Urologie und Urologische Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland

Fragestellung Erektile Dysfunktion, *Ejaculatio praecox* und geringe Libido gehören zu den häufigsten sexuellen Funktionsstörungen bei Männern. In vorangegangenen Studien, die meist Risikokollektive untersuchten, konnte gezeigt werden, dass HIV-positive Männer signifikant häufiger als HIV-negative Männer davon betroffen sind. Diese Studie untersucht mit bevölkerungsbasiertem Ansatz als erste unter anderem die Assoziation des HIV-Status mit sexuellen Funktionsstörungen bei 45-jährigen Männern in Deutschland. Aufgrund der derzeitigen Studienlage erwarten wir eine höhere Prävalenz der sexuellen Funktionsstörungen bei HIV-positiven Männern.

Methodik Im Rahmen der German Male Sex-Study, einem Begleitprojekt der deutschen Prostatakrebs-Screening-Studie PROBASE, wurden 45-jährige Männer zwischen April 2014 und April 2016 rekrutiert. In den 4 Studienzentren (Düsseldorf, Hannover, Heidelberg, TU München) wurden die Probanden mittels Fragebögen zu ihren soziodemographischen Daten, ihrem Lebensstil und dem Sexualverhalten befragt. Außerdem wurden ein ärztliches Anamnesegespräch und eine kurze körperliche Untersuchung durchgeführt. Einschlusskriterien waren die Angabe der sexuellen Identität als homosexuell sowie der HIV-Status, der anamnestisch erfragt bzw. durch den Abgleich mit der Medikation erhoben wurde. Die erektile Funktion wurde mit dem IIEF-6 erhoben (erektile Dysfunktion: IIEF-6–25). *Ejaculatio praecox* wurde über die Frage, ob der Proband seine sexuelle Erregung „oft“ oder „fast immer/immer“ nicht unter Kontrolle halten kann, innerhalb von 2 Minuten nach Penetration einen Samenerguss/Orgasmus bekommt und dies für ihn „ein gewisses Problem“, „ein beträchtliches Problem“ oder „ein sehr großes Problem“ darstellt, identifiziert. Die geringe Libido wurde mit der Frage, ob das sexuelle Verlangen in den letzten 4 Wochen „selten“ oder „sehr selten“ verspürt wurde, erhoben.

Ergebnis Von den 471 homosexuellen Männern waren 54 HIV-positiv (11,5 %). Nahezu alle Probanden (84,5 %) gaben an, in den letzten 3 Monaten sexuell aktiv gewesen zu sein. Der Definition einer erektilen Dysfunktion entsprachen mehr HIV-positive Probanden als HIV-negative (63,2 % vs. 50,2 %, $p = n. s.$). Eine *Ejaculatio praecox* konnte bei HIV-positiven Probanden häufiger identifiziert werden als bei HIV-negativen Probanden (12,1 % vs. 6,7 %, $p = n. s.$). Eine geringe Libido wurde von HIV-positiven und HIV-negativen Probanden nahezu gleich häufig berichtet (5,5 % vs. 5,9 %, $p = n. s.$). Die HIV-positiven Probanden gaben signifikant seltener an, in einer festen Beziehung zu leben als HIV-negative Probanden ($p = 0,023$). Es konnte ein starker Zusammenhang zwischen einer HIV-Infektion und einem niedrigen Bildungsgrad gezeigt werden (61,1 % vs. 35,4 %, $p < 0,001$). HIV-positive Probanden rauchten signifikant häufiger als HIV-negative ($p = 0,014$). Kein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen einer HIV-Infektion und Alkoholkonsum, sportlicher Aktivität, Adipositas und dem gesundheitlichen Allgemeinzustand. Zwischen einer HIV-Infektion und allen analysierten Komorbiditäten (Depression, Diabetes mellitus, Hypertonie, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Prostatitis, Varikozele, Zirkumzision, LUTS, Hepatitis B/C) konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung In unserer bevölkerungsbasierten Studie konnten wir zeigen, dass die Prävalenz der erektilen Dysfunktion und der *Ejaculatio praecox* bei HIV-positiven Männern tendenziell, aber nicht signifikant, höher ist als bei HIV-negativen. Die Prävalenz einer geringen Libido war in unserem Kollektiv niedriger als in anderen Studien und überraschender Weise in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt. Im Vergleich zur Literatur konnten wir zwischen keiner der sexuellen Funktionsstörungen und dem HIV-Status einen signifikanten Zusammenhang zeigen. Lediglich bei den soziodemographischen Faktoren Partnerschaft und Bildung, sowie dem Lifestylefaktor Rauchen konnte eine signifikante Assoziation zum HIV-Status gefunden werden.

P41

Ejaculatio praecox: Prävalenz und Assoziation mit Lebensstil und psychosozialen Faktoren von 45-jährigen, heterosexuellen Männern – Ergebnisse der German Male Sex-Studie

V. Zeh¹, H. A. G. Bosinski², A. Dinke³, M. Kron⁴, C. Arsov⁵, F. Imkamp⁶, B. Hadaschik^{7,8}, J. E. Gschwend¹, K. Herkommer¹

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München; ²Praxis für Sexualmedizin, Kiel; ³Klinik für psychosomatische Medizin und Psychotherapie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München; ⁴Institut für Epidemiologie und Medizinische Biometrie, Universität Ulm; ⁵Klinik für Urologie, Universitätsklinikum

Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; ⁶Klinik für Urologie und Urologische Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover; ⁷Urologische Klinik, Universitätsklinikum Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg; ⁸Klinik und Poliklinik für Urologie, Uroonkologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Essen, Deutschland

Fragestellung Die *Ejaculatio praecox* ist eine häufige Sexualstörung des Mannes. Sie steht in Zusammenhang mit Komorbiditäten, wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, erektiler Dysfunktion und benignem Prostata-syndrom. In der vorliegenden Studie sollten die Zusammenhänge zwischen *Ejaculatio praecox* und anderen Faktoren, wie sexuelles Selbstwertgefühl und gefühlter sozialer Druck, herausgearbeitet werden.

Methodik Probanden wurden im Rahmen der German Male Sex-Study, Teil der PROBASE-Studie, rekrutiert. Die Daten wurden im Zeitraum von April 2014 bis April 2016 erhoben. Nach einer kurzen Familien- und Medikamentenanamnese wurden den Probanden Fragebögen zu soziodemographischen Daten, Lebensstil und Sexualverhalten ausgehändigt.

Einschlusskriterien waren eine heterosexuelle Orientierung, kaukasische Herkunft und die Beantwortung der Fragen zur *Ejaculatio praecox*.

Ergebnis Insgesamt erfüllten 10.166 Probanden die Einschlusskriterien. Die Prävalenz der *Ejaculatio praecox* betrug 6,0 %. Probanden mit *Ejaculatio praecox* waren sportlich weniger aktiv, waren sexuell weniger aktiv, waren häufiger in einer festen Partnerschaft, hatten weniger Geschlechtspartner in ihrem Leben und einen geringeren Bildungsstand ($p < 0,001$). Es gab einen starken Zusammenhang zwischen *Ejaculatio praecox* und erektiler Dysfunktion, benignem Prostata-syndrom, Libidostörungen, sexuellem Selbstwertgefühl, gefühltem sozialen Druck, sexueller Unzufriedenheit und schlechtem gesundheitlichen Allgemeinzustand ($p < 0,001$). Kein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen *Ejaculatio praecox* und Rauchen, Alkoholkonsum, Masturbationshäufigkeit, Zirkumzision, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyper-/Hypothyreose, chronischer Prostatitis und einer Varikozele ($p > 0,05$).

Schlussfolgerung Eine *Ejaculatio praecox* zeigt eine Assoziation zu psychosozialen Faktoren, wie sexuelles Selbstwertgefühl und gefühlter sozialer Druck. Hingegen zeigte keine regelmäßige sportliche Aktivität als einziger Lebensstilfaktor einen signifikanten Zusammenhang. Komorbiditäten, wie Hypertonie und Diabetes mellitus, ergaben in der vorliegenden Studie keinen signifikanten Zusammenhang, im Gegensatz zu anderen Vorerkrankungen in der Literatur.

■ Ejakulatqualität und Fertilität

P42

Gene expression analysis of single human spermatozoa: approaches and caveats

A.-N. Spiess, H. Cappallo-Obermann

Klinik für Dermatologie und Venerologie, Andrologische Forschung, Uniklinik Hamburg-Eppendorf, Germany

Study Question The gene expression analysis of human ejaculates or purified spermatozoa comprises the averaging of millions of single expression values from a highly heterogeneous population. Consequently, gene expression changes of some sperm subpopulations may be obscured, resulting in an extreme loss of information. In addition, it is nearly impossible to eliminate all “round” cells (somatic cells such as leukocytes, macrophages, genital tract epithelial cells, immature germ cells) from the sperm population, resulting in a dilution effect that mimics “downregulation” [Cappallo-Obermann, et al., Hum Reprod. 2013; 28: 590–8] and which is a consequence of the ~500–1000-fold higher mRNA levels of a somatic cell (10–15 pg) compared to a sperm (20–50 fg). We previously demonstrated that standard methods of sperm purification do not sufficiently deliver a pure sperm population, as evident by a high contamination of somatic transcripts in most of the published microarray/RNAseq data [Cappallo-Obermann and Spiess, Sci Transl Med 2016; 8: 353tc1]. Single-cell gene expression analysis may circumvent this problem by enabling the quantification of expression levels at the single sperm level, thereby constituting the molecular pendant to a spermogram. The paradigm behind this is to substitute the population-averaged gene expression by a distribution of many single gene expression values, which provides much higher informational content. Differences in gene expression between two populations (i.e. two ejaculates) can then be estimated from differences in distribution parameters such as mean, median, skewness etc., by employing the corresponding statistical tests (e.g. KS-test, χ^2 -test).

Methods Here, we demonstrate approaches that we have undergone to establish a single cell analysis platform for human sperm. Our methodology encompasses the deposition of single human spermatozoa into microtiter plates by flow cytometry sorting (FACS). The specific gating we developed enables the complete absence of contaminating somatic cells (leukocytes, epithelial cells) to avoid the RNA dilution problem. In this advent, we observed that most of the FACS systems are unable to deposit single cells into plates/tubes efficiently, because the plate angle is not parallel to the deposition stream. The deposited sperm are lysed and subjected to either quantitative real-time PCR (qPCR) or digital-droplet PCR (ddPCR). Acquired Cq values (qPCR) or absolute copy numbers

(ddPCR) are displayed as histograms and compared by distributional testing.

Results The deposition of sperm by FACS is highly accurate and we were able to deposit predefined sperm numbers with a deviation 1–5%. qPCR analysis of defined sperm numbers for the single-copy protamine-2 gene demonstrates a linear response of Cq values, indicating a realistic quantification of template molecules. However, for single sperm, the qPCR approach delivers considerable technical variance at low copy numbers, so that biological differences are difficult to discern. Nonetheless, qPCR analysis on a large number of single human sperm for the protamine-2 transcript revealed a large heterogeneity within the sperm population. We are in the process of evaluating ddPCR as well as Stellaris probes, where the latter enables (by fluorescence microscopy) the visualization of single transcripts in sperm of ejaculate smears.

Conclusions We demonstrate a proof-of-principle for the gene expression analysis of single sperm. There are essential problems associated with this setup, because the calculated 5–20 transcript copies/gene/sperm deliver considerable biological variance that is hard to distinguish from the technical noise at low copy numbers. Hence, we believe that

qPCR is not a viable approach to tackle these problems. However, applying ddPCR or Stellaris probes may be more feasible for establishing a robust and realistic quantification of sperm transcript numbers.

P43

Akute Epididymitis: Auswirkungen auf die Hodenfunktion

L. Sturdza, T. Diemer, H.-C. Schuppe, F. Wagenlehner, A. Pilatz

Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Deutschland

Fragestellung Die Auswirkungen einer akuten bakteriellen Epididymitis auf Hodenfunktion und Ejakulatparameter nach adäquater antimikrobieller Therapie sind bisher überwiegend in Tiermodellen untersucht worden. Gegenstand der vorliegenden Studie ist daher die Untersuchung der Hodenfunktion anhand der Ejakulatqualität und eines basalen Hormonstatus von Patienten 14 und 84 Tage nach akuter Epididymitis.

Methoden Seit 2007 wurden im Rahmen einer prospektiven Studie 228 Männer mit akuter Epididymitis rekrutiert. Die Patienten erhielten eine leitliniengerechte antibiotische Therapie. Alle Patienten wurden 14 und 84

Tabelle 3: A. Pilatz, et al. (P 43). Ejakulatbefunde und Sexualhormone im Verlauf nach akuter Epididymitis.

Parameter [§]	Tag 14 [#]	Tag 84 [#]	p [*]
Volumen ($\geq 1,5$ ml) n = 66	2,2 (1,4–3,6)	2,4 (1,3–3,3)	p = 0,295 [*]
pH Wert ($\geq 7,2$) n = 66	8,3 (7,8–8,8)	8,1 (7,8–8,4)	p = 0,023 [*]
Spermatozoenkonzentration (≥ 15 Mio/ml) n = 66	15,9 (3,9–41,9)	39,5 (12,4–57,5)	p = 0,000 [*]
Progressivmotilität (≥ 50 %) n = 56	47,0 (27,0–62,8)	50,0 (38,3–61,5)	p = 0,024 [°]
Normalformen (≥ 4 %) n = 54	4,0 (1,0–9,0)	5,0 (3,0–9,0)	p = 0,024 [*]
Peroxidase pos. Leukozyten (< 1 Mio/ml) n = 59	0,9 (0,3–4,9)	0,2 (0,04–0,5)	p = 0,000 [*]
Granulozyten-Elastase (< 250 ng/ml) n = 62	854,8 (263,3–2000,0)	353,0 (127,2–814,7)	p = 0,000 [*]
α-Glukosidase (> 20 mU/Ejakulat) n = 38	12,3 (8,3–16,6)	13,6 (8,2–19,3)	p = 0,526 [*]
Zink ($\geq 2,4$ μ mol/Ejakulat) n = 34	2,0 (0,5–4,3)	2,5 (0,9–4,3)	p = 0,221 [*]
Fruktose (> 13 μ mol/Ejakulat) n = 44	5,2 (3,5–7,8)	8,4 (4,0–12,4)	p = 0,000 [*]
FSH (1,0–10,0 mU/ml) n = 63	4,9 (2,8–8,0)	5,2 (3,0–8,9)	p = 0,067 [*]
LH (1,9–9,0 mU/ml) n = 62	5,2 (3,7–7,3)	4,4 (3,4–6,4)	p = 0,010 [*]
Testosteron, gesamt (300,0–1000,0 ng/dl) n = 64	370,0 (274,3–487,3)	435,5 (318,0–568,5)	p = 0,036 [*]

[§]unterer Grenzwert nach WHO 2010; ^{*}Median (Interquartilsabstand)

[#]Wilcoxon-Test, [°]T-Test-verbundene Stichprobe; n = Anzahl gepaarter Analysen

Tage nach akuter Epididymitis gebeten eine Ejakulat- und Blutprobe abzugeben. Dies erfolgte grundsätzlich zwischen 8 und 11 Uhr am Morgen. Die Ejakulatanalyse nach WHO 1999/2010 beinhaltete neben den Standardparametern (Volumen, pH-Wert, Konzentration, Motilität und Morphologie) unter anderem Peroxidase-positive Leukozyten, Granulozyten-Elastase und alpha-Glukosidase. FSH, LH und Testosteron im Serum wurden über das Zentrallabor (Siemens ADVIA Centaur) bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte als verbundene Stichproben mittels Wilcoxon-Test. Die Werte sind als Median und Interquartilenabstand (ICR) dargestellt.

Ergebnisse Von den 228 Männern (Medianes Alter: 53 Jahre) lagen von 66 Patienten gepaarte Ejakulat- und Hormondaten sowohl nach 14 als auch 84 Tagen vor. Während sich das Ejakulatvolumen im Verlauf nicht signifikant änderte ($p = 0,295$), sank der pH-Wert von 8,3 auf 8,1 ab ($p < 0,05$). Alle Spermienparameter (Konzentration, Motilität und Morphologie) waren im Verlauf nach 84 Tagen deutlich verbessert (stets $p < 0,05$). Damit verbunden war eine Reduktion der Inflamationsparameter Peroxidase-positive Leukozyten und Elastase (stets $p < 0,001$). Bei den Sexualhormonen zeigte sich keine Veränderung der FSH-Werte (4,9 vs. 5,2 mU/ml; $p > 0,05$), während LH sank (5,2 vs. 4,4 mU/ml; $p < 0,05$) und das Gesamttestosteron anstieg (370 vs. 435 ng/dl; $p < 0,05$) (Tab. 3).

Schlussfolgerung Die Hodenfunktion zeigt 84 Tage nach akuter Epididymitis im Vergleich zur Frühphase nach 14 Tagen unter leitliniengerechter antibiotischer Therapie eine signifikante Erholung. Neben rückläufigen Entzündungsparametern im Ejakulat waren sowohl verbesserte Spermienparameter als auch eine Zunahme der Serum-Testosteronspiegel im Verlauf zu beobachten.

■ Fertilitätschirurgie

P44

Morzellierung von Myomen und Malignitätsrisiko

L. Mettler, I. Alkatout, K. Abdusattarova
Frauenklinik, Universitätsklinikum Kiel, Schleswig-Holstein, Deutschland

Fragestellung Frequenz uteriner Sarkome bei Patientinnen mit Myomchirurgie an der Universitätsfrauenklinik Kiel und Inzidenz präoperativ nicht bekannter Myome.

Methodik Retrospektive Analyse operierter Myome an der Universitätsfrauenklinik Kiel der Jahre 2003–2015.

Ergebnisse 2269 gutartige Myome und 7 Sarkome wurden in diesem Zeitraum operativ behandelt. Folgende Operationen fanden statt: Myomektomien *per laparoskopiam* und laparotomiam sowie vaginale, laparoskopische und abdominale Hysterektomien. Sechs der präoperativ als uterine Leiomyosarkome (ULMS) oder endometriale Sarkome (ESS), HGUS oder ERMS erkannten Patientinnen wurden konventionell mit der entspre-

chenden Therapie behandelt. Nur bei einer Patientin, 48 Jahre alt, die eine laparoskopische subtotale Hysterektomie mit Morzellierung erhielt, wurde die Diagnose einer ESS postoperativ gestellt. Die Immunohistochemie zeigte CD 10 (+), Desmin (+), Smooth Muscle Aktin (SMA) (-), Aktin (-) und 5 % Ki 67(+). Zwei Wochen nach der Erstoperation folgte bei dieser Patientin eine Zervix-Stumpf-Resektion mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie und Omentektomie.

Schlussfolgerung Die Inzidenz uteriner Sarkome war 7 in 2275 (0,31 %) und das Auftreten präoperativ nicht erkannter endometrialer Stroma-Sarkome (ESS) war 1:2269 (0,044 %) bei Patientinnen mit *Uterus myomatosus* oder uterinen Sarkomen. Unsere Kieler Daten korrelieren gut zu anderen internationalen Publikationen und zeigen, dass bei guter Vordiagnostik – MRT in Verdachtsfällen, Ultraschall und LDH-Bestimmung – ein Sarkom weitgehend ausgeschlossen werden kann.

■ Genetik in der Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

P45

Expanded genetic carrier screening decreases the risk of conceiving an affected child in both selected and unselected populations

A. Abraham¹, J.-J. Guillén¹, M. Palah², E. Alsina²,
R. Vassena¹, A. Rodríguez¹
¹Clinica Eugén, Reproduktionsmedizin; ²Reproductive genetics, Humangenetik, Barcelona, Spain

Objective It is estimated that there are more than 1300 recessively inherited disorders, whose symptoms range from very mild to severe, cumulatively affecting at least 30 in every 10,000 children. Carrier screening is defined as the detection of carrier status of recessive diseases in couples or persons who do not have an a priori increased risk of being a carrier based on their or their partners' personal or family history. Facilitated by new genetic testing technologies expanded carrier screening allows to screen for multiple autosomal and X-linked recessive disorders, regardless of ancestry or geographic origin. This study examines the question if expanded carrier screening (ECS) does reduce the risk of conceiving an affected child through assisted reproduction with either own or donated gametes?

Material and Methods Retrospective consecutive cohort study including 2380 women (both patients and donors) and 986 men between March and December 2015. All were tested with CarrierMap (Recombine), an expanded carrier screening test covering 2647 mutation in 311 genes implicated in 311 diseases. DNA samples were prepared and purified following the QIAamp DNA Purification Protocol via QIAcube (QIAGEN). Samples were assayed using the Infinium iSelect

HD Custom Genotyping BeadChip platform (Illumina). Donor candidates with a family history of FXS or more than 45 CGG triplets repetitions, mental retardation, chromosomal abnormalities, genetics or neurological conditions are excluded from the donor program. In addition 894 matches to identify the reproductive risk were performed.

Results A total of 3366 expanded carrier screening test were performed, 2380 women and 986 men. Of the 3366 individuals tested, 1458 (43.3%) were positive for at least one mutation; of them, 1091 (32.4%) carried 1 mutation, 306 (9.1%) 2 and 54 (1.6%) 3; 7 individuals carried 4 or more of the mutations analyzed. The most frequent mutations found were for Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness (GJB2 Related): 152 (10.4%); carrier frequency 1:22. Pseudocholinesterase Deficiency: 98 (6.7%); 1:34. Fragile X syndrome: 97 (6.6%); 1:34. Cystic Fibrosis: 89 (6.1%); 1:38. Familial Mediterranean fever (FMF): 82 (5.6%); 1:41. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency: 74 (5.0%); 1:45. 21-Hydroxylase-Deficient-Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia: 40 (2.7%); 1:84. Sickle-Cell Anemia: 29 (1.9%); 1:116. Out of the total of 894 matches (747 between donor and patient, 114 between 2 donors and 33 between patients), 26 (2.9%) showed a high reproductive risk, since both members were carrier for mutations leading to the same disease, thus having a 1 in 4 probability to generate an affected child. While matching with high reproductive risk involving donor gametes were replaced with different donors, the 2 couples of patients with high reproductive risk received genetic counseling and PGD was recommended.

