

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



**26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Reproduktionsmedizin (DGRM), 5.-7. Oktober 2006**

Regensburg (Abstracts)

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2006; 3 (4), 243-253

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

26. JAHRESTAGUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR REPRODUKTIONSMEDIZIN 5.–7. OKTOBER 2006, REGENSBURG (ABSTRACTS*)

MITTEILUNGEN
DER
GESELLSCHAFTEN:
DGRM
www.repromedizin.de



– ABSTRACTS

Andrologie

P01

SELEKTION CHROMATIN-INSTABILER SPERMIIEN IM OVIDUKT DES SCHWEINES

D. Waberski¹, F. Ardon¹, E. Töpfer-Petersen²

¹Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken und ²Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Einleitung: Erhöhtes Vorkommen Chromatin-instabiler Spermien ist bei Mensch und Tier mit Sub- oder Infertilität assoziiert. Für die Einschätzung der Befruchtungsrelevanz eines spermatologischen Parameters ist es prinzipiell von Bedeutung, ob dafür im weiblichen Genital Selektionsmechanismen existieren. Ziel der Studie war es, mit *In-vitro*- und *In-vivo*-Modellen die Selektionsfähigkeit für chromatin-instabile Spermien im weiblichen Genitale am Modell des Schweins zu untersuchen.

Methoden: Percoll-gewaschenes Sperma von vier Ebern mit unterschiedlicher Chromatininstabilität (DNA-Fragmentationsindex [DFI] 2–16 %) wurde im Ovidukt-Explant-Assay an Oviduktepithel *in vitro* gebunden (30 Min. Co-Inkubation; 39 °C; 5 % CO₂), die ungebundenen Spermien entfernt und anschließend die fest gebundenen Spermien durch Schockgefrierung in flüssigem N₂ abgelöst. Der Prozentsatz chromatin-instabiler Spermien im Ejakulat und in der an Ovidukt-Explant gebundenen Spermienpopulation wurde mittels des modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur-Assays verglichen. In einem weiteren *In-vivo*-Versuch wurde das Jungsau-Modell-Hannover angewendet. Jungsaunen wurden mit Sperma zweier Eber mit bekanntem Chromatinstatus (DFI 2–9 %) besamt und die Chromatininstabilität in der Population der akzessorischen Spermien in der Zona pellucida von Tag 3–5 Embryonen bestimmt. Akzessorische Spermien

gelten als befruchtungskompetent, da sie die wesentlichen Schritte der Befruchtungskaskade bis zum Eindringen in die Zona pellucida vollzogen haben.

Resultate: Im Ovidukt-Explant-Assay war der Prozentsatz Chromatin-instabiler Spermien bei gebundenen Spermien signifikant ($p < 0,05$) niedriger als im percoll-gewaschenen Ejakulat; ebenso war die Inzidenz Chromatin-instabiler Spermien in der akzessorischen Spermienpopulation signifikant ($p < 0,05$) vermindert.

Schlußfolgerungen: Es läßt sich schlußfolgern, daß Chromatininstabilität mit Funktionsstörungen der Plasmamembran einhergeht, die zu einer herabgesetzten Bindungsfähigkeit an das Eileiterepithel führen. Chromatin-instabile Spermien sind somit kaum an der Etablierung des funktionellen Spermienreservoirs im weiblichen Genitale beteiligt und haben *in vivo* nur geringe Chancen, auf eine Eizelle zu treffen.

P02

VOLUMENREGULATIONS- UND OVIDUKT-BINDUNGSASSAY ALS FUNKTIONELLE TESTS DER PLASMAMEMBRANINTEGRITÄT VON BULLENSPEMIIEN

E. Sahin¹, A. Petrunkina¹, E. Töpfer-Petersen², D. Waberski¹

¹Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken und ²Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Einleitung: Die sogenannte idiopathische Subfertilität ist bei Mensch und Tier ein verbreitetes Phänomen. Standardspermatologische Parameter sind oft unzureichend, um die komplexen fertilitätsrelevanten Eigenschaften von Spermien zu untersuchen. Unter *In-vivo*-Bedingungen ist die funktionelle Integrität der Spermienplasmamembran von maßgeblicher Bedeutung für die Fertilität. Ziel war es zu testen, ob mit dem Volumenregulations- und Ovidukt-Explant-Assay als funktionelle Tests der Plasmamembranintegrität Fertilitätsunterschiede bei normospermen Bullen erklärt werden können.

