

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



10. DVR-Kongress - Back to the future

20.09.–22.09.2023, World Conference Center Bonn

Abstracts

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2023; 20 (4), 135-156

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

10. DVR-Kongress Back to the future

20.09.–22.09.2023, World Conference Center Bonn

Abstracts*

PO 1.1

The ZZS complex protein SPO16 during male meiosis

M. D. Runkel¹, N. Rotte¹, S. Kliesch², F. Tüttelmann¹, C. Friedrich¹

¹Westfälische Wilhelms-Universität; ²Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Infertility affects one in six people worldwide but to this date, most of the underlying causes remain unknown. In 2020, we identified bi-allelic (likely) pathogenic variants in M1AP – encoding meiosis 1 associated protein – resulting in crypto-/azoospermia. Furthermore, a recent mouse study described the interaction of M1AP with the murine ZZS complex (SHOC1-TEX11-SPO16) that stabilises designated crossover sites to ensure correct homologous recombination. A loss of any of one of these three ZZS proteins leads to severe spermatogenic failure and complete meiotic arrest in mouse models. Similarly, human male infertility has been described for variants in SHOC1 and TEX11 in addition to M1AP. Moreover, a homozygous loss-of-function variant in SPO16 was recently published as cause for female infertility due to premature ovarian insufficiency, assuming an autosomal recessive inheritance. In our study, we aim to investigate the interplay of the human ZZS complex with M1AP, and in this part of the project we focused on SPO16 and its involvement in human spermatogenic failure.

Protein-protein interaction of human SPO16 and M1AP was investigated in vitro in HEK293T cells by co-immunoprecipitation and Western blotting. In parallel, exome sequencing data from our Male Reproductive Genomics (MERGE) cohort including > 2,400 men, mainly affected by crypto-/azoospermia, was screened for rare (minor allele frequency, MAF < 0.01, gnomAD) coding variants in SPO16. Besides the population database, gnomAD was used to determine the presumed inheritance of variants in this gene.

First, we demonstrated the interaction of human M1AP and SPO16 by co-immunoprecipitation. In a subsequent screen of the MERGE cohort, no bi-allelic variants in SPO16 have been identified. We only found single heterozygous variants (MAF < 0.001) in nine men, including one missense, two stop-gained, three synonymous, and three

splice-region variants. Phenotypes of these men broadly ranged from Sertoli cell-only to complete meiotic arrest up to quantitatively reduced complete spermatogenesis, but also multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). Presumably, these heterozygous variants are not causal for the observed broad spectrum of diverse phenotypes. In accordance, the calculated gene constraint in gnomAD results in a pLI score of 0 and an observed/expected ratio (o/e score) of 0.67 (CI 0.38–1.25), reflecting SPO16's tolerance to loss-of-function in a heterozygous state and supporting an autosomal-recessive inheritance.

In summary, we substantiated that M1AP is a co-actor of the human ZZS-complex supporting the hypothesis of a putative role of SPO16 also in the context of human male infertility. Taken our own and publicly available genetic, functional, and knockout model data together, we propose SPO16 as a strong candidate gene for human spermatogenic failure following an autosomal-recessive mode of inheritance. Considering the small size of the SPO16 gene (558 bp) and, therefore, less prone to be mutated, screening larger cohorts will likely be required to identify the first human male SPO16 case. This work was supported by the DFG Clinical Research Unit 326 „Male Germ Cells“.

PO 1.2

Einfluss von Antispermien-Antikörpern (ASA) im Ejakulat auf die klinische Schwangerschaftsrate bei einer In-vitro-Fertilisations- (IVF-) Behandlung

T. Trapphoff¹, S. Hirschmann², S. Dieterle¹
¹Kinderwunschzentrum Dortmund; ²Universität Witten/Herdecke, Deutschland

Antispermien-Antikörper (ASA) im Ejakulat werden mit Störungen der Spermienkapazität und Akrosomenreaktion, der Spermien-Eizellbindung, höherem oxidativem Stress und höherer DNA-Fragmentierung in Verbindung gebracht. Derzeit ist unklar, ob der Nachweis von ASA im Ejakulat einen Einfluss auf die Ergebnisse bei einer In-vitro-Fertilisations- (IVF-) Behandlung hat. Studien deuten darauf hin, dass es keinen Zusammenhang zwischen hohen ASA-Werten im Ejakulat und niedrigeren Schwangerschaftsraten nach einer IVF-Behandlung gibt, während andere Studien widersprüchliche Daten zeigen. In dieser retrospektiven Studie wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von ASA im Ejakulat und

der klinischen Schwangerschaftsrate pro Eizellenentnahme bei einer IVF-Behandlung untersucht.

Für die retrospektive Datenanalyse wurden 4291 IVF-Behandlungen des Kinderwunschzentrums Dortmund aus den Jahren 2015–2020 eingeschlossen. Es wurde nur die erste IVF-Behandlung pro Patientin berücksichtigt. Der Nachweis von ASA im Ejakulat erfolgte bei allen Patienten routinemäßig durch den „mixed antiglobulin reaction“ (MAR-) Test. Bei einer Spermienagglutination $\geq 50\%$ wurde der Patient als ASA-positiv gewertet. Die Patientenkohorte wurde in eine Kontrollgruppe (MAR-Test: < 50 % Spermienagglutination) und eine Studiengruppe (MAR-Test: $\geq 50\%$ Spermienagglutination) eingeteilt. Der primäre Endpunkt war die klinische Schwangerschaftsrate pro Eizellenentnahme. Sekundäre Endpunkte waren die Befruchtungsrates, Lebendgeburtenrate und das vollständige Fertilisationsversagen. Die statistische Analyse wurde mit dem Fisher's Exact-Test, dem T-Test und dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. In dieser Studie wurden p-Werte als deskriptiv und statistisch signifikant für p-Werte < 0,05 angesehen.

In die Studiengruppe wurden 159 IVF-Zyklen mit Nachweis von ASA im Ejakulat und einer Spermienagglutination $\geq 50\%$ eingeschlossen, während die Kontrollgruppe aus 4132 IVF-Zyklen mit einer Spermienagglutination < 50 % im Ejakulat bestand. Es gab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Durchschnittsalter und BMI zwischen beiden Gruppen. Die Anzahl der Eizellen pro Eizellenentnahme war nicht unterschiedlich zwischen der Studiengruppe (MW 7,9 \pm 2,6 Standardabweichung) und Kontrollgruppe (MW 8,1 \pm 2,2 Standardabweichung). Die Befruchtungsrates war in beiden Gruppen vergleichbar (Studiengruppe: 51 %; 95%-CI: 43,2–58,7 % vs. Kontrollgruppe: 49,3 %; 95%-CI: 47,7–50,8 %; p-Wert: 0,65). Die durchschnittliche Anzahl an Tag-3- bzw. Tag-5-Embryonentransfers war in beiden Gruppen nicht unterschiedlich. Die Rate an vollständigem Fertilisationsversagen in der ASA-positiven Gruppe (15 %; 95%-CI: 9,4–20,5 %) war vergleichbar zur ASA-negativen Gruppe (10,5 %; 95%-CI: 9,6–11,4 %; p-Wert: 0,08). Die klinische Schwangerschaftsrate (Studiengruppe: 46,5 %; 95%-CI: 38,7–54,2 % vs. Kontrollgruppe: 95%-CI: 38,7 %; 95%-CI: 37,2–40,2 %; p-Wert: 0,04) und Lebendgeburtenrate (Studiengruppe: 42,1 %; 95%-CI: 34,4–49,7 % vs. Kontrollgruppe: 33,6 %; 95%-CI: 32,2–35,1 %; p-Wert: 0,03) waren in der ASA-positiven Gruppe höher als in der ASA-negativen Gruppe.

*Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee. Ein alphabetisches Verzeichnis der präsentierenden Autoren finden Sie auf Seite 156.

Bei Patienten, die sich einer IVF-Behandlung unterzogen, waren die Befruchtungsrate und Rate an vollständigem Fertilisationsversagen nicht signifikant unterschiedlich zwischen der Kontroll- und Studiengruppe, wobei die klinische Schwangerschaftsrate und Lebendgeburtenrate in der ASA-positiven Gruppe höher als in der ASA-negativen Gruppe war. Die Ergebnisse zeigen, dass das Vorhandensein von ASA im Ejakulat mit einer Spermienagglutination $\geq 50\%$ die Erfolgsraten bei einer IVF-Behandlung insgesamt nicht negativ beeinträchtigt.

PO 1.3

BRD9 inhibition as potential treatment option for testicular germ cell tumors

A. Hansen¹, K. Funke¹, L. Arévalo¹, H. Schorle¹
¹University Hospital Bonn, Germany

Testicular germ cell tumors (TGCT) represent the most common tumor in young men. While cure rates are high, 15–20% of patients with metastatic non-seminomas develop resistance to chemotherapy. In prostate cancer, glioblastoma and breast cancer using inhibitors of BET proteins (BRDT, BRD2, BRD3 and BRD4) interfering with the epigenetic landscape was already shown to be effective. The bromodomain protein BRD9 is an epigenetic reader modulating gene expression by recruiting transcription factors. BRD9, a member of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, showed significantly increased protein levels in acute myeloid leukemia (AML) cells, overexpression in cervical cancer and high expression in malignant rhabdoid tumor (MRT) cells.

BRD9 expression in TGCT cell lines was determined by meta-analysis of microarray data and on protein level by Western Blot. XTT-assay was performed to evaluate the impact of I-BRD9 treatment on viability of cells. Cell cycle arrest as well as apoptosis rate were analyzed by FACS after 24 and 48 hours of treatment with I-BRD9. 3'mRNA-sequencing was performed after 24 and 48 hours of I-BRD9 treatment to determine differentially expressed genes caused by inhibition of BRD9.

TGCT cell lines showed strong decrease in viability after treatment with I-BRD9 whereas the control cell line was hardly affected. FACS analysis revealed increased apoptosis and cell cycle arrest in G1-phase in TGCT cells treated with I-BRD9. Analysis of 3'mRNA-sequencing data showed downregulation of pluripotency markers such as NANOG and KLF4 in TGCT cell lines after 24 and 72 hours of I-BRD9 treatment. Inhibition of BRD9 led to exit of pluripotency and upregulation of genes associated with neuronal differentiation.

I-BRD9 strongly reduces viability, initiates cell cycle arrest and apoptosis in TGCT cells while control cells remain mostly unaffected. Further, transcriptomic data indicate exit of pluripotency and differentiation towards the neuronal fate. The data suggest I-BRD9 as an effective treatment option for TGCTs, especially in the situation of cisplatin resistance.

PO 1.4

Elucidating the interplay of M1AP and the ZZS components in male meiosis

N. Rotte¹, P. Hauser¹, B. Stallmeyer¹, S. Kliesch²,
F. Tüttelmann¹, C. Friedrich¹
¹Universität Münster; ²Universitätsklinikum Münster,
Deutschland

Meiosis is a crucial step in spermatogenesis and the basis of genetic diversity through homologous recombination and the formation of haploid gametes. Disturbances can lead to meiotic arrest and infertility. In 2020, we described genetic variants in M1AP, encoding meiosis 1 associated protein, causing severely impaired spermatogenesis. In a recent mouse study, M1AP was identified as part of the highly conserved ZZS complex stabilising recombination intermediates. In humans, this complex is built by SHOC1, SPO16, and TEX11, but the contribution of M1AP to ZZS complex function is unknown. Thus, we aimed to compare men with loss-of-function (LoF) variants in the ZZS genes with men expressing a disturbed M1AP protein. For this, detailed histological phenotyping of human testicular tissue was combined with in vitro interaction studies.

Exome data of our Male Reproductive Genomics (MERGE) cohort including >2,400 men, mainly affected by crypto- or azoospermia, was screened for bi-allelic rare (minor allele frequency, MAF < 0.01, gnomAD) LoF variants in M1AP, SHOC1, SPO16, or hemizygous rare (MAF < 0.001, gnomAD) LoF variants in TEX11. Testicular phenotypes were assessed by PAS, γ H2AX, H3S10p, TUNEL, and CREM staining. Putative protein-protein interaction was analysed by in vitro co-immunoprecipitation.

We identified nine azoospermic and four cryptozoospermic men with homozygous LoF variants in M1AP. Besides, two men with bi-allelic LoF variants in SHOC1, and nine men with hemizygous LoF variants in TEX11 were detected, sharing azoospermia and severe spermatogenic failure. So far, no case with bi-allelic LoF variants in SPO16 was determined. Further testicular phenotyping was only possible for M1AP (n = 7) and TEX11 cases (n = 4) due to the limited material. A broad phenotypic spectrum was observed: TUNEL assay showed significantly increased apoptosis in all cases. Analysis of prophase I progression by γ H2AX staining in TEX11 men indicated meiotic arrest at the zygotene level. In contrast, M1AP disturbance was accompanied by prophase I completion and the presence of intact H3S10p positive/ γ H2AX negative metaphase I cells, hinting towards a metaphase I arrest. However, the majority of metaphase I cells maintained γ H2AX expression and exhibited aberrant chromosomes. Specifically, equatorial plate alignment was impaired and proper segregation failed. Still, occasional cells escaped these disturbances and developed into elongated spermatids present in individual tubules. For one M1AP man, testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (TESE-ICSI) was successful and led to the birth of a healthy

child with a normal karyotype. Moreover, protein-protein interaction of human M1AP and TEX11 was demonstrated by co-immunoprecipitation.

Our data support the hypothesis of an interplay between M1AP and TEX11 in humans. However, disturbance of TEX11 corresponds to a more severe phenotype, namely azoospermia due to complete meiotic arrest. On the contrary, genetic variants in M1AP are associated with crypto- or azoospermia and a TESE success of 27%. Thus, we propose a rather supporting role of M1AP for the human ZZS complex. Ongoing experiments include validation of these findings in situ and co-immunoprecipitation of M1AP with SHOC1 or SPO16. This work was supported by the DFG Clinical Research Unit 326 „Male Germ Cells“.

PO 1.5

Die Motilität der Spermien aus dem Hodengewebe hat einen Einfluss auf die Erfolgsraten einer TESE-ICSI

T. Pock¹, K. Fechtmann¹, E. Plester¹, T. Sperlbaum¹,
H. M. Behre¹, S. Kliesch¹, V. Nordhoff¹
¹Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Eine testikuläre Spermienextraktion (TESE) mit anschließender intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) ist für jedes IVF-Labor eine Herausforderung – insbesondere bei Vorliegen einer nicht-obstruktiven Azoospermie, bei der aufgrund einer primären Hodenschädigung nur wenige und überwiegend immotile Spermien verfügbar sind. Der Erfolg der TESE-ICSI hängt in hohem Maß von dem Aufbereitungsverfahren, einer guten Selektion der Spermien mit häufig eingeschränkter morphologischer Qualität, der Verwendung besonderer Behandlungstechniken, wie z. B. dem Laser-Test zur Identifikation von vitalen, aber immotilen Spermien, oder der Zugabe von Motilitätsinduktoren ab. Daher sind die Anforderungen an die fachliche Kompetenz und Fertigkeiten des IVF-Laborteams bei der Durchführung der TESE-ICSI hoch.

Es wurden insgesamt 360 TESE-ICSI-Zyklen der Jahre 2019–2022 identifiziert, in denen mindestens eine Eizelle gewonnen werden konnte. Die Aufbereitung der TESE-Proben erfolgte bei guten Ausgangswerten mechanisch, bei eingeschränkter Qualität der Proben ausschließlich mittels Kollagenaseverdau. Zur Detektion der Vitalität wurden immotile Spermien einem Lasertest unterzogen. Für die weitere Analyse wurden die 360 Zyklen in drei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe (G1; n = 230) wurde mindestens ein bewegliches Spermium am Tag der ICSI gefunden und alle Eizellen entweder nur mit motilen oder mit motilen und lasertesteten immotilen Spermien injiziert. In Gruppe 2 (G2; n = 125) konnten nur immotile Spermien gefunden, mit dem Laser auf Vitalität getestet und für die ICSI verwendet werden. Bei fünf Paaren konnten am Tag der ICSI keine Spermien gefunden (G3; n = 5) und somit keine Injektion durchgeführt werden. Zusätzlich wurden alle embryologischen und weiteren klinischen Daten für die Auswertung der Erfolgsraten erhoben.

Die durchschnittliche Eizellanzahl war in allen Gruppen mit 10–12 Eizellen ähnlich. Während in G1 die Befruchtungsrates bei 56,8 % lag, wurde in G2 nur eine Rate von 27,2 % erreicht. In G1 kam es in 3,9 % der Fälle zu keiner Befruchtung, während in G2 bei 21,6 % kein Vorkernstadium zu beobachten war. Die Transferrates lag bei 82,6 % (G1) und 59,2 % (G2), wobei eine inadäquate Entwicklung der Embryonen bis Tag 5 der häufigste Grund für nicht durchgeführte Transfers war. Die Spermiumsichzeiten nahmen stetig zu: so lag die mittlere Suchzeit bei $45,3 \pm 36,3$ min in G1, bei $82,6 \pm 48,1$ min in G2 und in der dritten Gruppe waren es $103,0 \pm 30,4$ min. Die klinische Schwangerschaftsrates lag bei 28,9 % in G1 und bei 10,8 % in G2.

Paare, bei denen nicht für alle Eizellen motile Spermien vorhanden sind, profitieren von der Lasertesting der immotilen Spermien und haben ähnliche Erfolgsraten wie mit einer ICSI aus Nativejakulat (31,3 %; D·I·R 2021). Die langen Suchzeiten bei den Paaren mit ausschließlich immotilen Spermien zeigen jedoch, wie hoch der Aufwand für dieses Patientenkollektiv ist. Auch wenn die Befruchtungs- und Schwangerschaftsrates bei Immotilität der Spermien geringer sind, stellt die TESE-ICSI für diese Paare weiterhin eine wichtige Option und oft die einzige homologe Therapie im Bereich der assistierten Reproduktion dar.

PO 1.6

Tertiary lymphoid organs develop in the cauda epididymidis following infection with uropathogenic *Escherichia coli*

H. Hasan¹, C. Pleuger¹, S. Bhushan¹, D. Ai¹, W. Peng¹, E. Wahle¹, K. L. Loveland², A. Meinhardt¹, M. P. Hedger², M. Fijak¹

¹Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland; ²Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Australia

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is a pathogen commonly isolated from male urogenital tract infections, including epididymitis. In human and mouse models, the cauda epididymidis is predominantly affected. We report here for the first time the detection of tertiary lymphoid organs (TLO) in the mouse cauda epididymidis after infection with UPEC.

Following ligation of the vas deferens in C57BL/6J mice, either PBS (sham control) or UPEC (strain CFT073) were bilaterally injected into the vas deferens. Mice were sacrificed 1, 3, 5, 10, 14, 18, 21 and 28 days ($n = 3-5$ animals per time point) after infection. Immunofluorescence was utilized as a main tool to localize and visualize different cell types and mediators responsible for TLO formation, organization and maintenance. The expression of TLO mediators and chemokines was analyzed by qPCR. To monitor and quantify B cell presence in normal and infected cauda epididymidis, flow cytometry was employed.

Our results show elevated mRNA expression of the TNF/lymphotoxin (LT) ligand-receptor family members, which play critical roles in high endothelial venule formation. Determination of the mRNA expression of the TLO

associated chemokine ligands Cxcl13, Ccl19 and Ccl21 in the cauda epididymidis revealed significantly elevated expression (~80-, 30-, 70-fold, respectively) 14 days post-infection (p.i.). Immunofluorescence examination showed distinct organized zones of B and T cells, high endothelial venules, proliferating B cells as well as isotype-switched plasma cells from day 14 p.i. The presence of isotype switched B cells was confirmed by flow cytometric analysis. These changes were not detected in the caput or corpus of UPEC infected epididymis.

The occurrence of TLO in inflamed epididymidis is previously unrecognized and was demonstrated by characteristic TLO-associated features and critical mediators. Therefore, in acute bacterial infection, the epididymidis harbors an ectopic lymphoid organ that we assume may control not only local adaptive B cell responses but also the cellular composition and function of other epididymal immune cells.

PO 1.7

The regional distribution of resident immune cells shapes distinct immunological environments along the murine epididymis

C. Pleuger¹, D. Ai¹, M. Hoppe¹, D. Bohnert¹, S. Guenther², S. Epelman³, C. Kantores³, M. Fijak¹, R. Middendorff¹, J. Mayer⁴, K. Loveland⁵, M. Hedger⁵, S. Bhushan¹, A. Meinhardt¹

¹Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland; ²Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung, Deutschland; ³University Health Network Canada, Canada; ⁴Klinikum der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, Deutschland; ⁵Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Australia

The epididymis faces contrasting immunological challenges (immune tolerance towards spermatozoa vs. immune reactivity against pathogens) and thus, healthy organ function depends on a tightly controlled immune balance. We have previously shown that the opposing ends of the epididymal duct react differently upon bacterial infection. While proximal regions (Initial segment [IS], caput) remain mostly unaffected, the distal regions (corpus, cauda) are prone for inflammation-associated tissue damage. The fulminant immune reaction within the cauda often leads to persistent epididymal duct obstruction and male sub- or infertility.

To understand the underlying reasons for region-specific differences in immune responses, we isolated extravascular immune cells (CD45+) from the four epididymal regions under physiological conditions and performed single cell RNA sequencing. In addition, high dimensional flow cytometry was conducted to assess the immune cell distribution among regions at steady state as well as upon bacterial infection with uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in an acute epididymitis mouse model. Immune cell infiltrations were correlated with histopathological and transcriptional changes throughout the disease progression. In total, 12 different immune cell subsets were identified, ranging from mononuclear

phagocytes (macrophages, dendritic cells, monocytes) to lymphocytes (NK, B and T cells). While proximal regions are densely populated by intraepithelial homeostatic macrophages, the distal regions contain a more heterogeneous immune cell network consisting of myeloid cells (monocyte-derived macrophages, dendritic cell subsets) and effector lymphoid cells (T cell subsets, B cells and NK cells). Upon UPEC infection, only distal regions showed severe histopathological alterations and high expression of pro-inflammatory mediators that correlated with the appearance and degree of immune cell infiltrations. High-dimensional flow cytometry analysis revealed a drastic change in the immune landscape towards a pro-inflammatory highly reactive environment.

Our findings indicate that resident immune cells are strategically positioned along the epididymal duct creating distinct immunological milieus to tightly control tissue integrity required for sperm maturation, and to adequately tackle invading pathogens ascending from the urogenital tract. Overall, these data provide the first atlas of resident immune cells within the murine epididymis under physiological conditions serving as common research platform for upcoming studies.

PO 1.9

Cylicins: a structural component of the sperm calyx indispensable for male fertility in mice and human

A. Kovacevic¹, S. Schneider², M. Mayer², A.-K. Dicke³, L. Arevalo⁴, S. A. Koser⁵, S. Young⁵, C. Brenker⁵, S. Kliesch⁵, G. Kirfel⁶, T. Strünker⁶, F. Tüttelmann⁶, H. Scharle¹

¹Universitätsklinikum Bonn; ²University of Bonn; ³University of Münster; ⁴University Hospital Bonn; ⁵University Hospital Münster, Germany

The postacrosomal calyx of the sperm contains cytoskeletal proteins such as Cylicins. There are two Cylicins in mammals: X-linked Cylicin 1 and autosomal Cylicin 2. Cylicins are characterized by repetitive, lysine-rich tripeptides and are actin binding proteins that serve as cytoskeletal regulators in the acrosomal region of round spermatids and the postacrosomal region of mature sperm. However, the precise role of Cylicins remains to be elucidated.

In order to study the function of Cylicins, we established Cylc1 and Cylc2 mouse lines using CRISPR/CAS9 gene editing. Furthermore, these lines were combined to obtain Cylc1/2 double deficient mouse line, in order to study the effect of combined deficiency. Adult male mice were mated with wild type females for fertility analysis. Detailed morphological analysis of testicular tissues as well as mature sperm was performed.

While Cylc1-/- males are subfertile, with epididymal sperm number and vitality unaltered, male Cylc2-/-, Cylc1-/- Cylc2-/- and Cylc1-/- Cylc2-/- mice are sterile, with severely reduced epididymal sperm count. Detailed morphological analysis of the sperm revealed that Cylc2 deficiency causes coiling of the flagellum and its wrapping around the sperm head, defects in the calyx portion of

PT, acrosome detachment from the nuclear envelope and retention of the cytoplasmic residue. Consequently, *Cylc2* deficient sperm displayed reduced motility. Interestingly, *Cylc1*-/*Y Cylc2*^{+/+} males show a similar phenotype suggesting that Cylicins compensate for each other and two alleles of Cylicins are required for proper sperm function. Severe morphological anomalies were observed in *Cylc1*-/*Y Cylc2*^{+/+} spermatozoa. α -tubulin and HOOK1 staining showed that the manchette of *Cylc2*^{+/+}, *Cylc1*-/*Y Cylc2*^{+/+} and *Cylc1*-/*Y Cylc2*^{+/+} spermatids assembles properly but elongates excessively and fails to be dissolved during the maturation of the cells. Localization of other calyx specific proteins such as Calicin and actin-capping protein 3 was altered in *Cylc* deficient sperm cells, suggesting that Cylicins might be indispensable for proper calyx organization. Interestingly, whole exome sequencing revealed the presence of variants in both *Cylc1* and *Cylc2* genes in one infertile patient. Close inspection of semen samples showed that morphological anomalies of the sperm observed in mice, such as wrapping of the tail, acrosome detachment and loss of calyx structure are similarly present in human.

Due to the expression pattern and the phenotype of the Cylicin deficient mice, we speculate that Cylicins are required for the integrity of PT during spermiogenesis and in mature sperm and are thus necessary for structural stability of the head-midpiece junction and localization of the acrosome.

PO 1.10

Spermatogonial stem cell numbers in testicular tissue of boys undergoing treatments for fertility preservation

V. Bojovic¹, C. Krallmann¹, R. Mitchell², S. Kliesch¹, S. Schlatt¹, N. Neuhaus¹

¹Universitätsklinikum Münster, Deutschland; ²Royal Hospital for Children and Young People Scotland, UK

Several centers worldwide offer cryopreservation of immature human testicular tissues to boys at risk of infertility. The German-wide network and fertility preservation program Androprotect aims to preserve testicular tissues of boys at risk of germ cell loss and to develop protocols to derive sperm from spermatogonia, which constitute the most advanced germ cell type within immature testicular tissues. The success rates of methods for fertility restoration will likely depend on spermatogonial quantity within the cryopreserved testicular tissues. As spermatogonial numbers show dynamic changes during development, we developed a Z-score that facilitates comparative analyses among patient groups independent of age [Funke et al., 2021]. Moreover, Z-score values for normal (between ± 3) and severely impaired (< -7) spermatogenesis have been defined. The aim of this study was to determine Z-scores for the entire Androprotect cohort ($n = 160$) and to determine the reproductive health outcome in the first follow-up cohort of Androprotect patients ($n = 23$).

This study evaluated testicular tissues from 160 Androprotect patients with heterogeneous diagnoses including cancer as well as non-malignant diseases (i.e., sickle cell disease, thalassemia, Klinefelter syndrome). Assessment of seminiferous tubules containing germ cells was performed following immunohistochemical stainings for Melanoma-associated antigen 4 (MAGEA4) in two independent tissue sections (distance $> 15 \mu\text{m}$) based on spermatogonial number per round tubular cross-section (S/T). Quantification involved counting positive cells in at least 25 round seminiferous tubules per patient, leading to exclusion of 6/160 cases with insufficient number of seminiferous tubules. Z-scores were then calculated for S/T values using published reference means. To assess reproductive potential following gonadotoxic therapy, boys from the Androprotect cohort who were 16 years or older were contacted for andrological re-evaluation from 2021 onwards. Clinical parameters that were collected included semen analysis, among others.

The majority of patients ($n = 96/154$) had S/T Z-scores between -3 and $+3$, indicating that their spermatogonial quantity at the time of biopsy was within the normal range. Patients with Hodgkin's lymphoma or sarcoma were highly represented in this group. In contrast, 35 patients had Z-scores below the normal range, and in 23 patients, spermatogonial numbers were severely depleted (S/T Z-scores < -7). This latter group mainly included patients with a diagnosis of Klinefelter syndrome ($n = 8$), sickle cell disease ($n = 3$), leukemia ($n = 2$), anemia ($n = 2$) and combined immunodeficiencies ($n = 2$). Clinical follow-up has been performed in 23 patients who cryopreserved testicular tissue for fertility preservation. Semen analyses revealed sperm in 10 out of these 23 patients, with the majority (6/10) belonging to the group of Hodgkin's lymphoma patients with Z-scores in the normal range.

This study demonstrates that the majority of Androprotect patients have an S/T Z-score within the normal range, suggesting that the cryopreserved immature testicular tissues can be used for fertility restoration in the future. Moreover, assessment of clinical parameters for the follow-up cohort, including hormone levels as well as information on previous exposure to chemotherapy and radiotherapy, will be highly valuable to further assess the impact of gonadotoxic treatments on patients' fertility potential and chances of recovery.

PO 1.11

Pregnancy after intracytoplasmic injection of acephalic spermatozoon

C. Ori¹, D. Makri¹, M. Franz¹, H. Bralo¹, J. Marcon¹, S. Mahner¹, V. von Schönfeldt¹, C. J. Thaler¹

¹LMU Klinikum, Deutschland

Teratozoospermia is characterized by the presence of sperm with abnormal morphology that affects their size and shape, including alterations on the head, midpieces or tails. These abnormalities disrupt the ability of spermatozoa to progressively move forward and/or fertilize the oocyte leading to male

infertility. The causes of teratozoospermia are mostly unknown; however, genetics, chronic diseases, and infections, as well as lifestyle and medication include some of the factors linked to this condition. Acephalic spermatozoa syndrome (ASS) constitutes a rare severe type of teratozoospermia with genetic origin, where the semen is composed of predominantly headless spermatozoa. Various genetic alterations associated with ASS have been identified thanks to the development of whole-exome and Sanger sequencing technologies, with SUN5 being the first gene identified in 2016 as disease-causing for ASS.

A couple of 34 (f) and 43 (m) years of age presented in our clinic after 3 failed ICSI attempts elsewhere with either complete or partial fertilization failure due to severe teratozoospermia. Upon semen analysis, we found only headless spermatozoa with rarely found detached heads. On current ICSI cycle, ovarian stimulation was performed using an agonist protocol. After ovulation induction and by using transvaginal follicle aspiration 4 oocytes were retrieved, of which 3 were mature (MII). Fresh semen was processed with a microfluidic-based device. We observed that almost 100% of spermatozoa either presented as "pinheads" or had residual cytoplasmic droplet instead of a head. After intensive examination of the sample, we identified extremely rare heads separated from the tails, but still attached next to them in a structure reminding of excess residual cytoplasm. Those were used for ICSI.

One MII was regularly fertilized – with 2 pronuclei (2PN) and a second polar body, one remained unfertilized and the third one was degenerated. The embryo was cultured for 3 days exhibiting regular blastomere divisions and classified as EEVA positive. On day 3, the embryo was successfully transferred into the uterus and 14 days later, serum - hCG was 835 IU/L. At 5+6 weeks of gestation, a positive intrauterine embryo with positive heartbeat was documented by transvaginal ultrasound. Currently, the pregnancy is at 10+2 weeks of gestation with normal development.

ICSI provides a potent and promising treatment for couples suffering from acephalic spermatozoa-related male infertility conditions. However, due to the specimen's phenotypic similarity to ASS syndrome, as well as the plethora of different genetic mutations identified in infertile men with ASS among which are several "variants of unknown severity" (VUS), we strongly advised for detailed genetic analysis with the results currently pending.

PO 1.12

The effect of gender-affirming hormone therapy on the spermatogonial cell compartment in trans women

F. Sieg¹, K. Schiwon¹, S. Di Persio¹, F. Schneider², J. Wistuba¹, S. Kliesch¹, S. Schlatt¹, N. Neuhaus¹

¹Uniklinik Münster; ²St. Franziskus-Hospital Münster, Deutschland

Trans women receive gender-affirming hormone therapy (GAHT) and are offered

gender-affirming surgery (GAS) to achieve transition between the sex assigned at birth and gender identity. Analyzing the impact of GAHT on testicular tissues in trans women revealed a reduction of the advanced germ cell stages, reduced numbers of MAGEA4 positive (pan spermatogonial marker) but a higher proportion of UTF1+ undifferentiated spermatogonia. These data suggest alterations not only in the numbers but also in the composition of the spermatogonial compartment. Recently, single-cell RNA sequencing studies have identified further spermatogonial subpopulations based on the expression of the marker genes PIWIL4, FGFR3, NANOS3, GFRA1 and KIT. While PIWIL4+ cells are considered to be at the origin of the germ cell differentiation process (state 0), state 1 spermatogonia are characterized by expression of GFRA1 and state 2 spermatogonia by expression of KIT. The latter spermatogonial subtypes are considered to also display the highest proliferative activity. Studies describing how these cell populations change in transwomen receiving GAHT are lacking. The aim of this study was to evaluate the alterations in the spermatogonial cell compartment, in testicular tissue sections from trans women under GAHT compared to controls.

25 age matched (mean: 28.1 yr) trans women, who underwent comparable GAHT regimens (10 or 12.5 mg cyproterone acetate and estrogens) and 8 adult men (mean: 34.5 yr) with complete spermatogenesis serving as controls were included in the study. Immunohistochemical staining was performed on one testicular tissue section per individual for the spermatogonial markers MAGEA4, UTF1, PIWIL4, FGFR3 and NANOS3, respectively. For each marker, the number of positive cells per tubular cross-section was determined in 25 round tubules per individual. In addition, the marker combinations GFRA1/MKI67/MAGEA4 and KIT/MKI67/MAGEA4 were evaluated using immunofluorescence stainings, in order to determine the proliferation rate of state 1 and state 2 spermatogonia. 400 MAGEA4+ cells per individual were quantified and the proportion of KIT+/GFRA1+ was determined. Finally, the MKI67+ cells among the KIT+/GFRA1+ cells were evaluated. Mann-Whitney U-test and Spearman correlation were used for the statistical analyses.

The total number of MAGEA4+ spermatogonia and interestingly, the proportion of PIWIL4+ spermatogonia within the MAGEA4+ spermatogonia were reduced in trans women compared to controls ($p < 0.001$). In contrast to that, the relative proportion of UTF1+, FGFR3+ and NANOS3+ spermatogonia was comparable. Regarding the trans women's age, the number of spermatogonia per tubule correlated negatively with the age at start of GAHT ($p < 0.01$) and the age on the day of GAS ($p < 0.001$). The treatment duration correlated negatively with the proportion of PIWIL4+ ($p < 0.01$) and NANOS3+ spermatogonia ($p < 0.05$). Preliminary data of the immunofluorescence stainings in trans women ($n = 3$), revealed a similar ratio of KI67+ cells within reduced proportions of GFRA1+/KIT+ cells, compared to the controls.

GAHT affects the total number of spermatogonia as previously described and it seems to affect specifically the PIWIL4+ spermatogonia that are considered the most undifferentiated spermatogonia. Therefore, trans women should be counseled with regard to fertility preservation options rather sooner than later following initiation of GAHT.

PO 1.13

Erhöhte DNA-Fragmentierung in Spermien: Verbesserte Schwangerschaftsrate durch Hyaluronselektion bei der ICSI

B. Wetzka¹, Y. Ersoy², A. Hanjalic-Beck¹, A. Ochsner¹
¹CERF; ²Kinderwunsch Bodensee, Deutschland

Zunehmend wird auch die Bedeutung des Mannes bei der ungewollten Kinderlosigkeit in den Fokus genommen. Die bisherigen Ejakulatparameter Motilität, Konzentration und Morphologie nach WHO sind eher deskriptiv. Eine bedeutende funktionelle Rolle für die Fertilisierung der Eizelle und Embryonenentwicklung bzw. Schwangerschaftsrate spielt wahrscheinlich die DNA-Fragmentierung in humanen Spermien (SDF), da eine Erhöhung des SDF mit verminderter Fertilisierung und Implantation und erhöhter Abortrate in Verbindung gebracht werden konnte. Ziel der Studie war, den Effekt einer erhöhten SDF und der Anwendung einer Spermienauswahl mittels Hyaluronsäure-Selektion auf den Outcome nach einer In-vitro-Fertilisation kombiniert mit intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) zu untersuchen. Bei der Anwendung von Hyaluronsäure-angereicherten Medien zur Spermienauswahl ohne vorherige Analyse der SDF konnte in den meisten Studien kein Benefit beobachtet werden.

In die Studie eingeschlossen wurden Paare ($n = 212$), bei denen im Ejakulat ein erhöhter DNA-Fragmentationsindex ($DFI > 25\%$) mittels DNA-Durchflusszytometrie festgestellt wurde (Synlab Labor Leinfelden). Ausschlusskriterium war Alter der Frau > 40 Jahre, da dies das Ergebnis der IVF-ICSI zu stark beeinflusst hätte. Die Beurteilung der subhaploiden Zellkerne erfolgte durch Propidiumjodid- (PI-) Markierung. Das SpermSlow™-Medium enthält Hyaluronsäure, an welche reife Spermien wesentlich besser binden als unreife. Die im SpermSlow™ gebundenen Spermien wurden dann für die ICSI ausgewählt. Bei 131 Paaren (DFI-Mittelwert 50,8 %, Alter der Frau 33,9 Jahre) wurde SpermSlow™ vor der ICSI eingesetzt, bei 81 Paaren (DFI-Mittelwert 51 %, Alter der Frau 33,4 Jahre) erfolgte die ICSI mit der üblichen Spermienaufbereitung (SilSelect®). Zur Bewertung des Outcomes nach Anwendung des SpermSlows™ wurden die Schwangerschaftsrate, die Befruchtungsrates und die Morphologie der sich entwickelnden Embryonen ermittelt.

Mit Hilfe des SpermSlows™ konnte bei Ejakulatproben mit hochgradiger DFI eine signifikant höhere Schwangerschaftsrate (p -Wert: 0,00184) mittels In-vitro-Fertilisation und ICSI erreicht werden als ohne Einsatz der Hyaluronsäure (39 % vs. 19 %). In der Altersgruppe < 30 Jahre lag die Schwangerschafts-

rate mit Hyaluronsäureselektion bei 40 % ($n = 14$), ohne bei 22 % ($n = 20$), in der Altersgruppe 30–35 Jahre mit bei 39 % ($n = 64$), ohne bei 17 % ($n = 43$), in der Altersgruppe 36–40 Jahre mit bei 36 % ($n = 47$), ohne bei 20,5 % ($n = 24$). Die Höhe des DFI zeigte zudem einen Trend zur negativen Beeinflussung der Schwangerschaftsrate ($p = 0,16$), der in diesen Altersgruppen relevanter ist als das Alter der Frauen ($p = 0,81$). Die Befruchtungsrates und die Embryonenmorphologie unterschieden sich nicht durch die Anwendung von SpermSlow™.

Die Auswahl von Spermien mittels SpermSlow™ führte zu einer verbesserten Schwangerschaftsrate nach einer In-vitro-Fertilisation mit ICSI bei Paaren mit erhöhtem DFI. Diese Ergebnisse unterstützen die Anwendung der Hyaluronsäureselektion von Spermien für die ICSI bei erhöhtem DFI. Allerdings besteht noch kein Standardverfahren mit entsprechenden Normwerten zur Bestimmung des SDF bzw. DFI, so dass die Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Nachweismethoden bzw. Laboren noch nicht wirklich vergleichbar sind, was den routinemäßigen Einsatz einschränkt.

PO 1.14

Testicular inflammatory response and fibrotic remodeling are regulated by activin A and macrophages in experimental autoimmune orchitis

M. Fijak¹, W. Peng¹, A. Kepsch¹, T. O. Kracht¹, H. Hasan¹, R. Wijayarathna², E. Wahle¹, C. Pleuger¹, S. Bhushan¹, S. Günther³, A. C. Kauerhof⁴, A. Planinic¹, D. Fietz¹, H.-C. Schuppe¹, M. Wygrecka⁵, K. L. Loveland², D. Jezek¹, A. Meinhardt¹, M. P. Hedger²

¹Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland; ²Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Australia; ³Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Deutschland; ⁴University of Zagreb, Croatia; ⁵University of Giessen and Marburg, Lung Center, Giessen, Germany

Testicular inflammation induced by bacteria, viruses, or sterile inflammation (including autoimmune diseases) is a significant cause of male infertility. Experimental autoimmune orchitis (EAO), a mouse model of chronic testicular inflammation reflects the pathological changes observed in some cases of human spermatogenic disturbances. Pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators, such as CCL2 and activin A are increased during EAO and correlate with immune cell infiltration and fibrosis. Activin A is produced mainly by Sertoli cells and plays multiple biological roles in inflammation, immunity, and fibrosis. CCL2 together with its receptor CCR2 mediate leukocyte trafficking and recruits macrophages. Therefore, we aimed to investigate the role of the activin A/CCL2-CCR2/macrophage axis in the development of testicular fibrosis.

EAO was induced by active immunization with testicular antigens and the testes were collected 50 days after the first immunization. The progression of EAO was compared in WT and CCR2^{-/-} mice as well as in mice overexpressing follistatin (FST), displaying

reduced activin bioactivity. Human testicular biopsies from patients with impaired spermatogenesis, testicular fibrosis, and inflammation and control biopsies revealing normal intact spermatogenesis were also included. The influence of activin A on CCR2 and fibrotic mediator expression in macrophages was investigated using bone marrow-derived macrophages (BMDMs) as a surrogate of testicular macrophages, generated in the presence of macrophage-colony stimulating factor.

In the absence of CCR2 testicular inflammation and fibrosis were reduced as documented by lower numbers of immune cells expressing ECM proteins (fibronectin, collagen I) and decreased production of collagen, matrix metalloproteinases (MMPs), as well as inflammatory mediators (IL-10, CCL2, and Inhba). Inhibition of activin A in vivo by overexpression of FST during EAO decreased testicular fibrosis and expression of collagen I by testicular macrophages. Furthermore, analysis of testicular biopsies from patients with impaired spermatogenesis and fibrotic alterations demonstrated that fibronectin expression was increased in testicular macrophages. In BMDMs, activin A stimulated expression of genes involved in ECM organization (fibronectin, MMP, PDGF). In the presence of activin A the expression of CCR2 was upregulated in BMDMs. Moreover, activin A enhanced the migratory ability of macrophages in response to CCL2 stimulation. These effects were abolished by addition of FST.

CCR2 and activin A regulate the development of fibrosis during testicular inflammation and underline the crucial pro-fibrotic function of macrophages in inflammation-associated fibrotic remodeling in EAO.

PO 1.15

Ageing is associated with transcriptional alterations in human testis with full spermatogenesis

S. Laurentino¹, Y. Wang¹, S. Berres¹, H. Krenz¹, A. Körtje¹, A. Henrich¹, N. Terwort¹, N. Neuhaus¹, S. Kliesch¹, J. Wistuba¹, J. Gromoll¹

¹University of Münster, Germany

Men can produce sperm throughout their entire adult life but, despite this, ageing has detrimental effects on male fertility, namely decreased sperm quality and lower spermatogenic efficiency. For example, increasing age is associated with increased levels of DNA fragmentation in sperm and, to maintain spermatogenic output at normal levels, more spermatogonia need to exit quiescence and enter spermatogenesis. Spermatogenesis is associated with precise regulation of gene expression, however the transcriptional changes occurring in testis in response to the ageing process have not yet been elucidated clearly.

To answer this question, we performed whole transcriptome analysis in testicular biopsies with qualitatively normal spermatogenesis from young (24–31 years, n = 4), middle-aged (38–45 years, n = 3), and aged men (54–75 years, n = 6). We performed bioinformatic

analyses including differential gene expression analysis, pathway analysis, and gene ontology. Moreover, we evaluated the protein expression of differentially expressed genes by immunohistochemistry.

We identified 104 differentially expressed genes between the different age groups. Ingenuity pathway analysis revealed an enrichment in genes involved in several processes, including ferroptosis (p < 0.01), an iron-dependent cell death pathway, characterised by an imbalanced redox balance. Moreover, when evaluating genes showing time-dependent expression patterns, we could identify five clusters of genes. Gene ontology analysis of these clusters indicates that genes involved in the regulation of DNA damage repair change their expression during ageing in testis.

Our study indicates that increased oxidative stress might also be involved in testicular ageing. Importantly, pathways involved in DNA damage repair seem to be differentially expressed with age, which is in accordance with the increased genomic instability and DNA damage found in sperm with age. Future studies should clarify mechanisms and pathways counteracting the detrimental effects of ageing to the male germline and sperm.

PO 1.16

Translational development and evaluation of a novel in vitro diagnostic test for CatSper-related male infertility

S. Young¹, C. Brenker¹, C. Krallmann¹, V. Nordhoff¹, S. Schiffer¹, S. Kliesch¹, C. T. Strücker¹

¹University of Münster, Germany

Infertility affects approximately 15% of couples trying to conceive. About 30% of infertile men display semen parameters within the reference range, suggesting that either a female or unexplained male factor, such as sperm dysfunction, underlie a couple's infertility. It has long been suspected that such sperm dysfunctions might involve defects in the sperm specific CatSper channel, which controls sperm's swimming behavior. In a recent publication (pre-print), we identified several patients with CatSper dysfunction and demonstrated that CatSper is indeed essential for fertilization by enabling sperm to penetrate the protective egg coat. Medical histories of affected patients corroborate this finding by showing that not only natural conception, but also insemination and IVF treatments failed, while only ICSI succeeded. In that study, we introduced the "CatSper-Activity-Test" as a diagnostic prototype to aid in assessing CatSper function in large patient cohorts. With the present study, we transform the CatSper-Activity-Test from a scientific discovery into a medical application in diagnostics.

Assessment of CatSper function using the CatSper-Activity-Test depends on translating CatSper activity into a visible motility response, achieved by exposing sperm to a defined chemical environment. Therefore, implementation of the test into routine diagnostics depends on the availability of safe,

effective, and CE-certified chemical test solutions for patient care within the European Union. We engineered an in vitro diagnostic device to serve these needs. To evaluate its performance characteristics, a validation study was conducted. We recruited a cohort of 4 diseased and 61 healthy patients and assessed CatSper activity with both the CatSper-Activity-Test and a standard Ca²⁺-fluorometric assay. We determined the test's sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and overall accuracy. Shelf-life and stability studies were conducted to determine the device's reliability over time, while usability studies assessed the compatibility of the test within the environment of a routine diagnostic laboratory.

The CatSper-Activity-Test demonstrated high diagnostic performance, exhibiting a sensitivity of 100% and a specificity of 98.3%, thus indicating its ability to accurately identify patients both with functional and dysfunctional CatSper, respectively. The positive predictive value was 100%, and the negative predictive value was 80%. The overall accuracy of the device was 98.5%, suggesting high diagnostic efficacy. Furthermore, the device exhibited a shelf life of > 12 months with consistent performance and stability throughout the study duration, even under various transport and storage conditions. Usability assessment revealed that performing the CatSper-Activity-Test was safe and straightforward, required only minimal training, and is, therefore, suitable for routine diagnostics with a positive benefit-to-risk-ratio.

This study presents the successful translation of a scientific finding into a medical application for the accurate and efficient assessment of CatSper function to supplement diagnostic male-infertility workups. The test solutions demonstrated excellent diagnostic performance, stability, and usability, ultimately acquiring the CE-label as an in vitro diagnostic according to the European Union's regulatory framework. We foresee widespread clinical adoption of the CatSper-Activity-Test as a valuable tool for healthcare professionals in the accurate and timely diagnoses of CatSper-related male infertility, thereby sparing affected couples the burden of insemination and/or IVF treatment attempts doomed to fail.

PO 1.17

T cells in testicular germ cell tumors: New evidence of functional contributions by rare subsets

D. Fietz¹, A. Pilatz², K. Loveland³, J. Guo⁴, H.-C. Schuppe¹, R. Islam¹, J. Heyer¹, C. Pleuger¹, S. Kliesch⁵

¹Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland; ²Universitätsklinikum Gießen, Deutschland; ³Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Australia; ⁴State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, China; ⁵Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Testicular cancer accounts for about 1% of newly diagnosed cancer in young men (aged 14-44 years) and overall incidence rate is steadily increasing world-wide with regional peaks. Testicular germ cell tumors (TGCT) are the most common testis cancer types, arise from pre-invasive germ cell neoplasia in

situ (GCNIS) and can be broadly divided into seminoma (SE) and non-seminoma, e. g. embryonic carcinoma (EC). Although TGCT is one of the most curable cancers with a 5-year survival rate of > 95%, around 15–20% of patients will relapse after initial therapy and require further treatment with poor prognosis. Immuno-based therapies, that have been established for other cancer entities, such as checkpoint inhibitors, fail in case of TGCT due to a poor understanding of the immune microenvironment. It is known that T cells represent the major component of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in TGCT, but the presence of rarer subtypes, such as regulatory (Treg) and follicular helper T (Tfh) cells has not been investigated here, despite these cells exhibit an influence on tumor progression and prognosis in other tumor entities.

To analyze TIL and their subsets, we followed three approaches: a) immunohistochemistry on a retrospective patient cohort to analyze composition and distribution of TIL using a panel of human testis biopsies with preserved spermatogenesis without (n = 10) or with immune infiltrates (n = 12), GCNIS with and without lymphocytic infiltrates (n = 15, each), SE (n = 28), and EC (n = 10); b) flow cytometry on a prospective patient cohort using samples from different locations of the tumor-bearing and contralateral testis (SE n = 12, EC n = 6); c) single cell RNAseq (normal testis n = 3, pooled and TGCT n = 4).

All approaches, despite using different and heterogeneous patient samples, showed that the immune cell environment it shifted from a macrophage-dominated immune environment in normal testis to a T cell-dominated milieu in TGCTs, especially in SE. Further, immunohistochemical analysis showed that rarer T cell subtypes such as Treg and Tfh cells were more abundant in SE samples than compared to other sample groups from the retrospective patient cohort. Flow cytometry using the prospective Giessen TGCT cohort on fresh human testicular specimens from different areas of tumor-bearing and contralateral testis revealed the highest percentage of T cells in tumor-centers of SE compared to other localizations and samples. Also, analysis of scRNA-seq datasets confirmed T cells to be the most abundant immune cell type in TGCT. Deeper analysis detected Treg and Tfh signature molecules to be highly expressed in TGCT.

Overall, this study describes the complexity of TIL in TGCTs and provides first indications of the functional potential importance of rarer T cell subtypes and their signalling molecules in the immune environment of TGCT.

Grants: Funded by DFG IRTG 1871/P2.

PO 1.18

Spermatozoal RNA expression as predictor of ART fertilization rates

T. Greither¹, D. Handke¹, I. Hoffmann¹, H. M. Behre¹
¹University Medicine Halle (Saale), Germany

Background Spermatogenesis is tightly regulated by the spatial expression of different phase-specific RNA transcripts over the

differentiation course from spermatogonia to mature spermatozoa. The aim of this study was the analysis of spermatogenesis-specific RNA transcripts in mature spermatozoa used for assisted reproductive treatments (ART) and the association to clinical parameters such as fertilization success.

Material and Methods From 168 patients, aliquots of the motile sperm fraction used for ART were collected, and total RNA was extracted. The RNA was transcribed via reverse transcription reaction, and the cDNA pre-amplified according to the manufacturer's protocol (Standard BioTools, San Francisco, CA, USA). 65 spermatogenesis-related genes, which were previously identified to be associated with impaired male fertility [see Greither et al., *Cytogenet Genome Res.* 2020; Greither et al., *Andrology* 2023], were quantified in the patients' samples using the BioMark HD system (Standard BioTools). Six reference genes were quantified in parallel, of which ACTB, RHOQ and GAPDH were expressed homogeneously and therefore were used in combination for the normalization of gene expression.

Results Gene expression of spermatogenesis-related genes in mature spermatozoa was heterogeneous, with high and constant expressions of SAG, LDHC, HORMAD, NRIP1, DMRT3, ODF1 or AKAP4, but also low expressions of VASA, CYLC1, TEX11, PRSS21, ASZ1, TNF1 and RNF17. In the group of patients (n = 104) with higher fertilization rates, spermatozoal expression of DAZL, DNAJC5B, AKAP4, CFAP251 and ODF1 was significantly lower than in the spermatozoa of patients with fertilization rates below 50% (n = 64; Mann-Whitney-U-Test).

Conclusion Spermatogenesis-related transcript expression in mature spermatozoa may mirror the physiological differentiation course and might be used as predictor for ART success in future.

PO 2.1

Supplementation of mitochondria from endometrial mesenchymal stem cells (EnMSCs) improves oocyte quality in aged mice

Q. Zhang¹, J.-X. Hao¹, B.-W. Liu¹, Y.-C. Ouyang¹, J.-N. Guo¹, M.-Z. Dong¹, Z.-B. Wang¹, F. Gao¹, Y.-Q. Yao¹
¹Medical School of Chinese People's Liberation Army General Hospital, China

Maternal aging is one of the major causes of reduced ovarian reserve and low oocyte quality in elderly women. Decreased oocyte quality is the main cause of age-related infertility. Mitochondria are multifunctional energy stations that determine the oocyte quality. The mitochondria in aging oocytes display functional impairments with mtDNA damage, which leads to reduced competence and developmental potential of oocytes. To improve oocyte quality, mitochondrial supplementation is carried out as a potential therapeutic approach. However, the selection of suitable cells as the source of mitochondria remains controversial. We cultivated endometrial mesenchymal stem cells (EnMSCs) from aged mice and

extracted mitochondria from EnMSCs. To improve the quality of oocytes, GV oocytes were supplemented with mitochondria via microinjection. And MII oocytes from aging mice were fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) combining EnMSCs mitochondria microinjection.

In this study, we found that the mitochondria derived from EnMSCs could significantly improve the quality of aging oocytes. Supplementation with EnMSC mitochondria significantly increased the blastocyst ratio of MII oocytes from aging mice after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). We also found that the birth rate of mitochondria-injected aging oocytes was significantly increased after embryo transplantation.

Our study demonstrates that supplementation with EnMSC-derived mitochondria can improve the quality of oocytes and promote embryo development in aging mice, which might provide a prospective strategy for clinical treatment.

PO 2.2

Cryostorage of human ovarian tissue: Evaluating the storage and disposal pattern of a 22-year period with 2475 patients

A. Schallmoser¹, R. Einkenkel¹, C. Färber¹, V. Hüren¹, N. Emrich¹, J. John¹, N. Sängner¹
¹University Hospital Bonn, Germany

Cryopreservation of ovarian tissue is one feasible option to preserve fertility in female cancer patients ahead of gonadotoxic therapy. The purpose of this study was to evaluate parameters like age, indication for ovarian tissue cryopreservation (OTC), storage characteristics and the pattern of sample disposal.

The relevant parameters of a single university center were revised and digitalized in the period from 2019 to 2021. To assess the patient motivation of storage, patients were contacted by letter, e-mail and telephone calls.

2475 patients with stored ovarian tissue were analyzed in the time period between 2000 and 2021, the response rate of contact calls and letters was 28.8% (224/777). When storage ended (n = 1155), patients stored for 4.2 years, mean age was 33 years, indications were breast cancer (53%) and lymphoma (17.5%). We observed that 2.5% had a transplantation on site, 10.3% transferred their tissue to another cryobank while 11.5% deceased. The majority of this group (75.7%) ended their storage due to pregnancy (49.1%), no desire to have children (25.9%), too expensive storage fees (8.9%), death (8.5%), recurrence of cancer (8.5%), no partner (4%) and fear of surgery in the future (3.1%). 6.7% regretted the end of storage retrospectively.

The pregnancy rate of 49.1%, resulting from ovarian tissue that was not removed during surgery for scheduled OTC supports the clinical approach of removing and cryopreserve only 25–50% of one ovary. We propose to implement interdisciplinary counselling not only prior to fertility preservation but also when end of storage is intended.

PO 2.3

Can vitrification of human ovarian tissue replace slow freezing? A comparison in angiogenic potential and apoptotic changes.

A. Schallmoser¹, R. Einenkel¹, C. Färber¹, V. Hüren¹, N. Emrich¹, J. John¹, N. Sängner¹
¹University Hospital Bonn, Germany

Vitrification of ovarian tissue is a promising alternative approach to slow freezing. Few empirical investigations have been focused on the determination of angiopoietic factors expressed in tissue culture after cryopreservation and thawing with these two freezing methods.

Hypoxic tissue culture for 48 hours was conducted with fresh, thawed slow frozen or rapid warmed vitrified ovarian cortex tissue from 20 patients. Tissue culture supernatants were determined regarding cytokine expression profiles of angiogenin, angiopoietin-2, epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF), hepatocyte growth factor (HGF), Leptin, Platelet-derived growth factor B (PDGF-BB), placental growth factor (PLGF) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) via fluoroimmunoassay. Apoptotic changes were assessed by TUNEL staining of tissue sections.

In all tissue samples angiogenic factors were secreted. Comparing the angiogenic expression profiles of vitrified/rapid warmed tissue with slow frozen/thawed tissue samples, significant differences in levels of bFGF ($P = 0.037$), HGF ($P = 0.005$), PLGF ($P = 0.012$), VEGF-A ($P = 0.030$) were detected, besides a borderline difference regarding angiopoietin-2 ($P = 0.086$) expression. Tissue staining for nicked DNA (TUNEL) revealed that both slow freezing/thawing and vitrification/rapid warming caused an increase in the signal, which was higher for slow freezing/thawing than for vitrification/rapid warming, but not significantly different.

Ovarian cortex tissue cryopreserved and thawed with both methods expresses different profiles of angiopoietic factors potentially contributing to the revascularisation capacity of the tissue, besides ensuring tissue integrity.

PO 2.4

The impact of phospholipid liposomes on endometrial cell proliferation and decidualization

A. Jasarevic¹, S. Fayezi¹, J. Jauckus¹, A. Germeyer¹, T. Strowitzki¹
¹Universitätsfrauenklinik Heidelberg, Deutschland

Successful implantation is a crucial step in achieving a healthy pregnancy, relying on the coordinated processes of embryo implantation and endometrial stromal cell decidualization. Recent research has shed light on the significant role of extracellular vesicles in embryo implantation and endometrial disorders. In addition, liposomes, hydrophobic, bilayer phospholipids forming artificial spherical vesicles, have gained considerable attention as effective carriers for delivering

pharmaceutical drugs and essential nutrients to the endometrium. Phospholipids are the primary components used in the preparation of liposomes. In this study, our aim was to investigate the direct effects of phospholipid liposomes on endometrial stromal cells in terms of proliferation and decidualization.

To simulate endometrial cells, we employed immortalized human endometrial stromal cells (t-HESC) as a model. We generated phospholipid liposomes as artificial extracellular vesicles using sonication. The influence of liposomes on cell proliferation was examined by seeding t-HESC cells and treating them with various doses of liposomes. After 72 hours of incubation, we assessed proliferation using the Cell Counting Kit-8. To investigate the impact of liposomes on the proliferation of decidualized cells, we induced in vitro decidualization by treating the cells with liposomes in conjunction with a decidualization cocktail containing cAMP, estradiol, and medroxyprogesterone acetate for six days. Decidualization was confirmed by assessment of the secreted prolactin in the supernatant of the cells.

Treatment with phospholipid liposomes did not significantly change endometrial cell proliferation compared to the untreated condition (1.53-fold at 100 nM, $p = 0.42$). Conversely, phospholipid liposomes decreased the production of prolactin compared to the control group (-34.9% at 50 nM, $p = 0.04$).

Our findings suggest that supplementing with phospholipid liposomes does not modulate cell proliferation while inhibiting decidualization. This is supported by the decreased levels of prolactin observed in liposome-treated cells during in vitro decidualization. These findings highlight the effect of surface phospholipids, independent of cargo, on implantation and have potential applications in designing therapeutic strategies for liposome-based delivery to endometrial cells.

PO 2.5

Differential characteristics of vaginal versus endometrial microbiota in 71 infertile patients

A. Polifke¹, A. von Schwedler², R. Gulba², R. Bensmann³, A. Dilthey², N. N. Nassar⁴, P. Finzer²
¹Labor dus.ana; ²Universitätsklinikum Düsseldorf; ³ZOTZ/KLIMAS MVZ Düsseldorf-Centrum GbR; ⁴novum – Zentrum für Reproduktionsmedizin, Deutschland

Female reproductive tract microbiota is associated with different gynecological disorders, such as endometriosis or chronic endometritis, and may affect reproductive outcome. However, it remains to be clarified if the vaginal or the endometrial microbial community is more suitable for diagnostic purposes. The endometrial microbiome probes are acquired by trans-cervical sampling using a “pipelle”, which could lead to contamination of the endometrial probe with slid through vaginal microbiota. Therefore, this retrospective study aims to compare microbiota of vaginal smear and endometrial biopsies acquired trans-cervically by pipelle, in an unselected group of 71 infertile outpatients treated in an IVF clinic.

The study was conducted at “novum, Zentrum für Reproduktionsmedizin”, Essen/Duisburg, Germany. 71 patients (mean age: 35 years [range 26–42], mean body mass index [BMI]: 24,5 [range 18,8–38,7]), provided both vaginal swab and endometrial biopsy samples between February 2020 and March 2021. 20 patients were diagnosed with chronic endometritis, 15 with endometriosis. 40 study participants were found to have undergone past miscarriages. After DNA extraction the V1–V2 region of the 16S rDNA was sequenced using MiSeq system (Illumina Inc. San Diego, CA, USA). Sequencing data analysis including raw read filtering, clustering into Operational Taxonomic Units (OTUs), followed by calculation of alpha diversity was carried out using the CLC Microbial Genomic Workbench 12.0.3 (Qiagen, Hilden, Germany). Statistical analyses were carried out using the implemented workflows of the CLC Microbial Genomic Workbench or excel.

Vaginal and endometrial microbiota vary significantly. Both show essentially two separable distributions with the endometrial microbiome being of higher diversity, grouping more disperse and representing a polymicrobial community. Abundance analyses showed high correlation between vaginal and endometrial samples for the different *Lactobacillus* sp. (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasserie* and *L. iners*), but also for *G. vaginalis*. However, a group of non-lactobacilli was enlarged in the endometrial group, encompassing mainly *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Prevotella* sp. and *Propionibacterium* sp. Classification of both microbiotas yielded conflicting data. Whereas 11,3% of patients were grouped into Community State Types (CST) IV, which indicates clinical signs of bacterial vaginosis, 32,4% of women were found to display a non-lactobacillus dominated (NLD, which is less than 90% abundance) endometrial microbiome, known to be indicative for unfavourable reproductive outcome. Adjustment of vaginal classification schemas by the 90% dominance criterion or introduction of diversity metrics did not lead to concordance with the endometrial results, underlining in addition differences of both microbiotas.

This study could show that the microbiome of endometrial biopsy samples – although trans-cervically acquired – differs significantly from their vaginal counterpart and may detect the group of women with an unfavourable reproductive outcome prognosis more precisely.

PO 2.6

Hohe FSH-Konzentration beeinflusst VEGF-Sekretion von humanem Ovarialgewebe in vitro

R. Einenkel¹, A. Schallmoser¹, N. Sängner¹
¹Universitätsklinikum Bonn, Deutschland

Die Kryokonservierung von Ovarialgewebe ist eine wichtige Option zum Fertilitätsersatz. Patientinnen, bei denen eine gonadotoxische

Therapie geplant wird, kann ein Stück Ovar entfernt, im Labor aufgearbeitet und kryokonserviert werden, um es nach Ende der Therapie wieder transplantiert zu bekommen. Der transplantierte Ovarialkortex kann anschließend seine Funktion wieder aufnehmen. Der Erfolg ist maßgeblich von der Vaskularisierung des transplantierten Gewebes abhängig. Es dauert etwa 7–10 Tage, bis eine vollständige Blutversorgung aufgebaut ist. Durch die Phase der Unterversorgung und den Reperfusionsschaden, der durch die wiederkehrende Sauerstoffversorgung und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies geschieht, kommt es zu einem Verlust von ca. 70 % der Follikel. Humaner Ovarialkortex sekretiert spontan VEGF – ein Schlüsselfaktor für die Vaskularisierung. Welche Faktoren die VEGF-Sekretion beeinflussen, ist bisher kaum beforscht.

Humanes Ovarialgewebe von 8 Patientinnen wurde aufgetaut und *in vitro* in Kultur genommen. Zum Kulturmedium wurde entweder 0, 1 oder 10 ng/mL rekombinantes humanes FSH zugesetzt. Dies entsprach 0, 17,5 bzw. 175 mIU/mL FSH, also neben der Behandlungskontrolle einer prä-menopausalen Serumkonzentration und einer Konzentration, die den post-menopausalen Serumlevel übersteigt. Die VEGF-, IL-8, HIF und FSHR-Expression wurde mittels ELISA und/oder Immunhistofluoreszenz- (IHF-) Färbungen überprüft.

Humanes Ovarialgewebe braucht etwa 48 h, um sich nach der Kryokonservierung und dem Auftau metabolisch zu erholen. In diesen 48 h nimmt auch die VEGF-Sekretion stetig zu. Neben endothelialen Strukturen exprimieren vor allem Follikel und die enthaltenen Oozyten VEGF. Der Zusatz von 17,5 mIU/mL FSH führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung der VEGF-Sekretion. In der IHF konnte ein leichter, nicht signifikanter Anstieg beobachtet werden. Die Sekretion von IL-8 wurde ebenfalls leicht, nicht signifikant erhöht. Allerdings führt die Zugabe der hohen FSH-Konzentration von 175 mIU/mL zu einer signifikant eingeschränkten VEGF-Sekretion um etwa 23 % ($p = 0,016$), verglichen mit der Kontrolle ohne FSH. Außerdem führte es zu einer signifikanten Reduktion der Expression von FSHR in der IHF-Färbung.

Ovarielle Insuffizienz, die durch gonadotoxische Therapien frühzeitig hervorgerufen werden kann, geht mit einem hypergonadotropen FSH-Level einher. Unsere *In-vitro*-Daten zeigen, dass eine hohe FSH-Konzentration einschränkend auf die VEGF-Sekretion und damit auf das Vaskularisierungspotential des Ovarialgewebes wirken kann. Eine Hormonersatztherapie könnte die Vaskularisierung nach der Transplantation unterstützen und den Verlust der Follikel verringern. Zusammenfassend hat FSH *in vitro* einen regulierenden Einfluss auf humanes Ovarialgewebe und insbesondere auf den angiopoetischen Faktor VEGF. Hohe FSH-Konzentrationen wirken *in vitro* einschränkend auf die VEGF-Sekretion und damit auch das Vaskularisierungspotential von humanem Ovarialgewebe.

PO 2.7

Filamin A in the human ovary: sites of expression, regulation and possible interaction partners

Y. Jia¹, K. Caban¹, T. Fröhlich¹, M. Höfner¹, D. Berg², U. Berg², A. Müller-Taubenberger¹, A. Mayerhofer¹, H. Welter¹

¹Ludwig-Maximilian-University (LMU); ²Fertility Centre A.R.T. Bogenhausen, Germany

Filamin A (FLNA) cross-links actin filaments and is a well-characterized cytoskeletal protein. Moreover, it functions as an intracellular signalling scaffold, orchestrating pathways associated with cell differentiation, development, and morphogenesis. While the role of FLNA in various organs and related tumors has been explored, its presence in the ovary, a very dynamic organ, and its involvement in its functions have remained unexplored.

Cell culture of IVF-derived human granulosa cells (GCs) and KGN cells; qPCR, Western blot, immunoprecipitation, mass spectrometry, immunohistochemistry, immunocytochemistry.

Data mining uncovered expression of FLNA in the human ovary, particularly in granulosa cells of follicles, but also in the corpus luteum, which was confirmed by immunohistochemistry. Furthermore, we found that the expression of FLNA is sustained in cultured human IVF-derived GCs, allowing us to explore its regulation and interaction partners. A regulation of FLNA by human chorionic gonadotropin (hCG) and forskolin was detected in cultured IVF-GCs. In addition, mass spectrometry (MS) and Western blot analysis indicated a regulation by hypoxia. Expression was also observed in KGN cells, a well-studied granulosa cell tumor cell line serving as a model for proliferating GCs. Similar to cultured IVF-GCs, FLNA expression was regulated by hCG and forskolin in KGN cells. To study the interaction partners of FLNA in GCs and KGNs we performed immunoprecipitation (IP) studies followed by MS. The interacting proteins identified in GCs include among others filamin B, cholesterol side-chain cleavage (CYP11A1), a crucial enzyme involved in steroidogenesis, as well as two mitochondrial associated proteins: heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8) and mitochondrial stress-70 protein (HSPA9). In KGN cells, in addition to filamin B, a different set of interaction partners was detected.

In conclusion, FLNA is expressed by cells of the human ovary, IVF-GCs and KGN cells. Initial results indicate that both cell types show similar regulation by forskolin and hCG. Yet different sets of interaction partners of FLNA were revealed by IP/MS. Further studies are required to define the roles of FLNA in the human ovary.

Grants: Supported by DFG project number 491030536.

PO 2.8

microRNA miR-29C regulated invasiveness and viability of endometrial cells *in vitro* by targeting CDK6 and COL4A2

M. Götte¹, T. Wentges¹, H. El-Shorafa¹, S. Schäfer¹, L. Kiesel¹, B. Greve¹

¹Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Endometriosis is a hormone-dependent disease characterized by ectopic growth of endometrial tissue outside the uterus, resulting in pain and reduced fertility in affected patients. Recent studies point at a role of microRNAs – small posttranscriptional regulators of gene expression – in the pathogenesis of endometriosis. Among these, miR-29c is downregulated in the ectopic endometrium. Previous studies suggest roles in regulating proliferation, apoptosis, invasion and progesterone resistance, but the molecular mechanisms are not fully clear.

Primary endometrial stroma cells of a 35yr ASRM stage III patient and immortalized endometrial 12Z cells were used for *in vitro* experiments following transfection with miRNA-29c or control reagent. Gene expression was analysed by real-time qPCR. Changes at the protein level were analysed by Western blotting. Cell migration was investigated by scratch wound healing assay, invasive growth by Matrigel assay and cell viability by MTT assay. The cell cycle was analyzed by flow cytometry.

In miR-29c transfected cells a down-regulation in the expression of TCFL-1, TCFL-2, PTEN, Col4A2 and CDK6 could be observed ($p < 0.01$). For CDK6, down-regulation could be confirmed by Western blotting. While there a significant difference couldn't be detected in scratch assays, a reduction in invasive growth of transfected cells by 40% could be observed in Matrigel assay ($p < 0.05$). Transfected cells also showed a reduced cell viability by 25% ($p < 0.01$).

Our data confirm an important role of miR-29c in regulating the viability and invasive growth of endometrial cells and expand the list of regulatory targets to several transcriptional regulators, regulators of proliferation and of basement membrane constituents. miR-29c emerges as a potential tool to modulate the pathogenesis of endometriosis.

PO 2.9

Impact of cytokines on pre-receptive gene expression and trophoblast adhesion in a novel 3D model of the window of implantation

M. Götte¹, U. Obermeyer¹, H. El-Shorafa¹, M. Heukamp¹, M. Franchi²

¹Universitätsklinikum Münster, Germany; ²University of Bologna, Italy

Endometrial receptivity is an important factor for successful embryo implantation. The endometrium is receptive during the window of implantation (WOI), where embryo adhesion and invagination can occur. This phenotype results from molecular changes in the endometrium, regarding ovarian hormones,

growth and transcription factors, lipids and cytokines. We recently established a novel 3D *in vitro* model for mimicking the human endometrium. Here, we evaluate the impact of defined cytokine stimulation on the expression of genes with relevance to the WOI. Furthermore, we study the influence on embryo implantation using trophoblast cell lines.

The 3D model of the endometrium was established using the immortalized stromal cell line ST-T1b on collagen coated 96well-plates as a stromal compartment. Subsequently this layer was coated with matrigel, followed by the addition of either Ishikawa or RL95 cells as the epithelial component. Cell morphology was studied by immunofluorescence microscopy and scanning electron microscopy. Cells were stimulated with the cytokines EGF, IGF and IL-6, respectively. Gene expression changes were studied by qPCR. Embryo implantation was studied measuring adhesion of spheroids generated from HTR8/Svno cells.

The stimulation of the 3D model with the cytokines resulted in complex changes in gene expression, with EGF being most effective. Notably cytokine stimulation influenced the number of attached spheroids: The cytokines IGF and IL6 significantly reduced spheroid attachment. The cytokine EGF enhanced spheroid attachment only in the Ishikawa model.

Our study demonstrates that EGF has a profound effect on the expression of genes relevant for the WOI in our *in vitro* model. With respect to embryo implantation, EGF, IGF and IL6 demonstrated differential effects. Overall, our study demonstrates the suitability of our novel *in vitro* model to study the impact of specific cytokines on gene expression changes and embryo implantation *in vitro*.

PO 2.10

Functional analysis of the histidine N-methyltransferase SETD3 in endometriosis

M. Götte¹, M. Poloczek¹, C. L. M. Ludwig², M. Pouttanen³, L. Kiesel¹, S. D. Schäfer¹, J. Weitzel²

¹Universitätsklinikum Münster, Germany; ²Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Germany; ³University of Turku, Finland

Endometriosis is associated with pain and reduced fertility. Here, we investigate the effects of alterations in the expression of SETD3, an actin-specific histidine N-methyltransferase, on cytoskeletal function and endometriotic cell motility.

SETD3 expression in human tissue was analyzed using EndometDB, and evaluated in the uteri of the superfertile Dummerstorf mouse line FL1 by qPCR. SETD3 function in human endometriotic 12Z and primary cells were studied using siRNA. Cell motility, contractility, invasiveness, morphology and gene expression were analyzed by rt-PCR, western blotting, immunofluorescence, scratch wound assay, collagen contraction assay and matrigel invasion assay, respectively.

SETD3 gene expression was slightly increased in deep endometriotic lesions, and downregulated 1.6-fold in the uteri of superfertile mice.

In vitro, immunofluorescence did not reveal major changes in cytoskeletal morphology. Only moderate changes in cytoskeletal element gene expression were observed, whereas SETD3 depletion resulted in a delay in cell motility in a scratch assay, in a reduction in invasiveness of 12Z cells, and in a reduced capability to contract collagen gels.

SETD3 affects invasive growth, cell motility and contractility of endometriotic cells *in vitro* and could be related to the pathogenesis of (deep) endometriosis. SETD3 downregulation in the uteri of superfertile mice may indicate a possible link to infertility.

PO 2.11

Role of the Musashi-Notch pathway in the pathogenesis of endometriosis

M. Götte¹, T. Strauß¹, N. Achmad¹, B. Greve¹, L. Kiesel¹, S. D. Schäfer¹

¹Universitätsklinikum Münster, Deutschland

The RNA-binding protein Musashi-1 is an important modulator of notch signaling, and it is overexpressed in endometriosis, a disease related to pain and infertility in women. Stem cells may promote the pathogenesis of the disease due to their unlimited replicative potential and high developmental plasticity. In this study, we aimed to investigate the role of both human Musashi homologues (MSI-1 and MSI-2) in the pathogenesis of endometriosis using an *in vitro* system.

Immortalized endometriotic 12-Z cells and primary endometriotic stroma cells were treated with Musashi-1- and Musashi-2-siRNA. Subsequently, the impact on cell proliferation, cell apoptosis, cell necrosis, spheroid formation, stem cell phenotype and the Notch signalling pathway was studied *in vitro*.

Musashi-1/2-double-knockdown increased apoptosis and necrosis and reduced stem cell gene expression, cell proliferation, and the formation of spheroids. Musashi silencing increased the expression of the anti-proliferation mediator p21.

Our findings suggest the therapeutic potential of targeting the Musashi-Notch axis. We conclude that the Musashi genes have an impact on Notch signalling and the pathogenesis of endometriosis through the downregulation of proliferation, stemness characteristics and the upregulation of apoptosis, necrosis and of the cell cycle regulator p21.

PO 2.12

Einfluss des Corpus-luteum-Peptids Relaxin auf die Eigenschaften humaner endometrialer Stromazellen

F. von Versen-Höyneck¹, S. Meier¹, C. Springer¹, K. Richter¹, B. Schröder-Heurich¹

¹Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland

Patientinnen, die sich einem Kryoembryotransfer in einem artifiziellen Zyklus unterziehen, haben im Vergleich zum Embryotransfer in einem natürlichen Zyklus ein doppelt so hohes Risiko für eine Präeklampsie.

Dies kann mit dem Fehlen des Gelbkörpers in einem artifiziellen Kryozyklus zusammenhängen, der in der Frühschwangerschaft wichtige Hormone wie Östrogen und Progesteron produziert. Diese Hormone werden während artifizieller Kryozyklen zugeführt, was bei anderen Produkten des Corpus luteum, wie z. B. Relaxin (RLX), nicht der Fall ist. Bei Frauen mit Spontankonzeption, die eine Präeklampsie entwickelten, wurden niedrige mütterliche Relaxinspiegel festgestellt. Der direkte Zusammenhang zwischen RLX und dem Auftreten einer Präeklampsie ist jedoch weitgehend ungeklärt. Wir gingen der Frage nach, ob RLX wichtige Faktoren, die in der Pathophysiologie der Präeklampsie bedeutsam sind, beeinflusst. Dazu haben wir die Dezidualisierung sowie die Freisetzung pro- und antiangiogener Faktoren durch primäre humane endometriale Stromazellen (hESC), primäre Dezidualzellen (pD) und hTERT-immortalisierte hESC (T hESC) untersucht.

Primäre hESC wurden aus Biopsien von Frauen ohne Endometriumphathologie isoliert, pD-Zellen aus Biopsien der Basalplatte der Plazenta unkomplizierter Schwangerschaften und T-hESCs wurden erworben (ATCC). Die Zellen wurden entweder mit 0,5 mM zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder einem Cocktail aus 10 nM Östradiol, 1 µM Progesteron und 0,5 mM cAMP (EPC) dezidualisiert und mit 0, 0,3 oder 1 ng/ml RLX behandelt. RNA wurde am Tag 0 und Tag 12 aus allen drei Zelltypen isoliert. mRNA-Expressionsniveaus von Dezidualisierungsmarkern (Prolaktin [PRL], Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1 [IGFBP1]) sowie pro- und antiangiogenen Faktoren (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor [VEGF]; plazentarer Wachstumsfaktor [PlGF]; lösliche Fms-ähnliche Tyrosinkinase-1 [sFlt-1] und Endoglin [ENG]) wurden durch quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) bestimmt, n = 3 biologische Replikate.

Während es in der cAMP-Behandlungsgruppe keinen Anstieg der Dezidualisierungsmarker PRL (p = 0,99) und IGFBP1 (p = 0,95) gab, zeigten hESC nach der EPC-Behandlung einen signifikanten Anstieg sowohl von PRL (p = 0,0003) als auch von IGFBP1 (p = 0,0001). Die RLX-Behandlung in den mit EPC behandelten hESC und pD erhöhte die mRNA-Expressionsniveaus von PRL und IGFBP1 (beide p < 0,05) sowie die Expression des proangiogenen Markers VEGF (p = 0,05). Eine vergleichende Analyse mit T hESC zeigte einen moderaten Effekt auf VEGF und PlGF. Für die IGFBP1- und PRL-mRNA-Expressionsniveaus wurde kein Effekt von RLX festgestellt. Das mRNA-Expressionsniveau des antiangiogenen Markers ENG stieg in der EPC-Gruppe sowohl in primären hESC (p = 0,04) als auch in T-hESC (p = 0,01) nach der Behandlung mit 0,3 ng/ml RLX im Vergleich zur Kontrolle. Das ENG-mRNA-Expressionsniveau stieg in pD dosisabhängig an, nicht jedoch in hESC und T hESC. Die RLX-Behandlung mit 1 ng/ml cAMP dezidualisierten hESC steigerte die mRNA-Expressionsniveaus von VEGF (p = 0,002) und PlGF (p = 0,02) nur in hESC, nicht jedoch in T hESC oder pD, signifikant.

Unsere Pilotstudie zeigt, dass RLX die Dezdualisierung verbessert und pro- und antiangiogene Faktoren in drei verschiedenen menschlichen endometrialen Stromazellmodellen beeinflusst. Unsere Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Studien, die den Zusammenhang zwischen niedrigen mütterlichen RLX-Werten und dem Auftreten einer Präeklampsie klären. Dies könnte zur Entwicklung verbesserter Vorhersagemodelle und neuer Behandlungsmöglichkeiten in der assistierten Reproduktion führen, die das Risiko einer Präeklampsie reduzieren, z. B. in künstlichen Kryozyklen.

PO 2.13

The Dummerstorf high-fertility mouse line 1 – a worldwide unique model for increased female reproductive performance

C. L. M. Ludwig¹, S. Bohleber², R. Lapp¹, A. Rebl¹, E. K. Wirth³, M. Langhammer¹, U. Schweizer², M. Michaelis¹, J. M. Weitzel¹

¹Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN); ²Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; ³Charité - Universitätsmedizin Berlin, Deutschland

The development and maturation of ovarian follicles is a complex and highly regulated process, which is essential for successful ovulation. During recent decades, several mouse models provided insights into the regulation of folliculogenesis. In contrast to the commonly used transgenic or knockout mouse models, the Dummerstorf high-fertility mouse line 1 (FL1) is a worldwide unique selection experiment for increased female reproductive performance. FL1 mice are selected for the litter size and the birth weight of the entire litter for more than 200 generations. During the selection process, FL1 mice almost doubled the number of pups per litter compared to the unselected control mouse line with no signs of growth retardation in the offspring.

To get insights into the cellular mechanisms leading to the high-fertility phenotype, granulosa cells were isolated from antral follicles and used for mRNA sequencing. To obtain a global picture of how the phenotype is achieved gonadotropins, growth factors and other hormones associated with follicular development were analyzed.

FL1 females are characterized by various alterations on endocrine and molecular levels, which have the potential to improve the follicular development. FSH and IGF1 levels are significantly decreased in FL1 females, LH levels are elevated. No differences were found in insulin, prolactin, and oxytocin levels in FL1 mice compared to the control mouse line. The results of the mRNA sequencing approach revealed that numerous genes, which are involved in important gonadotropin, apoptotic and metabolic signalling pathways in granulosa cells, are differentially expressed in granulosa cells of FL1 mice.

We showed that an overlap of different signalling pathways reflects the crosstalk between gonadotropin and growth factor signalling pathways, follicular atresia in FL1 mice is de-

creased due to improved granulosa cell survival and by improving the efficiency of intracellular signalling, glucose metabolism and signal transduction, FL1 mice have several advantages in reproductive performance and therefore almost doubled the number of ovulated oocytes. Thus, this worldwide unique mouse model can provide new insights into different factors leading to improved follicular development and has the potential to improve our understanding of high fertility. The understanding of these mechanisms and their interplay might be of fundamental interest for the understanding of proper fertility in human.

PO 2.14

Modelling the oviduct epithelium *in vitro*: oxygen level and media regime influence functional parameters of oviduct epithelial cells cultured at the air-liquid interface

J. Huo¹, J. Schoen¹, A. N. Eren¹, S. Chen¹

¹Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW), Berlin, Deutschland

The oviduct plays a critical role in reproduction as gamete storage and maturation, fertilization, and early embryonic development occur in its epithelium-lined luminal compartment. The oxygen (O₂) level within the oviduct is presumably crucial for maintaining a functional micro-environment for reproductive processes and is an often neglected variable when investigating oviduct functions through cell culture models. In line with this, lowering O₂ levels during *in vitro* embryo culture after IVF or ICSI has been shown to influence the embryonic phenotype and improve embryo quality in several species. To investigate the impact of divergent O₂ levels on oviduct epithelium functions *in vitro*, we cultured porcine oviduct epithelial cells (POEC) at the air-liquid interface (ALI) using two previously published media regimes and subjected them to reduced (5% O₂) and standard (not controlled, approx. 18% O₂) conditions in a humidified incubator maintained at 5% CO₂.

POEC (n = 5 donors) were cultured at the ALI for three weeks using a one-step (one medium during complete culture duration, 1S) and a two-step approach (divergent media for proliferation and maintenance phase of culture, 2S) under 5% or 18% O₂, respectively. The architecture of the epithelium (number of secretory cells, cellular height, and average diameter of cells) was analysed using histomorphometry. Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured to evaluate epithelial barrier formation. Protein concentration in the luminal fluid created by the epithelia (oviductal fluid surrogate, OFS) was determined by MicroBCA. OVGPI, a glycoprotein specifically secreted by the oviduct epithelium, was detected in the OFS via immunoblot. Additionally, RT-qPCR was applied to quantify the expression of oviduct-related marker genes, including mucins (MUC16, OVGPI), hormone receptors (PGR, ESR1) and proliferation markers (Ki67, PCNA).

Our findings revealed that ALI-cultured oviduct epithelial cells resembled tissue-like morphology (monolayer formation with columnar shaped ciliated and non-ciliated cells) and formed an appropriate epithelial barrier with moderate TEER (400–800 Ω·cm²) under all tested culture conditions. However, both the O₂ level and the media regime had pronounced effects on a) morphology (2S regime increased cell height, p < 0.01), b) cell composition (18% O₂ as well as 2S regime led to lower percentage of secretory cells, p < 0.05), c) production of OFS (higher volume and total protein amount under 18% O₂, p < 0.01) and OVGPI content in OFS (lower concentration under 2S regime, p < 0.05) and d) expression of hormone receptors (ESR1 reduced under 18% O₂ [p < 0.05] as well as 2S regime [p < 0.01]).

These results highlight the impact of culture conditions on functional characteristics of oviduct epithelial cells *in vitro*, which potentially influence the outcome and reproducibility of experiments employing these culture systems. O₂ availability is an often-neglected variable in cell culture procedures. To date, 5% CO₂ and atmospheric O₂ are the standard conditions employed for the vast majority of cell cultures. The actual O₂ availability for the cultured cells and its comparability with the „normoxic“ range of the specific cellular environment *in vivo* are often still overlooked.

PO 2.15

Näher an der Realität – Proteomveränderungen durch Endometriales Scratching bei fertilen Frauen

I. Scheliga¹, D. Baston-Büst¹, J.-S. Krüssel¹, A. Bielfeld¹

¹Universitätsklinikum Düsseldorf UKD, Deutschland

Das Endometriale Scratching (ES) ist seit seiner Einführung ein viel diskutiertes Verfahren in der assistierten Reproduktion (ART), durch welches möglicherweise die Schwangerschaftsrate verbessert werden kann. Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch bis heute unzureichend erforscht. Es wird vermutet, dass das ES durch die oberflächliche Verletzung der sekretorischen Gebärmutter-schleimhaut eine lokale Immunreaktion auslöst, die zu einer verbesserten Rezeptivität führt. Bisher haben Studien gezeigt, dass das ES die Genexpression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteinen beeinflusst, wodurch möglicherweise Immunantworten und die Expression von Adhäsionsmolekülen moduliert werden. Die größte Einschränkung der aktuellen Studienlage ist, dass der Wirkmechanismus bisher noch nie im Endometrium von fertilen Frauen untersucht wurde. Das Ziel dieser Studie war es deshalb, die Veränderungen im Endometrium von fertilen Frauen, die durch das ES ausgelöst werden, auf Proteinebene zu untersuchen, um einen Erklärungsansatz zu finden, warum diese Technik ggfs. zu einer Verbesserung der Schwangerschaftsrate vor ART führt.

Insgesamt wurde von 10 fertilen Frauen das Proteom des Endometriums analysiert und mit einer Follow-up-Scratching-Biopsie 28

Tage später verglichen. Das ES erfolgte bei den Probandinnen während des Implantationsfensters, da dies im Allgemeinen der Zeitraum zwischen dem Eingriff und dem Embryotransfer bei ART-Patienten ist.

Die vorliegende Proteomanalyse zeigte, dass das ES einen Einfluss auf Proteine hat, die an der Immunantwort und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind, was folglich die endometriale Rezeptivität erhöhen könnte. Insbesondere zeigte sich der Trend zur Hochregulation bei Proteinen wie Lactoferrin (LTF), welches bei der angeborenen Immunantwort involviert ist. Andererseits konnte ein Trend zur Herabregulation von Proteinen beobachtet werden, die eine Rolle bei der Regulierung des Aktinzytoskeletts und bei zellulären Prozessen wie dem intrazellulären Transport, der Apoptose und der Autophagie spielen, beispielsweise Prothymosin alpha (PTMA). Diese Proteinveränderungen deuten darauf hin, dass das ES die Konstitution des endometrialen Gewebes und den Umbau der extrazellulären Matrix beeinflussen könnte, wodurch die Einnistung der Embryonen möglicherweise gefördert wird.

Soweit wir wissen, liefert diese Studie zum ersten Mal Daten zur Untersuchung von Veränderungen im Endometrium aufgrund des Scratching-Verfahrens, die dessen möglichen Nutzen für Patientinnen bei der ART-Behandlung erklären könnten.

PO 2.16

Reproduktive Gesundheit nach Krebserkrankung – Ergebnisse einer Befragungsstudie mit standardisiertem Fragebogen nach Fertilitätsprotektion nach Kryokonservierung von Ovargewebe oder Oozyten

D. Madej¹, J. Schaar¹, P. Wimberger¹, M. Goeckenjan¹

¹Technische Universität Dresden, Universitätsklinikum Carus Gustav Carus, Deutschland

Heute haben junge Patientinnen mit onkologischen Erkrankungen durch Fortschritte in Diagnostik und Therapie eine hohe Lebenserwartung, so dass Kinderwunsch und Familienplanung zum Leben nach Krebserkrankung dazugehören. Die Krebstherapie kann sich direkt oder indirekt auf die reproduktive und psychosexuelle Gesundheit auswirken. Sorgen bezüglich Fruchtbarkeit und Familienplanung kommen bei jungen Krebsüberlebenden häufig vor, wurden bisher jedoch im Verlauf nicht detailliert untersucht.

Eingeschlossen wurden alle Patientinnen, bei denen von 2005–2019 an einem Universitäts-Kinderwunschzentrum eine Kryokonservierung von Ovargewebe und/oder Oozyten vor einer gonadotoxischen Therapie durchgeführt wurde. Von den 98 Krebsüberlebenden, die im Zeitraum zwischen 10/2021 und 06/2022 kontaktierbar waren, konnten 91 Frauen für eine telefonische Befragung eingeschlossen werden (92,9 %). Die Sorgen bezüglich reproduktiver Gesundheit wurden anhand des RCAC-Scores („Reproductive Concerns After Cancer“) standardisiert erhoben und ausgewertet. Der RCAC-Score

beinhaltet sechs Subkategorien (Subskalen) der Einstellung zu 1. Fruchtbarkeitspotenzial, 2. Offenheit gegenüber dem Partner, 3. Kindesgesundheit, 4. persönlicher Gesundheit, 5. Akzeptanz der Unfruchtbarkeit und 6. Schwangerschaft. Die Subskalen-RCAC-Scores sowie der Gesamt-RCAC-Score liegen zwischen 1 und 5, wobei höhere Werte auf größere Sorgen und Ängste hinweisen. Mögliche Zusammenhänge zwischen dem RCAC-Score und demographischen Daten, Krebserkrankung und -therapie, sozialer und reproduktiver Anamnese sowie dem Mental-Health-Inventory-5 (MHI-5-) Score wurden ausgewertet und statistisch analysiert.

Das Durchschnittsalter bei Befragung betrug $34,2 \pm 6,8$ Jahre. Die häufigste Erkrankung war Mammakarzinom ($n = 42, 46,2 \%$), gefolgt von Lymphomen ($n = 34, 37,4 \%$) und anderen Krebsarten ($n = 15, 16,5 \%$). Ovargewebe wurde bei 79 Frauen (86,8 %) und Oozyten bei 13 Frauen (15,5 %) kryokonserviert. Bei einer Patientin wurden sowohl Oozyten als auch Ovargewebe konserviert. Bis zum Studienschluss verwendeten 9 Frauen (9,9 %) das kryokonservierte Gewebe und insgesamt 31 Frauen (34,1 %) wurden schwanger. 55 Frauen (60,4 %) äußerten einen starken aktuellen Kinderwunsch. Der mittlere RCAC-Gesamtwert betrug $2,4 \pm 0,7$, wobei die mittleren Subskalenwerte zwischen $1,8 \pm 1,0$ („Offenheit gegenüber dem Partner“) und $2,8 \pm 1,2$ („Fruchtbarkeitspotenzial“) lagen. Die multivariable Regressionsanalyse identifizierte zwei unabhängige Variablen, die mit höherem RCAC-Gesamtwert assoziiert waren: ausgeprägter Kinderwunsch ($\beta = 0,20$; Standardfehler [SE] = $0,07$; $p = 0,002$) und erhöhter MHI-5 Score ($\beta = 0,13$; SE = $0,61$; $p = 0,037$). Ein niedrigerer RCAC-Gesamtwert war unabhängig mit „Schwangerschaft nach Krebs“ assoziiert ($\beta = -0,37$; SE = $0,07$; $p < 0,001$). Feste Partnerschaft wirkte sich positiv auf den RCAC-Subscore „Akzeptanz der Unfruchtbarkeit“ aus ($\beta = -0,26$; SE = $0,12$; $p = 0,029$). Das Alter der Patientinnen sowohl zum Zeitpunkt der Diagnose als auch zum Zeitpunkt der Befragung, Krebsart und -behandlung, beruflicher Status und andere demographische Merkmale zeigten keine statistisch signifikante Assoziation mit dem RCAC-Gesamtwert oder RCAC-Subscores.

Fertilitätsprotektion mit Kryokonservierung von Ovargewebe oder Oozyten führte zu einem günstigeren RCAC-Score, als in früheren Studien ohne standardisierte Beratung zu Fertilitätsprotektion nachgewiesen wurde. Stärkere reproduktive Sorgen (höherer RCAC-Wert) waren mit einem höheren Risiko für psychische Störungen wie Depressionen und Angststörungen, gemessen mit standardisiertem Kurzfragebogen MHI-5, assoziiert. Bei 34 % der Frauen kam es nach Krebserkrankung zu Schwangerschaften, diese Frauen wiesen einen signifikant niedrigeren RCAC-Wert im Fragebogen auf. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Beratung zur Fertilitätsprotektion vor gonadotoxischer Therapie und deren langfristige positive Auswirkungen auf die Lebensqualität von Frauen nach Krebserkrankung.

PO 2.17

Do different protocols for endometrial preparation before frozen embryo transfer (FET) have different pregnancy or birth rates?

M. Amrani¹, W. Willem², J. Limberg³, R. Seufert³, C. Skala²

¹TFP Kinderwunschzentrum Wiesbaden und Universitätsmedizin Mainz; ²Johannes-Gutenberg-Universität Mainz;

³TFP Kinderwunschzentrum Wiesbaden, Deutschland

A proliferated and secretorily converted endometrium is required for a FET. This can be achieved with or without ovulation. Hormon replacement treatment (HRT) dispenses with ovulation, instead focusing on endometrium proliferation. In the modified natural or mildly stimulated cycle, transfer depends on ovulation and the resulting implantation window. To date, the optimal choice for a corresponding procedure has not yet been proofed. Often, HRT cycles are chosen for better timing of thawing and transfer. However, there are increasing indications that the presence of the corpus luteum has other important functions for the maintenance and progress of pregnancy in addition to its hormone secretion.

It was an anonymous retrospective, explorative, monocentric, observational study in 2021. Data collection was performed in accordance with ethical standards of TFP, University of Mainz, the Helsinki declaration and its amendments or comparable ethical standards. Between 2015 and 2020, 1382 patients received a first FET. After anonymization FETs were sorted by protocol. Target parameters were pregnancy and birth rate. Additionally, age, BMI, length of infertility, sonographic thickness of endometrium, number, and grading of embryos, as well as progesterone administration in NC and SC protocol were descriptively evaluated. The treatment effect was evaluated with logistic regression, specifying the odds ratio, the confidence interval, and the p-value. Level of significance was $\alpha = 0.05$.

Pregnancy and birth rate was for 197 NC 27.9 % (55) and 67.3 % (37), for 725 SC 29.0 % (210) and 67.1 % (141), and 458 HRT cycles 33.2% (152) and 52.0% (79). Mean age was 34.8, 35.2 and 33.8 years. The mean BMI was 23.1, 22.9 and 23.5 kg/m² and the mean length of the infertility was 3.9, 3.5 and 3.5 years. The mean endometrial thickness before the start of the secretory phase was measured at 8.8, 9.5 and 9.4 mm. The average number of embryos transferred was 1.7, 1.8, 1.8 and the mean proportion of A-grading embryos was 40.0, 48.1 and 46.7%. Progesterone was given in an average of 83.2 and 38.5% cases, respectively. The calculated odds ratios with 95% confidence interval (CI) and the p-value for the clinical pregnancy rate between protocol NC and SC were 1.053 (0.742–1.494) and $p = 0.773$, between protocol NC and HRT 1.282 (0.888–1.851) and $p = 0.183$ and between protocol SC and HRT 1.218 (0.947–1.568) and $p = 0.125$. The calculated values were for birth between protocol 1 and 2 of 0.994 (0.528–1.871) and $p = 0.985$, between protocol 1 and 3 of 0.526 (0.276–1.005) and $p = 0.052$ and between protocol 2 and 3 of 0.530 (0.345–0.813) and $p = 0.004$.

Modified natural cycle (NC) or mild stimulation (SC) appear to be associated with a higher birth rate than hormone replacement therapy (HRT) for FET. Since endometrial preparation with ovulation could have a positive effect on the course of pregnancy after FET, the HRT protocol should be reserved for patients with cycles that are difficult to stimulate. These individual ovulation-oriented FET treatments could result in organizational and personal consequences for practices and clinics.

PO 2.18

Überprüfung der individuellen endometrialen Rezeptivität im programmierten vs. natürlichen Zyklus

P. Edimiris¹, D. M. Baston-Büst¹, A. P. Bielfeld¹, J.-S. Krüssel¹
¹Uniklinik Düsseldorf, Deutschland

Trotz enormer Fortschritte in der assistierten Reproduktion in den letzten Jahrzehnten leiden immer noch etwa 5–10 % der Patientinnen unter wiederholtem Implantationsversagen. Als eine der möglichen Ursachen wird ein individuell verschobenes Implantationszeitfenster („window of implantation“, WOI) diskutiert. Im Jahr 2011 wurde ein Test zur Untersuchung der individuellen endometrialen Rezeptivität auf Grundlage einer Genexpressionsanalyse des Endometriums eingeführt (ERA[®], Igenomix). Er bestimmt die personalisierte Dauer der Progesteron-Exposition, die erforderlich ist, um einen rezeptiven Status im Endometrium zu erreichen, um den Embryo in einem Kryozyklus einzusetzen. Vergleicht man den Anteil der Patientinnen mit verschobener endometrialer Rezeptivität innerhalb der zu diesem Thema veröffentlichten Studien, so zeigt sich eine große Streuung zwischen 18 % und 85 %, wobei häufig nicht unterschieden wird, ob der Test in einem programmierten oder natürlichen Zyklus durchgeführt wurde. Der Modus des Kryotransfers hat sich in den letzten Jahren aufgrund des nachgewiesenen positiven Einflusses eines vorhandenen Corpus luteum vom komplett programmierten Zyklus hin zu einem natürlichen Zyklus mit oder ohne Ovulationsinduktion und mit oder ohne Lutealphasensubstitution verändert. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb zu untersuchen, ob die endometriale Rezeptivität derselben Patientin sich im programmierten im Vergleich zum natürlichen Kryozyklus unterscheidet.

Dies ist eine retrospektive Analyse im Zeitraum 2016–2023 am universitären interdisziplinären Kinderwunschzentrum Düsseldorf (UniKiD). Untersucht wurden 9 Patientinnen, bei denen der Test zur Bestimmung der individuellen endometrialen Rezeptivität sowohl im programmierten wie auch im natürlichen Kryozyklus durchgeführt wurde. Es wurden die Häufigkeit der Verschiebung und die Streuung der endometrialen Rezeptivität analysiert.

Im programmierten Zyklus zeigte sich bei 66 % (6/9) der Patientinnen ein prärezeptives Endometrium, wobei die Verschiebung bei 12 Stunden (n = 2), 24 Stunden (n = 3) und 47 Stunden (n = 1) lag. Die gleichen Patientin-

nen hatten im natürlichen Kryozyklus nur in 22 % (2/9) ein verschobenes WOI. Eine der Patientinnen war postrezeptiv, d. h. das WOI lag 12 Stunden vor der Biopsie. Das WOI der anderen Patientin war prärezeptiv um 12 Stunden verschoben.

Die endometriale Rezeptivität ist im programmierten Zyklus im Vergleich zum natürlichen Zyklus deutlich häufiger verschoben und zeigt eine breitere Streuung. Möglicherweise wird durch die Anwendung des programmierten Kryozyklus iatrogen eine reduzierte/pathologische endometriale Rezeptivität verursacht und damit das reproduktive Outcome verringert. Bei konsequentem Einsatz des natürlichen Kryozyklus kann somit nicht nur die Häufigkeit der verschobenen endometrialen Rezeptivität verringert, sondern möglicherweise auch das reproduktive Outcome verbessert werden.

PO 3.1

Nanoparticle tracking analysis for monitoring exosome secretion from an immortalized ovarian granulosa cell model

S. Oehms¹, S. Fayezi¹, T. Strowitzki¹, A. Germeyer¹
¹Frauenklinik der Universitätsklinik Heidelberg, Deutschland

Exosomes are extracellular vesicles that originate from inside cells. These particles are enclosed by lipid membranes and are identified by vesicle size and endosomal marker expression. Exosomes are representative of their cellular origins and are heterogeneous at multiple levels. Unique technologies have recently been designed to measure specific physical aspects of exosomes in biological fluids. Fundamentally, reproduction is a multicellular, multiorgan process. In the main stages of female reproduction, the granulosa cells surrounding the oocytes coordinate the ovary, uterus, and brain, which might be partly via exosomal secretion. Characterization of the secreted particles provides a means to study their functions.

We cultured the line of immortalized granulosa cells (COV434) that was originally obtained and established from a 27-year-old female patient with ovarian carcinoma. We isolated exosomes from the conditioned medium using repeated centrifugation and ultracentrifugation. All samples were measured three times with five replicates with nanoparticle tracking analysis (NTA). Using a particle tracking analyzer, we assessed multiple physical parameters, including particle concentration and particle size distribution. A microfluidic pump was set so that the exosomes could traverse the measurement area in 10 s at 25 °C. The analyzer software visualized the Brownian motion of nanoparticles in real time to measure particle size and calculate particle concentration. Additionally, exosomal membrane markers were confirmed with western blotting analysis. Electron microscopy was used to examine the ultrastructural morphology of the particles.

We introduced a workflow for the rapid isolation and characterization of intact exosomes from granulosa cell cultures in an *in vitro*

model using COV434 cells. The marker CD81 was present in exosomes derived from the cells. We then visualized and enumerated exosomes isolated from the cells' 18 h-conditioned medium. The particles were seen to be spherical in visual analysis with a transmission electron microscope. With NTA the mean mode of particle size was 84 nm, on average 90% of particles were 240 nm or smaller. The granulosa COV434 cell model cells shed exosomes at a rate of 200–250 per cell per hour.

Nanoparticle tracking analysis can rapidly screen granulosa cell models with respect to the size and concentration of exosomes. Our reproducible workflow using an experimental cell model facilitates testing exosomes for clinical application in reproduction. The value of the reported exosome parameters for additional applications, such as biomarkers and transporters, should be tested.

PO 3.2

Association between early embryo morphological assessment and pregnancy rate

D. Makri¹, C. Ori¹, L. Sela¹, S. Mahner¹, C. J. Thaler¹,
V. von Schönfeldt¹
¹LMU Klinikum, Deutschland

Prolonged *in vitro* culture allows for morphological analysis to select the most competent embryo(s) for transfer on Day 5. In certain cases Day 3 embryo transfers are carried out, mainly when the outcome from stimulation and/or fertilization is poor. In these patients, early markers of quality and viability are needed to facilitate embryo selection. The use of timelapse systems allows for the application of Early-Embryo-Viability-Assessment (EEVA) criteria for early embryo selection in d3 transfers.

This is a retrospective data analysis from assisted reproduction cycles carried out in LMU „Hormon- und Kinderwunschzentrum“ between 2018 and the first trimester of 2022. A total of 104 ICSI fresh d3 single embryo transfers were included. Patients with suboptimal response (≤ 5 mature oocytes after stimulation) undergoing ICSI were selected for d3 transfer (average age 38). The EmbryoScope™ system was used for morphokinetic evaluation and grouping of embryos into EEVA⁺ (second division 9–11 hrs from first AND third division 2hrs later) and EEVA⁻ (division timings not met) embryos. Chi-squared analysis was performed to compare the pregnancy (P) and non-pregnancy (NP) groups in relation to the transfer of an EEVA⁺ or EEVA⁻ embryo.

From the 104 cycles, 18 led to a positive pregnancy test and 86 were negative resulting in an overall pregnancy rate of 17%. In the P group, 15 embryos were EEVA⁺ by the time of transfer (83%) and 3 were EEVA⁻ (17%). In the NP-group, 17 EEVA⁺ (20%) and 69 EEVA⁻ (80%) embryos were transferred. The number of EEVA⁺ embryos in the P-group was significantly higher compared to the number of EEVA-embryos ($p < 0.0001$). Additionally, the frequency of EEVA⁻ in the NP group was

significantly higher compared to the number of EEVA⁺ embryos ($p < 0.0001$).

The application of early morphokinetic markers to select embryos for d3 transfer is an effective strategy to improve the success rates in assisted reproduction technology cycles. In patients where the number of fertilized embryos is low could benefit from this strategy, since the best embryos can be identified and transferred as early as Day 3, thus avoiding the negative effects of extended in vitro culture without compromising pregnancy rates. Application of the EEVA criteria for d3 transfers significantly improves pregnancy rates while limiting the culture time *in vitro*.

PO 3.3

Nicotinic receptor alpha 7 in the human ovary and cultured granulosa cells

P. Seßenhausen¹, K. Eubler¹, N. Kreitmair¹, U. Berg², D. Berg², A. Mayerhofer¹

¹Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU); ²Fertility Centre A.R.T., Deutschland

Nicotinic receptor alpha 7, encoded by CHRNA7, is best known for roles in fast synaptic transmission of nerve cells, but it is also found in several non-neuronal cells. We recently found expression in mouse ovary, mainly in stroma cells and macrophages, but also oocytes (Seßenhausen et al., in revision). The ovarian consequences in *Chrna7* receptor-knockout mice (e. g. lower primordial follicles, macrophage and stroma cell alteration and proteomic changes) indicate several roles in female gonadal functions, including follicle development. The ligands of this receptor, acetylcholine and choline, are present in the human ovary and according to human ovary single cell RNA-seq data [Human protein Atlas; https://www.proteinatlas.org/EN-SG00000175344-CHRNA7/single+cell+type/ovary_07/23/2023; Zhang et al. 2018] CHRNA7 is expressed by several ovarian cells (e. g. stromal cells, oocytes), but in striking contrast to the mouse ovary, human CHRNA7 is readily found in granulosa cells (GCs) of ovarian follicles. Roles of CHRNA7 are associated with several cellular functions including anti-inflammatory responses. To study possible roles within the human ovary, we reasoned that cultured IVF-derived human GCs may be instructive. They stem from the preovulatory follicle and undergo luteinization in cultures and are therefore a model for the large follicle and the CL.

Immunohistochemical staining was performed to verify CHRNA7 expression in human ovary. IVF-derived human GCs were cultured for 5 days and receptor expression, as well as the human-specific variant of CHRNA7, CHRFA7A, were examined using qPCR and/or immunocytochemistry and Western Blot. To investigate possible regulation by gonadotropins, GCs (culture day 3) were treated with either human chorionic gonadotropin (hCG; 10 IU/ml) or forskolin (a potent cAMP activator; 50 μ M) for 24h. Since CHRNA7 is associated with anti-inflammatory responses, GCs were treated with

either LPS to induce inflammation (10 μ g/ml), the selective alpha7 agonist PNU 282987 (10 μ M), or both for 24h. Results were quantified using qPCR and ELISA.

Immunohistochemistry confirmed CHRNA7 in human ovarian GCs and the CL. Expression levels of CHRNA7 varied during culture period of GCs, with the highest expression level detected on culture day 3, when GCs are vital and fully functional. Western Blot and immunofluorescence confirmed the expression.

CHRNA7 expression was not affected by hCG or forskolin. We found that PNU 282987 significantly reduced the LPS-induced IL6/IL8 production, implicating CHRNA7 in immunological events. Of note, CHRFA7A, was also detected in GCs, although less abundant than CHRNA7. Further studies are required to examine its role as a possible inhibitor of CHRNA7-mediated actions.

Although preliminary, the results demonstrate expression of CHRNA7 in the human ovary and indicate a role of CHRNA7 in the regulation of GCs functions. Additional studies are currently being conducted to examine the involvement of this channel in ovarian function.

Grants: Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), project number 4324342.

PO 3.4

Stimulatory potential of granulosa cell-derived exosomes on endometrial stromal cell proliferation

H. Wolff von Gudenberg¹, S. Fayezi¹, J. Jauckus¹, T. Strowitzki¹, A. Germeyer¹

¹Universitätsfrauenklinik Heidelberg, Deutschland

Following decidualization, the ability of the blastocyst to implant in the endometrium is limited to a brief period called the implantation window. This phase of the endometrium begins immediately after the release of the granulosa cell-oocyte complex and its constituents. This study aims to characterize the lipid composition of exosomes secreted from granulosa cells and to investigate the impact of the exosomes on the endometrium, focusing on potential effects on endometrial proliferation during the implantation window.

The human ovarian granulosa cell line COV434 was used as the cell model oocyte surrounding cells. To model the endometrium, immortalized human endometrial stromal cells (t-HESC) were employed. Exosomes were obtained from the conditioned media of COV434 cells after 18–24 hours of culture, utilizing serial centrifugation and ultracentrifugation techniques and characterized by nanoparticle tracking analysis. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to investigate the lipidome profiles of isolated exosomes. t-HESCs were cultured and incubated with exosomes derived from COV434 cells for 48 hours. A cell viability test using WST-8 reagent was then conducted in five replicates to evaluate the proliferation rate.

The most abundant lipids in the isolated exosomes were as follows: free chole-

sterol (42.27%), ester phosphatidylcholine (18.83%), triglyceride (7.22%), sphingomyelin (7.01%), phosphatidylserine (4.74%), and ester phosphatidylethanolamine (4.55%). Treatment with exosomes from COV434 cells resulted in a statistically significant but modest effect size, with a 11% increase in proliferation compared to the untreated condition ($p = 0.013$).

The hypothesis posits that the secreted particles of the granulosa cell-oocyte complex, as represented by COV434 exosomes in this experiment, contain diverse bioactive lipid components and might impact the cell proliferation of the uterus during the implantation window. These findings could hold significant implications for in vitro fertilization treatments, where the cumulus-oocyte complex and its surrounding fluid are typically removed.

PO 3.5

Bewertung der Inzidenz von totalem Fertilisationsversagen (TFV) nach konventioneller IVF (cIVF) und dem Ergebnis nachfolgender Zyklen mit intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)

L. Nanassy¹, B. Schöpfer¹, M. Depenbusch¹, A. Schultze-Mosgau¹, T. K. Eggersmann¹, R. A. F. Hiller¹, G. Griesinger¹

¹Universitäres Kinderwunschzentrum Lübeck, Deutschland

TFV nach einer cIVF ist ein verheerendes Ergebnis für Patientinnen und Ärzte und die Angst davor ist vermutlich eine der Hauptursachen für die übermäßige Anwendung von ICSI. Die ESHRE bewertet das TFV nach einer cIVF als Qualitätsindikator und legt einen Inzidenzwert von $< 5\%$ fest. Daten zum TFV in einer nicht selektierten Population sind allerdings nur aus einer Zeit verfügbar, in der ICSI noch nicht angewendet wurde und zeigten eine höhere Rate. Wir untersuchten die Inzidenz von TFV und bewerteten die Wahrscheinlichkeit einer Lebendgeburt nach einem solchen Ereignis im ersten Behandlungszyklus.

Für den Zeitraum 2010–2021 wurde eine monozentrische retrospektive Datenerhebung durchgeführt, um alle Zyklen zu identifizieren, in denen die cIVF nicht zu mindestens einer Eizelle mit ≥ 2 Vorkernen führte. Außerdem wurden solche Patientinnen ausgewählt, bei denen im ersten Zyklus mehr als 2 Eizellen entnommen wurden und die Behandlung mit ICSI als Befruchtungsmethode in den nachfolgenden Zyklen fortsetzten. Für den untersuchten Zeitraum wurden 5772 initiierte IVF-Zyklen identifiziert. Das Kriterium für die Anwendung einer cIVF war das Vorliegen einer Normozoospermie beim Partner und wurde als Befruchtungsmethode in 1001 (17,3 %) Zyklen angewendet. Alle Fälle mit TFV nach einer cIVF wurden ermittelt und die Anzahl der Eizellen, der Rang des Zyklus, das Alter der Frau und das Ergebnis der Folge-Zyklen, falls vorhanden, aufgezeichnet. Die Daten wurden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert, $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft.

Von den 1001 cIVF-Zyklen wurden insgesamt 125 TFF-Zyklen identifiziert (12,49 %). Eine signifikant höhere Häufigkeit von TFF wurde in Zyklen beobachtet, in denen < 3 Eizellen entnommen wurden, im Vergleich zu solchen mit > 2 Eizellen (38/99 [38,38 %] vs. 87/902 [9,65 %], $p < 0,001$). Es wurde kein statistischer Unterschied zwischen dem Risiko für das Auftreten von TFF im ersten, zweiten oder dritten cIVF-Zyklus festgestellt (87/664 [13,10 %], 30/224 [13,39 %], 5/75 [6,67 %]; $p > 0,05$). Die Unterschiede blieben nicht-signifikant, wenn nur Zyklen mit > 2 Eizellen analysiert wurden (67/608 [11,02 %], 16/199 [8,04 %], 4/68 [5,88 %]; $p > 0,05$). Außerdem zeigten verschiedene Altersgruppen eine ähnliche Inzidenz von TFF (16/157 [10,19 %], 41/362 [11,33 %], 54/381 [14,17 %] und 14/101 [13,86 %] im Alter von < 30, 31–35, 36–40 bzw. > 40 Jahren; $p > 0,05$). Insgesamt wurden 56 Patientinnen identifiziert, die ihre Behandlung mit ICSI als Befruchtungsmethode in den nachfolgenden Zyklen fortsetzten. Diese Patientinnen absolvierten 101 Zyklen, in denen es zu 3 TFF-Fällen (3 %) und einer Befruchtungsrates von 75,1 % (524/698) kam, welche signifikant über unserer durchschnittlichen ICSI-Befruchtungsrates lag (70,9 % [25231/35568]; $p < 0,05$). Bei 19 dieser 56 Patientinnen (33,9 %) führte die Fortsetzung der Behandlung zu mindestens einer Lebendgeburt.

Variationen in der TFF-Inzidenz zwischen IVF-Zentren beruhen wahrscheinlich auf den jeweiligen Selektionskriterien (z. B. Patientenmerkmale und die Behandlungsart wie z. B. PGT-A) für die Wahl der Befruchtungsmethode. Es wird empfohlen, dass Laboratorien auf der Grundlage ihrer eigenen Daten eigene Benchmark-Werte für die Inzidenz von TFF festlegen. Frühere Studien identifizierten die Serumspiegel des luteinisierenden Hormons und des Progesterons bei Auslösung und die Anzahl der Eizellen als kritische Prädiktoren für TFF. Die ähnliche Wahrscheinlichkeit von TFF nach vorangegangener erfolgreicher Befruchtung deutet darauf hin, dass weibliche Faktoren stärker an TFF beteiligt sind. Akzeptable Lebendgeburtenraten können durch Fortsetzung der Behandlung erreicht werden.

PO 3.6

Multinucleation is not equal to Multinucleation: A time-lapse analysis about multinucleation and its impact on ART outcomes

C. Staib¹, J. Westermann¹, A. Woehl Wenigerkind¹, M. Schwab¹

¹Universitäts-Frauenklinik Würzburg, Deutschland

The effects of multinucleation on embryo development and on clinical outcomes are still unclear. In some studies, multinucleation has been associated with low embryonic development, low implantation potential and higher number of aneuploid embryos. Some other studies have observed that multinucleation is equally present in euploid and aneuploid embryos. Finally, there still is a debate about transferring multinucleated embryos. The objective of this retrospective study was to describe, using time-lapse embryo culture,

how the descriptive morphological criterion of nucleation at the 2- and 4-cell stage embryo predicts the outcome of ART cycles.

Kinetic data and cycle outcomes from fresh and frozen IVF and ICSI cycles were analyzed retrospectively from embryos cultured in an EmbryoScope (Vitrolife®) incubator. Timing of specific events was determined using time-lapse imaging and the EmbryoViewer® software. In our analysis we differentiated between different forms of multinucleation: binucleation, cluster-, micro- and polynucleation.

A total of 1499 embryos transferred on day 5 in fresh and frozen cycles were analyzed. We found mononucleation in 39% embryos and a form of multinucleation in 55% of the embryos, 6% of the embryos were excluded. Within the multinucleated cells we found binucleation, clusternucleation, micronucleation and polynucleation. The incidence of the different forms of multinucleation had significant impact on KIDScore, implantation rates and live birth rates.

These data provide us with a new perspective on multinucleation: Multinucleation is not equal to multinucleation. We suggest using the options time-lapse imaging gives us for a much closer look on the embryos to value the implantation potential of our ART embryos.

PO 3.7

Slow-freezing versus Vitrification in 2 PN-stage zygotes

C. Ori¹, D. Makri¹, A. Honke¹, N. Rogenhofer¹, C. J. Thaler¹, V. von Schönfeldt¹

¹LMU Klinikum, Deutschland

Cryopreservation of human gametes and embryos is routinely performed in assisted reproductive technologies (ART). Additionally, to oocyte cryopreservation for social freezing and fertility preservation approaches, surplus blastocysts exceeding the number intended for subsequent embryo transfer are usually frozen. However, the restrictions of the German Embryo Protection Law (ESchG) also necessitate cryopreservation methods that ensure optimal survival, subsequent early embryo development and clinical outcomes of 2PN-stage zygotes. Currently, vitrification (VIT) is the state of art method, since rapid cooling and warming processes prevent ice crystal formation during freezing and thawing; also, it does not require expensive equipment and is faster in comparison to the traditional slow freezing approach. These advantages, in addition to recent concerns about the long-term availability of suitable slow-freeze media, have prompted us to consider switching to VIT as a routine technique also for the cryopreservation of 2PN-stages. However, since largescale cryopreservation of zygotes is almost exclusively performed in Germany, data comparing VIT and slow-freeze approaches are scarce.

Here, we compare the two cryopreservation approaches with respect to post thaw viability, blastocyst formation and implantation rates in 213 frozen-thawed embryo transfer cycles following in vitro fertilization (IVF) or in-

tracytoplasmic sperm injection (ICSI) at our IVF-center, with the aim to prove non-inferiority of VIT-warming procedures applied to 2PN-stage.

The survival rates of the 2PN-stages were 89.5% after slow-freezing and thawing and 95.5%, respectively, after VIT-warming. Furthermore, we analyzed the blastocyst formation rates upon thawing and observed that 43% of the zygotes blastulated after slow-freezing and 39% following VIT. Due to our rather restrictive transfer policy, we transferred an average 1.42 embryos in slow-freeze group compared to 1.29 embryos per transfer in the VIT-group. The overall implantation rate of single embryo transfers (SETs) reached 27.7% after slow-freezing and 36.6% after VIT.

Cryopreservation of zygotes has routinely been performed for over 20 years. VIT approaches have been proven to be safe and efficient for gametes as well as for embryos in all stages of early development. We have shown that our switch from slow-freezing to VIT for 2PN-stage zygotes has yielded similar results in our setting and did not negatively affect the embryological and clinical outcomes.

PO 3.8

The composition of the vaginal microbiome in women undergoing frozen thawed embryo transfer cycles in IVF: a prospective cohort study

S. Graspeuntner¹, M. Lupatsch¹, K. Neumann¹, A. Masuch¹, M. Depenbusch¹, A. Schultze-Mosgau¹, T. K. Eggersmann¹, J. Rupp¹, G. Griesinger¹

¹Universität zu Lübeck, Deutschland

Clinical studies have reported a reduced likelihood for embryo implantation in women having a dysbiosis diagnosed by conventional means. The analysis of 16s sequencing by next generation sequencing of microbiota has greatly expanded the knowledge on the composition of vaginal microbiota. Recent studies have reported the pattern of the vaginal microbiome as significant predictor of IVF treatment success. However, further studies could merely confirm an association between vaginal microbiome and treatment success in IVF. In addition, discussions about methodology defining microbial communities were raised by previous studies.

Prospective, clinical cohort study (5/2018–11/2020) (NCT03507673); in an university IVF-center; women undergoing a programmed FET-cycle with either 2 mg oral estradiol (tid) and, for luteal support, 10 mg oral DYD (tid) or vaginal progestogens or in a spontaneous cycle without estradiol intake but with luteal phase support by progestogens. Main inclusion criteria: low serum progesterone on day 12–15 of the cycle; no exclusion criteria regarding type of frozen thawed embryo transfer cycle (programmed or not), etc.. Women undergoing FET on day 2 or day 3 (D2, D3, cleavage) or day 5 (D5, blastocyst) of embryonic development had sampling of microbiological swabs on day 12–15 of the cycle, on the 3rd, 4th or 6th day

of 10m (tid) DYD oral intake or vaginal progesterone administration and on day of hCG measurement, respectively. Microbiological swabs were stored at -80°C for later analysis by 16s sequencing.

We analyzed the microbial composition before FET identifying a vaginal community pattern largely dominated by *Lactobacillus iners* and *Lactobacillus crispatus* in most of women. Some women being dominated by other *Lactobacillus* species or having a rather diverse vaginal microbiota are making this study cohort representative for the global European population. Previously published results regarding markers for FET success were not repeatable by our study. Neither were global microbial community measures (alpha-diversity or unconstrained ordination techniques for beta-diversity) being predictive for treatment success nor did abundance of major vaginal microbes associate with the outcome. Though, fine scaling of our analytical setup revealed strong negative prediction for a well defineable group of women. Importantly we observed a reduction in treatment success of approximately 50% in the presence of one negative predicting species compared to women with no negative prediction while a broader prediction model defines non-pregnancy in 100% of a subgroup of women. Whether our analytical setup would yield comparable results in other, previously published studies yet is unclear due to lack of a meta-analysis of globally available data.

Generalized composition of vaginal microbiota seems not reliably associated with embryo transfer outcome in FET. However, specific microbial signatures allow precise negative prediction in some women. Future studies should include high number of patients for evaluation of the ideal procedure of vaginal microbiome analysis and its potential benefits.

PO 3.9

Können wir monozygote Zwillinge beim Single-embryo-Transfer (SET) vorhersehen? Erfahrungen aus dem UniKiD von 2015–2021 zu Geburten von monozygoten Zwillingen nach Transfer einer Blastozyste

D. Baston-Büst¹, P. Edimiris¹, I. Scheliga¹, A. P. Bielfeld¹, J. Hirchenhain¹, J.-S. Krüssel¹
¹Uniklinik Düsseldorf, Deutschland

Weltweit ist ein klarer Trend zur Blastozystenkultur mit dem Transfer nur eines Embryos („single embryo transfer“, SET) im Gegensatz zum bis vor einigen Jahren üblichen Transfer von 2 Embryonen („double embryo transfer“, DET) zu beobachten, wodurch erfreulicherweise die Anzahl der risikobehafteten Mehrlingsschwangerschaften deutlich reduziert wurde [1, 2]. Gleichzeitig erhöht sich durch verbesserte Kulturbedingungen und die Anwendung der Vitrifikation als Einfrieremethode die kumulative Lebendgeburtenrate [2, 3]. Laut aktuellen Zahlen des D-IFR liegt die Geburtenrate von Mehrlingen nach Transfer eines Embryos verteilt über alle Altersklassen bei $< 3\%$ [1]. Im Zusammenhang

mit der Blastozystenkultur selbst wird aber seit Längerem eine mögliche Erhöhung der Rate an monozygoten Zwillingen diskutiert, weitere mögliche Einflussfaktoren könnten „assisted hatching“, jüngerer mütterlicher Alter und ICSI sein [4–7]. Durch den Transfer einer Blastozyste können Zwillinge/Mehrlinge entweder durch die Existenz zweier Embryonalanlagen bereits in der Blastozyste entstehen oder durch Abschnürung während des „hatchings“, möglicherweise gehäuft nach „assisted hatching“ (zumeist frühe, komplette Teilung der Embryonalanlagen, „dichorional diamnial“ [DCDA]) oder Teilung erst nach Tag 5 bzw. nach der Implantation „monochorial diamnial“ [MCDA] oder „monochorial monoamnial“ [MCM]).

Die Morphologie der transferierten Embryonen wurde bislang wenig beachtet, um das Risiko von Mehrlingsschwangerschaften nach SET vorherzusagen zu können. Aus den Jahren 2015–2021 stellen wir 4 geborene monozygote Zwillinge vor. Hiervon wurden 3 Embryonen im Timelapse- (TL-) Inkubator und ein Embryo im Benchtop-Inkubator kultiviert. Daher stellen wir die Frage, ob bereits in der Kultur identifiziert werden kann, ob eine Blastozyste zwei Embryonalanlagen trägt.

Drei der 4 Zwillingspaare waren DCDA-angelegt, ein Zwillingpaar MCDA. Die korrespondierende Blastozyste zum MCDA-Zwillingspaaren wurde im TL kultiviert und wies nur eine Embryonalanlage (EA) auf. Die Zona pellucida des Embryos eines DCDA-Pärchens wurde an Tag 3 aufgrund einer Verdickung mittels Laser eröffnet. Dieser Embryo mit einer sichtbaren EA zeigte ein verzögertes „hatching“ an Tag 5. Der Embryo einer Patientin mit einer DC/DA-Schwangerschaft wurde im Benchtop-Inkubator mit mikroskopischer Evaluation an Tag 1, 2, 3 und 5 kultiviert. Auf dem zugehörigen Foto war nur eine EA in der fotografierten Ebene zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnten unter TL-Bedingungen bei der letzten Patientin mit einer DCDA-Gravidität 2 EA in 2 verschiedenen Ebenen dargestellt werden.

Zusammenfassend können wir schlussfolgern, dass MCDA-Zwillinge nach SET embryologisch nicht zu erkennen waren, da ihre Teilung in 2 Keimscheiben erst nach der Implantation erfolgte. Bei der Anwendung des „assisted hatching“ an Tag 3 sollte die Lochgröße ausreichend groß sein, um ein problemloseres „hatching“ zu ermöglichen. Im Vergleich zur traditionellen Mikroskopie können zwei EA im TL leichter erkannt werden.

Literatur:

1. DIR Jahrbuch 2021. J Reproduktionsmed Endokrinol 2022; 19 (SH 4): 1–60.
2. Mejia RB, Capper EA, Summers KM, et al. Elective transfer of one embryo is associated with a higher cumulative live birth rate and improved perinatal outcomes compared to the transfer of two embryos with in vitro fertilization. FS Reports 2021; 2: 50–7.
3. De Geyter C. Single embryo transfer in all infertile couples treated with assisted reproduction produces excellent results and avoids multiple births. Swiss Med Wkly 2021; 151: 1–7.
4. Kawachiya S, Bodri D, Shimada N, et al. Blastocyst culture is associated with an elevated incidence of monozygotic twinning after single embryo transfer. Fertil Steril 2011; 95: 2140–2.

5. Ikemoto Y, Kuroda K, Ochiai A, et al. Prevalence and risk factors of zygotic splitting after 937 848 single embryo transfer cycles. Hum Reprod 2018; 33: 1984–91.

6. Hviid KVR, Malchau SS, Pinborg A, et al. Determinants of monozygotic twinning in ART: A systematic review and a meta-analysis. Hum Reprod Update 2018; 24: 468–83.

7. Knopman JM, Krey LC, Oh C, et al. What makes them split? Identifying risk factors that lead to monozygotic twins after in vitro fertilization. Fertil Steril 2014; 102: 82–9.

PO 3.10

Variabilität im Spontanzyklus – Analyse einer prospektiven Langzeit-Kohortenstudie

M.-N. Malliou-Becher¹, P. M. Ruf², T. Strowitzki¹, P. Frank-Herrmann³

¹Universität Heidelberg; ²München Klinik Neuperlach; ³Universitätsfrauenklinik Heidelberg, Deutschland

Die Annahme eines regelmäßigen Zyklus mit Eisprung in der Mitte des Zyklus ($\pm 1-2$ Tage) bei gesunden Frauen ist immer noch weit verbreitet. Allerdings haben Studien die Variation des Ovulationszeitpunktes und anderer Zykluseigenschaften bereits hervorgehoben. Diese Studien stützen sich jedoch häufig auf kleinere Datenbanken und kurze Beobachtungszeiträume oder erlauben keine Langzeitbeobachtung der Frauen, wenn sie aufwendige Auswertmethoden, wie die Bestimmung von Hormonparametern oder die tägliche sonographische Follikulometrie zur Auswertung verwenden. Die vorliegende Datenanalyse wertet die deutsche NFP-Datenbank (Natürliche Familienplanung) der Universität Heidelberg aus, die Daten aus einer weltweit einmaligen prospektiven Langzeit-Kohortenstudie zu den Merkmalen des spontanen Menstruationszyklus und zur symptomthermalen Methode Sensiplan® enthält. Ziel dieser Analyse ist es, die Variation der Zykluslänge und die Schwankungsbreite des Ovulationszeitpunktes inter- und intra-individuell zu untersuchen.

Daten von 1923 Frauen mit insgesamt 43.999 Menstruationszyklen wurden zwischen Januar 1985 und Juli 2019 gesammelt. Die Teilnehmerinnen der Studie waren bei Studienbeginn zwischen 18 und 44 Jahre alt, nahmen keine Sexualhormone ein und hatten unterschiedliche Zykluslängen. Besondere Umstände wie die Zeit nach der Geburt, das Stillen, die ersten drei Monate nach Absetzen einer hormonellen Verhütung und die Amenorrhoe bei Studienbeginn wurden ausgeschlossen. Die Teilnehmerinnen willigten ein, mindestens ein Jahr lang Zyklusaufzeichnungen nach der symptomthermalen Methode Sensiplan® zu führen. Nach Erfüllung der Einschlusskriterien bestand die Hauptgruppe aus 1051 Frauen mit 12.612 Zyklen, während die Konzeptionsgruppe 420 Frauen mit 420 Konzeptionszyklen umfasste. Der Zeitpunkt des Eisprungs wurde anhand der Veränderungen des Zervixschleims und des Anstiegs der Basaltemperatur bestimmt und die Dauer des Menstruationszyklus vom ersten Tag der Menstruation bis zum Tag vor der nächsten Menstruation berechnet.

Der 28-tägige Zyklus trat bei 13,3 % der Zyklen auf. 7,4 % der Zyklen waren kürzer als

25 Tage, 8,8 % der Zyklen länger als 35 Tage. Zyklen mit einer maximalen Schwankungsbreite von 3 Tagen traten nur bei 5,4 % aller Frauen innerhalb eines Jahres auf. Die Zykluslängen variierten bei 53,3 % der Teilnehmerinnen um mehr als eine Woche zwischen dem kürzesten und dem längsten Zyklus innerhalb eines Jahres, während 41,4 % der Frauen eine Variation von 4–7 Tagen aufwiesen. Weiterhin fanden 50 % aller Ovulationen im Spontanzyklus zwischen dem 14. und 19. Zyklustag statt. Der Zeitpunkt des Eisprungs schwankte bei 54,8 % der Frauen um mehr als eine Woche innerhalb eines Jahres. Nur bei 3,5 % der Frauen schwankte dieser um maximal drei Tage. Die Zeitpunkte der Konzeption in der Konzeptionsgruppe wiesen eine ähnlich breite Verteilung auf wie die Ovulationszeiten im normalen Kollektiv. Die Zykluslänge nahm mit zunehmendem Alter ab. Das Alter hatte ebenso einen Einfluss auf den Zeitpunkt des Eisprungs, wobei ältere Frauen im Vergleich zu jüngeren Frauen stabilere Ovulationsmuster aufwiesen.

Diese prospektive Langzeit-Kohortenstudie mit Daten von 1923 Frauen mit insgesamt 43.999 Menstruationszyklen zeigt die beträchtliche Schwankungsbreite der Zykluslänge und des Ovulationszeitpunktes intra-individuell und altersabhängig auf und unterstreicht die Tatsache, dass die allgemein angenommene Vorstellung eines „regelmäßigen“ Menstruationszyklus mit einem Eisprung in der Mitte des Zyklus weniger häufig vorkommt als bisher angenommen.

PO 3.11

Quality of life during fertility treatment and acceptance of a blended care online psychosocial support program

A. Bachmann¹, S. Schulze², L. M. Pfadenhauer³, N. Sängler⁴
¹Universitätsklinikum Frankfurt; ²Goethe University Entrepreneurship Center Frankfurt am Main (DEU); ³Ludwig-Maximilians-Universität München; ⁴Universitätsklinikum Bonn, Deutschland

Infertility may adversely influence quality of life. Patients in fertility treatment have needs for high-quality information, peer-to-peer exchange and support as well as individual counselling. These needs are also stated in the 2016 Eshre guideline for routine psychosocial care. Our study question was: Which group of patients report most subjective benefits from a blended-care support platform for fertility patients and which aspects of infertility treatment have the greatest negative impact on quality of life of these patients?

Cross-sectional study with 189 IVF/ICSI patients of 2 University hospitals Frankfurt and Bonn who signed up for a blended care online program Mentalstark during October 2020 to March 2022. Patients filled out the WHO-Five Well-Being Index (German version 1998) and items of treatment and core domains of FertiQoL (Cardiff University, UK, German version) Statistical analysis was performed using spss software.

Out of 189 patients 46 women and 3 men completed the survey. The mean age of

women taking part in this study was 35,6 (28–44) years and the mean duration of infertility 36,07 (6–120) months. 65.2% of patients had college education. Estimated total costs of treatment were 6108,25 Euro (range 30–30,000). Patients with shorter duration of infertility ($R = 0.552$, $P = 0.002$) and lower FertiQoL subscale scores ($R = 0.510$, $P = 0.007$) show the greatest satisfaction with the blended-care program. The association of the WHO5 score and satisfaction with the blended-care program was weaker ($R = 0.305$, $P = 0.157$). The WHO5 score was significantly correlated with the estimated total financial costs of treatment ($R = 0.495$, $P = 0.014$) but less with the duration of infertility ($R = 0.270$, $P = 0.172$).

In our cohort total financial burden of fertility treatment costs had the biggest negative impact on quality of life, despite a large number of participants with higher level education and income. Patients with shorter duration of infertility and low fertility related quality of life seem to benefit most from this program. Wider implications of the finding are: Psychosocial care should be offered early during fertility treatment. Costs of fertility treatment should be minimized.

PO 3.12

Erfahrungen von Single-Frauen mit der Kinderwunschbehandlung in einem universitären Kinderwunschzentrum

R. Dittich¹, I. Hoffmann², M. W. Beckmann², L. Lotz²
¹Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; ²Universitätsklinikum Erlangen, Deutschland

Einleitung Die Verwendung von Spendersamen wurde ursprünglich für heterosexuelle Paare mit männlicher Unfruchtbarkeit etabliert, um ihnen zu helfen, Eltern zu werden. Heute ist eine feste Partnerschaft nicht mehr erforderlich, um sich den Kinderwunsch zu erfüllen und die geplante alleinstehende Mutterschaft wird immer häufiger. Die Zahl der alleinstehenden Frauen mit Kinderwunsch nimmt zu und die Mutterschaft ohne Partner wird für viele Frauen immer vorstellbarer. Ziel dieser Studie war es daher, die persönlichen Merkmale alleinstehender Frauen zu untersuchen, die sich in einem universitären Zentrum für Reproduktionsmedizin in Deutschland einer IUI/ICSI-Behandlung unterziehen.

Methode In dieser retrospektiven Studie wurden 99 alleinstehende Frauen, die sich von 2019–2021 an der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Universitätsklinikums Erlangen einer IUI und/oder ICSI mit Spendersamen unterzogen hatten, eingeschlossen und ihre persönlichen Merkmale untersucht.

Ergebnisse Das Durchschnittsalter der Frauen zum Zeitpunkt der Erstberatung in der Klinik betrug 37,5 Jahre (SD, Standardabweichung, 4,2; Spanne: 21–46 Jahre). Von den 99 Frauen gaben 27 (27,3 %) an, schon einmal schwanger gewesen zu sein und 9 (9,1 %) Frauen hatten bereits entbunden. Außerdem gaben 7 Frauen (6,6 %) an, in früheren Partnerschaften erfolglos versucht zu haben,

schwanger zu werden. 23 (21,7 %) Frauen hatten sich außerdem bereits einer Fruchtbarkeitsbehandlung durch Samenspende in einer externen Einrichtung unterzogen, 3 Frauen hatten sich einer Heimirsemination unterzogen und eine Frau hatte bereits Eizellen im Rahmen des „Social Freezing“ einfrieren lassen. Aufgrund der begrenzten Anzahl von Zentren, die alleinstehende Frauen in Deutschland behandeln, hatten die Frauen eine durchschnittliche Anfahrsstrecke von 125,5 km (SD 100, Spanne 1–454 km) zu unserer Klinik. Von den 99 Frauen berichteten 6 Patientinnen über Zyklusunregelmäßigkeiten (3 klagten über Polymenorrhoe und 3 über Oligomenorrhoe). Der mittlere AMH-Wert lag bei 2,09 µg/l (SD, 2,2; Bereich: 0,05–14,9). Insgesamt wurden 218 IUIs und 98 ICSI-Zyklen mit Spendersamen durchgeführt und es konnte eine Schwangerschaftsrate von 33,3 % erreicht werden.

Fazit Die Behandlung alleinstehender Frauen ist in der Reproduktionsmedizin relativ neu, und es gibt nur begrenzte Erkenntnisse über die Erfolgsrate von ART-Behandlungen für diese Gruppen. Da ART-Behandlungen kostspielig und manchmal psychologisch schwierig sind, wäre es von Vorteil, mehr Informationen über die Bedürfnisse von Frauen und den Erfolg dieser Behandlungen zu haben, damit die Patientinnen angemessen beraten werden können.

PO 3.13

Haben Symptomatik und Abstand einer SARS-CoV-2-Infektion des Paars Einfluss auf den Verlauf einer assistierten Reproduktion?

M. Goeckenjan¹, K. Glab¹, V. Eckstein¹, I. Trinkaus¹, P. Wimberger¹

¹Universitäres Kinderwunschzentrum Dresden, Deutschland

Im Verlauf der COVID-19-Pandemie berichteten im Jahr 2022 zunehmend Kinderwunschpaare von SARS-CoV-2-Infektionen vor der geplanten Behandlung mit assistierter Reproduktion mit IVF und ICSI (ART). Im Vergleich zu Vorjahren fielen vermehrt Fehlgeburten bei vergleichbaren Schwangerschaften auf, so dass eine monozentrische Kohortenstudie zu Outcome-Parametern von ART-Zyklen durchgeführt wurde.

Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission zustimmend bewertet. Mit einem standardisierten Fragebogen zu Zeitpunkt, Symptomen und Verlauf einer SARS-CoV-2-Infektion wurden insgesamt 211 Paare eines universitären Kinderwunschzentrums befragt. 239 ART-Zyklen mit Embryotransfer konnten analysiert werden. Durch binärlogistische Regressionsanalyse wurden der Einfluss des Zeitpunktes der letzten SARS-CoV-2-Infektion und Symptomatik der Infektion auf den Verlauf der ART untersucht.

2022 berichtete mindestens ein Partner in 62 % der IVF/ICSI-Zyklen von SARS-CoV-2-Infektionen seit Beginn der Pandemie. In 80 ART-Zyklen ohne nachgewiesene Infektion lag die Schwangerschaftsrate bei 39,6 %, während sie nach Infektionen 28,4 % betrug ($p = 0,088$). Die Fehlgeburtenrate unterschied

sich in dieser Gruppenanalyse von Zyklen bei Paaren ohne und mit Infektionen unabhängig vom zeitlichen Abstand nicht (33,3 vs. 34,1 %, $p = 1,000$). Jedoch zeigten sich Auswirkungen des zeitlichen Abstands der Infektion zur ART-Behandlung auf Schwangerschafts- und Fehlgeburtenrate. Werden nur Infektionen innerhalb von 6 Monaten vor ART berücksichtigt, so zeigt sich ein leichter, nicht signifikanter negativer Effekt auf die Schwangerschaftsrate. Die Schwangerschaftsrate sinkt mit kürzerem zeitlichen Abstand zwischen Infektionen von Frauen und Männern und der Behandlung ($p = 0,060/0,055$). Für die Fehlgeburtenrate weisen die Daten auf einen statistisch signifikanten und starken Effekt bei Infektionen von Frauen innerhalb von 6 Monaten vor ART hin, OR 4,7 für Fehlgeburten ($p = 0,009$). Das Risiko einer Fehlgeburt bei Schwangerschaftseintritt nach ART erhöht sich, je kürzer der zeitliche Abstand einer Infektion der Partner zur Behandlung ist ($p = 0,048$). Keinen Effekt hatten die Stärke der Symptomatik sowie die Anzahl der Tage mit Fieber bei Infektion auf den Verlauf einer ART-Behandlung.

In dieser retrospektiven Datenanalyse von ART-Zyklen mit IVF und ICSI ergab sich eine niedrigere Schwangerschaftsrate in Zyklen, bei denen mindestens ein Partner eine SARS-CoV-2-Infektion berichtete. Bei kürzerem Zeitintervall zwischen Infektion und Behandlung zeigte sich auch eine Erhöhung der Fehlgeburtenrate, besonders bei Infektion der Frau. Diese Studie wurde zu einem Zeitpunkt der Pandemie 2022 mit regelmäßigen Selbsttestungen auf Infektionen sowie Bestätigung von Infektionen mit PCR-Tests durchgeführt. Die detaillierte Erhebung des Infektionsstatus durch die Selbstangaben des Paares weist auf einen Einfluss von SARS-CoV-2-Infektionen auf Schwangerschaftsraten und -verlauf nach ART hin. Ob ähnliche Effekte nach Analyse der deutschlandweiten IVF-Daten und bei spontan eingetretenen Schwangerschaften im Jahr 2022 nachweisbar sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt. Es bleibt auch unklar, ob die berichteten Zusammenhänge auch bei Infektionen mit späteren SARS-CoV-2-Virusvarianten weiterhin berücksichtigt werden müssen.

PO 3.14

Unterdosiert der Follitropin-Delta-Algorithmus Frauen mit hohem Körpergewicht und erhöhtem Risiko für ein schwaches Ansprechen der Ovarien auf die ovarielle Stimulation?

L. I. da Costa Hackstein¹, K. Neumann², T. Eggersmann¹, M. Depenbusch¹, A. Schultze-Mosgau¹, R. A. Hiller¹, G. Griesinger¹

¹Universitätsklinikum Schleswig-Holstein; ²Kinderwunsch Praxisklinik Fleetinsel, Deutschland

Der Follitropin-Delta-Dosierungs-Algorithmus sieht im ersten Zyklus eine tägliche Dosis von 12 µg Follitropin Delta (FD) (äquivalent zu etwa 188IU/d rFSH) für Patientinnen mit einem Serum-AMH von < 15 pmol/L vor, unabhängig vom KG. In Studien [ESTHER-1, 2017; Blockeel, 2022] bekamen nahezu 40–

50 % der Patientinnen 12 µg FD verschrieben. In der Phase-III-Studie (ESTHER-1) wiesen jedoch nur 5 % der Patientinnen ein KG > 85 kg auf. Es war bisher nicht evident, ob Frauen mit hohem KG, i. e. einem hohen Verteilungsvolumen, die möglicherweise durch den FD-Dosierungs-Algorithmus unterdosiert werden, vor allem im Serum-AMH-Stratum < 15 pmol/L.

Es handelt sich um eine monozentrische, retrospektive Analyse aller Stimulationszyklen ($n = 337$) mit FD, die zwischen dem 12.06.2016 und 10.12.2021 an einem universitären Reproduktionszentrum durchgeführt wurden. In die Auswertung eingeschlossen wurden nur Frauen mit IVF- oder ICSI-Indikation ohne vorherige ART-Behandlung, welche eine kontrollierte ovarielle Stimulation mittels GnRH-Antagonisten-Protokoll mit hCG- oder GnRH-Agonisten-Trigger erhielten. Es gab keine Ausschlusskriterien bezüglich Serum-AMH, KG, Zyklusunregelmäßigkeiten oder Vorhandensein eines PCOS. FD wurde für die Patientinnen gem. Beipackzettel dosiert. Das KG wurde an Zyklustag zwei oder drei gemessen. Primäre Outcome-Variable ist die Anzahl der gewonnenen Eizellen („cumulus-oocyte-complex“ [COC]). Als Ziel-Response wurden 8–14 COCs definiert, in Übereinstimmung mit der ESTHER-1-Studie.

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung und/oder Median (Spannweite) oder Anzahl (Anteil). Auswertung von 182 ersten Zyklen mit einem durchschnittlichen Alter von $33 \pm 4,2$ Jahren, Serum-AMH $25,4 \pm 16,7$ pmol/L und KG $72,6 \pm 16,3$ kg. 37 von 182 (20 %) Frauen wiesen ein KG ≥ 85 kg auf. Die mediane Anzahl an COCs < 12 µg FD bei Serum-AMH < 15 pmol/L betrug 7 (0–19) bei Frauen mit einem KG < 85 kg und 7 (2–20) COCs bei einem KG ≥ 85 kg ($p > 0,05$). Ein zweiter Vergleich bezogen auf die KG-Strata (< 85 kg und ≥ 85 kg) und Serum-AMH-Strata (0–7 pmol/L und 7–15 pmol/L) zeigte ebenfalls keine geringere ovarielle Response bei höherem KG. Bei allen maximal dosierten ersten Zyklen mit 12 µg FD (84/182, 46 %) wurde die Ziel-Response in 32,1 % der Zyklen bei KG ≥ 85 kg erzielt und in 37,5 % bei KG < 85 kg. Im AMH-Stratum ≥ 15 pmol/L wiesen 20/125 Patientinnen (16 %) eine Hyporesponse mit < 8 COCs auf. Es konnte kein Unterschied in Alter, BMI oder durchschnittlicher FD-Dosis gefunden werden. Jedoch waren diese Patientinnen im Durchschnitt größer ($1,71 \pm 0,06$ m vs. $1,66 \pm 0,06$ m; $p = 0,01$), zeigten eine Tendenz zu höherem KG (73 kg (48–110 kg) vs. 63 kg (47–119 kg), $p = 0,08$) und größerer Körperoberfläche ($1,87 \pm 0,21$ vs. $1,76 \pm 0,2$ m², $p = 0,05$) als Patientinnen mit Ziel-Response. In allen Subgruppen war die Prävalenz von Zyklusunregelmäßigkeiten nicht unterschiedlich in Bezug auf Response.

Es handelt sich um eine unkontrollierte Kohorte und die Analyse erfolgte retrospektiv. Nur wenige Frauen wiesen ein hohes KG auf, wodurch Stichprobengröße und Teststärke limitiert sind. Hohes KG könnte mit verändertem follikulärem Recruitment und ovarieller Physiologie einhergehen. Unsere

Daten zeigen keine Abnahme der ovariellen Response bei Frauen mit hohem KG (i. e. ≥ 85 kg) und Serum-AMH < 15 pmol/L (2,1 ng/ml) unter einer täglichen FD-Dosis von 12 µg. Der FD-Dosierungs-Algorithmus sagt eine maximale Response bei 12 µg FD (äquivalent zu etwa 188IU/d rFSH) für alle Frauen mit Serum-AMH < 15 pmol/L voraus. Unsere Analyse unterstützt diese Vermutung.

PO 3.15

Ein neues Kryo-ET-Protokoll zur Terminierung der Embryoübertragung im ovulatorischen Zyklus

T. Eggersmann¹, N. Hamala¹, R. A. F. Hiller¹, M. Depenbusch¹, A. Schultze-Mosgau¹, P. Edimiris², A. Bielfeld², J.-S. Krüssel², D. Baston-Büst¹, S. Tauchert³, S. von Otte⁴, W. Junkers⁴, G. Griesinger¹

¹Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck;

²Universitätsklinikum Düsseldorf; ³IVF Zentrum SAAR; ⁴Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Deutschland

Weltweit werden rund 60 % aller Embryonenübertragungen nach Kryokonservierung durchgeführt. Sog. artifizielle („programmierte“ oder „HRT-“) Zyklen sind, wahrscheinlich aufgrund des Fehlens des Corpus luteums, häufig mit inadäquaten Progesteronspiegeln und erhöhten maternalen und fetalen Risiken assoziiert. Im ovulatorischen Zyklus ist orales Dydrogesteron (DYD) 10 mg (tid) möglicherweise geeignet, um das Implantationsfenster zu terminieren und die Lutealphase zu unterstützen, ohne Ovulation und Lutealphase zu stören. DYD zeigt im Immunoassay (ELISA) keine Kreuzreaktion mit Progesteron, sodass beide Analyte voneinander unterschieden werden können.

Die gegenständlichen Daten sind Teil einer laufenden multizentrischen, prospektiven klinischen Kohortenstudie (NCT03507673). 163 Patientinnen wurden zwischen 02/2021–11/2022 gemäß eines „programmiert ovulatorischen Kryozyklusprotokolls“ behandelt. Frühestens an Zyklustag 10 erhielten die Patientinnen ab einem E2-Serumspiegel >180 pg/ml, einem Leitfollikel > 16 mm und einer Endometriumsdicke > 6 mm, 10 mg DYD oral (tid). Ein Zyklusmonitoring wurde bis zum Erreichen der Kriterien alle 2 Tage wiederholt. Der Embryotransfer erfolgte, ohne vorangehende Ovulationsinduktion, bei Tag-2/3-Embryonen am 3./4. Tag bzw. bei Tag-5-Embryonen am 6. Tag der Einnahme von DYD. Zur späteren endokrinologischen Analyse mittels Roche Elecsys®-Immunoassay wurden Serum/Plasma-Proben am Tag des Embryotransfers, des Schwangerschaftstests, sowie des Schwangerschaftsultraschalls gesammelt und eingefroren.

Bei 94,4 % der Patientinnen konnte eine Ovulation (Progesteron > 1,5 ng/ml) durch Serum-Progesteronmessung am ET-Tag nachgewiesen werden (MW = $9,45 \pm 5,5$ ng/ml, Range = 0,2–28,1 ng/ml). Der Progesteronserumspiegel am ET-Tag war unabhängig vom E2-Spiegel, der Follikelgröße und dem LH-Anstieg (> 12,6 IU/l) am Tag des letzten Zyklusmonitorings (Progesteron-MW = 9,69

$\pm 4,78$ IU/l mit LH-Anstieg vs. Progesteron-MW = $8,96 \pm 5,91$ IU/l ohne LH-Anstieg, $p = 0,40$). Bei 9,2 % der Patientinnen (15/163) zeigte sich ein Serum-Progesteronspiegel von $< 1,5$ ng/ml am Embryotransfertag. 40 % (6/15) dieser – am Embryotransfertag anovulatorischen – Patientinnen erzielten in dem untersuchten Zyklus eine Schwangerschaft und zeigten am Tag des Schwangerschaftstests endogene Progesteronmesswerte von $> 1,5$ ng/ml (MW = $23,4 \pm 9,81$ ng/ml). Bei 5,5 % der Patientinnen (9/163) konnten wir durch unser Studiendesign keine Ovulation beweisen. Anhand der Daten kann ein ovulatorischer Zyklus mit kurzer Lutealphase ohne Eintritt einer Schwangerschaft nicht von einer tatsächlichen Anovulation unterschieden werden. Diese neun anovulatorischen Patientinnen zeigten im Vergleich zum ovulatorischen Kollektiv einen höheren BMI, höheres Lebensalter und höhere Endometriumsdicke. Unterschiede in AMH-, LH-, E2-Leveln und Follikeldurchmesser waren nicht signifikant. Die fortlaufende Schwangerschaftsrate war unabhängig vom Serum-Progesteronspiegel am Embryotransfertag bei Patientinnen unterhalb der 25. Perzentile (Progesteron $< 5,47$ ng/ml, $n = 41$) oder oberhalb der 25. Perzentile des Serum-Progesteronspiegels (Progesteron $> 5,47$ ng/ml, $n = 122$): Schwangerschaftsrate: 24,4 % (10/41) vs. 30,3 % (37/122) (Unterschied: $-5,9$ %, 95%-CI: $-19,6$ – $10,8$ %; $p = 0,55$).

Die erhobenen Daten zeigen die Möglichkeit der effizienten Planung eines Embryotransfers durch 10 mg orales DYD (tid) in einem ovulatorischen Zyklus ohne Ovulationsinduktion. Das kostengünstige und injektionsfreie Protokoll kombiniert somit sowohl die Vorteile einer oralen exogenen Progesteronzufuhr als auch der endogenen Progesteronaktivität des Corpus luteum. Zusammenfassend zeigen sich die endogenen Serumprogesteronlevel in dieser Interimsanalyse homogen, so dass weitere wissenschaftliche Untersuchungen in diesem Protokoll durchgeführt werden könnten. Im präpartalen und postnatalen Verlauf wurden bisher keine maternalen oder fetalen Komplikationen beobachtet. Die Analyse der gefrorenen Serum-/Plasma-Proben zur Ermittlung der Interaktion von endogenen Progesteron- und DYD-Serumspiegeln mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ist in der laufenden Studie geplant.

PO 3.16

Angst vor Einschränkung der Fertilität – eine der Hauptursachen für die Zurückhaltung bei der COVID-19-Impfung bei Kinderwunschpatientinnen

F. von Versen-Höyneck¹, J. Kern¹, C. Schippert¹, D. Fard¹, A. P. Bielfeld²

¹Medizinische Hochschule Hannover; ²Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland

Frauen, die eine Schwangerschaft planen, wird die Impfung gegen COVID-19 empfohlen, da festgestellt wurde, dass die Schwangerschaft selbst ein Risikofaktor für eine schwere COVID-19-Erkrankung ist. Während bei

schwangeren und stillenden Frauen zuvor über eine verminderte Akzeptanz der Impfung berichtet wurde, wurden Patienten, die sich einer Kinderwunschbehandlung unterzogen, in früheren Studien nur selten eingeschlossen. Dennoch tauchen in der täglichen Praxis weiterhin verschiedene Ängste und Bedenken hinsichtlich der SARS-CoV-2-Impfung auf, aber die genauen Gründe bei unfruchtbaren Paaren sind weitgehend unbekannt. Daher sind wir der Frage nachgegangen, wie die SARS-CoV-2-Impfung von Frauen angenommen wird, die eine Kinderwunschbehandlung in Anspruch nehmen möchten, und welche Ängste und Sorgen sie haben.

Zwischen dem 28. Januar und dem 10. August 2022 wurde eine anonyme Online-Umfrage durchgeführt. Informationen zur Studie wurden von Kinderwunschkliniken in Deutschland persönlich bereitgestellt und online, z. B. in Facebook-Gruppen, verbreitet. Die Online-Umfrage umfasste insgesamt 35 Fragen zu Demographie, dem COVID-19-Impfstatus, Bedenken der geimpften Teilnehmerinnen im Vorfeld und zu Gründen der ungeimpften Teilnehmerinnen gegen eine Impfung sowie zu Faktoren, die Einfluss auf die Entscheidung gegen eine Impfung hatten. Von 520 Teilnehmerinnen, die mit dem Fragebogen begonnen hatten, füllten 406 Patientinnen den Fragebogen aus und wurden in die statistische Analyse einbezogen.

Von den 406 Teilnehmerinnen gaben 92,1 % an, mindestens eine Dosis des COVID-19-Impfstoffs erhalten zu haben, 7,9 % waren ungeimpft. Mit der Entscheidung für eine Impfung assoziierte Faktoren waren Vollzeit- oder Teilzeitbeschäftigung ($p = 0,05$), hohes Vertrauen in das Impfprinzip ($p < 0,001$) und hohe Bereitschaft zu anderen Impfungen während der Kinderwunschbehandlung ($p < 0,001$) sowie Risikofaktoren für schwere COVID-19-Erkrankung ($p = 0,007$). Bedenken hinsichtlich direkt auftretender Nebenwirkungen nach der Impfung (42,0 %), hinsichtlich der eigenen Fertilität (21,9 %) oder Auswirkungen auf die Kinderwunschbehandlung (27,5 %) waren im Vorfeld die Hauptsorgen der geimpften Teilnehmerinnen. Es wurden Zusammenhänge zwischen Bedenken zum Einfluss auf die eigene Fruchtbarkeit und Misstrauen gegenüber dem allgemeinen Impfprinzip festgestellt. Neben allgemeinen gesundheitlichen Bedenken gaben ungeimpfte Teilnehmerinnen Ängste vor einer Beeinträchtigung der Fertilität als überzeugendstes Argument gegen eine COVID-19-Impfung an (Median 5,0 auf einer fünfstufigen Likert-Skala).

In unserer Studie war eine gemeinsame Sorge sowohl geimpfter als auch ungeimpfter Teilnehmerinnen eine mögliche Nebenwirkung der COVID-19-Impfstoffe auf die Fertilität des Empfängers. Um das Vertrauen der Patientinnen in medizinische Empfehlungen wie Impfungen zu stärken, Misstrauen gegenüber dem medizinischen System zu vermeiden und die Compliance der Patientinnen aufrechtzuerhalten, müssen zusätzliche Aufklärungsangebote gemacht werden, die auf infertile Patientinnen und ihre Bedürfnisse im Hinblick auf empfohlene Impfungen eingehen.

PO 3.17

Die konsequente Anwendung des Deutschen Mittelweges (DMW) mit Single-embryo-Transfer führt im Vergleich zum D-I-R-Durchschnitt zu keiner Verschlechterung der Schwangerschaftsraten, aber zu einer signifikanten Reduktion der Mehrlingsgeburten

J.-S. Krüssel¹, J. Hirchenhain¹, D. M. Baston-Büst¹, P. Edimiris¹, I. Schelliga¹, J. Bender-Liebenthrön¹, A. Bielfeld¹
¹Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

Weltweit ist ein klarer Trend zur Blastozystenkultur mit Transfer nur eines Embryos („single embryo transfer“, SET) im Gegensatz zum bis vor einigen Jahren üblichen Transfer von 2 Embryonen („double embryo transfer“, DET) zu beobachten, wodurch erfreulicherweise die Anzahl der risikobehafteten Mehrlingschwangerschaften deutlich reduziert wird [1, 2]. Durch verbesserte Kulturbedingungen und die Umstellung des Kryoverfahrens auf Vitrifikation kommt es zu stetigen Verbesserungen der Behandlungsergebnisse [2, 3]. Da der elektive SET nach allgemeiner Rechtsauffassung in Deutschland nicht erlaubt ist, wird seit mehreren Jahren der Behandlungsalgorithmus des „Deutschen Mittelweges“ (DMW) [4, 5] angewandt, wobei es in manchen Fällen zur nicht intendierten Entstehung überzähliger, entwicklungsfähiger Embryonen (Blastozysten) kommen kann, welche kryokonserviert und zu einem späteren Transfer verwendet werden können. Auch im UniKiD wird der DMW mit Kultivierung von meist 3–4 Vorkernstadien angewandt und immer häufiger – nach entsprechender, oft zeitintensiver Überzeugungsarbeit bedürftiger Aufklärung der Paare – nur ein Embryo transferiert. Im Jahr 2022 lag der Anteil der SETs im UniKiD bei 98,8 % (1196 von 1210 Transfers, durchschnittlicher Anteil SET im D-I-R: 59,9 %). Die Notwendigkeit der intensiven Beratungsarbeit beruht darauf, dass viele Paare einerseits die Vorstellung haben, dass die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit beim DET höher sei als beim SET und andererseits die mit Mehrlingschwangerschaften verbundenen möglichen Komplikationen in der Schwangerschaft und nach der Geburt stark unterschätzen. Die hier vorgestellte Untersuchung sollte die Frage beantworten, ob die konsequente Anwendung des SET zu einer „underperformance“ im Hinblick auf die Ergebnisparameter Schwangerschaftsrate pro Transfer und Lebendgeburtenrate pro Transfer führt, weiterhin sollte der Effekt des DMW-SET auf die Häufigkeit von Mehrlingschwangerschaften und Entstehung überzähliger Blastozysten hin untersucht werden.

Retrospektive Auswertung der UniKiD-Daten des D-I-R-Zentrumsprofils sowie der zentrumsinternen Dokumentation über die Jahre 2020–2022

Darstellung Jeweils Angaben UniKiD und in Klammern (D-I-R-Durchschnitt): Von 2020 über 2021 bis 2022:

– stieg der Anteil der SET-Zyklen (Frisch- und Kryozyklen): 2020: 93,6 % (43,9 %); 2021: 96,7 % (50,6 %); 2022: 98,8 % (59,9 %),

- sank die Anzahl der durchschnittlich verwendeten Embryonen/Transfer: 2020: 1,06 (1,58); 2021: 1,03 (1,51); 2022: 1,01 (1,41),
- lag dennoch die Schwangerschaftsrate pro Transfer deutlich über dem D-I-R-Durchschnitt: 2020: 34,1 % (31,6 %); 2021: 33,1 % (31,5 %); 2022: 35,3 % (30,7 %),
- lag auch die Lebendgeburtenrate pro Transfer deutlich über dem D-I-R-Durchschnitt: 2020: 26,1 % (22,9 %); 2021: 26,3 % (22,6 %); 2022: Geburten noch nicht ausgewertet,
- war die Mehrlingsrate verschwindend gering: 2020: 3,1 % (14,5 %); 2021: 0,6 % (13,6 %); 2022: Geburten noch nicht ausgewertet.

Im Jahr 2020 wurden 316 Blastozysten kryokonserviert (0,28 Blastozysten pro Transferzyklus), im selben Jahr wurden 270 kryokonservierte Blastozysten abgerufen und transferiert. Im Jahr 2021 wurden 492 Blastozysten kryokonserviert (0,39 Blastozysten

pro Transferzyklus), im selben Jahr wurden 323 kryokonservierte Blastozysten abgerufen und transferiert.

Durch die konsequente Anwendung des SET lassen sich trotz Reduktion der durchschnittlich transferierten Embryonen auf 1,01/ET überdurchschnittlich hohe Schwangerschafts- und Lebendgeburtenraten bei gleichzeitig auf < 1 % reduziertem Mehrlingsrisiko erreichen. Allerdings kommt es durch die verbesserten Kulturbedingungen hierbei selbst unter strenger Anwendung des DMW-Algorithmus bei jedem zweiten bis dritten Transferzyklus zur Entstehung einer nicht intendierten Blastozyste, welche zunächst kryokonserviert wird. Der überwiegende Teil der Blastozysten wird jedoch zeitnah zum Transfer verwendet, der Rest steht auch weiterhin (für ein Geschwisterkind) zur Verfügung. Mit der im Koalitionsvertrag angekündigten Zulassung des eSET wird diese Behandlungsrealität hoffentlich in naher Zukunft rechtssicher abgebildet.

Literatur:

1. DIR Jahrbuch 2021. J Reproduktionsmed Endokrinol 2022; 19 (SH 4): 1–60.
2. Mejia RB, Capper EA, Summers KM, et al. Elective transfer of one embryo is associated with a higher cumulative live birth rate and improved perinatal outcomes compared to the transfer of two embryos with in vitro fertilization. *FS Reports* 2021; 2: 50–7.
3. De Geyter C. Single embryo transfer in all infertile couples treated with assisted reproduction produces excellent results and avoids multiple births. *Swiss Med Wkly* 2021; 151: 1–7.
4. Bals-Pratsch M. Wandel in der Implementation des Deutschen Embryonenschutzgesetzes. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2010; 7: 87–95.
5. Kliebisch TK, Bielfeld AP, Krüssel JS, et al. The German Middleway as precursor for single embryo transfer. A retrospective data-analysis of the Düsseldorf University Hospital's Interdisciplinary Fertility Centre – UniKiD. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2016; 76: 690–8.

Autorenverzeichnis (nur Erstautoren)

A	J	R
Amrani M. 147	Jasarevic A. 142	Rotte N. 136
B	Jiang Y. 143	Runkel M. D. 135
Bachmann A. 152	K	S
Baston-Büst D. 151	Kovacevic A. 137	Schallmoser A. 141, 142
Bojovic V. 138	Krüssel J.-S. 155	Scheliga I. 146
D	L	Seßenhausen P. 149
da Costa Hackstein L. I. 154	Laurentino S. 140	Sieg F. 138
Dittrich R. 152	Ludwig C. L. M. 146	Staib C. 150
E	M	T
Edimiris P. 148	Madej D. 147	Trapphoff T. 135
Eggersmann T. 154	Makri D. 148	V
Einenkel R. 142	Malliou-Becher M.-N. 151	von Versen-Höyneck F. 144, 155
F	N	W
Fietz D. 140	Nanassy L. 149	Wetzka B. 139
Fijak M. 139	O	Wolff von Gutenberg H. 149
G	Oehms S. 148	Y
Goeckenjan M. 152	Ori C. 138, 150	Young S. 140
Götte M. 143, 144	P	Z
Graspeuntner S. 150	Pleuger C. 137	Zhang Q. 141
Greither T. 141	Pock T. 136	
H	Polifke A. 142	
Hansen A. 136		
Hasan H. 137		
Huo J. 146		

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](#)