Conclusion Expanded carrier screening effectively detects couples at a higher risk of conceiving an affected child with a positive match rate of 2.9%. This value should be higher in unselected patients, as most attempted matchings were made with donors preselected for lower carrier status by extensive family history review and initial specific genetic testing.

P46

FAMe (Fertility and Aging in healthy Men): Molecular features of ageing in sperm and blood DNA of healthy men

S. Laurentino¹, E. Pohl¹, C. Krallmann¹, J.-F. Cremers¹,
K. Czeloth², S. Kliesch¹, J. Gromoll¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Germany; ²Department of Urology, Medical University of Vienna, Austria

Introduction In Western societies, there is a tendency for increasing parental age. While the effects of ageing on female fertility and germline have been thoroughly studied, relatively little is known about the impact of ageing in the germline and fertility of men. Moreover, it is difficult to differentiate between the true effects of ageing and those of associated morbidities. The objective of this study was

to study molecular features of ageing such as telomere length and epigenetic changes in the blood and sperm of a cohort of healthy men.

Material and Methods The FAME cohort is composed of a total of 197 healthy men aged between 18 and 84 years. All probands underwent a thorough physical evaluation and provided sperm and blood samples. Sperm was analysed and swim-up fractions were prepared according to WHO criteria (2010). DNA was isolated from blood and swim-up sperm and analysed for relative telomere length (rTL) and DNA methylation of *LINE1* by pyrosequencing.

Results Relative telomere length in blood was inversely correlated with age ($p = -0.41$, $p < 0.001$), while in sperm rTL this correlation was positive ($p = 0.39$, $p < 0.001$). DNA methylation of *LINE1* repetitive elements did not show any alterations with age in this cohort (mean methylation = 79.29 ± 0.14).

Conclusion Telomere attrition is considered one of the hallmarks of ageing. In this cohort, we could confirm that telomeres become shorter with increasing age. In the male germline, however, telomerase has been previously shown to remain active, maintaining the telomeres long in sperm. Our results show that rTL in fact increases substantially in sperm with age. Some studies have shown an overall ageing-associated decrease of DNA methylation, including in repetitive elements. We could not detect any changes in the DNA methylation of *LINE1* with increasing age. This is likely due to the health status of the studied cohort, as *LINE1* methylation is probably affected by co-morbidities associated with ageing but not by the ageing process itself. In conclusion, this cohort allows differentiating between the molecular changes caused by ageing itself (telomere attrition in somatic lineages) from those caused by co-morbidities (*LINE1* demethylation).

bridization) untersucht. Verwendet wurde das 400k Array Set (Agilent). Die Ergebnisse wurden mit Daten aus Array-CGH-Analysen bei Männern mit normaler Spermatogenese verglichen und Kandidatengene selektiert.

Ergebnisse Die durchschnittliche Gesamtzahl an CNVs war in der Patienten- und Kontrollgruppe vergleichbar. Ebenfalls zeigte sich kein Unterschied bei der getrennten Analyse der beobachteten Verluste (Deletionen) oder Zugewinne (Duplikationen). Wie bei den zuvor untersuchten Patienten mit SCOS, fand sich allerdings auch bei den Patienten mit einem Meiosearrest ein leicht erhöhter Anteil an geschlechtschromosomalen Imbalancen. Von den CNVs, die ausschließlich bei den Patienten mit Meiosearrest zu finden waren und auch nicht als polymorphe CNVs in der Database of Genomic Variants (DGV) beschrieben wurden, wurden 32 CNVs zur weiteren Bewertung der betroffenen Gene selektiert. Insbesondere wurde ein CNV innerhalb des spermien-spezifischen *CATSPERB*-Gens (OMIM 611169) nachgewiesen. *CATSPERB* ist zusammen mit den anderen Proteinen des CatSper-Ionenkanals (CatSper1–4, CatSperG) im Hauptstück des Flagellums lokalisiert. Die CatSper-Kanäle sind für die Aufnahme von Kalzium notwendig und wurden bislang im Zusammenhang mit der Spermienmotilität beschrieben.

Schlussfolgerung Die Analyse von spezifischen CNVs bei Patienten mit einem Meiosearrest ergab Hinweise auf neue Kandidatengene, die einen Einfluss auf die Spermatogenese haben könnten.

Literatur:

1. Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, et al. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. PLoS One 2011; 6: e19426.

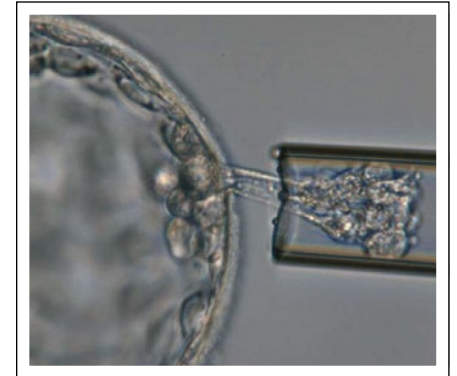


Abbildung 4: B. Paulmann (P48). Entnahme von 5–10 Trophektodermzellen einer expandierten Blastozyste.

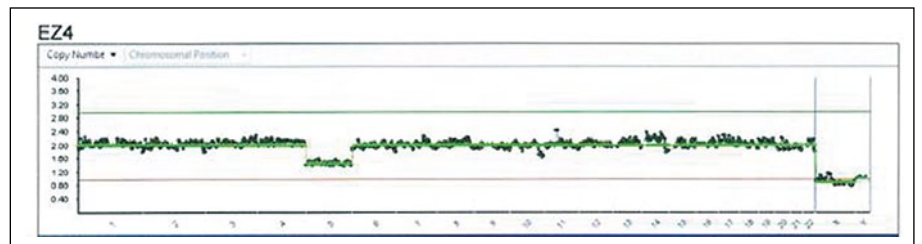


Abbildung 5: B. Paulmann (P48). Mosaikbefund durch NGS.

P47

Array-CGH bei infertilen Männern mit Meiosearrest

A. Röpké¹, S. Kliesch², P. Wieacker¹, F. Tüttelmann¹

¹Institut für Humangenetik, Universität Münster;

²Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster, Deutschland

Fragestellung Infertile Männer mit Spermatogenesestörungen zeigen eine höhere Prävalenz von Chromosomenanomalien als die Allgemeinbevölkerung. Mehrere genomweite Analysen zum Nachweis von chromosomalen Imbalancen, die bei einer konventionellen Chromosomenanalyse nicht detektiert werden können, haben bei infertilen Männern (u. a. aufgrund eines Sertoli-Cell-Only-Syndroms, SCOS) ebenfalls häufiger Copy-Number-Variants (CNVs) ergeben (u. a. [1]). Abgesehen davon wurden in den vergangenen Jahren zunehmend Gene identifiziert, in denen Sequenzveränderungen eine Oligo- oder Azoospermie verursachen.

Methodik 26 Patienten mit Azoospermie aufgrund eines Meiosearrests wurden mittels Array-CGH (Comparative Genomic Hy-

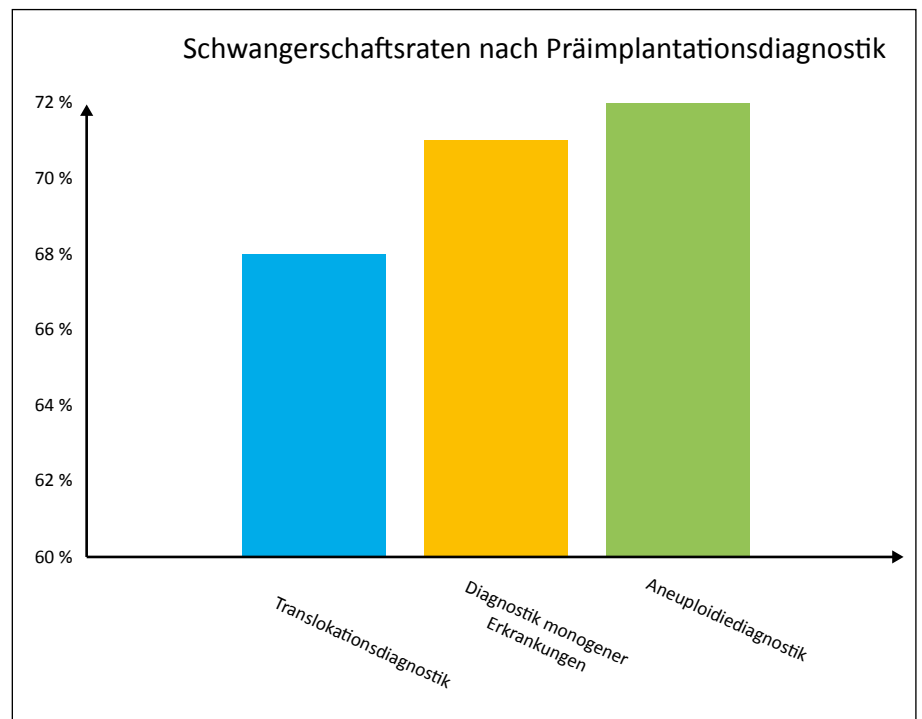


Abbildung 6: B. Paulmann (P48). Klinische Schwangerschaftsraten nach PID.

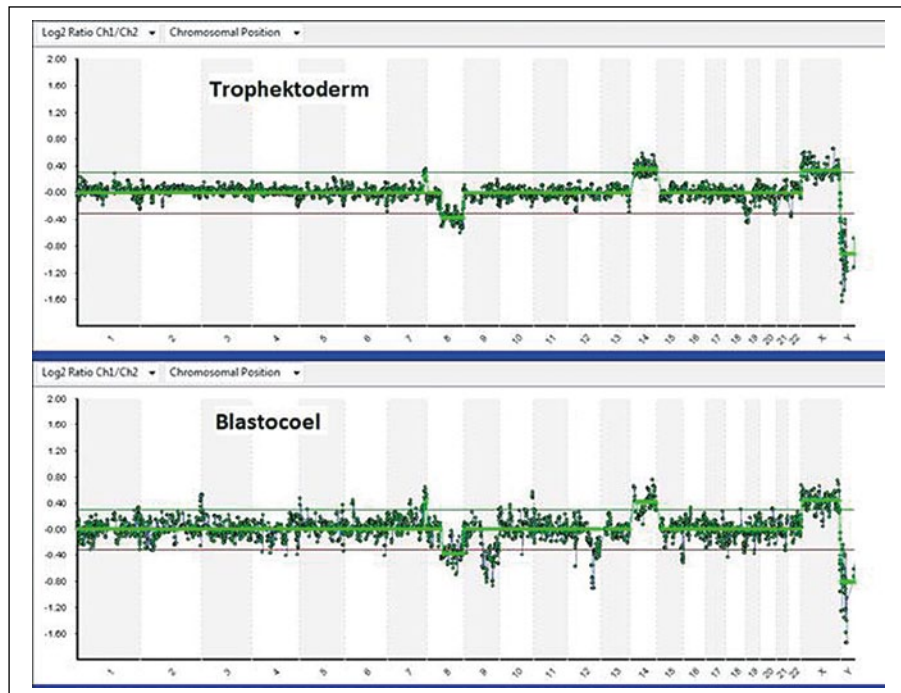


Abbildung 7: B. Paulmann (P48). NGS-Muster im Blastocoel.

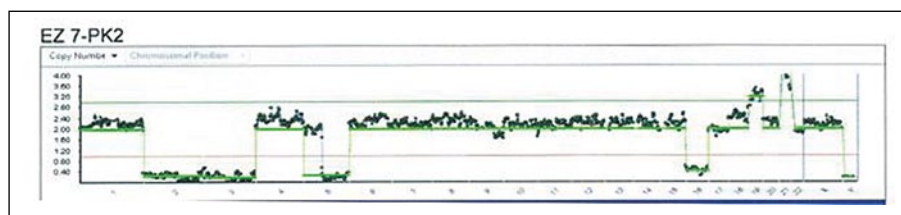


Abbildung 9: A.-K. Sommer (P49). Chaotische Befunde im NGS-Muster.

P48

Aktivitäten zur PID im MVZ KITZ Regensburg GmbH

B. Paulmann

MVZ KITZ Regensburg GmbH, Regensburg, Deutschland

Einleitung Die Zulassung als PID-Zentrum besteht seit dem 30.06.2015 sowohl mit dem Zentrum für Humangenetik Regensburg von Frau Prof. Hehr als auch mit dem Medizinisch Genetischen Zentrum (MGZ) München von Frau Prof. Holinski-Feder.

Methodik Die kritischen Punkte des Verfahrens stellen die Trophektodermbiopsie und die Vitrifikation von Blastozysten dar (Abb. 4). Aus genetischer Sicht sind für eine sichere Diagnostik etwa 30 % Mosaik zu berücksichtigen [1]. Durch NGS wurde diese Diagnostik möglich; die Befunde müssen häufig durch Pränataldiagnostik ergänzt werden (Abb. 5).

Ergebnisse Es wurden von Juli 2015 bis Juni 2017 insgesamt 69 Patientinnen nach Vorliegen eines Ethikvotums zur PID behandelt. Die klinischen Schwangerschaftsraten erreichen 70 % pro Embryotransfer (Abb. 6).

Schlussfolgerung Die PID könnte alternativ nach Abschluss von Validierungsuntersuchungen durch die Untersuchung der Blastozellflüssigkeit und des Kulturmediums ersetzt

werden, die beide zellfreie DNA des Embryos enthalten und eine atraumatische Vorgehensweise gewährleisten. Bei entsprechenden methodischen Voraussetzungen ist eine Konkordanz zum DNA-Befund des Embryos zu erwarten (Abb. 7). Im Rahmen der Aneuploidiediagnostik konnten durch PID im Blastocoel klinische Schwangerschaftsraten pro Embryotransfer von 80 % erreicht werden.

Literatur:

1. Esfandiari N, et al. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? J Assist Reprod Genet 2016; 33: 1439–44.

P49

Probleme bei der Aneuploidiediagnostik durch PKD

A.-K. Sommer

MVZ KITZ Regensburg GmbH, Regensburg, Deutschland

Fragestellung Die Aneuploidiediagnostik (PGS) hat sich in den vergangenen Jahren international als Verfahren im Rahmen der Reproduktionsmedizin etabliert. Als Indikationen gelten:

- Implantationsversagen
- Habituelle Abortneigung ohne Nachweis von Aneuploidien
- Alter > 38 Jahre

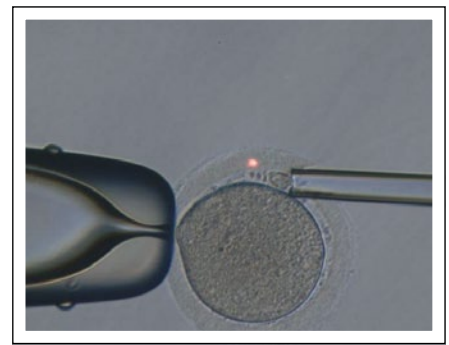


Abbildung 8: A.-K. Sommer (P49). PKD-Entnahme.

Bei diesen Indikationen ist von einer Aneuploidierate > 80 % auszugehen. Für diese Fälle ist kein Ethikvotum für eine PID zu erwarten. Die PKD muss deshalb als Alternative gesehen werden (Abb. 8).

Methodik Die Entnahme der Polkörperchen am Tag 0 und 1 stellen technisch kein Problem dar. Molekulargenetisch wurden Schwierigkeiten bei der Diagnostik durch Degradierung der Polkörperchen deutlich. Die Diagnosestellung durch NGS wird erschwert, eine fehlende Diagnose durch PKD ist in 12,2 %, durch PID jedoch nur in 5,7 % zu erwarten [1]. Weiterhin ist die Aussagefähigkeit aufgrund postzygotischer methodischer Fehler reduziert. Der prädiktive Wert der PKD für Aneuploidie beträgt 70,3 % [1]. Nach der ESHRE-Studie besteht jedoch eine 94 %-Vorhersage für einen Ploidiestatus der Zygote [2] (Abb. 9). Die PKD ist durch diesen Mangel der PID unterlegen.

Ergebnisse Es konnten bisher bei 11 Patientinnen PKD zur Aneuploidiediagnostik vorgenommen werden. Bei 8 Frauen wurden klinische Schwangerschaften (73 %) mit einer Abortrate von 12,5 % erzielt.

Schlussfolgerung Die PKD wird in Deutschland trotz schwieriger Diagnostik weiterhin aufgrund fehlender gesetzlicher Möglichkeiten erforderlich sein.

Literatur:

1. Salvaggio CN, et al. Polar body based aneuploidy screening is poorly predictive of embryo ploidy and reproductive potential. J Assist Reprod Genet 2014; 31: 1221–6.
2. Geraedts J, et al. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! Hum Reprod 2010; 25: 575–7.

■ Endometrium, Endometriose, Myome

P50

Endometriosis and infertility: Analysis of microRNA profiles in follicular fluid of women with or without ovarian endometriosis

K. Glaß, S. Kusche¹, I. Trinkaus, P. Wimberger, M. Goeckenjan

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, TU Dresden, Germany

Introduction Recent research shows that microRNAs (miRNAs) might play a leading role in the pathophysiology of infertility in women with endometriosis. A key to understanding infertility in women with ovarian endometriosis is based on altered ovarian microenvironment and oocyte maturation.

Methods To identify possible miRNAs of interest in women with or without ovarian endometriosis follicular fluid (FF) was collected during assisted reproduction techniques (ART) between 10/2015 and 10/2016 at a university hospital. Women were included after informed consent. The local ethic committee approved the study protocol. FF was collected after oocyte retrieval for ART. RNA purification mirVANA Paris Kits (Ambion) were used after spike-in with athmiR-159a for normalization. Two pools were formed using FF samples from 10 women with and 10 women without ovarian endometriosis. 754 human miRNAs were analyzed with TaqMan miRNA array. To confirm the results single qPCR of possible target-miRNAs was performed.

Results 11.2 ± 3.5 oocytes were retrieved in the control group compared to 7.4 ± 4.4 oocytes in the group with ovarian endometriosis. The maturation index in patients with ICSI was 75.6% vs 60.3% (controls vs. ovarian endometriosis).

In follicular fluid and serum of both groups we identified a specific miRNA profile in women with ovarian endometriosis. 208 of 754 miRNAs were detectable in FF and had a Ct < 30, 70 were up-regulated, 32 down-regulated with at least 25 % chance.

Five possible miRNAs in follicular fluid were selected according to the current research on miRNAs and endometriosis as well as ovarian microenvironment. The expression of these 5 miRNAs was controlled with qPCR-specific miR-primers and showed persistent significant differences for miR-142-3p and miR-451 ($n = 20$, $p < 0.01$).

Discussion/Conclusion Our results of miRNA-profiles in follicular fluid of women with ovarian endometriosis vs. controls show differences in the expression of target miRNAs which were already discussed in the context of oocyte maturation, ovarian microenvironment and endometriosis.

The miRNAs of the let-7-family are considered as unique miRNAs of gonadal tissue and play cellular "housekeeping" roles [Li et al. 2015]. These did not show a difference in both groups after single qPCR-analysis.

miR-451 expression correlates with oocyte maturation in humans. Overexpression is found in the follicular fluid of oocytes in early stages of maturation [Moreno et al. 2015]. The 2.2-fold overexpression in women with ovarian endometriosis compared to the control group in this study may reflect the lower maturation index. miR-142-3p is described as a modulator of inflammation in the context of endometriosis [Ludwig 2014]. In our study follicular fluid of women with ovarian endometriosis also showed an overexpression with a fold change of 2.5 which reflects the local inflammation process induced by ovarian endometriosis.

These first results are to be confirmed in a higher number of patients.

P51

Myofibroblastic Metaplasia in Endometriosis (EM) can be induced by Seminal Plasma (SP) and its Transforming Growth Factor beta 1 (TGFβ1)-content

M. G. Ibrahim¹, S. Schäfer², S. Kliesch³, L. Kiesel¹, M. Götze², A. Schüring¹

¹Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Kinderwunschzentrum; ²Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Germany

Introduction TGFβ1 mediates a myofibroblastic metaplasia in EM lesions, in which myofibroblasts predominate and express alpha smooth muscle actin (ASMA). TGFβ1 is highly concentrated in the peritoneal fluid (PF) in EM, but higher concentrated in SP. Our objective was to determine whether SP and its TGFβ1-content can induce metaplasia in EM.

Materials and Methods Liquefied semen samples were obtained from normozoospermic men ($n = 23$), centrifuged and the supernatant was pooled. PF from EM patients ($n = 12$) was collected intra-operative. TGFβ1-ELISA was carried out. Endometrial biopsies ($n = 4$), 12Z (endometriotic epithelial) and St-T1b (endometrial stromal) cell lines were used for in-vitro studies and PCR was performed.

TGFβ1 was measured in SP and in PF. In-vitro-studies were conducted to investigate an effect of 2h/6h incubation with SP 10% regarding the expression of metaplasia markers (ASMA, Fibronectin) and metaplasia mediators (SNAIL 1/2, ZEB2, and TWIST). To neutralize TGFβ1 in SP, anti-TGFβ1 antibody was added.

Results TGFβ1 concentration in SP-pool (88.17 ng/ml) was significantly ($p < 0.001$) higher than in PF (6.79 pg/ml). ASMA and fibronectin expression was significantly higher in both endometrial biopsies as well as in both cell lines after 2h and 6h incubation with SP 10%. Furthermore, neutralizing TGFβ1 in SP down-regulated ASMA and fibronectin expression. Incubation with SP 10% induced a rapid up-regulation of SNAIL1/2 (as early as 2h incubation), in addition to a delayed up-regulation of ZEB2 expression (as late as 6 h incubation). In contrast, TWIST expression was down regulated in both cell lines.

Conclusion SP induces a robust myofibroblastic metaplasia of both endometriotic and endometrial cells which is a key biological step in the pathogenesis of EM. This metaplasia is (early) SNAIL-mediated but (late) ZEB2-mediated. This effect could be a new start point for further research about the influence of SP on the pathogenesis of EM.

P52

mikroRNA miR-218 als Regulator von Zellviabilität und Invasivität bei der Endometriose

A.-B. Kency¹, B. Greve², S. D. Schäfer¹, A. N. Schüring¹, L. Kiesel¹, M. Götze¹

¹Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster; ²UKM, Strahlentherapie-Radioonkologie, Münster, Deutschland

Fragestellung Die Endometriose ist eine benigne Erkrankung, die das Vorhandensein endometrialer Drüsen und endometrialen Stromas außerhalb des Cavum uteri bezeichnet. Pathogenetisch wird eine Fehlregulation von mikroRNAs, darunter auch der mikroRNA-218, diskutiert. Bei diesen handelt sich um kleine, nicht kodierende RNA-Abschnitte, die zelluläre Prozesse auf posttranskriptioneller und translationaler Ebene regulieren. Ziel dieser Arbeit war es, die funktionellen Auswirkungen der mikroRNA-218 hinsichtlich Zellviabilität, Motilität und Apoptose in der epithelialen 12Z-Endometriosezell-Linie zu analysieren und mögliche Zielgene zu identifizieren.

Methodik Die immortalisierte Endometriosezell-Linie 12Z, die endometriale Stromazell-Linie St-T1b und primäre Stromazellen von Endometriosepatientinnen wurden *in vitro* transient mit mikroRNA-Vorstufen transfiziert. Änderungen im Zellverhalten wurden mittels MTT-Assay und Videomikroskopie analysiert. Expressionsunterschiede vorhergesagter Zielgene wurden mittels qPCR, Western-Blot und Durchflusszytometrie untersucht.

Ergebnis Die Überexpression von mikroRNA-218 führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellviabilität und -motilität. Hinsichtlich der Apoptose zeigten sich keine Unterschiede. Gleichzeitig konnte auf Gen- und Proteinebene eine signifikant verminderte Expression des Proteoglycans Decorin dargestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls eine verminderte Expression des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR auf mRNA- und Proteinebene bei gleichbleibender mRNA-Expression von ERBB2, ERBB3 und IGF-1R, sowie eine verminderte Survivinexpression auf mRNA-Ebene. Die beiden weiteren untersuchten Zielgene WASL und MMP2 zeigten keine signifikant veränderte Regulation.

Schlussfolgerung Unter den analysierten Zielgenen steht die nach mikroRNA-218-Transfektion verminderte Decorinexpression mit seinen bekannten anti-proliferativen und anti-invasiven Eigenschaften im Einklang mit den gleichzeitig beobachteten phänotypischen Veränderungen, also der Zunahme der Zellviabilität und -motilität. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass die Fehlregulation der mikroRNA-218 einen Einfluss auf die Pathophysiologie der Endometriose hat, und bilden eine Grundlage für weitere experimentelle Studien.

P53

Erhöht das „endometrial scratching“ in 2 konsekutiven Zyklen die Chance auf den Eintritt einer Schwangerschaft bei RIF-Patientinnen?

D. M. Baston-Büst, S. J. Pour, S. Schu, J.-S. Krüssel, A. P. Bielfeld

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

Fragestellung Bislang offerierte die Datenlage zum Nutzen des „endometrial scratching“ einen moderaten Benefit bei Patientinnen mit mindestens 2 vorausgegangenen erfolglosen Embryotransfers (ET) [1]. Viele dieser Patientinnen fallen unter die Definition des „recurrent implantation failure“ (RIF) mit ET von mindestens 4 Embryonen guter Qualität in mindestens 3 frischen oder Kryozyklen bei Patientinnen < 40 Jahren [2]. Initial ursächlich sind entweder der Embryo oder das Endometrium. Da sowohl die Untersuchungen des Embryos mittels PKD oder PID ggf. gesetzlich limitiert bzw. auch im Fall des Endometriums kostenintensiv (beispielsweise ERA) sind, sollte in dieser Untersuchung der Frage nachgegangen werden, ob bei RIF-Patientinnen das konsequente „scratching“ in den Lutealphasen zweier nicht stimulierter Zyklen die Chancen auf den Eintritt einer Schwangerschaft im nachfolgenden stimulierten Zyklus mit ET bzw. im Kryozyklus erhöhen kann.

Methodik Retrospektive Fall-Kontroll-Studie mit 14 RIF-Patientinnen mit zweifachem konsekutiven „scratching“ vs. 42 RIF-Patientinnen mit einfachem „scratching“ (Probet, Einmalbiopsiesaugkurette, Gynemed, Lensahn) jeweils in der Lutealphase vor geplantem Zyklus mit ET, durchgeführt im UniKiD zwischen April 2014 und November 2016. Das Ethikvotum der Heinrich-Heine-Universität lag vor (Studiennummer 4394R) inkl. der Zustimmung der Patientinnen.

Ergebnisse Die Patientinnen zeigten hinsichtlich ihrer Anamnese an vorab durchgeführten ETs mit Embryonen guter Qualität (mind. 2, max. 10 ETs) keinen Unterschied. Ebenso fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich Alter der Patientinnen, Tag des ETs (Tag 2, 3 oder 5) oder der Anzahl der bislang transferierten Embryonen guter Qualität.

Das konsequente „scratching“ erhöhte in den untersuchten Patientinnen den Eintritt einer Schwangerschaft um das 3,8-Fache (95%-CI 1,06–13,3).

Schlussfolgerung Mit dem konsequente „scratching“ ist eine für RIF-Patientinnen kostengünstige Alternative geboten. Weitere Analysen schließen sich derzeit an, die versuchen, diesen Benefit auf molekularer Ebene zu identifizieren.

Literatur:

1. Nastri CO, et al. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 3: CD009517.

2. Coughlan C, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 14–38.

Finanzielle Förderung: Ferring Frederick Paulsen Preis 2014 an DMBB und APB.

P54

Seminal plasma (SP) and its high TGFβ1-content can differentially regulate the cell migration, apoptosis and metaplasia of endometrial cells in regard to endometriosis (EM) pathogenesis

M. G. Ibrahim¹, S. Schäfer², S. Kliesch³, L. Kiesel⁴, B. Greve⁴, M. Götze², A. Schüring¹

¹Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Kinderwunschzentrum; ²Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe;

³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie;

⁴Klinik für Strahlentherapie – Radioonkologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Introduction SP comes in contact with the endometrium following intercourse, delivering its TGFβ1 to endometrial cells. The latter contributes to EM pathogenesis. In this study we investigated a possible effect of SP and its TGFβ1-content on cell migration, apoptosis and metaplasia of the endometrial cells.

Materials and Methods SP was collected from semen samples of normozoospermic men (n = 23). Peritoneal fluid (PF) (n = 14) was collected from EM patients. TGFβ1 level was assessed in both using ELISA. 12Z (endometriotic epithelial), St-T1b (endometrial stromal) cell lines as well as endometrial biopsies of premenopausal women (n = 4) were used for the in-vitro-studies.

In-vitro-studies were carried out in 6 groups; controls, SP1%, SP10%, SP1%+TGFβ1 Activin receptor-Like Kinase Inhibitor (ALK-I), ALK-I and TGFβ1. Flow cytometry to assess apoptosis, a scratch wound assay to assess cell migration and real-time PCR to assess the expression of a metaplasia marker (alpha smooth muscle actin “ASMA”) were done.

Results TGFβ1 in SP (average = 92.88 ng/ml) as well as in SP-pool (88.17 ng/ml) was significantly higher than in PF (average = 6.79 pg/ml) (p < 0.001).

Cell migration and apoptosis: SP 1% inhibited cell migration of endometrial epithelial cells, yet not reversed by blocking TGFβ1 in SP. Nevertheless, TGFβ1 alone stimulated cell migration, yet partially blocked by adding TGFβ1-inhibitor.

SP 1% forced endometriotic cells into apoptosis; the latter was partially reversed by blocking TGFβ1 in SP. SP10% massively induced apoptosis and reduced cell viability after prolonged incubation times (24h), resulting in cell detachment from culture plates.

Myofibroblastic metaplasia. While SP 10% robustly up-regulated the ASMA-expression in endometrial tissue as well as cell lines, the effect of SP 1% was yet more variable.

Conclusion SP induces metaplasia and apoptosis, but inhibits the endometrial cell

migration, suggesting a possible (protective) effect against EM. However, TGFβ1 stimulates cell migration and metaplasia, favouring EM genesis. This suggests a differential effect of SP and TGFβ1 on the endometrial cell behaviour regarding EM pathogenesis.

P55

Expression of prostaglandin E2 receptor EP1 in human healthy and diseased Endometrium

J. Zhu, C. Kuhn, M. Rahmeh, S. Mahner, V. von Schönfeldt, U. Jeschke

Department of Obstetrics and Gynecology, Campus Großhadern and Campus Innenstadt, LMU, München, Germany

Background Prostaglandin E2 (PGE2) is well-described to be associated with both endometrial functions and disorders.

Objectives Primary aim of this study was to access the expression of prostaglandin E2 receptor 1 (EP1) in human healthy endometrium across menstrual cycle and in pathological endometrium, such as ovarian endometriosis and endometrial cancer to explore the underlying mechanisms that affect the growth and function of endometrial epithelium and stroma.

Methods We retrospectively analyzed the EP1 expression in 42 human nonpregnant endometria across the menstrual cycle and diseased endometria by immunohistochemistry. The variation of EP1 was compared among health endometrium, ovarian endometriosis (n = 14), and endometrial cancer (n = 140) crosswise.

Results EP1 presented cyclical changes with apparently increased expression in both epithelium and stroma during the proliferative phase. EP1 expression in epithelium was increased in endometriotic tissue compared to healthy endometrium and tumor tissue, while in stroma, the staining in tumor was lower than that in both normal tissue and endometriosis. No significant differences in EP1 expression were detected for stage subtypes in endometriosis and histological, stage, grading, metastatic and recurrent subtypes in endometrial cancer. EP1 was also correlated to neither progression-free survival nor overall survival of patients with cancer. EP1 expression in progesterone receptor B (PRB)-positive tumor was stronger compared to PRB-negative tumour.

Conclusion EP1 may play a role in human endometrial physiology and pathology. Further studies on the effect of EP1 on human endometrium are needed.

■ Natürlicher und stimulierter Zyklus

P56

SART in der Kinderwunschtherapie – Ergebnisse einer Beobachtungsstudie

A. Schweizer-Arau¹, Y. von Hasselbach², A. Vogel³, V. Hochpöcher³, R. M. Popovic³, K. Meissner⁴
¹Private Praxis, Diessen; ²Praxis Prof. Hempen, München; ³Praxis Kiiz, München; ⁴Hochschule Coburg, Germany

Fragestellung Patientinnen mit langjährigem Kinderwunsch und erfolglosen konventionellen IVF- (cIVF-) Zyklen wenden sich oft an Psychotherapeuten und Ärzte der TCM (Traditionelle Chinesische Medizin). Ob diese Therapien Erfolg haben, ist unklar. Im Jahr 2014 haben wir ein sogenanntes „TCM-Register“ begonnen, um die Ergebnisse der komplementären Kinderwunschbehandlung mit TCM zu verfolgen. Wir haben nun erstmals die Ergebnisse des Jahres 2014 für eine Praxis ausgewertet, in der die sogenannte Systemische Autoregulationstherapie (SART), eine Kombinationstherapie aus tiefenpsychologischer Psychotherapie und TCM, im Rahmen der Kinderwunschbehandlung angewandt wurde.

Material und Methoden Prospektive Beobachtungsstudie aller 119 Frauen (Alter im Jahr 2014, $36 \pm 4,2$ [SD] Jahre, Spannweite 25–45 Jahre), die 2014 in einer privaten Praxis am Ammersee für Psychotherapie und TCM wegen unerfüllten Kinderwunsches in Behandlung waren oder sich 2014 dort erstmals vorstellten. Die Therapie bestand aus Akupunktur, Moxibustion, Schröpfen, chinesischen Heilkräutern, Nahrungsergänzungsmitteln und tiefenpsychologischer Psychotherapie. Die Durchschnittsdauer des unerfüllten Kinderwunsches betrug im Mittel $4,7 \pm 3,0$ Jahre (1–15 Jahre), 28 der 119 Patientinnen hatten bereits erfolglose konventionelle IVF-Behandlungen (cIVF) mit Gonadotropinen durchgeführt.

Ergebnisse Von den 119 Patientinnen wurden 92 (77 %) bis August 2017 mindestens einmal schwanger, davon gebären 84 Frauen (71 %) ein Kind und 8 Frauen (7 %) hatten mindestens einen Abort ohne weitere erfolgreiche Schwangerschaft. Von den 84 erfolgreichen Schwangerschaften erfolgten 23 Geburten (27 %) nach spontaner Konzeption, 35 (42 %) nach „natural cycle“-IVF (nC-IVF) bzw. nC-ICSI, 1 (1 %) nach IUI, 10 (12 %) nach cIVF bzw. c-ICSI, und 15 (18 %) nach alternativen Befruchtungsmethoden. In der Altersgruppe bis 36 Jahre (Alter Beginn 2014) lag die Geburtenrate bei 79 % ($n = 50$), in der Gruppe von 37–39 Jahren lag sie bei 68 % ($n = 19$), und in der Gruppe > 40 war sie 58 % ($n = 15$). Zwei Patientinnen stehen derzeit vor der Niederkunft. Es gab 4 (11 %) Zwillingsgeburten, davon 2 nach cIVF, eine nach Clomifenstimulation mit IVF und eine spontan. Es kam zu 2 Frühgeburten (< 1500 g): Das mittlere Geburts-

gewicht lag bei $3300 \text{ g} \pm 510 \text{ g}$, die mittlere Körpergröße lag bei $52 \text{ cm} \pm 3 \text{ cm}$.

Nach SART-Behandlung erfolgreiche Patientinnen wurden im Durchschnitt 12 Stunden (mindestens 1– maximal 81 Std) über einen Zeitraum von 17 Monaten (0–64 Monate) behandelt. Eine erfolgreiche Schwangerschaft trat im Mittel nach 14 Monaten SART (1–53 Monaten) ein. Von den 28 Patientinnen, die schon erfolglose cIVF hinter sich hatten, kam es bei 19 (70 %) Frauen (8 nach nC-IVF/ICSI, 2 nach cIVF/ICSI, 3 spontan, 6 nach alternativen Behandlungsmethoden) zur Geburt eines gesunden Kindes.

Schlussfolgerung Die Auswertung der kumulativen Schwangerschaftsraten weist darauf hin, dass Patientinnen – auch in höherem Alter – von einer ganzheitlichen Behandlung wie SART profitieren können. Auch Patientinnen, die nach erfolglosen cIVF-Behandlungen zur Behandlung kamen, hatten eine hohe Chance auf eine erfolgreiche Schwangerschaft. Die Therapieerfolge sind vermutlich nicht zuletzt auf das längere Durchhaltevermögen der Patientinnen zurückzuführen.

■ Stammzellen

P57

Gamma secretase inhibition of the notch signaling pathway as a therapeutic approach in endometriosis

L. Kettler¹, K. Brüggemann¹, B. Greve², L. Kiesel¹, M. Götze¹

¹Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe; ²Strahlentherapie-Radioonkologie, Universitätsklinikum Münster Germany

Research Question Adult stem cells are involved in the regeneration of the endometrium during the menstrual cycle. We have previously demonstrated that expression of Msi1, a modulator of the stemness-associated notch signaling pathway, is upregulated in endometriosis and endometrial carcinoma. Interference with Msi1 function leads to a downregulation of notch-1 and to an induction of apoptosis in endometrial carcinoma cells. In the present study, we investigated the effects of notch pathway inhibition via gamma secretase inhibitors (GSI) on stemness-associated properties of the epithelial endometrial cell line 12Z and on primary endometrial stroma cells.

Methods 12Z cells and primary endometrial stroma cells were subjected to gamma secretase inhibitor treatment and analyzed for changes in gene expression by TaqMan low density arrays and qPCR. The impact of notch pathway inhibition on stem cell properties was investigated by flow cytometric aldehyde dehydrogenase activity assays, cell cycle analysis and annexin V apoptosis assay.

Results qPCR analysis demonstrated expression of the notch pathway components notch 1–4, Msi1–2, numb, DLL1,3,4, Hes1, Hey1 and the presence of an ALDH+ cell

pool, a surrogate marker of stem cell activity in this cell line. GSI treatment lead to a reduction of ALDH+ cells, reduced cell viability in MTT assays, and increased apoptosis. In 12Z cells, the cell cycle shifted from the S- to the G2 phase after GSI-treatment. TaqMan Low density array analysis followed by qPCR confirmation revealed a significant downregulation of the pluripotency-associated transcription factor SOX2, previously shown to be associated with endometriosis, of the LIF receptor (confirmed by flow cytometry), IFITM1, a regulator of primordial germ cell function, and the stemness-associated factor PODXL. Expression of Msi1 and the notch antagonist numb was upregulated by GSI, while treatment of 12Z cells with recombinant notch-1 induced transcriptional downregulation of Msi1, numb, and the notch ligands DLL1 and DLL4.

Conclusions Our data suggest that pharmacological interference with the notch signaling pathway may be a worthwhile approach in the treatment of endometriosis that warrants further investigation.

P58

Do primordial germ cells migrate along nerve fibres? An interspecies comparison

E. Wolff¹, M. M. Suplicki¹, R. Behr¹

¹Plattform Degenerative Erkrankungen, Deutsches Primatenzentrum GmbH, Göttingen, Germany

Primordial germ cells (PGCs) are the embryonic precursors of sperm and egg cells. In mammals, they arise early in embryonic development and have to translocate from their tissue of specification over a long distance to reach their destination, the genital ridges. The exact mechanism of translocation is still debated; however, it involves active cell migration. A study on human embryos by Møllgard et al. published in 2010 demonstrated a very close spatial association between migrating PGCs and peripheral nerves. Based on this, it was proposed that peripheral nerves may act as guiding structures for migrating human PGCs. The goal of our study was to test this hypothesis in other mammalian species to draw an inter-species comparison, in order to check whether the findings by Møllgard and colleagues for human embryos may represent a general strategy to guide PGCs in mammals. Therefore, we investigated 16 embryos of different developmental stages from the mouse and a non-human primate, the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*), covering the phase from PGC emergence to their arrival in the gonadal ridge. We used immunohistochemical double-staining. Embryo sections were co stained for β -III-tubulin to visualize neurons and OCT4 as marker for PGCs, and the distance between PGCs and the nearest detectable neuron was measured. We discovered that in all embryos analysed of both species, the majority of PGCs ($> 94\%$) was found at a distance of $50 \mu\text{m}$ or more to the closest neuron and, more importantly, that the PGCs had

reached the gonads before any β III-tubulin signal could be detected in the gonad's vicinity. In conclusion, our data in a rodent and a non-human primate species does not support the theory of PGCs migrating along peripheral nerves to reach the gonad.

P59

Altered marker expression of somatic and germ cell populations in immature Androprotect patients at risk of germ cell loss

L. Heckmann, J. Wistuba, S. Schlatt, S. Kliesch, N. Neuhaus

Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University Hospital of Münster, Münster, Germany

Introduction Cryopreservation of immature testicular tissues is offered worldwide to prepubertal and pubertal boys at risk of germ cell loss in specialized centers. Characterization of these immature tissues is essential as patients differ individually concerning development, disease and previous treatment. For evaluation of somatic cell differentiation, anti-Müllerian hormone (AMH) and alpha-smooth muscle actin (SMA) are ideal markers. AMH is expressed in undifferentiated Sertoli cells and is downregulated by androgen effects during development. In contrast, SMA is only expressed androgen-dependent in differentiating peritubular cells. For germ cell characterization, the undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (UTF1) presents an interesting marker, being expressed in undifferentiated gonocytes and spermatogonia. UTF1 is considered a stem cell marker, but the proportions of human germ cells expressing this marker have not yet been assessed.

Material and Methods We aimed at investigating the expression of AMH, SMA and UTF1 in testicular tissues (n = 49, age range: 5 months to 20 years) cryopreserved for fertility preservation at our Centre in frame of the network Androprotect. The patient cohort was heterogeneous regarding their diseases and treatments. Thus, patients were assigned to three groups: Group A included patients who suffered from diseases which do not affect the testes (n = 8; 5–14 years), group B comprised patients who suffered from diseases affecting the testes (n = 22; 5 months to 17 years) and group C consisted of patients with Klinefelter syndrome (KS) (n = 19; 12–20 years). Immunohistochemical semi-quantitative analyses for somatic markers (AMH, SMA) were performed to determine the testicular differentiation status. We used a scoring system from one (no expression in the respective cell type) to five (intense expression in all cells of the respective cell type). Additionally, UTF1 positive and negative gonocytes, spermatogonia and spermatocytes were quantified in two independent tissue sections.

Results The semi-quantitative analysis of somatic markers showed an expression switch during development. In group A, high AMH expression levels were detected until the age of 13 years; thereafter expression lev-

els declined with age. In contrast, SMA expression was first detectable in patients older than 14 years. Interestingly, high AMH expression levels persisted during and after puberty in group B (affected tissues) and in Group C (KS patients), although SMA expression was already present. Regarding the germ cell marker UTF1, expression was detected in approximately 70% of gonocytes, in 45% of spermatogonia and in 0% of meiotic spermatocytes in intact testicular tissues. Interestingly, in patients suffering from diseases which potentially affecting the testis, UTF1⁺ cells only accounted for 49% of gonocytes and for 35% of spermatogonia.

Conclusion Developmental stage, diagnosis and previous treatment had an effect on somatic and germ cell marker expression. Somatic marker expression is dependent on age and is helpful to determine the developmental stage of patients' tissue. Thus, high AMH expression in Sertoli cells reflects an undifferentiated testis with gonocytes and spermatogonia, whereas declining AMH and rising SMA expression mirror a differentiating testis containing meiotic spermatocytes. Unexpectedly, AMH expression remained high in patients' testicular tissues which were affected by disease or treatment and in KS patients during puberty and thereafter. This might be an indication of Sertoli cell maturation failure. For germ cell marker analysis, we identified a UTF1⁺ subpopulation among the gonocytes and spermatogonia suggesting heterogeneity among those populations. Interestingly, the amount of UTF1⁺ spermatogonia was reduced in affected testicular tissues compared to relatively healthy testicular tissues. As UTF1 is mainly staining quiescent (non-proliferating, Ki67-) spermatogonia residing at the basement membrane, it needs to be further investigated if a specific spermatogonial subpopulation was impaired.

■ Psychologie in der Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

P60

Ungewollte Kinderlosigkeit bei Männern: Qualitativ-quantitative Studie zur Untersuchung der Auswirkungen von medizinischen Ursachen, Rollenkonzepten und Behandlungsstufen auf die Lebensqualität von unfreiwillig kinderlosen Männern

M. Schick¹, S. Rösner², B. Toth², T. Strowitzki², A. Jank³, H. Kantenich³, C. Thöne⁴, T. Wischmann¹

¹Institut für Medizinische Psychologie; ²Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen, Universitäts-Frauenklinik Heidelberg;

³Fertility Center, Berlin; ⁴Kinderwunschpraxis, Heidelberg, Deutschland

Hintergrund Ungewollte Kinderlosigkeit gilt als kritisches Lebensereignis und geht

häufig mit Gefühlen von Sorge, Angst und Depression einher. Besonders die reproduktionsmedizinische Behandlung wird als hohe Belastung aufgefasst wird. Ziel der Studie war die Exploration der männlichen Wahrnehmung von Fruchtbarkeitsbehandlungen sowie die Identifikation der Lebensqualität von Männern in Abhängigkeit verschiedener Behandlungsstufen, Ursachen der Unfruchtbarkeit und Rollenkonzepten.

Methode Die von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Heidelberg genehmigte Studie fand von Juli bis September 2013 mit n = 115 Teilnehmern in 3 deutschen Fruchtbarkeitszentren statt. Alle Teilnehmer beantworteten einen standardisierten, spezifisch für Männer entwickelten Kinderwunsch-Fragebogen (TLMK) sowie weitere soziodemographische und rollenspezifische Items; n = 13 wurden zusätzlich interviewt. Die Datenanalyse erfolgte durch Grounded Theory, Korrelation, Regression, t-Test-Analyse und ANOVA.

Ergebnisse Männer, bei denen schwere körperliche Erkrankungen persönlich oder in der Partnerschaft vorlagen, wie z. B. Krebs oder Gen-Dispositionen, berichteten über eine signifikant höhere Lebensqualität im Vergleich zu den anderen Teilnehmern (t[56] = -3.57, p = 0,001). Zudem zeigte sich eine signifikante Abnahme der Lebensqualität mit zunehmender Behandlungsdauer und invasiven Methoden (F[2,111] = 4,94, p = 0,009). Die Teilnehmer unterstrichen die fehlenden Kontrollmöglichkeiten über den Behandlungsprozess und ihr Bemühen um eine angemessene Rolle im gesamten Prozess; wobei Männer, die viele Aufgaben im Behandlungsprozess übernahmen, eine höhere Lebensqualität aufwiesen.

Diskussion Die großen Unterschiede der Teilnehmer bezüglich ungewollter Kinderlosigkeit sollten genauer identifiziert und von medizinischen Fachkräften beachtet werden. Die hohe Lebensqualität von Männern mit medizinisch schwerwiegenden Infertilitätsgründen enthält wertvolle und weitreichende Informationen über mögliche Resilienzfaktoren, die detailliert erforscht werden sollten. Die durch den Einsatz von invasiven Verfahren steigende Belastung von Männern verlangt nach verstärkten psychosozialen Diensten in Fruchtbarkeitskliniken.

P61

Bereitschaft zur Embryonenspende von Paaren mit sicher abgeschlossener Familienplanung nach erfolgreicher Kinderwunschbehandlung

A. Eder¹, D. Gutknecht², M. Bals-Pratsch¹

¹profertilita Fachklinik für Reproduktionsmedizin, Regensburg; ²ART Labor profertilita, Regensburg, Deutschland

Fragestellung Nach erfolgreicher Therapie und abgeschlossener Familienplanung können die Kinderwunschaare ihre planwidrig überzähligen Embryonen und Vorkern-

stadien vernichten lassen oder weiterhin lagern. Mit der Embryonenspende wird eine dritte Option für erfolgreich therapierte Paare mit sicher abgeschlossener Familienplanung geschaffen, nämlich die der Spende an ein anderes Kinderwunschpaar, das medizinisch und biologisch nicht in der Lage ist, auf natürliche oder reproduktionsmedizinische Art ein Kind zu zeugen. In Deutschland fehlen Daten zur Spendebereitschaft erfolgreich therapierter Paare. Ziel dieser Studie ist eine Darstellung der Bereitschaft solcher Paare, ihre überzähligen kryokonservierten Embryonen oder Vorkernstadien zu spenden, wenn die konkrete Entscheidung ansteht.

Methodik Im Zeitraum von 10/2013 bis 05/2017 kündigten 210 Paare nach erfolgreichem Abschluss ihrer Kinderwunschbehandlung die Lagerung ihrer Proben mit planwidrig entstandenen Embryonen oder Vorkernstadien. Diese Paare erhielten ein Anschreiben, in dem sie über die Möglichkeit der Spende informiert wurden.

Voraussetzung für die Spende ist die sicher abgeschlossene Familienplanung nach Geburt eines Kindes und dass die Spenderin zum Zeitpunkt der Follikelpunktion nicht älter als 37 Jahre war.

Interessierte Spenderpaare erhielten eine standardisierte ärztliche Beratung, inklusive einer detaillierten Darstellung des Spendenablaufes. Jedem Paar wurde eine juristische Beratung und eine weiterführende behandlungsunabhängige psychosoziale Beratung gemäß den Leitlinien für die psychosoziale Beratung bei Gametenspende der Deutschen Gesellschaft für Kinderwunschbehandlung (BKID) [1], beziehungsweise der Leitlinien für Embryooption von *Donum vitae* [2] angetragen. Die Unterzeichnung der Spendenformulare war anschließend frühestens nach einer Bedenkzeit von mindestens 2 Wochen möglich.

Ergebnisse Von den 210 Paaren, die nach Kündigung des Lagerungsvertrages über die Möglichkeit der Spende informiert wurden, stellten sich 19 (9,0 %) zur Beratung in unserem Zentrum vor. Unter Einhaltung der Bedenkzeit entschieden sich nach der Beratung 8 Paare (42,1 %) für die Spende und 11 Paare (57,9 %) dagegen. Insgesamt entschieden sich 96,2 % der informierten Paare gegen eine Spende.

Die Beweggründe für die Spende waren ethische Bedenken über die Verwerfung lebensfähiger Zellen und das Empfinden, dass ihre überzähligen Embryonen und Vorkernstadien ihre potentiellen Kinder und die Vollgeschwister ihrer Kinder sind, die man nicht „verwerfen“ kann. Ferner konnten alle Paare die ungewollte Kinderlosigkeit der potentiellen Empfängerpaare nachempfinden.

Die Beweggründe der Nicht-Spenderpaare waren die theoretische Möglichkeit von Unterhalts- und Erbansprüchen, sowie die Unmöglichkeit, das Empfängerpaar auswählen zu können.

Insgesamt wurden 22 Spenden an 22 Empfängerpaare vermittelt. Es erfolgten 21 Transfers, daraus resultierten 10 klinische Schwangerschaften (47 %). Fünf davon endeten im

Abort (50 %) und 2 mit einer Geburt (Einslings- und Zwillingsgeburt). Drei Schwangerschaften sind noch fortlaufend.

Schlussfolgerung Die Spende kryokonservierter Embryonen oder Vorkernstadien ist nur für eine kleine Gruppe (3,8 %) der erfolgreich therapierten Paare eine Option. Für die Entscheidung der Paare war das Entwicklungsstadium der gespendeten Embryonen nicht relevant. Im Ausland mit hochregulierter, altruistischer Embryonenspende (Neuseeland, Australien) wird ebenfalls nicht zwischen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien unterschieden [3]. Ob die planwidrig überzähligen Embryonen und Vorkernstadien hinsichtlich einer Spende gleichgestellt werden können, wird momentan juristisch diskutiert [4].

Literatur:

1. Thorn P, Wischmann T. Leitlinien für die psychosoziale Beratung bei Gametenspende. J Reproductive Med Endokrinol 2008; 5: 147–52.
2. Donum vitae Bayern e.V. Leitlinien für die Beratung bei Embryonadopation. Beschluss des Vorstandes am 30.09.2016. http://www.donum-vitae-bayern.de/fileadmin/user_upload/Bayern/Landesverband/Flyer_Embryonadopation_Feb_2017.pdf. (zuletzt gesehen: 25.10.2017)
3. Australian government. National Health and Medical Research Council (NHMRC). Ethical guidelines on the use of assisted reproductive technology in clinical practice and research. 2017. https://www.nhmrc.gov.au/files/nhmrc/file/guidelines/ethics/16506_nhmrc_-_ethical_guidelines_on_the_use_of_assisted_reproductive_technology-web.pdf (zuletzt gesehen: 25.10.2017).
4. Frommel M. Embryonenschutz und Elternschaft. Novo Argumente für den Fortschritt. 18.07.2017. https://www.novo-argumente.com/artikel/embryonenschutz_und_elternschaft (zuletzt gesehen: 25.10.2017).

P62

Psychosoziale Kinderwunschberatung als Teil des Teamangebotes – Websiteanalysen reproduktionsmedizinischer Zentren in den Jahren 2011 und 2016

T. Wischmann¹, B. Mayer-Lewis², P. Thorn³

¹Institut für Medizinische Psychologie, Universitätsklinikum Heidelberg; ²Staatsinstitut für Familienforschung an der Universität Bamberg; ³Deutsche Gesellschaft für Kinderwunschberatung – BKID, Mörfelden, Deutschland

Fragestellung Aus Expertensicht sollte psychosoziale Kinderwunschberatung integraler Bestandteil jedes reproduktionsmedizinischen Behandlungsangebotes sein. Unklar ist, inwieweit dieses den Internetangeboten reproduktionsmedizinischer Zentren in Deutschland zu entnehmen ist und inwieweit psychosoziale Beratung online als Teil des Teamangebotes identifizierbar ist.

Methodik Sowohl im Jahr 2011 als auch 2016 wurden die verfügbaren Internetangebote der im jeweils aktuellen IVF-Register aufgeführten reproduktionsmedizinischen Zentren nach der Internetpräsenz psychosozialer Beratungsangebote analysiert. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit psychosoziale Beratungsfachkräfte als Teil des Behandlungsteams auf der Internet-Homepage explizit aufgeführt sind.

Ergebnisse:

Studie von Stöbel-Richter et al. (2011)

103 analysierte Homepages (von 123 Zentren):

- bei 89 Webseiten waren Angaben zum ärztlichen und nicht-medizinischen Personal vorhanden
- 37 Zentren (ca. 36 %) gaben eine Kooperation bezüglich behandlungsunabhängiger psychosozialer Beratung an
- 7 Zentren hatten eine Beraterin direkt im Team (ca. 7 %).

Insgesamt gaben 62 Zentren eine detaillierte Übersicht über ihre angebotenen Leistungen an, davon gaben 4 Zentren (ca. 6,5 %) „psychologische Betreuung“ explizit als Leistung an.

Studie von Wischmann (2016)

123 analysierte Homepages (von 127 Zentren) mit Fokus „Team“:

- 20 Zentren nannten psychosoziale Beratungsfachkräfte als Teil des Teams (16,3 %)
- 4 Zentren gaben eine psychotherapeutische Zusatzqualifikation bei reproduktionsmedizinischen Fachkräften an
- in 6 Zentren war die psychosoziale Beratung prominent auf der Homepage vertreten.

Insgesamt zeigt die Analyse, dass 93 Zentren keine Angaben zu psychosozialen Fachkräften im Team machen (75,6 %).

Schlussfolgerung Obwohl laut einer Umfrage für das Bundesfamilienministerium ca. 39 % der Auskunft gebenden reproduktionsmedizinischen Zentren angaben, dass im Zentrum eine psychosoziale Fachkraft arbeitet, die eine behandlungsunabhängige psychosoziale Kinderwunschberatung anbietet, waren in den Internetauftritten im Jahr 2011 nur zu ca. 7 % und im Jahr 2016 nur zu 16,3 % diese Fachkräfte als Teil des Behandlungsteams aufgeführt. Auch wenn dieses nominell einer Verdoppelung des Prozentsatzes entspricht, erscheint psychosoziale Kinderwunschberatung in den Internetauftritten der Zentren marginalisiert, was (auch) deren geringe Inanspruchnahme durch die Patientinnen und Patienten mit unerfülltem Kinderwunsch erklären könnte.

Weiterführende Literatur:

- Stöbel-Richter Y, Umfrageergebnisse zum Stellenwert psychosozialer Beratung in reproduktionsmedizinischen Zentren in Deutschland – eine Pilotstudie. J Reproductive Med Endokrinol 2011; 8: 416–23.
- Wischmann T, Thorn P. Psychosoziale Kinderwunschberatung in Deutschland – Status Quo und Erfordernisse für eine bessere Konzeptualisierung, Implementierung und Evaluation. BMFSFJ 2014. https://www.informationsportal-kinderwunsch.de/fileadmin/templates/pdf/Abschlussbericht_Erhebung_Psychosoziale_Kinderwunschberatung_2012.pdf (zuletzt gesehen: 25.10.2017).
- Wischmann T, Thorn P. Kinderwunsch? Beratung! Abschlussbericht für das BMFSFJ 2017.

P63

Neuronale Antwort auf viszerale Schmerzreize bei Patientinnen mit Dysmenorrhö

B. Böttcher¹, E. R. Gizewski², C. Siedentopf², R. Steiger², M. Verius³, D. Riedl⁴, A. Ischebeck⁵, J. Schmid⁶, L. Wildt¹, S. Elsenbruch⁶

¹Klinik für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Frauenklinik; ²Department Neuroradiologie; ³Department Radiologie; ⁴Universitätsklinik für medizinische Psychologie, Medizinische Universität Innsbruck; ⁵Institut für Psychologie, Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich; ⁶Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie, Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland

Fragestellung Chronische Unterbauchschmerzen, insbesondere Regelschmerzen, sind ein relevantes Problem der gynäkologischen Praxis. Dennoch ist bei Dysmenorrhö die neuronale Schmerzverarbeitung noch wenig verstanden. In dieser Studie sollte die neuronale Schmerzverarbeitung eines viszeralen Schmerzreizes bei Dysmenorrhöpatientinnen im Vergleich zu gesunden Probandinnen untersucht werden.

Methode Rektale Distensionen wurden mittels eines Ballons durch ein MRT-kompatibles BAROSTAT-Gerät gesetzt. Bei 23 Frauen mit Dysmenorrhö und 23 gesunden Frauen wurde die Messung im 3T MRT (Verio) an Tag 1–5 des menstruellen Zyklus durchgeführt. Es wurde die individuelle Wahrnehmungs- und Schmerzschwelle bestimmt. Anschließend wurden 6 schmerzvolle Distensionen, gefolgt von 6 schmerzfreien Distensionen während der fMRT-Messung verabreicht. Die Analyse der fMRT-Daten erfolgte mittels SPM 12 im General Linear Model (GLM). Fragebögen zur Schmerzintensität, Lebensqualität und Angst und Depression wurden ausgehändigt.

Ergebnisse Frauen mit Dysmenorrhö berichteten mehr Schmerzen und eine höhere Schmerzbeeinträchtigung im Alltag. Dennoch zeigten sich im Vergleich zu den gesunden Frauen keine Unterschiede in der viszeralen Sensitivität. Die Analyse der zerebralen Antwort auf die Schmerzreize zeigte eine Aktivierung der typischen Schmerz-

regionen, aber keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Schlussfolgerung Patientinnen mit Dysmenorrhö zeigen eine unveränderte Wahrnehmung und Verarbeitung von viszeralen Schmerzreizen. Dieses spricht gegen eine generalisierte Sensitivierung auf viszerale Stimuli und für spezifische Schmerzmechanismen bei Dysmenorrhöpatientinnen. Diese sollten in weiteren bildgebenden Studien mit geeigneten Modellen untersucht werden.

■ Varia

P64

Restitutio ad integrum? Fallbericht einer Kinderwunschpatientin mit Agenesie des linken Ovars und Stieldrehung des rechten Ovars

S. Feigl¹, R. Heider², B. Böttcher¹, B. Seeber¹, B. Toth¹
¹Universitätsklinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Innsbruck; ²Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Bezirkskrankenhaus Kufstein, Österreich

Fragestellung Ist die Wiederaufnahme der Ovarfunktion bei einer Patientin mit Ovaragenesie links und Stieldrehung mit nekrotischem Ovar rechts möglich?

Methodik Darstellung des Behandlungsverlaufs einer 28-jährigen 0-Gravida mit Ovaragenesie links sowie Stieldrehung rechts aufgrund einer Dermoidzyste.

Ergebnisse Die Patientin wurde uns im April 2017 im Z. n. Ovar torsion und Entfernung einer Dermoidzyste im Januar 2017 zugewiesen. Die Agenesie des linken Ovars wurde erstmalig im Rahmen der Laparoskopie festgestellt.

Sie litt an einer sekundären Amenorrhö, Hitzewallungen, Schlafstörungen sowie Schmerzen beim Geschlechtsverkehr. Im transvaginalen Ultraschall zeigte sich ein 16 × 8 mm kleines Ovar, es ließen sich keine antralen Follikel darstellen. Das FSH betrug 25 IU/l bei einem E2 von < 10 ng/l, woraufhin

eine kombinierte Hormontherapie begonnen wurde.

Im Rahmen der Kontrolluntersuchung im August 2017 berichtete die Patientin über Schmierblutungen. Sonographisch zeigte sich eine Follikelreifung, woraufhin eine Punktion veranlasst wurde. Dabei konnte keine Eizelle gewonnen werden. Im darauffolgenden Zyklus wurde eine Eizelle entnommen, welche sich fertilisieren ließ. Allerdings kam es zu einem Arrest der Embryonalentwicklung am Tag 2. Im Anschluss an die Punktion entwickelte die Patientin eine Infektion mit unklarem Fokus und diffusen Unterbauchschmerzen, welche nach einer einwöchigen antibiotischen Behandlung komplett sistierten.

Die Patientin wünscht weitere Natural Cycle (NC-) Punktionen mit Kryokonservierung des Embryos, da der Kinderwunsch aufgrund einer beruflichen Weiterbildung derzeit noch nicht realisiert werden soll. Eine aktuelle Kontrolle zeigte einen AMH-Wert von 0,45 ng/ml bei einem antralen Follikelcount von 1–2.

Das mögliche Infektionsrisiko bei Z. n. Dermoidzystenentfernung und nekrotischem Ovar wurde intensiv mit der Patientin erörtert. Laut einer aktuellen Literaturrecherche ist das Infektionsrisiko bei ovariellen Dermoidzysten gering, in einigen Fallberichten jedoch bereits beschrieben [1–4].

Schlussfolgerung Eine Restitutio nach Stieldrehung und Dermoidzystenentfernung ist möglich, allerdings scheint zum jetzigen Zeitpunkt keine vollständige Erholung im Falle unserer Patientin absehbar. Aufgrund der persönlichen Lebenssituation sind trotz erhöhtem Infektionsrisiko vonseiten der Patientin weitere NC-IVF-Zyklen erwünscht.

Literatur:

1. Ayhan A, Aksu T, Develiglu O, Tuncer ZS, Ayhan, A. Complications and bilaterality of mature ovarian teratomas (clinicopathological evaluation of 286 cases). Aust N Z J Obstet Gynaecol 1991; 31: 83–5.
2. Aharoni A, Leibovitz Z, Levitan Z, Degani S, Ohel G. Complication of Laparoscopic Detorsion of Adnexal Mass. Gynecol Obstet Invest 2008; 65: 39–40.
3. Luk J, Quaa A, Garner E. The superinfection of a dermoid cyst. Infect Dis Obstet Gynecol 2007; 2007: 41473.
4. Lee WL, Yen MS, Tseng JY, Yu KW, Wang PH, et al. Mature teratoma with secondary infection: case report. Changgeng Yi Xue Za Zhi 1999; 22: 339–43.

DVR 2017 Index der präsentierenden Autoren

A		I		Schweizer-Arau A.	245
Abraham A.	240	Ibrahim M. G.	243, 244	Seidensticker M.	234
B		Indumathy S.	232	Sommer A.-K.	242
Bagnjuk K.	228	K		Spiess A.-N.	239
Baston-Büst D. M.	244	Klein B.	222	T	
Bertl L.	233	L		Togawa R.	236
Beyer D.	224	Laurentino S.	240	V	
Böttcher B.	248	M		von Kopylow K.	233
D		Malliou-Becher M.-N.	235	W	
Da Costa R.	235	Menkhaus R.	222	Wagner I. V.	233
Djourabchi A.	224	Mettler L.	240	Walenta L.	229
E		N		Weitzel J. M.	231
Eder A.	246	Neumann K.	236	Wetzka B.	223
Eifler L.	234	P		Wischmann T.	247
Espey B. T.	221	Paulmann B.	242	Wolff E.	245
Eubler K.	230	Pilatz A.	239	Wrenzycki C.	226
F		Pleuger C.	228	Y	
Feigl S.	248	Pock T.	230	Ye Y.	231
Fijak M.	232	Pohl E.	227	Z	
Fill Malfertheiner S.	224	Pohl K.	226	Zehe V.	238
Franik S.	226	Pour S. J.	235	Zervomanolakis I.	222
G		R		Zhu J.	244
Giakoumakis I.	221	Röpke A.	241	Zitzmann M.	237
Gies S.	227	S			
Glaß K.	242	Schick M.	246		
Götte M.	243, 245	Schmid N.	229		
H		Schneider-Wirth S.	238		
Hack C. T.	232	Schroeter L.	237		
Hartmann K.	230	Schütt M.	225		
Heckmann L.	246				

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