Methoden: Tiefgefriersperma von drei fertilen Bullen (Non-Return-Rate 72 %) und drei subfertilen Bullen (Non-Return-Rate 58 %) wurde wie folgt untersucht: standardspermatologisch (progressive Motilität, Morphologie), flowzytometrische Evaluierung der Plasmamembran- und Akrosomintegrität nach Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumjodid und FITC-PNA, Volumenregulationstest im iso- und hypotonen Medium mit dem CASY-1-System sowie die quantitative Bestimmung gebundener Spermien an Eileiterepithel im Ovidukt-Explant-Assay.

Resultate: Die standardspermatologischen und flowzytometrischen Untersuchungen zeigten keine Unterschiede zwischen den Bullengruppen. Die Volumenregulation unterschied sich nach 5 Minuten Inkubation der Spermien im hypotonen Medium signifikant ($p < 0,05$) zwischen fertilen und subfertilen Bullen. Dabei entsprachen die Modalwerte der Volumenverteilung in der fertilen Gruppe bekannten Referenzwerten für Bullensperma. Unter hypotonen Bedingungen war das Spermienvolumen der subfertilen Bullen signifikant höher ($p < 0,05$) als bei fertilen Bullen. In der Gruppe der fertilen Bullen lag der Bindungsindex im Ovidukt-Explant-Assay höher als in der subfertilen Gruppe ($p < 0,01$).

Schlußfolgerungen: Es läßt sich schlußfolgern, daß der Volumenregulationstest und der Ovidukt-Explant-Assay als funktionelle Tests der Spermienplasmamembran ein höheres fertilitätsdiagnostisches Potenzial als standardspermatologische Tests und die flowzytometrische Analyse der Membranintegrität haben.

Einleitung: Die sogenannte idiopathische Subfertilität ist bei Mensch und Tier ein verbreitetes Phänomen. Standardspermatologische Parameter sind oft unzureichend, um die komplexen fertilitätsrelevanten Eigenschaften von Spermien zu untersuchen. Unter *In-vivo*-Bedingungen ist die funktionelle Integrität der Spermienplasmamembran von maßgeblicher Bedeutung für die Fertilität. Ziel war es zu testen, ob mit dem Volumenregulations- und Ovidukt-Explant-Assay als funktionelle Tests der Plasmamembranintegrität Fertilitätsunterschiede bei normospermen Bullen erklärt werden können.

P03

EXPRESSION UND ZELLULÄRE LOKALISATION DES ESTROGENREZEPTORS-ALPHA (ER-A) IM HODEN VERSCHIEDENER SÄUGER

O. Lekhkota, M. Bergmann
Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Universität Gießen

Einleitung: In den Leydig-Zellen einiger Spezies werden unterschiedliche Estrogenmengen synthetisiert, die in peripherem Blutplasma, Tubulusflüssigkeit und Ejakulat nachgewiesen werden

* Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Kongreßkomitee (lokales Organisationskomitee, DGRM-Vorstand sowie Vorstand bzw. Sprecherinnen der DGRM-AGS Reproduktionsgenetik und ÄRE)



können. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Estrogene eine funktionelle Bedeutung für die Hodenfunktion haben. So weisen Hengste im peripheren Blutplasma Estrogenkonzentrationen von bis zu 400 ng/ml, Männer 68 pg/ml und Hunde 10–40 pg/ml auf. Die Daten hinsichtlich der exakten Lokalisation von Estrogenrezeptoren im Hoden sind widersprüchlich. So wird bei Nagern die Expression von ER- α -Protein immunhistochemisch sowohl in Keimzellen als auch in somatischen Sertoli- und Leydig-Zellen beschrieben, beim Hund in Leydig- und peritubulären Zellen sowie beim Mann nur in den Leydig-Zellen.

Methoden: In dieser Studie wurde die ER- α -mRNA-Expression mittels RT-PCR am Hodenhomogenat und die zelluläre Lokalisation mittels *In-situ*-Hybridisierung, *In-situ*-PCR und UV-Laser-Cell-Picking bei Mensch, Maus, Hund und Pferd nachgewiesen.

Resultate: Die RT-PCR für ER- α an Gesamthomogenat ergab ein spezifisches PCR-Produkt. Im Unterschied zu den immunhistochemischen Untersuchungen läßt sich die zelluläre Lokalisation von ER- α -mRNA bei Mann, Maus und Pferd in Spermato gonien und primären Spermatozyten bis zum Mid-Pachytän und beim Hund in Spermato gonien und allen primären Spermatozyten nachweisen. Die interstitiellen Leydig- und peritubulären Zellen sowie die Spermatoziden sind negativ.

Schlußfolgerungen: Die zelluläre Lokalisation des ER- α weist darauf hin, daß Estrogene an der Proliferation und Differenzierung von Spermato gonien und primären Spermatozyten beteiligt sind.

P04

UNTERSUCHUNG DES SPERMATOGENESE-PHÄNOTYPS BEI TRANSGENEN MÄUSEN MIT SERTOLI-ZELL-SPEZIFISCHEM KNOCKOUT DES CONNEXIN43-GENS

M. Zeiler¹, M. Kibschul², E. Winterhager², K. Willecke³, F. Guillou⁴, K. Steger⁵, L. Konrad⁶, M. Bergmann¹, R. Brehm¹
¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Universität Gießen, ²Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, ³Institut für Genetik, Universität Bonn, ⁴INRA-CNRS, Universität Tours-Haras, Nouzilly, Frankreich, ⁵Urologische Klinik, Universität Gießen, ⁶Klinik für Urologie, Universität Marburg

Einleitung: Zell-Zell-Verbindungen über „gap junctions“, die Connexin43 (Cx43) enthalten, kommen im Keimepithel des Hodens zwischen benachbarten Sertoli-Zellen sowie zwischen Sertoli- und Keimzellen vor. Sie werden mit der Keimdrüsenentwicklung und mit der pubertären Initiierung der Spermatogenese bei verschiedenen Spezies wie Maus, Ratte und Mensch in Verbindung gebracht.

Methoden und Resultate: Da Mäuse mit einem generalisierten Connexin43-Knockout aufgrund von Herz-Kreislauf-Mißbildungen nicht lebensfähig sind, wurde erfolgreich eine konditionale Cx43-Knockout-Mauslinie (SCCx43KO) unter Einsatz des Cre/LoxP-Rekombinationssystems generiert, bei der nach Verpaarung von Cx43 geflochtenen Mäusen mit AMH-Cre-Mäusen die Deletion des Cx43-Gens auf Sertoli-Zellen beschränkt ist. Ein Fertilitätsassay ergab, daß die homozygoten SCCx43KO-Tiere dieser Linie steril waren aber Libido zeigten, während die heterozygoten SCCx43KO und Wildtyp-Mäuse fertil waren. Mit diesem Tiermodell können nun die Folgen des zellspezifischen Verlustes des Cx43-Gens auf die postnatale Differenzierung der Sertoli- und Keimzellen gezeigt werden. Nach der Genotypisierung mittels Schwanzspitzenbiopsie wurde das erfolgreiche Ausschneiden des Cx43-Gens im Hoden mit Hilfe einer RT-PCR und dem indirekten immunhistochemischen Nachweis der nuklearen β -Galaktosidase bestätigt. Der Phänotyp homozygoter SCCx43KO-Mäuse zeigte im Vergleich zu heterozygoten SCCx43KO- oder Wildtyp-Mäusen ein

vermindertes Hodengewicht (0,06 % des Körpergewichts vs. 0,23 % bei heterozygoten SCCx43KO- und 0,32 % bei Wildtyp-Mäusen) und einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermato gonien mit Ausbildung primärer Spermatozyten in vereinzelt Keim tubuli. Um den Differenzierungszustand der Sertoli-Zellen näher charakterisieren zu können, wurden mittels *In-situ*-Hybridisierung die Synthese von Cx43 mRNA und immunhistochemisch das Vorkommen des Cx43-Proteins untersucht. Auffallend war dabei, daß weder in Sertoli-Zellen noch in Keimzellen das Protein, aber in Spermato gonien die Cx43-mRNA detektiert wurde. Wie müssen also Sertoli- und Keimzellen miteinander kommunizieren, damit ein vollständiges Cx ausgebildet wird? Bei einem Teil der homozygoten SCCx43KO-Mäuse fand sich außerdem in bis zu 10 % der Tubuli eine zumindest qualitativ intakte Spermatogenese.

Schlußfolgerungen: Zusammenfassend deuten die bisherigen Ergebnisse auf das Vorliegen eines somatischen Mosaiks hin.

P05

GENEXPRESSION DES TESTIS-SPEZIFISCHEN HISTONS (H1T) IN DER SPERMATOGENESE DES PFERDES

M. Oliveira Cavalcanti¹, M. Bergmann¹, J. Geyer²

¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie und ²Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Gießen

Bei Säugetieren werden in den Spermato gonien und Spermatozyten Histone exprimiert. Die Histone werden in Kor- (H2A, H2B, H3 und H4-) und Linker-Histone (H1.1-5, H1t und H1) eingeteilt. Das H1t ist ein hodenspezifisches Histon und wird nur in den Keimzellen exprimiert. Die Expression dieser Kernproteine ist beim Pferd bisher nicht untersucht worden. Beim Pferd war die H1t-Sequenz bisher unbekannt. Durch Bioinformatikanalysen sind Primer ausgesucht worden. Das equine H1t-Gen ist kloniert und die H1t-Sequenz ist in der Genbank eingetragen (Accession number AJ865320). Die mRNA-Expression konnte durch RT-PCR in Hoden-



homogenaten sowie durch eine H1t-mRNA-Sonde mittels *In-situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden. Es hat sich gezeigt, daß in der normalen Spermatogenese H1t-mRNA in primären Spermatozyten bis zum „Mid“-Pachytän exprimiert wird. Das H1t-Protein ist durch Westernblot in der normalen Spermatogenese am Hodenhomogenat mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen H1t-Peptid LITEALSVSQER identifiziert und sequenziert worden. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 21 kDa. In einem Expressionsprofil wurde festgestellt, daß H1t tatsächlich hodenspezifisch ist. Quantitative Real-Time-PCR sowie Westernblots an Homogenaten skrotaler Hoden mit normaler Spermatogenese sowie inguinal kryptorcher Hoden, die einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der fetalen Prä-spermatogonien bzw. Spermatogonien aufweisen, zeigen, daß Prä-spermatogonien und Spermatogonien im Vergleich zur primären Spermatozyten eine geringe mRNA-Expression aber noch keine Proteinexpression aufweisen. Diese Daten zeigen, daß, ebenso wie bei der Maus, das equine H1t auf RNA-Ebene in geringen Mengen bereits in Spermatogonien exprimiert und mit dem Beginn der Meiose hochreguliert wird. In weiteren Untersuchungen soll geklärt werden, ob eine geringe Spermatogenese-Effizienz mit einer geänderten H1t-Expression korreliert.

P06

MOSAİK DES ANDROGENREZEPTORS DER SERTOLI-ZELLE

K. Handte, S. Hartmann, K. Herde, M. Bergmann
Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie, Universität Gießen

Der Androgenrezeptor (AR) enthält im Exon 1 in der N-terminalen Transaktivationsdomäne eine polymorphe Polyglutaminwiederholung der Basen CAG. Die physiologische Variationsbreite beträgt 9–36 „Repeats“. Lange Repeats (> 26) korrelieren mit Spermatogenesestörungen, die durch eine geringere Affinität des Rezeptors für Androgen bedingt ist. Der kausale Zusammenhang zwischen genomischem AR-Polymorphismus und Infertilität ist unbekannt. Bisherige Da-

ten beruhen auf Untersuchungen der DNA in Lymphozyten. Wir untersuchen erstmals die Möglichkeit des somatischen Mosaiks des AR in bezug auf den Differenzierungsgrad der Sertolizellen (SZ) bei Patienten mit bunter Atrophie der Spermatogenese. Sowohl Keimzellen als auch SZ verfügen über genomische DNA. Deshalb wurde der CAG-Polymorphismus an mRNA untersucht, da innerhalb der Keimtubuli nur die SZ den AR exprimiert.

An Paraffinschnitten wurden mittels UV-Laser-gestützter-Mikrodissektion Tubuli mit qualitativ intakter Spermatogenese und präpubertäre Stränge ausgeschnitten, RNA isoliert, amplifiziert, kloniert und sequenziert. Dabei entspricht ein Klon dem Amplifikat aus einer SZ.

Zur Charakterisierung des SZ-Differenzierungsgrades wurden immunhistochemische Färbungen gegen Anti-Müller-Hormon (AMH), Zytokeratin 18 und AR angefertigt.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, daß SZ aus Proben jedes einzelnen Patienten sowohl assoziiert mit intakter Spermatogenese als auch in präpubertären Keimsträngen ein Mosaik unterschiedlicher CAG-Repeatlängen bis zu 4 Repeats aufweisen.

Die Repeatlänge liegt bei allen Proben mit 24–26 (intakte Spermatogenese) bzw. 25–27 (präpubertäre Keimstränge) innerhalb der physiologischen Variation.

Die Immunhistologie zeigt eine heterogene SZ-Population innerhalb präpubertärer Stränge auf. Dabei zeigen SZ in präpubertären Keimsträngen im Vergleich zu SZ bei intakter Spermatogenese eine Expression von AMH und eine nur geringe Expression des AR.

Die vorliegenden Daten belegen erstmals das somatische Mosaik des AR auf zellulärer Ebene und geben Hinweise darauf, daß die geringere AR-Expression in undifferenzierten SZ bei adulten Patienten mit der Länge des Repeats korrelieren könnte.

P07

EXPRESSION VERSCHIEDENER CONNEXINE IN SERTOLI- UND KEIMZELLEN IN DER NORMALEN UND GESTÖRTEN SPERMATOGENESE DES HUNDES

C. Rüttinger¹, M. Bergmann¹, S. Pesch², K. Seitz³, A. