

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



**30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Andrologie (DGA) e.V. 29. November bis 1. Dezember**

2018, Gießen Abstracts

*J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2018; 15 (Supplementum
1), 1-19*

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

30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie (DGA) e.V.

29. November bis 1. Dezember 2018, Gießen

Abstracts*

Freie Vorträge

FV1

Neue Real-Time, ultraschallunterstützte intraläsionale Applikationstechnik von Xiapex (CCH) in der Behandlung eines nicht kalzifizierten Mb. Peyronie (IPP) – Beurteilung von Effektivität und Nebenwirkungsrate

Y. Kunz¹, G. M. Pinggera²

¹Medizinische Universität Innsbruck, Universitätsklinik für Urologie; ²LKH Innsbruck, Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich

Einleitung Die intraläsionale Injektion von Clostridium histolyticum-Kollagenase (CCH) wird als nicht-operative Therapie der IPP empfohlen [1, 2]. In zwei großen randomisierten, placebokontrollierten, doppelblinden Phase-3-Studien (IMPRESS I und II) konnte eine Verbesserung der Deviation von 34 % belegt werden. Allerdings zeigte sich eine große Nebenwirkungsrate (NWR) von 84,2 %. Studienziel war es zu untersuchen, inwiefern die NWR durch Implantation eines intraop. US verringert werden kann.

Material/Methode Das Patientenkollektiv umschließt 23 Männer, durchschnittliches Alter 58,17 Jahre (SD: 7,97), davon 22 ohne SKAT-bedürftige Erektile Dysfunktion (ED). 70 % erhielten ein modifiziertes Schema mit full-dose Xiapex-Applikation (0,9 mg vs. 0,58 mg). Die präop. Diagnostik umfasste neben ausführlicher Anamnese einen hochfrequenten penilen US + CPD sowie Autofotographie unter Erektionsbedingung zur Deviationsbestimmung. Ausgeschlossen waren signifikant kalzifizierte Plaques.

Unsere Methode basiert auf der Hochfrequenz-ultraschallgezielten intraläsionalen Applikation in Echtzeit zur millimetergenauen intraop. Detektion der Plaques (GE logic 9, ML6-15) mit peniler Streckung. Die CCH-Injektion mit 27-G-Nadel erfolgte bei allen Patienten nur nach ultraschallkontrollierter Lokalisation, Modelling entsprechend der Herstellerinformation, zusätzlich peniles Stretching-Device frühestens nach dem 7. Tag postop.

*Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee. Ein Verzeichnis der präsentierenden Autoren finden Sie auf Seite 19, alphabetisch geordnet nach Erstautoren.

Bei allen Patienten konnten insgesamt 65 CCH-Behandlungen mit dieser Applikationstechnik erfolgreich durchgeführt werden, kein intraoperativer Abbruch.

Ergebnisse Das Follow-up erstreckt sich durchschnittlich über 11,1 Monate (SD: 7,1 m), keine „adverse drug reactions“ (ADR) dokumentiert. Direkt postop. wurden insgesamt 7 leichte NW bei 5 Patienten erfasst. Zwei penile Schwellungen (Remission < 3 Tagen), 3 passagere penile Schmerzen (< 24h), 1 superfizielles Hämatom (Remission innerhalb < 3 Tagen) und eine Ekchymose. 18 Patienten berichteten von keinerlei Beschwerden. Bei allen 23 Patienten kam es im postop. Follow-up zu keinen ADR. Somit konnte in unserer Kohorte die NWR patientenbezogen auf 21,7 % gesenkt, bei n = 65 CCH-Injektionen auf 10,8 % gesenkt werden. Die subj. Erfolgsrate nach CCH-Therapie wurde bei 15/23 Patienten (65 %) erreicht, bei 3/23 (13 %) zeigte sich keine Besserung, 5 (22 %) Patienten befinden sich in laufender Therapie. Kein Patient unterzog sich bis dato einer sekundären chirurgischen Intervention. Ein Patient mit bekannter, PD5-I refraktärer ED und IPP ist für eine penile Prothese vorgesehen.

Diskussion Diese kombinierte Methode mit US-kontrollierter intraläsionaler Injektionstechnik eines gestreckten Penis und folgend intensivem penilen Modelling verringert signifikant die NWR nach CCH-Injektion und verbessert das Outcome für IPP-Patienten. Eine „full dose“ CCH-Dosis erhöht die NWR nicht.

Literatur:

1. CUA 2018 10.5489/cuaj.5255
2. AUA 2015 doi:10.1016/j.juro.2015.05.098

FV2

Das DNA-Methylierungsprofil humaner, aus TESE-Biopsien isolierter Spermatozoonen auf Einzelzell- bzw. Einzel-Allel-Ebene

K. von Kopylow¹, D. Fend², A.-N. Spiess¹, W. Schulze³, A. Salzbrunn¹, S. Diederich², N. El Hajj⁴, T. Haaf⁵, U. Zechner^{2,5}, M. Linke²

¹Andrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg; ²Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz; ³MVZ Fertility Center Hamburg, amedes group, Hamburg; ⁴Biozentrum, Institut für Human-

genetik, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg; ⁵Senckenberg Zentrum für Humangenetik, Frankfurt/M, Deutschland

Einleitung Die eingehende Charakterisierung humaner spermatogonialer Stammzellen (hSSCs) bildet die Grundlage für deren späteren Einsatz in der Klinik, beispielsweise zur Wiederstellung der Fertilität bei prä-pubertären Jungen nach zytotoxischer Krebstherapie oder auch zur Behandlung von an spermatogenetischem Meiose-Arrest leidenden männlichen Erwachsenen. In der Vergangenheit haben wir FGFR3⁺ Spermatozoonen (SPG) als eine Subpopulation undifferenzierter SPG und potentielle hSSC-Population charakterisiert, sowie eine Methode zur Isolierung dieser Zellen über das Membranprotein FGFR3 entwickelt. Bei der hier präsentierten Studie handelt es sich um eine Analyse des DNA-Methylierungsprofils von FGFR3⁺ und FGFR3-SPG, welches mit dem von Spermien-DNA und Blut-DNA verglichen wurde.

Material/Methode Aus TESE-Biopsien normogonadotroper Patienten (n = 5) mit vollständiger Spermatogenese (n = 4; Alter: 26–44 Jahre) oder Meiose-Arrest (n = 1; Alter: 37 Jahre) wurden mittels magnetischer Dynabeads und mikromanipulatorischem Picken einzelne bzw. 10-er Pools an Bead-gebundenen (FGFR3⁺) und nicht-gebundenen (FGFR3⁻) SPG gewonnen. Aus den Zellen wurde die DNA isoliert, diese Bisulfit-konvertiert und bei den 10-Zell-Pools verdünnt, um pro Well einzelne DNA-Moleküle für die nachfolgenden PCR-Reaktionen zu erhalten (*limiting dilution*). Anschließend wurden Genspezifische Multiplex-nested-PCRs für hSSC-Marker (*FGFR3*, *GFRA1*, *PLZF*, *LITD1*), Pluripotenzmarker (*OCT4*, *NANOG*), paternal geprägte Gene (*H19*, *MEG3*) und maternal geprägte Gene (*KCNQ1OT1*, *PEG3*, *SNRPN*) durchgeführt. Die Bestimmung des Methylierungslevels der Amplikons erfolgte per Pyrosequenzierung.

Ergebnisse Die Analyse ergab, dass die FGFR3⁺ und FGFR3-SPG einen relativ einheitlichen Methylierungsstatus aufweisen, der größtenteils der Methylierung von Spermien entspricht. Dabei liegen die hSSC-Markergene und die maternal geprägten Gene hypomethyliert vor, während die Pluripotenzgene und die paternal geprägten Gene hypermethyliert sind.

Diskussion Die Übereinstimmung des DNA-Methylierungsmusters zwischen SPG/

hSSCs und Spermien zeigt, dass die Regulation der spermatogonialen Stammzellfunktion und der Keimzellendifferenzierung nicht auf epigenetischer Ebene erfolgt. Die vollständige Methylierung des Pluripotenzmarkergens *OCT4* zusammen mit der nicht vorhandenen *OCT4*-Expression auf Protein- und mRNA-Level in humanen SPG [1] könnte die Schwierigkeiten bei der klonalen In-vitro-Vermehrung von hSSCs im Unterschied zu SSCs der Maus (*Oct4* kaum methyliert und exprimiert; [2]) erklären.

Gefördert durch die DFG.

Literatur:

1. von Kopylow K, Spiess AN. Human spermatogonial markers. *Stem Cell Research* 2017; 25: 300–9.
2. Pamnani M, et al. Methylation of the Sox9 and Oct4 promoters and its correlation with gene expression during testicular development in the laboratory mouse. *Genet Mol Biol* 2016; 39: 452–8.

VF3

In-vitro-Reorganisation adulter humaner Hodenzellen aus TESE-Biopsien im dreischichtigen 3D-Gradientensystem

K. von Kopylow¹, W. Schulze², A. Salzbrunn¹, J. P. Alves-Lopes³, J. B. Stukenborg³, A.-N. Spiess¹
¹Andrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg; ²MVZ Fertility Center Hamburg, amedes group, Hamburg, Deutschland; ³Department of Women's and Children's Health, NORDFERTIL Research Lab Stockholm, Paediatric Endocrinology Unit, Karolinska University Hospital, Stockholm, Schweden

Einleitung Morphogenetische Dynamiken (= Rekapitulation der embryonalen Organentstehung) von *in vitro* kultivierten Hodenzellen sind seit Langem aus Nagerstudien bekannt. Im 2D-Modell konnten wir zeigen, dass auch unter Verwendung adulter testikulärer Zellen aus kleinen TESE-Biopsien eine In-vitro-Reorganisation stattfindet und diese hoch reproduzierbar ist, sogar unabhängig vom Spermatogenese-Status des Patienten. Konzentrationsgradienten-ermöglichende, mehrschichtige 3D-Zellkultursysteme könnten jedoch die Formierung der reorganisierten Hodenstrukturen optimieren sowie einen besseren Keimzellerhalt und die Vermehrung humaner spermatogonialer Stammzellen (hSSCs) innerhalb der Strukturen bzw. die Differenzierung von Keimzellen fördern. In testikulären Organoiden vermehrte hSSCs könnten therapeutisch zur Refertilisierung prä-pubertärer, geheilter Krebspatienten eingesetzt werden. Innerhalb von *in vitro* reorganisierten testikulären Strukturen differenzierte Keimzellen könnten zur Behandlung adulter Meiose-Arrest-Patienten dienen.

Material/Methode Aus TESE-Biopsien normogonadotroper Patienten mit vollständiger Spermatogenese und obstruktiver Azoospermie bzw. Zustand nach Vasektomie wurden mittels Kollagenase-Verdau, manueller Zerkleinerung mit einer Mikroskopierringe und Filtration durch Siebe (Maschenweite 70 µm) aggregatfreie Zellsuspensionen hergestellt. Eine bestimmte Anzahl von Zellen

aus diesem Zell-Gemisch wurde dann in die zelltragende, mittlere Schicht des dreischichtigen, aus Matrigel bestehenden 3D-Gradienten-Systems [1, 2] eingebracht, welche anschließend in einem *Well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte mit je 600 µl Zellkulturmedium für 14 Tage kultiviert wurde. Fütterung, mikroskopische Beobachtung der Zellen sowie Fotodokumentation erfolgten jeweils im 2-Tages-Intervall.

Ergebnisse Erste Ergebnisse zeigen, dass, ebenso wie im 2D-System, im dreischichtigen 3D-System eine In-vitro-Reorganisation der adulten Hodenzellen erfolgt und dieses im ähnlichen Zeitrahmen geschieht, wie in der 2D-Zellkultur beobachtet.

Diskussion Die Optimierung dieses 3D-Zellkultur-Systems könnte die Vermehrung von hSSCs in einem der testikulären Nische ähnelnden Milieu ermöglichen und somit für die Fertilitätsprotektion bei präpubertären Jungen nach gonadotoxischer Therapie relevant sein. Des Weiteren könnte das 3D-System als Vehikel für eine In-vitro-Spermatogenese dienen und damit nutzbringend für die Entwicklung einer Therapie für männliche Erwachsene mit Meiose-Arrest sein.

Gefördert durch die DFG.

Literatur:

1. Alves-Lopes JP, et al. Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system. *Biomaterials* 2017; 130: 76–89.
2. Alves-Lopes JP, et al. Use of a three-layer gradient system of cells for rat testicular organoid generation. *Nat Protocols* 2018; 13: 248–59.

VF4

Molecular expression pattern of TOP2A and SF1 in normal and impaired spermatogenesis in human testis

J. Ott¹, K. Hartmann¹, M. Baker², S. Kliesch³, A. Pilatz⁴, H.-C. Schuppe⁴, M. Bergmann¹, D. Fietz¹
¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland; ²School of Environmental and Life Science, University of Newcastle, Australien; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Abteilung für Klinische und Operative Andrologie, Münster, Deutschland; ⁴Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinik Gießen, Deutschland

Introduction In the testis, the correct expression and function of transcription factors such as topoisomerase 2α (TOP2A) and splicing factor 1 (SF1) are essential as the impact of aberrant splicing can have tremendous effects. Whereas TOP2A is important for DNA processing by induction of double strand breaks, SF1 is a nuclear pre-mRNA factor, part of the spliceosome complex and involved in transcriptional repression. We hypothesize these factors to play a pivotal role in the testis and aberrant expression to be involved in defective germ cell development. Therefore, we analyzed the expression of TOP2A and SF1 in intact and impaired spermatogenesis.

Material & Methods We used 27 formalin-fixed, paraffin embedded human testis biop-

sies. Histological evaluation revealed normal spermatogenesis (NSP, n = 8), qualitatively intact but quantitatively reduced spermatogenesis (hypospermatogenesis, HYP, n = 6), maturation arrest (MA, n = 6), or Sertoli cell only syndrome (SCO, n = 7). To analyze mRNA and protein expression, we performed RT-PCR from testis homogenate and laser-assisted microdissection material, immunohistochemistry (both proteins), and immune electron microscopy (iEM, SF1).

Results TOP2A protein was detected within the nuclei of germ cells from spermatogonia up to step 4 elongating spermatids in NSP. No somatic cells were stained. In HYP or MA samples, all germ cells present were stained, whereas staining was absent in SCO. This result was verified by RT-PCR (NSP and SCO). SF1 protein was detected in nuclei of somatic cells, endothelial cells, and germ cells in NSP. This staining pattern was confirmed using iEM. In regard to germ cells, spermatogonia and step 4 elongating spermatids were regularly stained, although staining of primary spermatocytes was weaker compared to other germ cells. In HYP, MA, and SCO samples, staining pattern was consistent (somatic cells and germ cells present), with primary spermatocytes showing an intense staining in MA. So far, expression of SF1 protein was confirmed for somatic cells using RT-PCR. A closer identification of germ cell staining as well as quantification using quantitative RT-PCR is pending.

Discussion Expression of TOP2A in intact spermatogenesis throughout all germ cell stages confirms its importance for germ cell development and spermatogenesis itself. So far, no involvement in germ cell loss or MA could be detected. Nevertheless, quantitative analysis is still pending. In contrast to that, expression pattern of SF1 during the course of normal spermatogenesis and in impaired spermatogenesis requires further investigations, as its presence in different germ cell stages seem to vary in distinct forms of spermatogenic impairment. Here, quantitative analyses will help to elucidate the biological significance of SF1 during germ cell development.

VF5

Exomweite Mutationsanalyse bei infertilen Männern mit Meiose-arrest

C. Friedrich¹, M. Wyrwoll¹, A. Pilatz², A. Röpke¹, H.-C. Schuppe², J. Gromoll³, S. Kliesch³, F. Tüttelmann¹

¹Institut für Humangenetik, Universität Münster; ²Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Einleitung Infertilität ist ein weitverbreitetes Problem, das 10–15 % der Paare mit Kinderwunsch betrifft. Die Azoospermie, die bei etwa 10 % der infertilen Männer gefunden wird, stellt die schwerste Form der männlichen Unfruchtbarkeit dar. Genetische Ursachen, die bisher lediglich bei 4 % der

infertilen Patienten nachgewiesen werden, umfassen chromosomale Aberrationen, Y-chromosomale AZF-Deletionen, kongenitale bilaterale Aplasie des *Vas deferens*. Bislang wurden nur wenige monogene Ursachen identifiziert. Für einen Meiosearrest haben wir neben hemizygoten Mutationen im X-chromosomalen *TEX11*-Gen kürzlich compound heterozygote Mutationen im *STAG3*-Gen beschrieben. Mittels Exomanalyse sollten nun neue Kandidatengene identifiziert werden.

Material/Methode In einer spezifisch selektierten Patientenkohorte ($n = 38$) mit Meiosearrest wurde nach Ausschluss anderer genetischer Ursachen eine exomweite Sequenzierung durchgeführt. Bei der Mutationsanalyse wurden seltene Varianten ($MAF < 5\%$ in gnomAD) mit schweren Konsequenzen für die Proteinfunktion (Stop, Frameshift, Splice Site) berücksichtigt, die homozygot oder compound heterozygot vorkamen. Ausgeschlossen wurden Gene, in denen Mutationen auch bei Patienten mit anderen Spermatogenese-Phänotypen vorlagen (Patienten insgesamt $n = 462$, u. a. Sertoli-cell-only Syndrom [SCOS], $n = 170$).

Ergebnisse Bei 3 nicht verwandten Patienten mit Meiosearrest wurde eine seltene ($0,21\%$ in gnomAD) homozygote Duplikation (c.676dup) im *MIAP*-Gen festgestellt, die zu einem Frameshift führt (p.Trp226LeufsTer4). Im *MSH5*-Gen wurden 2 homozygote Frameshift-Varianten bei insgesamt 3 nicht verwandten Patienten identifiziert. Eine homozygote Duplikation (c.75dup, p.Ser26GlnfsTer42) wurde bisher nicht beschrieben und kommt bei einem Patienten mit Meiosearrest vor. Bei der Überprüfung der Exomdaten des gesamten Patientenkollektivs ($n = 462$) wurde bei 2 Männern mit nicht-obstruktiver Azoospermie (NOA) eine 2. homozygote Deletion (c.1857del, p.Ala620GlnfsTer9) gefunden, die ebenfalls unbekannt ist. Da bei diesen Männern keine Hodenbiopsie erfolgt ist und der Phänotyp somit nicht weiter spezifiziert werden konnte, handelt es sich hier möglicherweise auch um einen Meiosearrest, der durch eine Mutation in *MSH5* verursacht wird. Beide Gene werden hodenspezifisch exprimiert (GTex)

und wurden bereits in Publikationen in Zusammenhang mit der Meiose gebracht. Daten zu infertilen Männern lagen bislang nicht vor.

Diskussion Mit Hilfe exomweiter Mutationsanalysen bei Männern mit Meiosearrest konnten wir die neuen Kandidatengene *MIAP* und *MSH5* identifizieren. Unsere Ergebnisse in Zusammenhang mit den publizierten funktionellen Daten deuten darauf hin, dass homozygote Mutationen in *MIAP* und *MSH5* zu einer autosomal-rezessiven Form der männlichen Infertilität infolge eines Meiosearrests führen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen der DFG klinischen Forschergruppe „Male Germ Cells: from Genes to Function“ (KFO 326) durchgeführt.

FV6

The impact of tobacco smoking on transition proteins and protamines genes mRNA content in the sperm of infertile men

H. Amor, M. Hammadeh
Universität des Saarlandes, Frauenklinik (IVF Labor),
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Saar,
Deutschland

Introduction Transition proteins 1 and 2 (TNP1 and TNP2), and protamines 1 and 2 (PRM1 and PRM2) contribute in the high order repacking of the spermatid chromatin. A chromatin damage may occur as a result of uni or multi-factors like tobacco smoking which generates reactive oxygen species (ROS) in the ejaculate. The purpose of this study was to investigate if the tobacco smoking affects sperm parameters and the expression levels of TNP1, TNP2, PRM1 and PRM2 genes in human spermatozoa.

Participants, Materials, Setting, Methods Semen samples of 98 smokers (G.I) and 43 heavy-smokers (G.II) were prepared according to WHO guideline 2010. Sperm RNA was extracted from the purified sample using Isolate II DNA/RNA/Protein kit (Bioline) then its concentration and purity were determined with the Nanodrop spectrophotometer ND-2000c. Total RNA was

converted into cDNA and real-time quantitative PCR (RT-PCR) SYBR green I was used to quantifying the expression levels of TNP1, TNP2, PRM1, and PRM2 genes. IBM SPSS for Windows software package version 24.0 (SPSS Inc., USA) was used for the statistical analyses and the p -value ≤ 0.05 were considered to be statistically significant. The relative RNA quantity in the samples was calculated separately by the Livak method.

Results Statistically significant differences for the standard semen parameters and the relative amount of TNP1, TNP2, PRM1 and PRM2 mRNA ($p < 0.05$) were observed between (G.I) and (G.II). In G.II, the sperm concentration, progressive motility, and normal morphology were significantly lower ($p < 0.05$) and the mRNA amount of the studied genes was significantly higher ($p < 0.01$) than that of G.I. Besides in G.II, the sperm count showed a positive correlation with PRM1, PRM2, TNP1 and TNP2 mRNA ($r = 0.335$, $r = 0.329$, $r = 0.391$, $r = 0.369$; $p \leq 0.001$ respectively), the sperm progressive motility was positively correlated to PRM1, PRM2, TNP1 and TNP2 mRNA ($r = 0.337$, $r = 0.338$, $r = 0.361$, $r = 0.359$, $p \leq 0.001$ respectively), and the normal morphology demonstrated a positive correlation with the expression levels of PRM1, TNP1 and TNP2 ($r = 0.214$, $r = 0.294$, $r = 0.303$, $p < 0.05$). On the contrary, in G.I, no correlations were observed between those investigated genes expression levels and standard semen parameters. The PRM1/PRM2 mRNA ratio differed significantly among studied groups (0.60 ± 1.08 in G.II; 0.11 ± 0.84 in G.I) and correlated positively ($p < 0.01$) with the mRNA amount of PRM2 and TNP2 in both groups. Likewise, the mRNA amounts of the mentioned nucleoproteins are highly correlated ($p = 0.001$) between them in both groups.

Discussion This study proves the relationship between the TNP1, TNP2, PRM1, and PRM2 throughout the sperm chromatin repackaging. Besides, it demonstrated that an external stimulus „smoking“ negatively influence the sperm parameters and modify the relative amount of the TNP1, TNP2, PRM1, and PRM2 gene mRNA. Thus, subfertile patients should be encouraged to quit smoking.

Poster

■ Erektile Dysfunktion und Penile Chirurgie

P1

Hat Masturbation einen positiven Einfluss auf das funktionelle Outcome im postoperativen Verlauf nach radikaler Prostatektomie?

V. H. Meissner¹, S. Dumler¹, M. Kron², S. Schiele¹, A. Bannowsky³, J. E. Gschwend¹, K. Herkommer¹
¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Universitätsklinikum rechts der Isar der Technischen Universität

München, ²Institut für Epidemiologie und Medizinische Biometrie, Universität Ulm; ³Klinik für Urologie, Imland Klinik GmbH, Rendsburg, Deutschland

Einleitung Eine penile Rehabilitation nach nervenschonender radikaler Prostatektomie (nsRP) beeinflusst das funktionelle Outcome (erektile Funktion und Kontinenz) positiv. Dabei werden postoperativ Medikamente/Hilfsmittel eingesetzt, um die Erektionsfähigkeit zu verbessern. Ob auch Masturbation, als nicht-medikamentöser Ansatz, mit einem besseren funktionellen Outcome nach RP assoziiert ist, wurde erstmals in vorliegender Studie untersucht.

Material/Methode In vorliegender Analyse wurden präoperativ potente Patienten (International Index of Erectile Function [IIEF-EF] ≥ 22 und/oder Erection Hardness Score [EHS] ≥ 3) ohne neo- oder adjuvante Therapie eingeschlossen, die zwischen November 2013 und März 2016 eine nsRP hatten. Präoperativ und postoperativ nach 6, 12, 24 und 36 Monaten wurden die Patienten mittels Fragebögen jeweils zu Masturbation (ja: m; nein: nm), erektiler Funktion (mäßig bis gute erektile Funktion: IIEF-EF ≥ 17 oder EHS ≥ 2), morgendlichen Erektionen (ja: gelegentlich, fast immer, immer; nein: fast nie, nie) und Kontinenz (kontinent: maximal eine trockene Sicherheitsvorlage) befragt.

Ergebnisse Es wurden 314 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 64,1 Jahren (45,2–77,6) eingeschlossen. Präoperativ gaben 63,4 % der Patienten an zu masturbieren, mindestens gelegentliche morgendliche Erektionen hatten 80,7 %. Im postoperativen Verlauf masturbierten 65,7 %, 71,4 %, 65,2 % und 70,5 % der Patienten nach 6, 12, 24 und 36 Monaten. Postoperativ zeigte sich nach 24 und 36 Monaten bei den m-Patienten im Vergleich zu den nm-Patienten eine klinisch relevant (≥ 10 %) bessere erektile Funktion (24 Monate: 47,5 % vs. 37,5 %; 36 Monate: 47,7 % vs. 35,7 %). Darüber hinaus hatten m-Patienten häufiger morgendliche Erektionen (24 Monate: 54,6 % vs. 34,9 %; 36 Monate: 52,2 % vs. 35,7 %) und die Kontinenzrate der m-Patienten war zu den Zeitpunkten 12 und 36 Monaten nach nsRP klinisch relevant und statistisch signifikant höher (12 Monate: 83,1 % vs. 70,2 %; $p < 0,05$; 36 Monate: 89,4 % vs. 67,9 %; $p < 0,05$).

Diskussion Unsere Studie zeigt, dass Masturbation nach nsRP mit einem klinisch relevanten besseren funktionellen Outcome assoziiert ist. Ob Masturbation ein besseres funktionelles Outcome bedingt oder ob ein besseres funktionelles Outcome zu vermehrter Masturbation führt, lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht eindeutig belegen. Da es sich um eine Beobachtungsstudie handelt, die einen solchen Zusammenhang untersucht hat, sind weitere, wenn möglich kontrollierte Studien für eine bessere Evidenz nötig.

■ Fertilitätsprotektion

P2

Optionen für die Fertilitätsprotektion bei transsexuellen Mann-zu-Frau-Patientinnen am Beispiel des histologischen Spermatogenesebefundes zum Zeitpunkt der geschlechtsangleichenden Operation

*B. Scheffer, F. Schneider, N. Neuhaus, J. F. Cremers, J. Rohayem, M. Zitzmann, S. Schlatt, S. Kliesch
Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie
Münster, Deutschland*

Einleitung Bei transsexuellen Mann-zu-Frau-Patientinnen (MzF) führt die gegen geschlechtliche Hormontherapie (CST) zu einer Einschränkung der gonadalen Funktion und die geschlechtsangleichende Operation (GCS) zu einem irreversiblen Verlust der natürlichen Fortpflanzungsmöglichkeit. Die internationalen Leitlinien fordern eine Aufklärung über Möglichkeiten der Fertilitätsprotektion (FP) vor Einleitung einer CST.

Ziel unserer Arbeit ist es, anhand des Spermatogenese-Status zum Zeitpunkt der GCS Rückschlüsse auf Möglichkeiten der FP zu ziehen. Des Weiteren sollte die Nachfrage nach FP bei MzF an unserem Centrum eruiert werden.

Methoden In 3 kooperierenden Kliniken wurde 12/2012–06/2018 am Tag der GCS das Hodengewebe von 238 MzF gewonnen

und die Spermatogenese mittels Bergmann-Kliesch-Score ausgewertet. Im gleichen Zeitraum wurde die Zahl der MzF an unserem Centrum ermittelt, die sich mit der Frage nach FP vorstellten.

Ergebnisse Zum Zeitpunkt der GCS war bei 39 von 238 MzF histologisch (16,4 %) eine qualitativ intakte Spermatogenese nachweisbar.

An unserem Centrum stellten sich 12 MzF im Alter von 17–62 J vor (mittleres Alter 40 J). Bei 2 MzF war die Diagnose nicht abschließend gesichert, bei einer MzF erfolgte bereits eine GCS, 4 stellten sich zur Einleitung/Kontrolle einer CST vor (2 in Ehe mit Kindern lebend, 2 mit unbekannter familiärer Situation). Vier MzF (33 %) stellten sich zur FP-Beratung vor, davon entschieden sich 3 für eine Kryokonservierung von Ejakulatspermien (KE), die jeweils erfolgreich war (2× Terato-, 1× Normozoospermie). Im selben Zeitraum stellten sich insgesamt 708 Patienten zur KE aufgrund anderer Diagnosen vor.

Diskussion Trotz einer Prävalenz von 1:11.9000 bis 1:45.000 [De Cuyper et al., 2007] stellen MzF einen Anteil von $< 0,5$ % der Patienten zur KE an unserem Centrum. Eine Studie zeigt, dass 70 % der MzF einen Kinderwunsch haben, jedoch nur 10 % eine KE in Anspruch nehmen [Auer et al., 2018].

Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Möglichkeiten der FP für MzF bisher wenig bekannt sind. Einigen MzF mag aufgrund des hohen Leidensdruckes die rasche Einleitung einer CST dringlicher als die Auseinandersetzung mit Möglichkeiten der FP sein. Hier zeigen die histologischen Ergebnisse, dass für jeden 6. Betroffenen noch bei GCS die Chance besteht, mittels testikulärer Spermienextraktion eine FP zu realisieren. Die TESE käme ebenso für Patienten in Betracht, die sich aufgrund der Aversion zum biologischen Geschlecht nicht zu einer KE in der Lage fühlen. Perspektivisch könnte sogar früh-/präpubertären MzF die Entnahme und Kryokonservierung immaturren Hodengewebes im experimentellen Setting analog zu onkologisch erkrankten Kindern (Androprotect) angeboten werden.

In der Andrologie und Urologie können MzF etablierte Verfahren zur FP angeboten werden. Die Etablierung einer standardisierten Aufklärung über Möglichkeiten der FP für MzF ist sinnvoll, um die in Deutschland bestehende Versorgungslücke zu schließen.

P3

Funktionelle Marker in Spermatogonienpopulationen immaturren Hodengewebes

L. Heckmann¹, J. Portela², J. Wistuba¹, A. van Pelt², S. Kliesch³, S. Schlatt¹, N. Neuhaus¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie, Münster, Deutschland; ²Center for Reproductive Medicine, Amsterdam Research Institute Reproduction and Development, Amsterdam, Niederlande;

³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Abteilung für Klinische und Operative Andrologie, Münster, Deutschland

Einleitung In den vergangenen Jahrzehnten wurde die Überlebensrate von jungen Krebspatienten durch verbesserte Krebstherapien auf > 80 % gesteigert, wodurch ihre Lebensqualität in den Fokus gerückt ist. Krebsbehandlungen führen zu einem Verlust der Keimzellen, besonders der teilungsaktiven Spermatogonien (Spg), und somit zu temporärer oder permanenter Infertilität. Im Gegensatz zu Männern bilden Jungen noch keine Spermien und können nur Hodengewebe zur Fertilitätsprotektion einlagern, um ihre spermatogoniale Stammzellen zu bewahren. Ziel dieser Studie war es, Spermatogonienpopulationen mittels der Expression funktioneller Marker in immaturren menschlichen Hodengewebe unter Einfluss einer Erkrankung und ihrer Behandlung zu analysieren.

Material/Methoden Hodenbiopsien von 55 Patienten wurden diagnoseabhängig in 3 Gruppen aufgeteilt: NT-Gruppe: Patienten, deren Hoden weder durch Erkrankung noch Behandlung beeinflusst sein sollten (2–14 Jahre; $n = 14$); AT-Gruppe: Patienten, deren Hoden durch Erkrankung oder Behandlung beeinflusst wurden (5 Monate–17 Jahre; $n = 22$); KS-Gruppe: Patienten mit Klinefelter-Syndrom (47,XXY) (12–20 Jahre; $n = 19$). Die Gewebe wurden immunhistochemischen Färbungen unterzogen; im Einzelnen wurde detektiert: Keimzellmarker: *Melanoma-associated antigen 4* (MAGEA4) und *Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1* (UTF1); Proliferationsmarker: *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) und als Methylierungsmarker: *5-Methylcytosin* (5mC). Für jeden Marker wurden Labeling Indices (positiv detektierte (+) gegen alle Spg) auf einem Schnitt (0,6–25,4 mm²) pro Patient bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test.

Ergebnisse MAGEA4 wurde alters- und gruppenunabhängig in allen Spg exprimiert. Der Anteil der UTF1 (+) Spg nahm in Abhängigkeit vom Alter ab und der Anteil der PCNA (+) und 5mC (+) zu. Der Anteil der UTF1 (+) Spermatogonien in der NT-Gruppe lag bei 57 ± 18 % und war mit 39 ± 22 % signifikant geringer in der AT-Gruppe ($p = 0,02$). Ebenso wurde eine höhere Anzahl an 5mC (+) Spg in der NT (38 ± 23 %) im Vergleich zur AT-Gruppe (14 ± 16 %) detektiert. Für PCNA wurde eine signifikant höhere Anzahl PCNA (+) Spg in der NT-Gruppe mit 16 % im Vergleich zur KS-Gruppe mit 3 % gefunden ($p = 0,02$).

Diskussion Die Expression von MAGEA4 ist unabhängig von Alter, Erkrankung oder Behandlung und eignet sich als ein diagnostischer Marker zur Detektion von Spg in immaturren Hodengewebe. In der AT-Gruppe weist eine verringerte UTF1-Expression auf reduzierte undifferenzierte Spg hin, eine niedrigere 5mC-Expression auf eine Beeinträchtigung der *De-novo*-Methylierung. Grund für diese veränderten Spermatogonienpopulationen könnte die gonadotoxische Behandlung der Patienten sein. In der KS-Gruppe weist eine verminderte PCNA-Ex-

pression auf eine eingeschränkte Proliferation der Spg hin. Hinsichtlich der Expression der untersuchten Marker unterschieden sich Spermatogonienpopulationen in Abhängigkeit von Alter, Erkrankung und Behandlung.

P4

Reversible effects of aqueous *Carica papaya* seed extract on Leydig cells

V. Ghaffarilaleh¹, D. Fisher¹, R. Henkel^{1,2}

¹Medical Bioscience, University of the Western Cape, Cape Town, South Africa; ²American Centre for Reproductive Medicine, Cleveland Clinic, Ohio, USA

Background *Carica papaya* seeds are used in traditional medicine as a male contraceptive. It has been shown to cause reversible sterility.

Experimental Design Papaya seeds were washed, dried and ground to a powder, which was extracted for 72 hours at 70 °C. Thereafter, the extract is filtered, frozen at -20 °C and subsequently freeze-dried to obtain a powder. Dulbecco's Modified Eagle supplemented with 5% fetal bovine serum, 2.5% donor equine serum and 1% penicillin-streptomycin. in the first experiment, TM3 Leydig cells were seeded into two sets of 24-well plates for 24 hours then Both sets of cells were exposed to the wässrige *C. papayaseed* extract for 48 hours. Thereafter the medium of one set of cells was replaced with fresh media, while the other set of cells was exposed for 48 hours. In the second experiment, two sets of cells were exposed for 72 hours in 24-well plates under chronic exposure, then one of the sets was monitored. Finally, cell proliferation and performance were evaluated. In the third experiments, TM3 cells were exposed for 24, 48, 72 and 96 hours and 72, respectively, and zero hours, respectively. Afterwards, TM3 cells were checked for cell proliferation, viability, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO).

Results showed that TM3 cell proliferation was exposed throughout the experiment, which was significantly suppressed in a dose-dependently manner ($p < 0.05$). The TM3 cell viability, exposed with extract throughout the experiment, was significantly suppressed, while cells exposed for 48 hours only, recovered to control levels after the replacement with fresh media ($p < 0.05$). Results from experiment two Showed did cell proliferation and viability were suppressed relative to controls after exposure of *C. papaya* for 72 hours and after adding fresh media for 72 hours Further ($p < 0.05$). Results from experiment three showed that ROS and NO were significantly increased ($p < 0.05$) in a dose- and time-dependent manner.

Conclusion Aqueous *C. papaya* seed extract had reversible effects on cell proliferation and viability 48 hours after exposure after 72 hours of cell proliferation and viability were irreversible. Furthermore, ROS and NO were changed in a time-dependent manner relative to controls.

P5

Aqueous *Carica papaya* seed extract affects DNA fragmentation and reactive oxygen species in Sertoli cells

V. Ghaffarilaleh¹, D. Fisher¹, R. Henkel^{1,2}

¹Medical Bioscience, University of the Western Cape, Cape Town, South Africa; ²American Centre for Reproductive Medicine, Cleveland Clinic, Ohio, USA

Background *Carica papaya* seeds are used in traditional medicine as a male contraceptive. It has been shown to cause reversible sterility.

Experimental Design Papaya seeds were washed, dried and ground to a powder, which was extracted for 72 hours at 70 °C. Thereafter, the extract is filtered, frozen at -20 °C and subsequently freeze-dried to obtain a powder. Dulbecco's Modified Eagle supplemented with 5% fetal bovine serum, 2.5% donor equine serum and 1% penicillin-streptomycin. in the first experiment, TM4 Sertoli cells were seeded into two sets of 24-well plates for 24 hours then Both sets of cells were exposed to the aqueous *C. papayaseed* extract for 48 hours. Thereafter the medium of one set of cells was replaced with fresh media, while the other set of cells was exposed for 48 hours. 72 hours in 24-second plates under chronic exposure then after 72 hours one of the sets monitored, and the other set was left exposed for 72 hours. Finally, cell proliferation and performance were evaluated. In the third experiment, TM4 cells were exposed for 24, 48, 72 and 96 hours and 72, respectively, and zero hours, respectively. Afterwards, the TM4 cells were checked for DNA fragmentation and reactive oxygen species.

Results The TM4 cell proliferation, exposed with an extract throughout the experiment, was significantly suppressed in a dose-dependently manner ($p < 0.0001$). The TM4 cell viability, exposed with extract throughout the experiment, was significantly suppressed, while cells exposed for 48 hours only, recovered to the levels of control with fresh media ($p < 0.0001$). Results from experiment two showed that cell proliferation and viability were suppressed relative to controls after exposure of *C. papaya* 72 hours ($p < 0.05$). Results from experiment showed DNA fragmentation increased significantly ($p < 0.05$) in a dose and time dependent manner. Similarly, ROS was significantly increased in a dose and time dependent manner ($p < 0.05$).

Conclusion Thus, aqueous *C. papaya* affects cell proliferation, viability, DNA fragmentation and ROS in a dose and time dependent manner.

P6

Aus iPS-Zellen abgeleitete menschliche Keimzellen interagieren während der Tubulogenese mit Ratten-Sertolizellen: Untersuchungen eines Xeno-Organoid-Systems

N. Rotte¹, E. M. Malf¹, J. Wistuba¹, S. Schlatt¹, R. Sandhowe-Klaverkamp¹, K. Hübner², H. R. Schöler²
¹Centrum für Reproduktionsmedizin & Andrologie, Institut für Reproduktions- und Regenerationsmedizin, Münster; ²Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Zell- und Entwicklungsbiologie, Münster, Deutschland

Einleitung Hodentubuli sind hoch spezialisierte Strukturen, die Ort der männlichen Keimzellreifung sind. Die Mechanismen, die zur Hodenbildung führen und den adäquaten Differenzierungsweg der Keimzellen induzieren, sind kaum verstanden. Die Generierung tubulusähnlicher Organoid-Systeme wird helfen, Prozesse der testikulären Tubulogenese und Spermatogenese *in vitro* zu untersuchen. Diese Studie etabliert ein Kultursystem, in dem testikuläre immature Rattenzellen mit humanen, aus iPS abgeleiteten, primordialen Keimzellen (hPGCLC) beobachtet werden.

Material/Methoden Testikuläres postnatales Rattengewebe (5–8 dpp) wurde in einem 2-stufigen Ansatz enzymatisch verdaut. Humane Keimzellen wurden über eine intermediäre Form (hPGC *precursor*) aus pluripotenten Stammzellen (iPS) differenziert. Diese ubiquitär GFP-exprimierenden Keimzellen wurden der Rattenkultur nach 24 Stunden zugegeben. Systematisch wurde eine Optimierung erarbeitet, die folgenden Fragestellungen entsprang: (1.) Haben basalmembranartige Derivate, wie Laminin oder Matrigel, einen Einfluss auf das Zellwachstum und die Dynamik der Kultur? (2.) Gibt es Variationen innerhalb der Kultur nach endogener Keimzellreduktion mittels hypotonischer Behandlung während der Präparation oder nach Aussaat der Zellen? (3.) Zeigen sich Effekte durch Anreicherung des Mediums mittels KnockOut Serum Replacement (KSR)?

Die Kultivierung erfolgte für 5–7 Tage. Als primäre Endpunkte wurden Veränderungen in Dynamik/Zelltypkomposition mikroskopisch festgehalten. Nach Fixierung der Zellen wurde deren Komposition immunhistologisch analysiert.

Ergebnisse Die primären Rattenzellen differenzierten kaskadenartig in definierten Schritten: (1.) Defragmentierung und Bildung eines *monolayers*, (2.) Aggregation in größere Verbände und (3.) Zusammenschluss zu tubulusähnlichen Strukturen. Auf Laminin war diese Kaskade koordinierter und reproduzierbarer. Die hypotonische Schockbehandlung führte zu einer Reduktion endogener Keimzellen um 80 %. Zusätzliche hypoosmotische Behandlung während der Kultur führte zu einer weiteren Reduktion um mehr als 90 %. Eine Zugabe von KSR beschleunigte die Entstehung tubulärer Strukturen. Die nach 24 Stunden ko-kultivierten

hPGC precursor siedelten sich auf den Aggregaten und tubulusähnlichen Strukturen an. Quantitative Immunfluoreszenzanalysen belegten die Präsenz von SOX9⁺ (Sertoli-) und SMA⁺ (Peritubulär-) Zellen, vereinzelt endogenen VASA⁺-Keimzellen sowie GFP⁺/OCT4⁺/SOX17⁺ humanen Zellen.

Diskussion In unserer Studie wurde erfolgreich ein neuartiges Xeno-Kultursystem realisiert. Dieses ermöglicht die Generierung tubulusähnlicher Strukturen aus Rattenzellen und die Beobachtung humaner Keimzellvorläufer in testikulärer Mikroumgebung. Wir gehen davon aus, mit diesem System relevante Differenzierungsschritte der männlichen Keimzellreifung durch testikuläre Nischen *in vitro* beschreiben zu können.

■ Fertilitätsstörungen

P7

Hyperglykämie induziert Störungen in der Spermatogenese über Haupt-Signalwege der Diabetes-Pathogenese

C. C. Maresch¹, D. C. Stute², T. Fleming³, H. P. Hammes⁴, T. Linn⁵

¹Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Molekulare Andrologie (Biomedizinisches Forschungszentrum), Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen; ²Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinische Forschungseinheit, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen; ³Zentrum für Innere Medizin I und Klinische Chemie, Universitätsklinikum Heidelberg; ⁴Institut für Vaskuläre Biologie und Medizin, Medizinische Fakultät Mannheim, Deutschland

Einleitung Bereits zuvor wurde gezeigt, dass Diabetes-induzierte Hyperglykämie männliche Fertilität beeinträchtigt. Über die zugrundeliegenden Mechanismen ist jedoch noch wenig bekannt. In der vorliegenden Studie haben wir die vier Hauptsignalwege (Hexosamin-Signalweg, Glykierungsendprodukt- [AGE-] Signalweg, Diacylglycerol (DAG)-Protein-Kinase-C-[PKC-] Signalweg sowie den Polyol-Signalweg), welche in der Diabetes-Pathogenese impliziert sind, sowohl im Hoden als auch Nebenhoden im *Ins2*^{Akita}-Maus-Modell für Typ-1-Diabetes (T1DM) untersucht.

Material/Methoden Sorbitolgehalt, PKC-Aktivität sowie der AGE-Signalweg, einschließlich Vorstufen, Rezeptoren und nachgeschalteter Mediatoren, wurden im Hoden und Nebenhoden des *Ins2*^{Akita}-Mausmodells (12 und 24 Wochen alte Tiere) mittels gängiger histologischer, proteinbiochemischer und genetischer Methoden untersucht. Nicht-diabetische *Ins2*^{Akita}-Mäuse dienten als Kontrolle.

Ergebnisse In vorangegangenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Typ-1-diabetische *Ins2*^{Akita}-Mäuse progressive testikuläre Dysfunktion, einhergehend mit einer 30%igen Reduktion des Hodengewichts und Spermienkopfschäden, im Alter von 24 Wochen aufweisen. Hier zeigen wir, dass Hyperglykämie zu einer signifikanten

und progressiven Aktivierung des PKC und Polyol-Signalwegs im Hoden, jedoch nicht im Nebenhoden führt. Untersuchungen hinsichtlich des AGE-Signalwegs ergeben widersprüchliche Ergebnisse und weisen eine Hochregulation des AGE-Vorläufers Methylglyoxal sowie des AGEs Carboxymethyllysin in Hoden und Nebenhoden auf, allerdings ohne Veränderungen hinsichtlich des Rezeptors für AGEs. Nachgeschaltete Mediatoren wurden zum Teil reguliert (CDC42, Akt1), während andere keine Veränderung aufwiesen (ERK1, ERK2, Rela, Nrf-2, IκBκB, NFκB).

Diskussion Der Fund, dass 2 Hauptsignalwege der Hyperglykämie-induzierten Organschäden im Hoden Typ-1-diabetischer Mäuse modifiziert sind, weist darauf hin, dass eine Blutglukoseregulation hin zu Normwerten die Auswirkungen von Hyperglykämie-induzierten Störungen der männlichen Reproduktion verhindern könnte. Um die klinische Signifikanz unserer Ergebnisse zu bestätigen, wären Interventionsstudien erstrebenswert.

P8

Einfluss des Gewinnungsorts auf die Ejakulatqualität

F. Ochsendorf, S. Stein, M. Meissner
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Frankfurt/M, Deutschland

Hintergrund Prä-analytische Faktoren können die Ejakulatqualität beeinflussen. Studienergebnisse sind bezüglich des Einflusses des Abgabeorts auf die Ejakulatqualität widersprüchlich.

Ziel Es sollte festgestellt werden, ob der Ort der Ejakulatgewinnung einen relevanten Einfluss auf die Ergebnisse der Spermogramm-Analyse hat.

Material und Methode Die Ejakulatergebnisse von 101 Männern, die in unserem andrologischen Labor 2 Proben mit jeweils unterschiedlichen Gewinnungsorten abgaben, wurden ausgewertet: n = 59 gewannen die erste Probe vor Ort in der Klinik, die zweite Probe zu Hause; n = 42 gewannen die erste Probe zu Hause, die zweite in der Klinik. Die Auswertung erfolgte standardisiert nach WHO-Kriterien. Die Null-Hypothese war, dass sich die Anzahl normal geformter, progressiv motiler Spermien (a+b) nicht bezüglich des Gewinnungsorts unterschied (t-Test). Die übrige Auswertung erfolgte deskriptiv. Mittels Fragebogen wurden zudem Parameter zu subjektiven Aspekten der Ejakulatgewinnung erhoben.

Ergebnisse Die Transportzeit bis zur Klinik betrug maximal 45 Minuten. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl progressiv motiler, normomorpher Spermien bei Gewinnung in der Klinik oder zu Hause. Die Einzelergebnisse bei den Ejakulatparametern „Gesamtzahl der Spermien“, „Motilität a+b“, „Motilität d“ oder „Spermien mit normaler Morphologie“ zeigten ebenfalls keinen Zusammenhang. Auch gab es bei diesen Variablen keine Tendenz der Ergebnisse zum primären Gewinnungsort. Bei der Gewinnung

zu Hause war die Partnerin öfter beteiligt (25 % vs. 9 %). 85 % der Befragten hätten bei weiteren Probe-Abgaben die Gewinnung zu Hause bevorzugt.

Schlussfolgerung Bei einer Transportzeit von < 1 Stunde bis zum Beginn der Ejakulat-Analyse werden deren Ergebnisse nicht vom Ort der Ejakulatgewinnung beeinflusst.

P9

Regulatory Factor X2 als Marker der Spermiogenese

F. Büdel, L. Konrad, R. Dietze, I. Meinhold-Heerlein
AG Konrad, Zentrum für Gynäkologie und Geburtshilfe, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Einleitung Die Spermiogenese ist der Reifungsprozess runder Spermatiden (rSpd) zu Spermatozoen. Eine eingeschränkte oder fehlende Spermiogenese führt entsprechend zu Infertilität. Marker, die verschiedene Reifestadien männlicher Keimzellen anzeigen, sind daher wichtig für die Diagnose der Pathologien und können zusätzlich bei der Entscheidungsfindung zugunsten oder gegen IVF-gestützte Therapien herangezogen werden.

Der Regulatory Factor X 2 (RFX2) wurde in Nagern als kritischer Faktor während der Spermiogenese identifiziert und vor allem mit der Entwicklung des Flagellums und elongierter Spermatiden in Verbindung gebracht. Die Meiose hingegen wird auch in RFX2-null-Mäusen korrekt durchlaufen. In der hier dargestellten Arbeit wurde untersucht, ob sich RFX2 als Marker für menschliche Proben eignet. Zu diesem Zweck wurden Patientenproben mit normaler Spermiogenese mit Proben verglichen, die mit Hypofertilität bzw. Spermatidenarrest diagnostiziert wurden. Ziel war, hier abzuschätzen, ob Patienten mit pathologisch eingeschränkter Spermiogenese eine signifikant geringere Anzahl an pachytänen Spermatozyten (pSpC) oder rSpd zeigen.

Material/Methode

Patienten: Die Patienten wurden mittels Scoresystem von Bergmann und Kliesch (2009) in 3 Gruppen eingeteilt: Normale Spermiogenese (NSP, n = 10, Median-Alter = 37 [27–51]), Hypofertilität (HYP, n = 8, Median-Alter = 40 [29–57]), Spermatidenarrest (SDA, n = 4, Median-Alter = 35 [30–37]).

Immunhistochemie: Die in Bouin fixierten Gewebeproben wurden mit dem Primäranantikörper Anti-RFX2 (Fa. Sigma) und dem Sekundäranantikörper EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit K4003 (Fa. Dako) sowie DAB-Lösung (Liquid DAB + Substrate Chromogen System K3468, Fa. Dako) gefärbt.

Auswertung: Mit dem DM200 LED Fotomikroskop wurden die Schnitte begutachtet und in den runden, intakten Tubuli seminiferi die RFX2-positiven Zellen ausgezählt getrennt nach rSpd und pSpC.

Statistische Auswertung: Zur statistischen Auswertung wurde die Zahl der RFX2-positiven Zellen pro Tubulus in Prism 5 for Win-

dows (V5.01, Fa. GraphPad Software Inc.) eingegeben und mittels One-Way-ANOVA und Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Als Post-Test wurde der Multiple-Comparison-Test nach Dunn verwendet.

Ergebnisse In der Anzahl der RFX2-positiven pSpc unterscheiden sich die beiden Gruppen NSP und HYP signifikant (Mittelwert: 25 [NSP] vs. 17 [HYP], $p < 0,0003$), während zwischen den Gruppen NSP und SDA nur ein geringer Unterschied besteht (Mittelwert: 25 [NSP] vs. 23 [SDA]). In der Anzahl der RFX2-positiven rSpd ist tendenziell ein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar ($p = 0,0680$). Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, müssen jedoch weitere Schnitte ausgewertet werden.

Diskussion Generell erscheint RFX2 als Marker für rSpd und pSpc auch im Menschen als geeignet. Darüber hinaus sind Unterschiede zwischen den verschiedenen Infertilitätskategorien mit diesem Marker ermittelbar, was zu potenziellen Anwendungen in der Diagnostik führen könnte.

P10

Entzündung verursacht Leydig-Zell-Dysfunktion und Apoptose bei metabolischem Syndrom

Q. Jiang¹, C. C. Maresch², S. Petry¹, A. Paradowska-Dogan³, S. Bhushan⁴, C. Wrenzycki⁵, M. F. Hartmann⁶, S. Wudy⁶, T. Linn¹

¹Klinische Forschungseinheit, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen; ²Molekulare Andrologie (Biomedizinisches Forschungszentrum), Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen; ³Institut für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn; ⁴Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen; ⁵Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Justus-Liebig-Universität, Gießen; ⁶Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Steroid- und Peptidhormonlabor, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen, Deutschland

Einleitung Das Metabolische Syndrom (MetS) führt zu Hypogonadismus und männlicher Subfertilität, jedoch werden verschiedene zugrundeliegende Mechanismen diskutiert. Da MetS mit chronischer Entzündung assoziiert wird, verwendeten wir leptinresistente db/db-Mäuse als Modell, um Anzeichen einer Hodenentzündung und einer beeinträchtigten Leydig-Zellfunktion zu erkennen.

Material/Methoden Hoden- und Spermiemorphologie, Fertilität, Steroidhormonspiegel, sowie Entzündungsmarker wurden im Hoden von BKS(D)-Leprdb^{+/+}/JOrlRj (db/db) Mäusen (12 und 24 Wochen alte Tiere) als auch in der Leydig-Zell-Linie MLTC-1 mittels gängiger histologischer, proteinbiochemischer und genetischer Methoden untersucht. C57Bl/6J und BKS(D)-Leprdb^{+/+}/JOrlRj (db/+) Mäuse dienten als Kontrolle.

Ergebnisse Die Mäuse zeigten sich durch eine verminderte Hodengröße, einen niedrigen Testosteronspiegel und eine ge-

ringere Anzahl von Leydig-Zellen aus. Interessanterweise waren die testikulären Kortikosteronkonzentrationen bei db/db-Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Kontrollen erhöht. Entzündungen und endoplasmatischer Retikulumstress, gekennzeichnet durch hochreguliertes IL-1 β und MCP-1, wurden im Hoden von db/db-Mäusen nachgewiesen. In-vitro-Behandlung von Maus-Leydig-Zellen mit IL-1 β stimulierter MCP-1-Freisetzung zusammen mit erhöhter Caspase-3-Expression, die in der Zelle als Indikator für Apoptose aktiviert wurde. Die chemische Hemmung von MCP-1 hat die Funktion der Leydig-Zellen *in vitro* vollständig gerettet und sowohl das Hodengewicht als auch den Testosteronspiegel bei db/db-Mäusen um ein Viertel erhöht.

Diskussion Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch MCP-1 vermittelte chronische Entzündung für die Dysfunktion und die Apoptose von Leydig-Zellen in MetS verantwortlich ist.

P11

Low-Level-Laser-Therapy (LLLT) improves human sperm motility and has no effect on the integrity of CD46 sperm-oocyte interacting protein

B. Espey¹, K. Kielwein^{1,2}, H. van der Ven^{1,2}, K. Steger³, J. P. Allam², A. Paradowska-Dogan¹, K. van der Ven¹

¹Abteilung für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn; ²Abteilung für Dermatologie, Andrologie und Venerologie, Universitätsklinikum Bonn; ³Molekulare Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Introduction In this study, we investigated Low-level-laser-therapy (LLLT) towards improvement of sperm motility. LLLT affects the mitochondrial respiratory chain leading to an increase of ATP thus increase of energy. The increase of sperm motility after laser radiation has been demonstrated in animal and in human sperm, however there is a lack of data concerning potential side effects of laser treatment on spermatozoa. The aim of the study was to define the optimal radiation dose and treatment duration for sperm of healthy donors and asthenozoospermic patients. Furthermore, the degree of sperm DNA fragmentation and the expression of CD46 sperm-oocyte interacting protein has been analyzed.

Material and Methods The study was performed on semen samples of asthenozoospermic ($n = 42$) and normozoospermic ($n = 22$) patients. Native fresh liquefied semen samples underwent radiation with energy doses from 0, to 4, 6 and 10 J/cm² (Reimers & Jansen, Germany). Sperm parameters were assessed according to WHO 5 manuals at 0, 30, 60, 90 and 120 min after radiation using a SCA[®] CASA-System (MICROPTIC S.L., Barcelona).

The amount of DNA-strand breakage was analyzed with the “Ligation-Mediated Real-Time Polymerase Chain Reaction” (LM-RT-

PCR) in 18 patients with asthenozoospermia and 13 normozoospermic controls. The expression of CD46 prior and after radiation in 7 sperm specimens has been analysed using flow cytometry. Statistical analysis was performed by using matched-paired one-way-ANOVA in combination with Dunnett’s multiple comparison tests (GraphPad Prism 7).

Results A significant increase of the progressive sperm motility (PR) with laser intensity of 6 J/cm² ($3.562\% \pm 1.105$; $p = 0.0069$) and decrease of non-progressive (NP) sperm motility of 4 J/cm² ($-3.25\% \pm 1.325$; $p = 0.0477$) and immotile (IM) sperm by 6 J/cm² (-6.517 ± 1.824 , $p = 0.0026$) could be observed. Furthermore, similar effects were detected for velocity parameters. Significant increase of VCL by 4 J/cm² ($2.835 \mu\text{m/s} \pm 1.065$; $p = 0.029$). For the normozoospermic group statistically significant changes for motility (6 J/cm² after 120 min: PR $6.125\% \pm 2.063$, $p = 0.0195$; IM -8.131 ± 2.655 , $p = 0.0158$; NP at 60 min: $-3.123\% \pm 1.004$, $p = 0.0142$;) or velocity (6 J/cm²: ALH $0.1286 \mu\text{m} \pm 0.05075$, $p = 0.0496$) could be observed between 60–120 min after radiation.

The LMqPCR results show no significant DNA fragmentation level after laser exposition as compared to the control group (Ct-values for 6 J/cm²: 23.24 ± 0.9779 vs. 0 J/cm²: 22.63 ± 1.033 , $p = 0.9268$). No effect on acrosomal integrity as shown with the expression of CD46 protein was demonstrated (Control vs 6J/cm², difference of means 0.226 , $p = 0.1633$).

Conclusion The improvement of sperm motility after laser therapy may raise a chance for successful intrauterine insemination, before patients participate 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.

■ Freie Themen

P12

Bilaterale gedoppelte Vasa deferentia – Fallbericht und Übersicht der Literatur

A. Jungwirth

EMCO Privatklinik, Urologie und Andrologie, Bad Dürrenberg, Österreich

Kasuistik Im Rahmen einer klassischen, unkomplizierten No-Skalpell-Vasektomie kam ein Patient mit einer Normozoospermie (!) zu den postoperativen Kontrollspermogrammen. Nachdem die 5., in der Ordination abgegebenen Samenprobe noch immer massenhaft motile Spermien zeigte, wurde eine Revision in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Dabei zeigten sich bilaterale komplett normal ausgebildet gedoppelte Vasa deferentia. Diese wurden in klassischer Weise koaguliert, ligiert und mit der Interponattechnik versorgt. Die danach untersuchten Postvasektomiespermogramme zeigten dann eine Azoospermie.

Übersicht Die Häufigkeit bilateral gedoppelter Samenleiter wird mit 1:5000 angegeben und es sind lediglich 22 Fallstudien dazu publiziert. Bei den gedoppelten Vasa wird unterschieden zwischen Typ I: 2 *Vasa deferentia* ohne Polyorchidismus, Typ II: multiple *Vasa deferentia* (VD) mit Polyorchidismus und Typ III: 2 Vasa, wovon eines ein ektopter Ureter ist, welches in den Ejakulationstrakt mündet. Es finden sich in 47 % ein komplett gedoppeltes VD von Epididymis bis zu Prostata und in 53 % die Fälle partiell gedoppelte VD. Als Ursache wird ein gedoppeltes fetales Mesonephron oder eine transversale Teilung des Mesonephrons während der Organogenese angenommen.

Schlussfolgerung Im Rahmen der Vasektomie sollte man immer an die Möglichkeit gedoppelter *Vasa deferentia* denken. Dazu ist es auch unbedingt notwendig, den Patienten von der Bedeutung der postoperativen Samenproben zu überzeugen. Nur so gelingt es, eine größtmögliche postoperative Sicherheit und Zufriedenheit für den Patienten und den Operateur zu erzielen.

P13

Untersuchung der Hoden-Knochen-Achse bei infertilen Männern

H. Kaplan¹, J. I. Kilb², A. Pilatz², T. Diemer², D. Fietz³, K. S. Lips⁴, H.-C. Schuppe², C. Heiß^{4,5}, F. Wagenlehner^{1,2}

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ²Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Gießen; ³Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ⁴Experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ⁵Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Gießen, Deutschland

Einleitung Studien an Mäusen haben gezeigt, dass unterkarboxyliertes Osteokalzin über die Bindung an den Rezeptor GPRC6A auf Leydig-Zellen einen Einfluss auf die Regulation der Testosteronproduktion hat. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB wird die Expression von Enzymen reguliert, die für die Testosteronsynthese notwendig sind. Untersuchungen an subfertilen Männern zeigten zudem, dass diese häufig sowohl einen Hypogonadismus als auch eine reduzierte Knochendichte aufweisen [1, 2].

Das Ziel dieser Studie ist es, die Hoden-Knochen-Achse bei Patienten mit Azoospermie hinsichtlich Osteoporose zu charakterisieren.

Material/Methoden Infertile Patienten mit Indikation zur Hodenbiopsie/TESE werden andrologisch untersucht und in 3 Kohorten kategorisiert: a) nicht-obstruktive Azoospermie mit Normogonadismus (NOA-Norm), b) NOA mit Hypogonadismus (NOA-Hypo) und c) obstruktive Azoospermie mit Normogonadismus (OA-Norm). Die Patienten erhalten eine Knochendichtemessung mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) und die Bestimmung

der Knochenstoffwechselfparameter erfolgt im Serum mittels ELISA. Das Knochenprofil wird von aus Monozyten differenzierten Osteoklasten, sowie aus skrotalem Fettgewebe isolierten mesenchymalen Stromazellen differenzierten Osteoblasten analysiert. Hodenbiopsien werden immunhistochemisch auf das Vorhandensein des Rezeptors GPRC6A für Osteokalzin sowie CREB untersucht.

Ergebnisse Die Testosteron- und Knochendichtewerte zeigen eine signifikant positive Korrelation ($p < 0,01$). Die Testosteronwerte sowie die Knochendichte im Femurbereich der Kohorte NOA-Hypo sind signifikant niedriger im Vergleich zu den Gruppen NOA-Norm und OA-Norm (stets $p < 0,05$). Die Aktivität der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (ALP) im Zellkulturmedium der Kohorten NOA-Norm und NOA-Hypo weisen im Vergleich zu OA-Norm eine deutliche Reduktion auf. Im Serum ist die Reduktion der ALP Aktivität der Kohorte NOA-Norm zu OA-Norm signifikant ($p < 0,05$).

Diskussion Die Studie soll Auskunft darüber geben, inwieweit bei verschiedenen Formen der Azoospermie Knochenstoffwechselveränderungen vorliegen und welche Parameter geeignet sind, dies zu untersuchen. Weiterhin erhoffen wir uns neue Erkenntnisse über den Einfluss des Knochenystems auf die Hodenfunktion.

Literatur:

1. Oury F, Ferron M, Huizhen W, et al. J Clin Invest 2013; 123: 2421–33.
2. Bobjer J, Bogefors K, Isaksson S, et al. Clin Endocrinol 2016; 85: 189–95.

P14

Charakterisierung transsexueller Hodengewebe aus drei deutschen Kliniken: Update zu Hormon- und Spermatogenesestatus am Tag der geschlechtsangleichenden Operation

F. Schneider¹, J. Wistuba¹, B. Scheffer¹, J. Hess², H. van Ahlen², D. Mahler¹, S. Schlatt¹, S. Kliesch¹, N. Neuhaus¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster; ²Abteilung für Urologie, Universitätsklinikum Essen; ³Abteilung für Urologie, Klinikum Osnabrück; ⁴Abteilung für Urologie, Asklepios Westklinikum, Hamburg, Deutschland

Einleitung Die Behandlung von transsexuellen Patientinnen (Mann zu Frau) erfolgt interdisziplinär. In Deutschland gibt es keine Spezialzentren, die Patientinnen untersuchen, behandeln, begleiten und operieren. Die Behandlung orientiert sich an internationalen Leitlinien und ist darauf ausgelegt, dass die Patientinnen am Tag der geschlechtsangleichenden Operation („gender confirming surgery“, GCS) sowohl physisch als auch psychisch vorbereitet sein sollen. Weltweit gibt es wenige Untersuchungen, die sich mit dem Zusammenhang zwischen gegengeschlechtlicher Hormontherapie, dem Hormonstatus und Auswertung der Hodengewebe transsexueller Patientinnen beschäftigen, außer Schneider et al. (2015). Ziel war

es, ein Update zu diesem Zusammenhang in einer größeren Patientenkohorte zu zeigen.

Material und Methoden Es wurden zwischen 12/2012 und 06/2018 268 Patientinnen aus 3 verschiedenen Kliniken am Tag der GCS rekrutiert. Insgesamt konnten 354 Hodengewebe und 226 Fragebögen von 268 Patientinnen ausgewertet werden.

Ergebnisse Die Behandlungen sind klinikabhängig unterschiedlich bezüglich des präoperativen Zeitpunktes, zu dem die Hormontherapie endet. Eine Klinik ließ die Patientinnen die gegengeschlechtliche Hormontherapie bis zum Tag der GCS einnehmen ($n = 48$). In den anderen beiden Kliniken mussten die Patientinnen die Hormontherapie 2 Wochen ($n = 178$) bzw. 4–6 Wochen ($n = 40$) vor der Operation beenden. Die Patientinnen waren im Durchschnitt 41 Jahre (16–66 Jahre) alt. Die meisten Patientinnen wurden mit einer Mischung aus Cyproteronacetat (CPA) und Östrogenen behandelt ($n = 168$), andere wurden allein mit Östrogenen ($n = 30$) und mit einer Mischung aus Spironolacton/Östrogen ($n = 11$) bzw. mit Spironolacton/Östrogen/CPA ($n = 11$). Die Durchschnittsmenge an CPA/d lag bei 23,63 mg (min 0,25 mg/d, max 150 mg/d; $n = 152$). Die Hormontherapie dauerte 29,15 Monate (min 5 Monate, max 169 Monate; $n = 213$) bis zur GCS. Die mittlere Hodengröße zum Zeitpunkt der geschlechtsangleichenden Operation ($n = 254$) betrug 11,35 g (Mittelwert, SD 4,6 g). Die histologische Auswertung der Spermatogenese (Bergmann/Kliesch) ergab bei 39 Hodengewebe eine vollständige Spermatogenese, bei 63 einen meiotischen Arrest, bei 95 einen spermatogenialen Arrest, bei 38 ein Sertoli-Cell-Only-Syndrom und bei 3 einen atrophierten Hoden („Tubulus-schatten“). Serum-Testosteron lag im Mittel bei 8,86 nmol/l (SD 8,6 nmol/l, $n = 233$) und Östrogen bei 195,9 pmol/l (SD 382,4 pmol/l, $n = 220$).

Diskussion Die Behandlung von transsexuellen Patientinnen befindet sich im Dilemma zwischen individueller und leitliniengemäßer Therapie. Nicht bei allen Patientinnen wurden am Tag der GCS eine unterdrückte Spermatogenese und ein devirilisierten Hormonstatus festgestellt. Dennoch wurde eine GCS durchgeführt. Mehr Forschung ist nötig, um Mechanismen der gegengeschlechtlichen Hormontherapie zu verstehen und die beste Therapie anbieten zu können, um die Patientinnen besser für die GCS vorzubereiten.

P15

Anti-Müller-Hormon (AMH) bei transsexuellen Patientinnen am Tag der geschlechtsangleichenden Operation

M. Kuhlmann, J. Dabel, N. Neuhaus, L. Heckmann, S. Schlatt, K. Redmann, R. Sandhove-Klaverkamp, J. Wistuba, S. Kliesch, F. Schneider
Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster, Deutschland

Einleitung Anti-Müller-Hormon (AMH) wird von den Sertoli-Zellen des embryonalen

Hodens gebildet und bewirkt die Rückbildung der Müllerschen Gänge bis zur 8. Woche der Embryogenese. Die Differenzierung der Sertoli-Zellen im Laufe der Entwicklung geht mit einer reduzierten AMH-Expression im menschlichen Hoden einher. Transsexuelle Patientinnen (Mann zu Frau) werden mit gegengeschlechtlicher Hormontherapie (Anti-Androgene und Östrogen-Derivate) bis zum Tag der geschlechtsangleichenden Operation behandelt. Bei adäquater Therapie findet eine Reduktion der Spermatogenese statt [Schneider et al. 2015] und es verdickt sich die Tubuluswand. Um eine mögliche De-Differenzierung der Sertoli-Zellen festzustellen, war es Ziel dieser Studie, die Expression von AMH in histologischen Schnitten und die serologischen AMH-Werte von transsexuellen Patientinnen am Tag der geschlechtsangleichenden Operationen zu untersuchen.

Material und Methoden Hodengewebe (n = 54) und Blutproben (n = 62) wurden am Tag der geschlechtsangleichenden Operation von transsexuellen Patientinnen (Mann zu Frau, Durchschnittsalter 40 Jahre) untersucht, die mit dem Anti-Androgen Cyproteronacetat (10–12,5 mg) und Östrogenen behandelt wurden. Der Spermatogenesestatus einiger Patientinnen wurde durchflusszytometrisch erfasst (n = 35). Hierzu wurde eine Ploidieanalyse durchgeführt: 2C nur diploide Zellen (keine Meioseaktivität mehr) und 1C haploide Zellen (Meiose findet noch statt). Zusätzlich wurden Hodengewebe einiger Patientinnen (n = 31) histologisch bewertet (Bergmann-Kliesch-Score). Gewebeschnitte wurden weiterhin Immunhistochemie (IHC) für AMH (Santa-Cruz anti-MIS 1:00) analysiert und mit Hilfe von Precipoint® Viewpoint morphometrisch hinsichtlich der Färbungsintensität (nicht, schwach, mittel, stark gefärbt) ausgewertet und statistisch (GraphPadPrism) beurteilt. AMH Serumwerte wurden mittels ELISA (BeckmannCoulter) bestimmt. Der Referenzwert für Männer lag bei 2–14 ug/l.

Ergebnisse Bei der Unterteilung der Spermatogenese mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie zeigten sich signifikante Unterschiede. Patientinnen mit haploiden Zellen (1C) wiesen signifikant mehr AMH-negative Tubuli in der IHC als bei Patientinnen mit diploiden Zellen (2C). Die Untersuchung der Blutproben ergab einen mittleren AMH-Wert von 13,68 ng/l (SD 25,01 ng/l, min 0,55 ng/l, max 116,1 ng/l). Patientinnen mit Sertoli-Cell-Only-Syndrom wiesen hingegen im Vergleich zu denen mit einer vollständigen Spermatogenese signifikant höhere AMH-Werte auf (p < 0,1).

Diskussion Die signifikant höheren AMH-Blutwerte in den Hoden mit arretierter und undifferenzierter Spermatogenese und die niedrige Expression von AMH bei Patientinnen mit differenzierter Spermatogenese (Haploidisierung) kann auf eine De-Differenzierung von Sertoli-Zellen unter gegengeschlechtlichen Therapie am Tag der geschlechtsangleichenden Operation hindeuten. Eine Vertiefung der Forschung und eine Erhöhung der Fallzahlen sind nötig, um dieses Studienergebnis zu bestätigen.

P16

Negativeres sexuelles Selbstbild bei Männern mit Erektile Dysfunktion, Ejaculatio praecox oder Libidostörung

J. Schineis¹, M. Kron², S. Schiele¹, A. Dinke¹, C. Arsov⁴, B. Hadaschik^{6,5}, 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 für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München; ⁴Klinik für Urologie; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; ⁵Urologische Klinik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; ⁶Klinik und Poliklinik für Urologie, Uroonkologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Essen; ⁷Klinik für Urologie und Urologische Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland

Einleitung Das Selbstbild ist ein multidimensionales Konstrukt, dessen einzelne Facetten die Wahrnehmung eines Menschen von sich selbst beschreiben. Unterschiedliche Facetten des Selbstbildes, wie zum Beispiel das Körperbild, zeigten in vorangegangenen Studien bereits einen Zusammenhang mit physischer und psychischer Gesundheit sowie mit dem Sexualleben. Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen 4 sexuellen Selbstbildfacetten und den 3 häufigsten sexuellen Dysfunktionen Erektile Dysfunktion, Ejaculatio praecox und Libidostörung zu untersuchen.

Material/Methode Im Rahmen der German-Male-Sex-Study wurden im Zeitraum von April 2014 bis April 2016 Männer im Alter von 45 Jahren mittels Fragebögen zu den sexuellen Dysfunktionen Erektile Dysfunktion, Ejaculatio praecox und Libidostörung sowie zu 4 Facetten ihres Selbstbildes befragt: Körperbild (3 Items aus dem Dresdner Körperbildfragebogen, DKB35), Verständnis von Maskulinität (3 Items aus der Male-Role-Norms-Scale, MRNS), sexuelles Selbstwertgefühl und Wahrnehmung sozialen Drucks in Bezug auf sexuelle Leistungsfähigkeit (3 bzw. 4 neu konstruierte Items). Die Items wurden von den Probanden jeweils auf einer 5-stufigen Likert-Skala beantwortet. Die Ejaculatio praecox wurde mittels des Sexual complaints screeners erhoben, die Erektile Dysfunktion mittels IIEF-EF (Score ≤ 25 = Erektile Dysfunktion). Die Libido wurde mittels folgender Frage erhoben: „Wie oft verspürten Sie in den letzten 4 Wochen das Verlangen, sexuell aktiv zu sein?“ („selten“ und „sehr selten“ = Libidostörung). Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Wilcoxon- oder Kruskal-Wallis-Test.

Ergebnisse Insgesamt wurden die Daten von 12.220 Männern im Alter von 45 Jahren in die Analyse mit einbezogen. Im Gesamtkollektiv zeigten sich ein positives Körperbild, ein modernes Verständnis von Maskulinität, ein hohes sexuelles Selbstwertgefühl und eine geringe Wahrnehmung sozialen Drucks in Bezug auf sexuelle Leistungsfähigkeit. Es konnte jeweils ein signifikanter Trend

zu einem negativeren Körperbild, einem geringeren sexuellen Selbstwertgefühl, stärkerer Wahrnehmung sozialen Drucks in Bezug auf sexuelle Leistungsfähigkeit bei allen drei untersuchten sexuellen Dysfunktionen gezeigt werden (jeweils p < 0,001). Es zeigte sich zudem ein signifikanter Trend zu einem traditionelleren Verständnis von Maskulinität bei Ejaculatio praecox bzw. erektiler Dysfunktion (p < 0,001), dieser zeigte sich nicht in Bezug auf die Libidostörung.

Diskussion 45-jährige Männer in Deutschland haben insgesamt ein positives sexuelles Selbstbild, jedoch zeigte sich bei Männern mit mindestens einer der untersuchten sexuellen Dysfunktionen ein Trend zu einem negativeren Selbstbild. Dies sollte vom behandelnden Arzt bei der Anamneseerhebung berücksichtigt werden.

P17

Veränderung glatter Muskelzellen in der Hodentubuluswand von Mann-zu-Frau Transsexuellen

J. Dabel¹, L. Heckmann¹, J. Wistuba¹, S. Schlatt¹, S. Kliesch², N. Neuhaus¹, F. Schneider^{1,2}

¹Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie; ²Abteilung für Klinische und Operative Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster, Deutschland

Einleitung Eine Geschlechtsidentitätsstörung beschreibt eine Inkongruenz zwischen dem biologisch zugewiesenen Geschlecht und der Geschlechtsidentität. Durch eine gegengeschlechtliche Hormontherapie werden Mann-zu-Frau-Transsexuelle (MzF-TS) mit Östrogenen und Anti-Androgenen wie z. B. Cyproteronacetat (CPA) behandelt. CPA unterdrückt die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Ziel der Behandlung ist die phänotypische Feminisierung und die supprimierte Spermatogenese, was mit der Degeneration der Tubuli einhergeht. Über die Effekte der Hormonbehandlung auf die Peritubulärzellen (PZ) ist bisher wenig bekannt.

Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss der Hormonbehandlung auf die PZ und die Organisation der Tubuluswand anhand der SMA Expression zu untersuchen.

Material/Methode 20 testikuläre Gewebe von MzF-TS wurden bisher am Tag der geschlechtsangleichenden Operation analysiert. Die MzF-TS wurden mit 10–12 mg CPA und Östrogenen behandelt. Die einzelnen Gewebeprobe wurden nach ihrem Differenzierungsgrad (DG) in Gruppen eingeteilt: 1.) Vollständige Spermatogenese (VS, n = 2); 2.) Meiotischer Arrest (MA, n = 4); 3.) Spermatogonialer Arrest (SPG, n = 6); 4.) Sertoli-Cell-Only (SCO, n = 5) und 5.) Tubulusschatten (TS, n = 3). Die Zuteilung erfolgte durch die Auswertung des DG der einzelnen Tubuli. Wenn ≥ 50 % aller Tubuli einen gewissen Grad aufwiesen, wurde die Probe der entsprechenden Gruppe zugeordnet. 3-µm-Schnitte des Bouin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebes wurden immunohistochemisch gegen „smooth muscle

actin“ (SMA) gefärbt. Hierbei handelt es sich um einen Differenzierungsmarker für PZ. Die Tubuli wurden semi-quantitativ einer von vier Kategorien zugewiesen: ungefärbt, partielle Färbung (< 50 % oder > 50 %) und vollständig gefärbte Tubuluswände. Zudem wurde die Dicke der Tubuluswände (Basalmembran und PZ) gemessen.

Ergebnisse Mit fortgeschrittener Spermatogenese war eine Zunahme der SMA-Expression erkennbar. Der Anteil der vollständig SMA gefärbten Tubuli war in Geweben mit VS höher (43 %) im Vergleich zu den TS-Geweben (0 %). Die Anzahl der ungefärbten Tubuli war in den TS-Proben signifikant höher verglichen mit den SCO- ($p \leq 0,021$), SPG- ($p \leq 0,028$) und MA- ($p \leq 0,03$) Geweben. Vergleiche der Tubuluswanddicke zeigten signifikant dickere Wände in den ungefärbten Tubuli der TS-Proben im Vergleich zu den ungefärbten Tubuli der SCO- ($p \leq 0,0001$), SPG- ($p \leq 0,0001$) und MA- ($p \leq 0,003$) Proben.

Diskussion Die semi-quantitative Auswertung zeigte eine Abnahme der SMA-Expression mit supprimierter Spermatogenese, bei gleichzeitiger Zunahme der Wandstärke. Die Hormonbehandlung wirkt sich unterschiedlich auf die Spermatogenese auf und zeigte heterogene Ergebnisse im Vergleich der Differenzierungsgrade untereinander in Bezug auf die SMA-Expression und die Verdickung der Tubuluswand. Um die Degeneration der Tubuluswände mit dem Testosteron korrelieren zu können, sollte das intratestikuläre Testosteron bestimmt werden.

P18

Haben sexuelle Orientierung und Aktivität einen Einfluss auf den PSA-Wert in einem Prostatakarzinom-Screening-Kollektiv?

M. Hollerer¹, V. H. Meissner¹, S. Schiele¹, P. Albers², C. Arsov², M. Kuczyk³, F. Imkamp³, M. Hohenfellner⁴, B. Hadaschik^{4,5}, J. E. Gschwend¹, K. Herkommer¹
¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Universitätsklinikum rechts der Isar, München; ²Urologische Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf; ³Klinik für Urologie und Urologische Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover; ⁴Urologische Klinik, Universitätsklinikum Heidelberg; ⁵Klinik und Poliklinik für Urologie, Uroonkologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Essen, Deutschland

Einleitung Es gibt sehr wenige Studien, die das Sexualleben und die Assoziation zum PSA-Wert untersucht haben. Auch Studien zu sexuell übertragbaren Erkrankungen und den Einfluss auf den PSA-Wert zeigten uneinheitliche Ergebnisse. Ob die sexuelle Orientierung, Art und Frequenz der sexuellen Aktivität einen klinisch relevanten Einfluss auf die Höhe des PSA-Werts haben, wurde in vorliegender Studie untersucht.

Material/Methode Im Rahmen der German-Male-Sex-Study wurden im Zeitraum von April 2014 bis April 2018 Männer nach deren sexueller Orientierung (heterosexuell, homosexuell), Analverkehr (ja, nein), Anzahl Sexualpartner (0; 1–10; 11–30; > 30),

Masturbationsfrequenz und sexueller Aktivität (0, 1, 2–3, > 3× pro Woche) und vorzeitigem Samenerguss (ja [unabhängig vom Leidensdruck], nein) gefragt. Die PSA-Werte wurden im Rahmen der PROBASE-Studie gemessen.

Ergebnisse Es wurden die Daten von 13.489 Männern im Alter von 45 Jahren ausgewertet. Davon waren 13.013 (96,5 %) heterosexuell und 476 homosexuell. Der mediane PSA-Wert lag bei 0,75 ng/ml (IQR: 0,51–1,08 ng/ml; Mittelwert 0,91 ng/ml). Homosexuelle Männer hatten einen leicht höheren PSA-Wert als heterosexuelle (0,79 ng/ml vs. 0,75 ng/ml). Bei homosexuellen Männern mit Analverkehr (61,9 %) zeigte sich ein leichter Trend zu einem erhöhten PSA-Wert gegenüber homosexuellen Männern ohne Analverkehr (0,82 ng/ml vs. 0,78 ng/ml). Bei höherer Masturbationsfrequenz und vermehrter sexueller Aktivität war der PSA-Wert im Gesamtkollektiv, sowie bei den hetero- und homosexuellen Männern leicht erhöht. Ein vorzeitiger Samenerguss führte zu einem leicht erniedrigten PSA-Wert im Gesamtkollektiv (0,75 ng/ml vs. 0,72 ng/ml), bei den heterosexuellen Männern (0,75 ng/ml vs. 0,72 ng/ml) und bei den homosexuellen Männern (0,8 ng/ml vs. 0,75 ng/ml).

Diskussion In diesem sehr jungen Kollektiv 45-jähriger Männer zeigt sich zwar, dass der PSA-Wert tendenziell leicht höher ist bei homosexueller Orientierung, Analsex, steigender Zahl der Sexualpartner, höherer Masturbationsfrequenz und häufiger sexueller Aktivität. Jedoch sind die Unterschiede im PSA-Wert gering und somit klinisch nicht relevant.

P19

Characterization, Identification and Isolation of Phytochemicals in Freeze-dried Aqueous Extracts of *Carica papaya*

V. Ghaffarilaleh¹, S. Egieyeh¹, D. Fisher¹, R. Henkel^{1,2}
¹Medical Bioscience, University of the Western Cape, Cape Town, South Africa; ²American Centre for Reproductive Medicine, Cleveland Clinic, Ohio, USA

Background Ethnobotanical review revealed did green fruits of *C. papaya* are used to treat high blood pressure, dyspepsia, constipation, amenorrhoea, general debility, expel worms and stimulate reproductive organs. Currently, we are investigating the latter effect and we hope to isolate, characterize and identify the compounds responsible for this effect.

Methods We performed organoleptic and physicochemical characterization of freeze-dried aqueous extract of *Carica papaya*. Infrared spectroscopy guided to an idea of chemical functional groups predominant in the extract. A HPLC fingerprint was developed for the extract and column chromatography.

Results The extract is a brownish colored powder that is soft to the touch. Phytochemical screening revealed the presence of flavo-

noids, alkaloids and terpenes. Infrared spectroscopy showed the presence of hydroxyl groups (-OH), bonded carbonyl groups (-CHO) and CH single bonds. A HPLC fingerprint showed reproducible distinct peaks that can be used to identify the extract, isolated on a thin-layered column with 95% methanol on silica gel.

Conclusions/Next step The freeze-dried aqueous extracts of *Carica papaya* are characterized by organoleptic properties, phytochemical screening and HPLC fingerprinting. Initial column fractionation gave fractions with possible contains single compounds. The process will be optimized to obtain more fraction for structural elucidation.

P20

Einfluss einer Vorinkubation der Spermien auf die Entwicklung und die Verteilung des Geschlechts bei bovinen *in vitro* produzierten Embryonen

F. Kotarski, B. Zimmer, C. Wrenzycki
 Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Die In-vitro-Produktion (IVP) ist beim Rind seit vielen Jahren eine Routinemethode, um Embryonen zu erzeugen. Sie wird im Rahmen eines Ovum-Pick-Up- (OPU-) Programms, nach Schlachtung/Tötung oder Ovariektomie des Spendertieres angewendet. Ziel dieser Studie war die Optimierung der Entwicklungsgeschwindigkeit boviner Blastozysten. Es wurde verglichen, ob durch eine Vorinkubation der Spermien in HHE- (Hypotaurin-Heparin-Epinephrin-) Fertilisierungsmedium, ein Einfluss auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der Blastozysten zu erreichen ist. Des Weiteren sollte mittels PCR das Geschlecht der resultierenden Blastozysten untersucht werden.

Es wurden Ovarien geschlechtsgesunder Kühe auf einem Schlachthof entnommen, Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) mittels Slicing-Methode isoliert und für 24 Stunden bei 39 °C und 5 % CO₂ *in vitro* gereift. Die In-vitro-Fertilisation der in 2 Gruppen (A und B) unterteilten gereiften KOK fand in FertTALP-Medium mit HHE statt. Tiefgefrierespermia eines IVF-tauglichen Bullen stand für diesen Versuch zur Verfügung. Durch Zentrifugation mit einer 90%igen Lösung aus Spermfilter und FertTalp-Gebrauchslösung wurde das Tiefgefrierespermia aufgearbeitet. Daran schlossen sich 2 weitere Waschschriffe des Spermapellets an, der erste mit FertTALP-Gebrauchslösung und der zweite mit FertTALP-Gebrauchslösung plus HHE. Für die KOK der Gruppe A wurden 100.000 Samenzellen in 100 µl HHE-Fertilisierungsmedium für 1 Stunde vorinkubiert und anschließend die gereiften KOK hinzugefügt. In Gruppe B wurden die gereiften KOK direkt in den HHE-Fertilisierungstropfen überführt und ebenfalls mit 100.000 Spermien ohne Vorinkubation versetzt. Nach 18 Stunden bei

39 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Denudierung der vermeintlichen Zygoten. Die Kultivierung in SOFaa-Medium bei 5 % O₂, 5 % CO₂ und 39 °C schloss sich an. Die Teilungs- und Entwicklungsraten wurden an Tag 7 erhoben. Blastozysten wurden bei –80 °C bis zur Ermittlung des Geschlechts mittels PCR unter Verwendung boviner und Y-Chromosom-spezifischer Primer eingefroren.

Insgesamt wurden in Gruppe A 110 und in Gruppe B 117 KOK (jeweils 4 Wiederholungen) eingesetzt. Die Teilungsrate der Embryonen der Gruppe A lag bei 67,2 ± 5,0 % und Gruppe B bei 70,6 ± 3,8 %. An Tag 7 betrug in Gruppe A die Gesamtentwicklung (Morulae und Blastozysten) 23,3 ± 6,2 %, verteilt auf 58,1 ± 10,3 % Blastozysten und 41,9 ± 1,7 % Morulae. In Gruppe B lag die Gesamtentwicklungsrate bei 19,6 ± 4,8 %, das Verhältnis lag hier bei 36,5 ± 11,4% Blastozysten und 63,5 ± 5,5 % Morulae.

Das Geschlechterverhältnis (in Prozent, weiblich:männlich) lag bei den Embryonen der Gruppe A bei 42:58 und bei denen der Gruppe B bei 39:61.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sich durch die Präinkubation der Spermien die resultierenden Embryonen schneller zur Blastozyste entwickeln. Die bekannte Verschiebung im Geschlechterverhältnis wird aber durch die Präinkubation nicht weiter erhöht.

P21

Increase of extracellular traps (ETs) and histone (H4) 3 citrullinated in smear of seminal samples from epididymitis patients

F. Zambrano^{1,2}, M. Schulz^{1,2}, P. Uribe¹, F. Wagenlehner³, H.-C. Schuppe³, A. Taubert⁴, R. Sanchez⁵, C. Hermosilla⁴

¹Center of Excellence in Translational Medicine-Scientific and Technological Bioresource Nucleus (CEMT – BIOREN), Temuco, Chile; ²Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad De La Frontera Temuco, Chile; ³Department of Urology, Children Urology and Andrology, Justus Liebig University Giessen, Deutschland; ⁴Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Deutschland; ⁵Universidad de la Frontera, Temuco, Chile

Introduction Neutrophils play a key role in the innate immune system by constituting the first line of defense. Its last described function corresponds to the mechanism of NETosis, which is characterized by the citrullination of histone H3 by means of the enzyme peptidylarginin deiminase (PAD4), in this process of posttranslational modification, arginine residues change to citrulline, then, the chromatin of the condensed neutrophil changes to its decondensed state, finally the process concludes with the release of extracellular neutrophil traps (NETs). The aim of this study was to determine the presence of NETs in seminal samples of men diagnosed with epididymitis, to establish a link between this defense mechanism in the pathophysiology of this disease in the male reproductive tract.

Material and Method Sperm samples from men with a diagnosis of epididymitis were used. They were evaluated in 2 groups (G1, G2), classified according to the following criteria: G1, seminal samples without infection and G2, seminal samples of patients with epididymitis (*Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*). In each group a number of 4 samples was used. The detection and visualization of NETs was carried out by means of double immunofluorescence of seminal spreads of the different groups. Total histones were determined and citrullinated histones. For nuclei staining and visualization of extracellular DNA (characteristic of NETs), Sytox Orange was used. The mean fluorescence intensity (IFM) of the samples was determined by the ImageJ image analysis program.

Results The quantification of predominant proteins of NETs as total histones, showed higher IFM in the group G2 (230) in comparison with the group G1 (1787), which was significantly higher $p < 0.05$, similar was the result of the quantification of histones citrullinated, which were more abundant ($p < 0.05$) in G2 (1863) purchased with the G1 group (552.5). Likewise, the MFI of the seminal samples with diagnosis of epididymitis (1275), showed greater presence of extracellular DNA than the group without infection (740.3), which was significantly lower in this parameter ($p < 0.05$).

Conclusions The greater presence of NETs in seminal samples of men with epididymitis suggests an important role of extracellular traps in the defense of the host against pathogens in the male reproductive tract. In addition, the presence of NETs in seminal samples, could have diagnostic value not only in the pathologies shown in this work, but in other infectious diseases present at reproductive level in both men and women.

Financial Support: Postdocs Program (FZ), University de La Frontera, Temuco, Chile.

■ Hypogonadismus

P22

Arteriosklerose im Hoden: mikrovaskuläre Schäden und Beeinträchtigung der Leydig-Zellen sind assoziiert mit einem Testosterondefizit

D. Beyer¹, K. Steinfeld^{1,2}, A. Mietens¹, C. Mühlfeld³, G. Eichner⁴, B. Altinkilic², M. Kampschulte⁵, G. A. Krombach⁵, W. Weidner², R. Middendorff¹

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie, Gießen; ²Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ³Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover; ⁴Institut für Mathematik, Justus-Liebig-Universität Gießen; ⁵Radiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Fragestellung Arteriosklerotische Veränderungen im Hoden haben bislang wenig Beachtung gefunden. So ist zum Beispiel nicht bekannt, ob Gefäßveränderungen im Hoden

zu Spermatogenesestörungen oder Testosterondefizienz führen können.

Methoden Zur Klärung dieser Frage setzten wir das ApoE^{-/-}/LDL-Rezeptor^{-/-}-Knockout-Mausmodell für Arteriosklerose ein. Dabei zeigte sich bei alten Tieren neben Spermatogenesestörungen ein reduzierter Serum-Testosteronspiegel. Wir verglichen daher sowohl das Gefäßsystem des Hodens als auch die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen mittels Micro-CT und Stereologie in Knockout- (Ko-) und Wildtyp-Mäusen (WT) verschiedener Altersstufen (20, 40, 60 und 87 Wochen).

Ergebnisse In den KOs fiel in allen Altersstufen ein im Vergleich zum WT reduziertes Serum-Testosteron auf. Zusätzlich war in den KOs ein reduziertes Hoden- und Gefäßvolumen nachweisbar. Interessanterweise konnte in den KOs eine Reduktion von Kapillarlumen, -länge und -oberfläche festgestellt werden, obwohl keine offensichtlichen arteriosklerotischen Veränderungen im Gefäßbett des Hodens beobachtet wurden. Einerseits könnte diese Rarefizierung der Hodenkapillaren und die damit verringerte kapillare Austauschfläche für den Transfer von Testosteron ins Blut den beobachteten erniedrigten Serum-Testosteronspiegel erklären. Andererseits war in den KOs auch eine reduzierte Leydig-Zellzahl auffällig, darüber hinaus verbunden mit einer Reduktion der Leydig-Zellgröße, die Hinweise auf eine zusätzlich verringerte Testosteronproduktion geben.

Schlussfolgerung Unsere Daten zeigen, dass auch der Hoden ein Zielorgan der Arteriosklerose ist. Eine der Hauptfunktionen des Hodens neben der Spermatogenese ist die Versorgung des Körpers mit Testosteron. Diese wird durch die arteriosklerotisch bedingte Ausdünnung des Kapillarnetzes sowie die verminderte Anzahl und Größe der Leydig-Zellen beeinträchtigt und kann so zu Störungen der männlichen Fertilität beitragen. Die Behandlung der Arteriosklerose sollte daher in das Management der männlichen Unfruchtbarkeit integriert werden.

■ Infektionen und Entzündungen

P23

Epigenetische Veränderungen in Tumorsuppressorgenen bei Männern mit chronischer Prostatitis/chronischem Beckenschmerzsyndrom

D. J. Dengler^{1,2}, N. Nesheim^{1,2}, H.-C. Schuppe²,

A. Pilatz², F. Wagenlehner², U. Schagdarsurengin^{1,2}
¹Arbeitsgruppe Epigenetik des Urogenitalsystems; ²Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Einleitung Chronische Prostatitis/chronisches Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS) ist eine multifaktorielle Erkrankung unbekannter Ursache mit einer weltweiten Prävalenz von 2,2–16 %. Chronische Entzündung ist in der Lage, epigenetische Veränderungen

zu induzieren und somit auch eine Zelltransformation zu initiieren. Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen (TSG) und deren Inaktivierung ist ein bekannter epigenetischer Mechanismus, welcher signifikant mit Tumorgenese assoziiert wird.

Das Ziel dieser Studie war es zu analysieren, ob bei Patienten, welche an CP/CPSPS leiden, eine epigenetische Veränderung von TSG nachweisbar ist.

Material/Methoden Aufgrund des Fehlens von Biopsie-Material aus der Prostata, bei der CP/CPSPS-Diagnose, wurden sog. „liquid biopsies“ (hier Ejakulate) analysiert. Ejakulatproben von 50 CP/CPSPS-Patienten und 20 gesunden Kontrollen wurde gesammelt. Durch Dichtegradient-Zentrifugation wurden aus dem Ejakulat die somatischen Zellen (Leukozyten und andere Zellen aus dem Urogenitaltrakt einschl. Prostata) isoliert. Die aufgereinigte DNA (Trifast) wurde mit Bisulfit behandelt (5h, 56°C) und mittels Pyrosequenzierung bzgl. der Promotor-CpG-Methylierung in den TSGs *PLS3*, *EDNRB* und *BMP4* untersucht.

Ergebnisse Die Promotor-Methylierung des Genes *EDNRB* war in Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht (4,4 % [1,2–15,4] vs. 1,0 % [0,25–14,0]; $p = 0,003$). Für die Gene *BMP4* (3,4 % [0,75–21,4] vs. 1,7 % [1,0–9,2]; $p = 0,098$) und *PLS3* (1,4 % [0,4–21,4] vs. 1,6 % [0,8–6,6]; $p = 0,265$) wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen.

Schlussfolgerung Unsere Ergebnisse zeigen, dass *EDNRB*, welches eine Rolle in der Signaltransduktion sowie in der Stimulation von Zellwachstum und -teilung spielt, bei CP/CPSPS-Patienten epigenetisch verändert ist. Die Ergebnisse geben einen ersten Hinweis dafür, dass CP/CPSPS mit epigenetischen Veränderungen in TSGs einhergehen kann.

P24

Einfluss von Activin A auf die Regulation der Immunantwort von Makrophagen: Implikationen für den testikulären Immunstatus?

J. Bender¹, Y. Yang¹, M. P. Hedger^{2,3}, K. L. Loveland^{2,3}, R. Wijayarathna^{2,3}, M. Fijak¹, S. Bhushan¹, A. Meinhardt^{1,2,3}

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie, Reproduktionsbiologie, Gießen, Deutschland; ²Hudson Institute of Medical Research, Centre for Reproductive Health, Clayton, Australien; ³Monash University, School of Clinical Sciences, Clayton, Australien

Einleitung Die testikulären Makrophagen (TM) tragen mit ihren antiinflammatorischen Eigenschaften wesentlich zum Immunprivileg des Hodens bei. Die Mechanismen der Induktion des immunsuppressiven TM-Phänotyps sind bislang jedoch wenig verstanden. Eine wichtige Rolle könnten hierbei von Sertoli-Zellen sezernierte immunregulatorische Zytokine, wie Activin A, spielen, welche die Funktion von TM beeinflussen. Dies wird

durch Studien unterstrichen, die zeigen, dass Transplantate, die zusammen mit Sertoli-Zellen co-appliziert werden, eine lokale Immunsuppression hervorrufen und somit deutlich längere Überlebenszeiten aufweisen.

Activin A ist ein pleiotropes Zytokin, welches in zahlreiche biologische Prozesse involviert ist und, je nach Kontext, sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen entfalten kann.

In dieser Studie möchten wir mit einem Surrogatmodell herausfinden, ob Activin A potentiell den TM-Phänotyp beeinflussen kann und damit zum testikulären Immunprivileg beiträgt.

Methoden Isolierte murine Knochenmarkszellen wurden zunächst mit M-CSF (25 ng/ml, 6 Tage) zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurden die Zellen für einen Tag mit Activin A (50 ng/ml) behandelt, um dann unter weiterer Zugabe von Activin A allein (ruhend) oder von Activin A zusammen mit Lipopolysacchariden (LPS, 10 ng/ml) und Interferon- γ (IFN γ , 10 U/ml) aktiviert zu werden. Mögliche Veränderungen der Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor α (TNF α) und des entzündungshemmenden Interleukin-10 (IL-10) wurden im Zellkulturmedium analysiert. Außerdem wurde die relative mRNA-Expression von TNF α , IL-10, sowie weiteren pro- als auch antiinflammatorischen Faktoren (z. B. Arginase 1 [*Arg1*]) evaluiert.

Ergebnisse Die vorläufigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Activin A die Sekretion von proinflammatorischen Faktoren in diesem Zellkulturmodell nicht beeinflusst, wohingegen es möglicherweise die durch LPS + IFN γ -Stimulation erhöhte Ausschüttung des antiinflammatorischen IL-10 reduzieren kann. Weiterhin konnte eine signifikante Reduktion des Expressionslevels von *Arg1*, einem Hauptmarker entzündungshemmender Makrophagen, nach Activin A Behandlung in ruhenden Makrophagen gezeigt werden.

Diskussion Diese initialen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Activin A den Immunstatus jeweils spezifisch beeinflusst: (i) in ruhenden Makrophagen zum antiinflammatorischen Phänotyp (Immunhomöostase), (ii) wohingegen Activin A in aktivierten Makrophagen den proinflammatorischen Phänotyp mitsteuert und eine entzündliche Reaktion fördert.

P25

Contribution of activin A to the development of fibrosis during testicular inflammatory response

C. A. Kauerhof^{1,2}, N. Nicolas^{1,3}, S. Bhushan¹, E. Wahle¹, K. A. Loveland^{2,3,4}, M. Bergmann⁵, D. Fietz⁶, S. Kliesch⁶, H.-C. Schuppe⁷, F. Wagenlehner⁷, A. Meinhardt^{1,3,4}, M. P. Hedger^{2,3,4}, M. Fijak¹

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig Universität Gießen, Deutschland; ²Department of Molecular & Translational Sciences Monash University, Melbourne, Australien; ³Centre for Reproductive Health, Hudson Institute of Medical Research, Clay-

ton, Australien; ⁴Department of Anatomy & Developmental Biology, Monash University, Melbourne, Australien; ⁵Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig University Giessen, Deutschland; ⁶Centre of Reproductive Medicine and Andrology, Department of Clinical and Surgical Andrology, University of Münster, Deutschland; ⁷Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig University Giessen, Deutschland

Activin A, a member of the TGF- β superfamily of cytokines regulates inflammation and fibrosis in many tissues and controls spermatogenesis and steroidogenesis in the normal testis. Testicular activin A levels increase during murine experimental autoimmune orchitis (EAO). EAO is an animal model of chronic testicular inflammation and autoimmunity. It reflects histopathological changes such as fibrosis found in testicular biopsies from idiopathic infertile patients with focal inflammatory lesions associated with mixed atrophy of spermatogenesis. However, it is not known whether activin A is directly involved in the development of testicular fibrosis observed in EAO.

EAO was induced by immunization with testicular homogenate in adult C57BL/6J male mice. In testes, collected at 30, 50 and 80 days after the first immunisation, total collagen content and fibronectin expression were measured by hydroxyproline assay and Western blot, respectively. Moreover, human testicular biopsies with histologically diagnosed focal inflammatory lesions associated with impaired spermatogenesis were included. Biopsies from patients with obstructive azoospermia and intact spermatogenesis without signs of inflammation served as controls. In order to investigate the effect of activin A on the expression of extracellular matrix proteins, peritubular cells (PTC) from 21 day-old mice and NIH 3T3 fibroblasts were treated with activin A (25 and 50 ng/ml) and/ or its binding protein, follistatin 288 (100 ng/ml). The expression of fibronectin, α -smooth muscle actin, collagen type I, III and IV were determined by qRT-PCR and Western blot.

Our results show that in testes of EAO mice, total collagen content and fibronectin expression were increased, and fibronectin expression was directly related to the severity of the EAO response. Moreover, higher levels of activin A gene expression were observed in human testicular biopsies with leukocytic infiltrates and impaired spermatogenesis. This was coinciding with an increase in total collagen and fibronectin deposition as compared to biopsies showing intact spermatogenesis. *In vitro*, treatment of primary PTC and NIH 3T3 fibroblasts with activin A increased the expression of fibronectin mRNA as well as the production of collagen type I and fibronectin. Activin A stimulation also led to elevated α -smooth muscle actin mRNA and protein expression in 3T3 fibroblasts, while collagen type IV mRNA levels were significantly upregulated in PTC. Follistatin 288, a potent antagonist of activin A, significantly inhibited these effects in both investigated cell types.

Our data indicate that fibroblasts and PTC may contribute to the development of testicular fibrosis under activin A control. The association between fibrosis, inflammatory infiltrates and impaired spermatogenesis needs to be further elucidated using *in vivo* inhibition of elevated activin A levels by follistatin administration.

■ Molekulare Andrologie

P26

Differential regulation of PIWI-LIKE 2 expression in primordial germ cell tumor cell lines by promoter methylation

M. Giebler, T. Greither, H. Behre
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie,
Universitätsklinik Halle/Saale, Deutschland

Background Differentiation of human germ cells involves maintenance of pluripotency, but also controlled cell division, meiosis and terminal maturation. This tightly regulated cellular program is accompanied by repression of somatic genes as well as a unique epigenetic reprogramming. PIWI-LIKE 2, a member of the Argonaute protein family, is exclusively expressed in pre-pachytene and pachytene stages of spermatogenesis and acts in maintaining the stem cell character and furthermore guaranteeing the genomic integrity by repression of transposon elements. In the present study we investigated DNA methylation as potential mechanism for the regulation of human PIWI-LIKE 2 expression in cell lines related to spermatozoa precursor cells.

Methods For epigenetic regulation studies TCam-2 (a seminoma cell line) and NT2D1 (a testicular embryonal carcinoma cell line) cells were used. We studied the expression of *PIWI-LIKE 2* by quantitative real-time PCR and Western Blot after treatment with the DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5AzadC). Analysis of the CpG methylation status of the *PIWI-LIKE 2* promoter was assessed by bisulfite sequencing. *PIWI-LIKE 2* promoter activity was analyzed by luciferase reporter gene assay.

Results *PIWI-LIKE 2* mRNA and protein was upregulated in TCam-2 cells after 5AzadC treatment, whereas NT2/D1 showed no change in *PIWI-LIKE 2* expression. Bioinformatic analysis identified 57 CpG dinucleotides in the promoter sequence from -300 bp to +600 bp around the transcription start site (TSS). Bisulfite sequencing of the CpG site demonstrated a different basal methylation level of *PIWI-LIKE 2* in the cell lines. Treatment of the cells with 5-AzadC allows a partial demethylation of *PIWI-LIKE 2* promoter in TCam-2 and NT2/D1. Transfection of cells with different *PIWI-LIKE 2* promoter constructs identified several regulatory regions, located in the region from -300 bp to the TSS, by an increase of the luciferase activity. Vice versa, *in vitro* methylation of selected fragments suppressed *PIWI-LIKE 2* promoter activity.

Conclusion Our data indicate that in humans DNA methylation is able to induce epigenetically silencing of *PIWI-LIKE 2* expression and provide first hints for epigenetic alterations during spermatogenesis.

P27

Die Bedeutung von posttranslationalen Histonmodifikationen in der Spermatogenese von Mäusen mit Protamin-2-Defizienz

A. Kruse¹, S. Schneider², H. Schorle², K. Steger¹,
C. C. Maresch¹
¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Molekulare Andrologie, Gießen; ²Institut für Pathologie, Entwicklungspathologie, Bonn, Deutschland

Einleitung Während der Spermatogenese ist eine Hyperkondensation der DNA notwendig, um die DNA-Integrität zu erhalten und die physiologische Spermienmorphologie zu gewährleisten. Verbleibende Histone des unvollständigen Austauschs von Histonen zu Protaminen sind aufgrund ihrer genregulatorischen Funktion durch post-translationalen Modifikationen (PTMs) für die Entwicklung von Spermien und den späteren Embryo von Bedeutung. Über die Variationen und die Menge der PTMs nach dem Verlust von *Prm2* ist jedoch noch wenig bekannt.

Material/Method Es wurde eine umfassende Stadienspezifische Charakterisierung im Hodengewebe von *PRM2*-defizienten Mäusen (heterozygot und homozygot) mittels Immunhistochemie für Marker des oxidativen Stresses (8-OHdG, γ H2A.X) und für verschiedene PTMs verbliebener Histone (H3, H3K27me3, H3K4me3, H3K79me3, H3K36me2, H4K12ac, H4K20me3, H3K9ac) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Darüber hinaus wurde die Größe der Spermienköpfe mit ImageJ (NIH, USA) analysiert.

Ergebnisse Während die Färbung für den oxidativen Stressmarker γ H2A.X keine Anomalien zwischen den Gruppen zeigte, war 8-OHdG nur bei *PRM2*-defizienten Mäusen vorhanden. Im Hinblick auf die PTMs der verbliebenen Histone zeigten H3K4me3, H3K36me2 und H4K12ac eine Verschiebung des Expressionsmusters. Weiterhin fanden wir eine Zunahme der Spermienkopfgroße bei homozygoten Mäusen im Vergleich zu heterozygoten und Wildtyp-Mäusen. Die Unterschiede waren zwischen Wildtyp- und homozygoten Mäusen am stärksten ausgeprägt.

Diskussion Dies ist die erste Studie, die nachweist, dass *Prm2*-Mangel PTMs von Histonen beeinflusst und zu oxidativen Schäden bei reifen Spermien führt. Unterschiede in den Histon-PTM-Expressionsmustern deuten auf einen veränderten Genregulationsmechanismus mit gestörter Chromatinstruktur hin. Veränderungen in der Größe des Spermienkopfes deuten auf eine Verschiebung des Histon-Protamin-Verhältnisses hin.

P28

Effects of BPAF exposure on fetal male germ cell development in mice

J. Borderies^{1,2,3,4}, D. Moison^{2,3,4}, S. Abdallah^{2,3,4},
N. Nicolas^{2,3,4}, G. Livera^{2,3,4}, V. Rouiller-Fabre^{2,3,4},
M. J. Guerin^{2,3,4}

¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Giessen, Deutschland; ²Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, Frankreich; ³CEA, DSV, iRCM, SCSR, LDG, Fontenay-aux-Roses, Frankreich; ⁴INSERM, Unité 967, Fontenay aux Roses, Frankreich

Over the last past years, different abnormalities of the male reproductive function have been largely described as hypospadias, cryptorchidism, testicular cancer and the diminution of the sperm quality. These [DF1] abnormalities are the consequences of endocrine disruptor exposure during pregnancy, which is a critical window for the development of the gonadal functions and especially for germ cells differentiation. In the mouse testis, it is characterized by the loss of pluripotency markers, the entry into the mitotic quiescence phase at 14.5 days post-conception (dpc) during fetal life, and the entry into meiosis after birth. These first steps of differentiation are dependent on extrinsic and intrinsic signals to the germ cell; and any alteration of them could influence germ cell survival or differentiation. Many environmental pollutants, including Bisphenol A (BPA), a plasticizer, are known to alter this differentiation program. For these reasons, among others, BPA has been forbidden in any plastic food containers in France, since January 2015. It has been replaced by some structural analogs like Bisphenol AF (BPAF), whose toxicity on fetal gonad, and especially on the germ line, has not been evaluated yet.

Thus, the goal of the study was to determine the effects of an *in utero* BPAF exposition on mouse fetal male germ cells survival and differentiation. We exposed mice to BPAF (10^{-5} M equivalent to 0.7 mg/kg/day) in drinking water for the second part of the gestation (10.5–18.5 dpc). By immunofluorescence with phosphorylated histone H2AX (gH2AX), we observed that BPAF exposure induce DNA double strand break in male germ cells, which may be the cause of a significant decrease of the germ cells number at 14.5 dpc. Moreover, BPAF exposure leads to an alteration of germ differentiation reflected by a) a delay of entry into the quiescence phase and b) an ectopic and early entry into meiosis of some germ cells at 14.5 dpc, shown respectively by immunostaining of the proliferative marker KI67 and the lateral element of the synaptonemal complex SYCP3. We also observed that a BPAF exposure induced a decrease of the number of spermatogonia (PLZF protein) in the adult testis.

To conclude, this study put in a nutshell the bad effects of the BPAF on male murine germ cell development and differentiation. The use of BPA structural analog therefore seems to show the same adverse effects as BPA exposure itself. By that, the use of BPAF may have

an impact on human fertility which requires further investigation.

P29

Kleine RNAs im humanen Seminalplasma: Spezies, Verteilungen und prognostische Anwendung

A.-N. Spiess¹, H. Cappallo-Obermann¹, M. Schaks², A. Paradowska-Dogan³, A. Pilatz⁴

¹Molekulare Andrologie, Uniklinik Hamburg-Eppendorf, Hamburg; ²Technische Universität Braunschweig; ³Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universität Bonn; ⁴Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Gießen, Deutschland

Einleitung Das humane, zellfreie Seminalplasma, erhalten als Überstand der Zentrifugation eines Ejakulates, beinhaltet zahlreiche Proteine (überwiegend Seminogelin 1 & 2), als auch mRNAs, rRNAs, tRNAs und kleine RNAs (miRNA, piRNA, snRNA, snoRNA). Speziell die kleinen RNAs können in freier Form oder in Vesikeln kompartimentiert vorliegen. Während Erstere als Überbleibsel apoptotischer Zell-Lyse von Spermien und „Rundzellen“ (Leukozyten, Makrophagen, Epithelzellen, runde Spermatisiden) betrachtet werden, sind Letztere das exozytotische Produkt der Epithelzellen des Genitaltrakts (sog. Epididysomen, Prostatasomen). Denkbar ist jedoch auch die Anwesenheit spezifischer kleiner RNAs im Seminalplasma, die mit einer vollständigen oder gestörten Spermatogenese im Hoden einhergehen, und welche als simple, nicht-invasive Spermatogenese-Marker benutzt werden können.

Zur Charakterisierung der kleinen RNAs haben wir diese aus dem Seminalplasma folgender Patientengruppen isoliert und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt: BA: Bunte Atrophie, Azoospermie; SCO: Sertoli-Cell-Only-Syndrom, Azoospermie; MA: Meiose-Arrest, Azoospermie; NS: Obstruktive Azoospermie (keine CBAVD); V1: Ejakulat vor Vasektomie; V2: Ejakulat nach Vasektomie.

Material/Methode Die Ejakulate wurden 10 min bei 10.800 g zentrifugiert (Zell-Pelletierung), aus dem Überstand kleine RNAs mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und diese mittels Kapillarelektrophorese (Bioanalyzer) validiert. Die kleinen RNAs von 5 Proben wurden gepoolt und anschließend eine „single-strand“ RNA-Sequenzierung mit 20 Mio. Reads Sequenzierertiefe durchgeführt (Illumina NextSeq 500). Die Sequenzen wurden mit *Bowtie2* gegen das humane Genom (Hg38, Build 10) gemappt, die Counts normalisiert und differentiell mit *Cufflinks/Cuffdiff* berechnet. Da bei den gängigen Genom-Annotationen die tRNAs und Keimzell-spezifischen piRNAs fehlen, wurden diese der Annotations-Datei zugefügt.

Ergebnisse Die Sequenzierung der kleinen RNAs lieferte interessante Ergebnisse bezüglich des *small RNA landscape* humaner Seminalplasmen:

1) Die einzelnen Proportionen kleiner RNAs teilen sich auf in miRNAs (60–90 %), mRNA-Fragmente (10–20 %), tRNAs (5–30 %) und piRNAs (1–2 %).

2) tRNAs kommen hauptsächlich als 30–35 nt große Fragmente vor, von denen ein den piRNAs ähnliches Retrotransposon-*Silencing* bekannt ist.

3) Die piRNA-Datenbanken sind massiv mit miRNA- und tRNA-Sequenzen kontaminiert.

Diskussion Aus der differentiellen Analyse der verschiedenen Patientengruppen (SCO, BA, MA, NS, V1, V2) konnten miRNAs gefiltert werden, die exklusiv im Seminalplasma einer Gruppe vorhanden waren und die folgende Zustände charakterisieren:

1) Nicht in BA/SCO/MA/V1, nur in V2/NS => **Obstruktions-Marker**

2) Nur in V2 => **Vasektomie-Marker**

3) Nur in BA/V1, nicht in NS/V2/SCO/MA => **Spermatogenese-Marker**

4) Nur in SCO oder MA => **SCO- oder MA-Marker**

Diese miRNA-Marker werden für eine Anwendung im Rahmen der pre-TESE-Diagnose zur Zeit an einem „test set“ validiert.

P30

Prostatakarzinom-assoziierte Fibroblasten (CAF) induzieren CCL18-Expression in Makrophagen

N. Neshheim¹, G. Risbridger², S. Ellem², F. Wagenlehner¹, U. Schagdarsurengin¹

¹Molekulare Andrologie, Justus-Liebig Universität Gießen, Deutschland; ²Monash University, Melbourne, Australien

Einleitung (Hintergrund, Relevanz und Fragestellung der Arbeit) Bei Prostatakrebs (PCa) findet eine Veränderung des Tumor-Stroma mit vermehrter Leukozyten-Infiltration und Aktivierung von krebsassoziierten Fibroblasten (CAF) statt. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) sind hierbei in Richtung immunsuppressiver Typ-2-Immunität polarisiert (M2) und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss von Mastzellen und CAF auf die Makrophagen-Polarisation.

Material/Methode (Patientenkollektiv, Methode, statistische Verfahren) Primäre CAF wurden aus Prostatakrebs-Gewebe isoliert, kultiviert und mittels RT-qPCR charakterisiert (CAF-Marker: ESR1/HOXD8/SFRP1/SDC2/EPHB6/PITX2). Humane Monozyten (THP-1) wurden zu Makrophagen differenziert (PMA) und mit konditioniertem Medium von Mastzellen (HMC-1/LAD2), Epithelzellen (BPH-1/PC-3/DU-145/LnCaP) sowie CAF polarisiert. Die Polarität der behandelten Makrophagen wurde mit RT-qPCR bestimmt (M1-Marker: TNF, IL1B, HLA-DRA, HLA-DQA; M2-Marker: CD206, CCL13, CCL18, IL10).

Ergebnisse (Resultate mit Daten und Statistik) Mastzellen (LAD2) regulierten M1-typische Makrophagen-Transkripte herunter

(TNF, IL-1B, HLA-DQA) und M2-typisches CD206-Transkript hoch. Epithelzell-Linien oder CAF von Gleason-7-Tumoren bewirkten keine signifikanten Veränderungen. CAF von fortgeschrittenen (Gleason-9) Tumoren mit lokaler Metastasierung induzierten M2-typische Transkripte (CD206/CCL13/CCL18) und unterdrückten M1-spezifische TNF-Expression.

Diskussion (Bedeutung der vorgelegten Arbeit und Schlussfolgerung) Die Ergebnisse unserer Arbeit unterstützen, dass stromale Zellen des PCa die Makrophagen-Polarisation zum M2-Phänotyp induzieren. M2-Makrophagen sind mit Tumor-Progression und Metastasierung des PCa assoziiert, daher könnten Mastzell-Infiltration sowie Fibroblasten-Aktivierung zu CAF eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung dieser Prozesse spielen.

P31

The ability of SOD1 and SOD3 in seminal plasma to distinguish between two different azoospermic subgroups (mixed testicular atrophy and Sertoli cell-only syndrome).

E. Savadi Shiraz, A. Pilatz, W. Weidner, D. C. Fietz, L. O'Donnell, M. Bergmann, T. Diemer, P. Stanton
Justus-Liebig University, Gießen, Deutschland

Introduction Men with NOA have zero sperm in the ejaculate. Sperm is collected by micro-testicular sperm extraction (M-TESE). 50% of azoospermic men are unable to have sperm retrieved at M-TESE and therefore have surgery unnecessarily. Identification of specific proteins related to spermatogenesis in seminal plasma (SP) could provide a novel proteomics assay for sperm presence prior to biopsy. SP is a rich, easily-accessible and promising source of spermatogenesis biomarkers. This study was designed to compare the SP proteomes of two different groups of NOA.

1) Men with mixed-testicular atrophy (MA) with a positive sperm retrieval at M-TESE.

2) Sertoli-Cell-Only (SCO) patients with a negative sperm retrieval at M-TESE.

Results also compared with the control-group.

Materials and Methods SP was collected from MA and SCO patients (n = 8/group). All samples were compared by label-free Liquid chromatography-mass spectrometry/MS proteomics. Differentially expressed proteins were defined as those with a fold-change > 2.0 and a significant difference between the groups (p < 0.05).

Among the significant proteins identified, SOD3 and SOD1 were selected for further validation by 3 different methods: Western blotting, immunohistochemistry and ELISA (n = 15/group). Also, to compare with seminal plasma, the protein concentrations of SOD3 and SOD1 were measured in the blood-serum of participants.

Results SOD3 immunoreactivity (ELISA) in SP from SCO men was 2.3 fold lower than controls ($p < 0.05$), and SP from MA men was 4.6 fold lower than controls ($p < 0.0001$). The SOD3 MA/SCO protein ratio was 0.49 ($p < 0.05$) by ELISA and 0.16 ($p < 0.01$) by mass spectrometry. SOD3 gave the expected band of 30kDa by Western blot of SP samples, but no significant difference between MA and SCO groups was observed.

In normal human testis, SOD3 staining was predominantly observed in Sertoli cells, while in the testis of azoospermic patients staining was more variable.

SOD1 immunoreactivity (ELISA) in SP from SCO and MA men was decreased significantly compared with controls ($p < 0.05$). The MA/SCO ratio of SOD1 was significantly different by mass spectrometry but not by ELISA or quantitative Western blot. In normal human testis, SOD1 was predominantly localized in spermatogonia, while in the testis of azoospermic patients variable SOD1 staining was noted. There were no significant differences in the levels of SOD1 and SOD3 in the blood-serum of MA compared to SCO patients.

Discussion SOD3 was significantly different in SP from MA versus SCO azoospermic patients by at least 2 different proteomics-methods (mass spectrometry and ELISA), and thus has the potential to predict the presence of sperm in the testis prior to biopsy. Two different antibodies were used for quantitation of protein (in both cases of SOD1 and SOD3) by Western-blotting compared to ELISA which may explain the variation in results. Moreover, the selected antibodies may not target the same sequence region that was detected by the mass spectrometry.

■ Reproduktive Gesundheit des Mannes

P32

Die Kontraktilität von Prostata-drüsen in Unterscheidung zu Prostatagängen und den Einfluss von Oxytocin hierauf

B. Stadler¹, D. Beyer¹, F. Wagenlehner², M. Kampschulte³, B. Exintaris⁴, R. Middendorff¹
¹Institut für Anatomie und Zellbiologie; ²Urologie, Kinderurologie und Andrologie; ³Radiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland; ⁴Monash Universität, Institut für Pharmakologie, Melbourne, Australien

Fragestellung Benigne Prostatahyperplasie (BPH) betrifft bis zu 80 % aller 80-jährigen Männer. Erst vor Kurzem haben wir als Erste den kontraktilen Unterschied von Prostatagängen und -drüsen untersucht, was dazu beitragen kann, Wirkungen und lokale Nebenwirkungen von Medikamenten vorauszusagen, die in der Behandlung der BPH eingesetzt werden, um die glatte Muskulatur innerhalb der Prostata zu relaxieren [1]. Die meisten dieser Experimente wurden mit Rattengewebe durchgeführt. Überraschender-

weise fehlen weitestgehend Informationen über (i) Struktur und Funktionsweise der humanen Prostatagänge sowie (ii) das Potential anderer Rezeptorgruppen in der Prostata (außer adrenergen Rezeptoren). In dieser Studie wurden das humane Gangsystem der Prostata und die Auswirkungen von Oxytocin erforscht.

Methoden Korrosionspräparate, Anfärbungen glatter Muskelzellen und Micro-CT-Aufnahmen wurden verwendet, um die humanen Prostatagänge zu erforschen. Die Oxytocin-Auswirkungen wurden mithilfe von Videomikroskopie abgebildet.

Ergebnisse Es war uns möglich, das Gangsystem in der humanen Prostata darzustellen und dessen räumlichen Verlauf zu klären. Außerdem haben wir mehr Informationen über die Organisation der glatten Muskulatur erhalten, die die Gänge umgibt. Oxytocin erhöhte die Frequenz der spontanen Kontraktionen in der Prostata signifikant. Außerdem war ein Unterschied zwischen Oxytocin-induzierten und Noradrenalin-induzierten Kontraktionen zu sehen, die sich auch zwischen Gang und Drüse unterschieden.

Schlussfolgerungen Unterschiede zwischen Gängen und Drüsen der humanen Prostata zu definieren, erweitert unsere Kenntnisse der anatomischen Grundlagen und könnte helfen, eine zielgerichtete Medikation zu entwickeln. Diese Kenntnisse in Kombination mit neuen Oxytocin-Analoga/-Antagonisten könnten zu neuen BPH-Therapiemöglichkeiten führen.

DFG (IRTG Giessen-Monash, GRK 1871)

Literatur:

1. Kügler R, et al. Novel imaging of the prostate reveals spontaneous gland contraction and excretory duct quiescence together with different drug effects. *FASEB J* 2018; 32: 1130–8.

P33

Altersbedingte Veränderungen von Sertoli-Zellkernen in humanen Hoden

V. Höffken¹, E. Pohl¹, S. Schlatt¹, S. Kliesch², J. Gromoll¹, J. Wistuba¹
¹Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie; ²Institut für klinische und operative Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster, Deutschland

Einleitung Heutzutage wird der Kinderwunsch sozio-ökonomisch bedingt zunehmend auf spätere Lebensphasen verschoben. Neben bekannten Einflüssen mütterlichen Alters mehren sich die Hinweise eines negativen Einflusses auf die Kindsgesundheit durch ein höheres Alter des Vaters. Eine Rolle könnten hierbei bspw. Mutationen oder epigenetische Keimbahnveränderungen, die zu altersassoziierten Erbkrankheiten führen, spielen. Bisher ist unklar, ob und wenn ja, wie genau Alterung die Spermatogenese und darin involvierte Zellen beeinflusst. Dazu wurde bisher überwiegend die Keimbahn erforscht, deren Spermatogonien durch Alterungsprozesse beeinflusst werden könnten. Sie sind die einzigen Keimzellen, die altern können, da alle differenzierenden Zellen nur

für einen Spermatogenese-Zyklus (max.72 Tage) bestehen. Beeinflusst werden könnten auch die kaum untersuchten somatischen Hodenzellen, wie die terminal differenzierten Sertoli-Zellen (SZ); sie sind ebenso zeitlebens funktional und in die Erhaltung der Stammzellnische involviert. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass sich mit steigendem Alter Nukleoli (Nki) verändern, was sich durch Vermehrung & Vergrößerung der Nki zeigt. Diese altersbedingten Änderungen hängen wahrscheinlich mit einer erhöhten Produktion ribosomaler RNA zusammen und weisen auf einen Verlust der Proteinhomöostase hin. Um morphometrische Veränderungen in somatischen Zellen als mögliche Biomarker für die Hodenalterung zu testen, wurden Nki in SZ-Kernen analysiert.

Material/Methoden Hodenbiopsien von 24 Patienten aus 3 Altersgruppen (CBAVD, Vasektomie, Vaso-Vasostomie, Paraplegie [Gr. 1&2] oder Orchidektomie bei Prostatakarzinom [Gr. 3]) wurden histologisch untersucht: 1) 28,8 ± 2,7 Jahre, 2) 48,1 ± 1 Jahre und 3) 70,6 ± 6,2 Jahre (je n = 8). Alle Proben zeigten normale Spermatogenese. Biopsie-Schnitte (3–5 µm) wurden mit Periodsäure-Schiffsreagenz/Hämatoxylin gefärbt und je Probe 101 SZ hinsichtlich Nki-Anzahl, Kernfläche und Nki-Fläche analysiert.

Ergebnisse Mit fortschreitendem Alter zeigte sich eine Zunahme von Nki-Anzahl und Nki-Flächen je SZ-Kern. Die Nki-Anzahl/Kern wuchs um 4,3 % und 5,6 % von Gr.1 zu 2 bzw. 2 zu 3. Die Kern- und Nki-Fläche war von Gr.1 zu 2 signifikant vergrößert ($p = 0,0394$ bzw. $p = 0,0189$), sowie die Nki-Fläche von Gr.1 im Vergleich zu 3 (+0,4 %). Die Kernfläche nahm um 9,1 % von Gr.1 zu 2 zu, die Nki-Fläche um 7,9 %.

Diskussion Sertoli-Zellen sind zeitlebens funktional, wodurch sie Alterungseffekten ausgesetzt sind. Diese Alterungsprozesse und ihre Auswirkungen können Veränderungen in Morphologie von SZ-Kernen und Nki verursachen, deren Vergrößerungen können mit einer Proteinüberproduktion assoziiert sein. Die Resultate der morphometrischen Analysen der Kompartimente deuten auf altersbedingte Veränderungen in somatischen Hodenzellen hin. Männer in ihren Mittvierzigern (Gr. 2) weisen bereits vergrößerte Kern- und Nki-Flächen auf. Eine solche Veränderung der SZ und damit der Stammzellnische könnten sich auf die Spermatogenese auswirken.

P34

Presence of extracellular traps (ETs) by activated leukocytes in seminal fluid of patients consulting for infertility

M. Schulz^{1,2}, F. Zambrano^{1,2}, F. Wagenlehner³, H.-C. Schuppe³, A. Taubert⁴, R. Sánchez^{1,2}, C. Hermosilla⁴
¹Universidad de La Frontera, Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Temuco, Chile; ²Laboratory in Reproductive Medicine and Molecular Endocrinology, Centre of Translational Medicine, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; ³Depart-

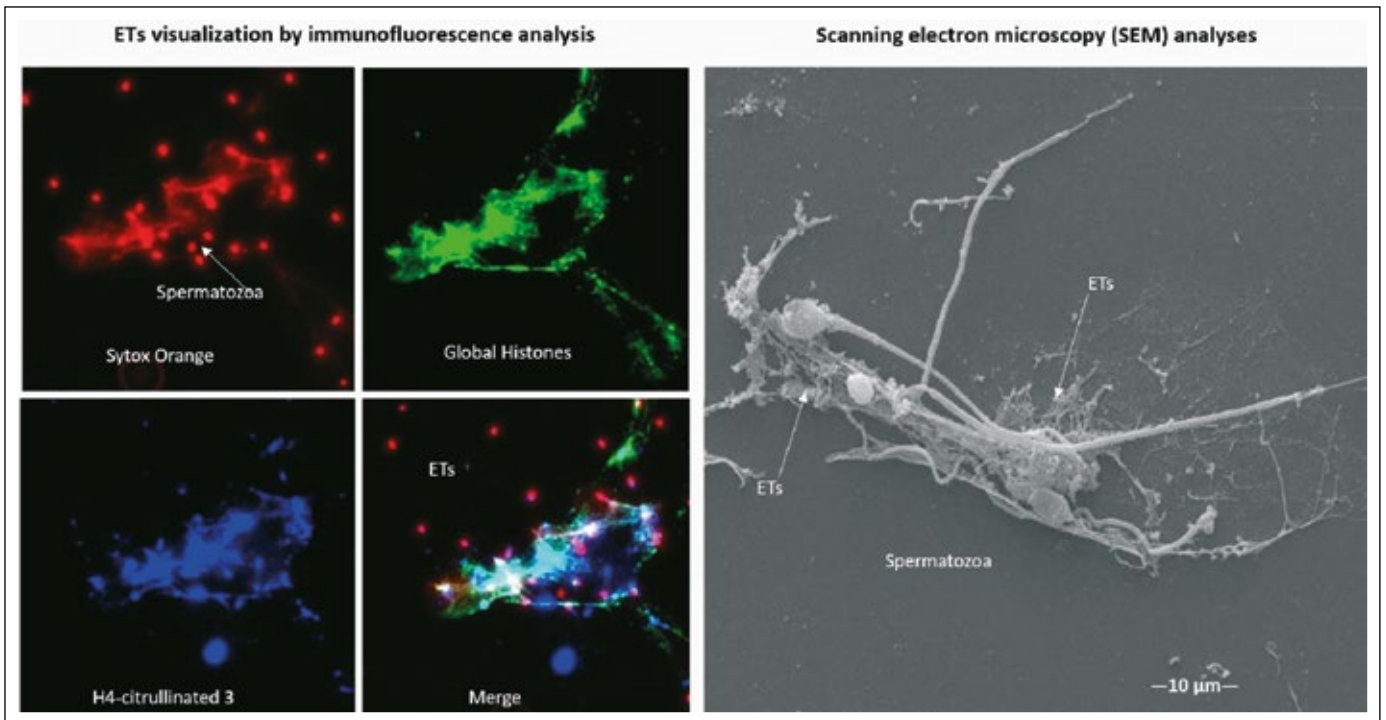


Figure 1. M. Schulz et al. P34

ment of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig-University Giessen, Deutschland; ⁴Institute of Parasitology, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Justus-Liebig-University Giessen, Deutschland

Introduction Extracellular traps (ET) are produced by activated leukocytes during the innate immune response to invading pathogens. The molecular composition of ETs is composed by backbone of DNA filaments and citrullinated histones, antimicrobial peptides and proteases, which trap pathogens to prevent their dissemination. ETs were described for the first time in neutrophils (PMN), but in subsequent investigations, it was evidenced that other phagocytic cells also produce them in response to diverse stimuli. Thus, ETs represent an early host innate immune reaction by which these phagocytes undergo a cell death process nowadays known as ETosis. There is a large amount of ETosis data in humans in response to various infectious agents, but a recent study demonstrated significance of human PMN-derived NETosis against spermatozoa (*in vitro*) thereby decreasing progressive sperm motility in human spermatozoa exposed to NETs.

Objective To determine the presence of ETs in seminal fluid (LS) (*ex vivo*) of patients consulting for infertility in an Andrological Clinic.

Material and Methods Routine semen parameters (OMS, 2010) of 22 patients were analyzed. Leukocytes (CD45, CD15, CD64) and ETs (global histone and H4-citrullinated 3) were determined by immunostaining and scanning electron microscopy, in LS smears

Results 77.3% from patients presented ETs of neutrophils and macrophages. From these patients, 41.2% presented seminal infection. Patients with ETs had a higher leukocyte

concentration compared to patients without ETs (1.28 v/s $0.06 \times 10^6/\text{mL}$) ($p < 0.05$). The spermatic concentration was higher in patients without ETs in relation to those who had ETs plus seminal infection (64.7% v/s $22.9 \times 10^6/\text{mL}$) although it was not statistically significant.

The DNA of ETs marked with Sytox Orange, was observed composed of global and citrullinated histones. The ETs trapped spermatozoa through the head, middle piece and flagellum. The morphology of the ETs was mainly diffuse and elongated (diffETs, sprETs).

Conclusions We describe the first results of ETosis *ex vivo* samples of seminal fluid from infertile patients. The formation of ETs occurs in direct contact with the ejaculated spermatozoa, and we observe that ETosis is not exclusively dependent on the presence of seminal infection, which could be associated with a chronic aseptic inflammation. We also observed that ETs are produced in samples with or without leukocytospermia (according to WHO definition) and that they are produced by both PMN and macrophages present in the seminal fluid (Fig. 1).

P35

Sexuelle Gesundheit bei HIV-positiven Männern unter stabiler antiretroviraler Therapie während eines Zeitraums von 12 Monaten

C. C. Maresch¹, T. Discher², J. Lohmeyer², C. G. Schüttler³, H.-C. Schuppe⁴, T. Diemer⁴, F. Wagenlehner⁴, A. Pilatz⁴

¹Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Molekulare Andrologie (Biomedizinisches Forschungszentrum), Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen; ²Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen; ³Ins-

titut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; ⁴Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen, Deutschland

Einleitung Die Einführung der hochwirksamen antiretroviralen Therapie (ART) hat sowohl die Lebensqualität als auch die Lebenserwartung von HIV-Patienten verbessert, weckte aber weitere Bedenken hinsichtlich der sexuellen Gesundheit und Fruchtbarkeit. In der vorliegenden Studie haben wir die sexuelle Gesundheit bei männlichen HIV-Patienten während eines Jahres stabiler ART untersucht.

Material/Methoden Zwischen 2011 und 2014 wurden 181 HIV-positive Männer (38–49 Jahre alt) in unserer Ambulanz für Infektionskrankheiten prospektiv aufgenommen. Nachdem Patienten mit Hepatitis-Koinfektionen, ART-naive Patienten und solche, die keine Samenprobe liefern konnten, ausgeschlossen wurden, wurden 87 Patienten für eine vollständige Untersuchung einbezogen. Unser Hauptergebnis war die sexuelle Gesundheit, wobei eine umfassende andrologische Aufarbeitung zu Beginn und nach einem Jahr Follow-up bewertet wurde.

Ergebnisse Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 43 Jahre (IQR: 38–49 Jahre), wobei 55 % der Patienten in einer Beziehung und 16 % verheiratet waren. 25 % der Patienten hatten Kinder und weitere 9 % hatten einen Kinderwunsch. Die Mehrheit der Patienten war sexuell aktiv (93 %) und 47 % waren Männer, die Sex mit Männern hatten (MSM). Der mediane Follow-up-Zeitraum betrug 13 Monate (IQR: 12–14 Monate), während dessen 7 von 87 eine Änderung der ART-Behandlung hatten. Die Ultraschallparameter für Hoden, Nebenhoden und Prostata sowie die Geschlechtshormone lagen innerhalb der normalen Grenzwerte, wobei Veränderungen

gen für Gesamttestosteron von 17,79 nmol/l (IQR: 12,7–22,43 nmol/l) auf 15,48 nmol/l (IQR: 11,85–20,33 nmol/l; $p = 0,0117$) und für freies Testosteron von 0,28 nmol/l (IQR: 0,23–0,3675 nmol/l) auf 0,26 nmol/l (IQR: 0,2–0,3375 nmol/l; $p = 0,0092$) verzeichnet wurden. Weitere Veränderungen wurden sowohl für den pH-Wert des Seminalplasmas als auch für Elastase beobachtet, welche einen Rückgang von der Ausgangssituation bis zum Ende der Studienzeit zeigte und sich von 8,0 (IQR: 7,7–8,3) auf 7,7 (IQR: 7,5–7,9; $p < 0,0001$) bzw. 96 ng/ml (IQR: 24,6–511,0 ng/ml) auf 52 ng/ml (IQR: 18,0–222,0 ng/ml; $p = 0,0002$) änderte.

Diskussion Unsere Studie zeigt, dass stabile ART keine negativen Auswirkungen auf konventionelle Samenparameter und die sexuelle Gesundheit bei HIV-positiven Männern hat. Weitere Studien in größeren Patientenkohorten wären wertvoll, um diesen Befund zu untermauern.

P36

Proteomic markers in seminal plasma as diagnostic tool to predict successful TESE in patients with azoospermia

R. Sgaier^{1,2}, D. Fietz¹, M. Bergmann¹, L. O'Donnell¹, P. Stanton³, L. Dagley⁴, A. I. Webb⁴, H.-C. Schuppe², A. Pilatz², T. Diemer²

¹Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus-Liebig-University, Giessen;

²Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus-Liebig-University, Giessen; ³Centre for Reproductive Health, Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Australien; ⁴Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australien

Introduction Current non-invasive male infertility diagnostics tools are inconclusive, as standard semen analysis provides only a rudimentary idea about the fertility state of the patient and steroid blood serum levels are not necessarily correlated to sperm quality. New diagnostics biomarkers are therefore needed. By the characterization of the seminal plasma proteome from men diagnosed with obstructive azoospermia (OA, i.e. intact spermatogenesis), mixed atrophy (MA) and Sertoli cell-only syndrome (SCOS), we aim for the discovery and validation of proteomic markers for the diagnosis of azoospermia and the prediction of TESE outcome.

Materials and Methods Seminal plasma samples from four groups: OA, MA, SCOS, and a control group (N) were subject to label-free mass spectrometry (MS). Relative quantification data composed of protein ratios was analyzed to determine differentially regulated proteins. Candidate markers were selected by using further „omics“ databases and available MS datasets from previous studies. Gene expression levels of selected potential markers were evaluated using qRT-PCR. mRNA was extracted from cryo-preserved human epididymal and testicular tissue samples.

Results Out of 37 proteins significantly down-regulated in OA, but not in MA or SCOS, DEFB129 (FCN/OA = 15.24; $p = 0,000935$), ELSPBP1 (FCN/OA = 5.77; $p = 0,00614$), and ADGRG2 (FCN/OA = 6.19; $p = 0,00288$) were selected as potential obstruction markers. Gene expression analysis confirmed these proteins to be specific to the epididymis with a significantly lower number of transcripts in the testis. Among the proteins found to be significantly down-regulated in SCOS but exhibiting similar abundances in the MA and control groups, CSE1L

(FCN/SCO = 8.634; $p = 0,00173$), and PFKP (FCN/SCO = 182.278; $p = 0,0188$), as well as DNAH2 and SLC52A3, were chosen for confirmation as potential markers of successful sperm retrieval. PFKP and CSE1Ls overall expression levels in MA far surpassed those in SCOS, with high variance within each of the groups, while DNAH2 showed significantly higher expression in MA compared to SCOS ($p = 0,0026$).

Discussion The observed depletion of certain epididymal proteins in the seminal plasma of OA patients but not in non-obstructive azoospermia makes them ideal markers of efferent duct obstruction. On the other hand, testis-enriched proteins that are down-regulated in SCOS like CSE1L and DNAH2 are potentially good markers for successful sperm retrieval. Given the high biovariability of seminal plasma samples and the complexity of the spermatogenic process, marker validation requires the application of more quantitative techniques as well as higher sample sizes.

FC: Fold Change

Autorenverzeichnis (nur Erstautoren)

B			H			R		
Bender J.	13		Hammadeh M.	4		Rotte N.	6	
Beyer D.	12		Heckmann L.	5				
Borderies J.	14		Höffken V.	16				
Büdel F.	7		Hollerer M.	11				
D			J			S		
Dabel J.	10		Jungwirth A.	8		Savadi Shiraz E.	15	
Dengler D. J.	12					Scheffer B.	5	
E			K			Schineis J.		
Espey B.	8		Kaplan H.	9		Schneider F.	9	
F			Kruse A.			Schulz M.		
Fietz D.	18		Kunz Y.	2		Spiess A.-N.	2, 15	
Fijak M.	13		M			Stadler B.		
Friedrich C.	3		Maresch C. C.	7, 8, 17				
G			Meissner V. H.			V		
Ghaffarilaleh V.	6, 11					von Kopylow K.	3	
Giebler M.	14		N			W		
O			Nesheim N.			Wrenzycki C.		
				15				11
Z			O			Z		
			Ochsendorf F.	7		Zambrano F.	12	
			Ott J.	3				

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD 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](#)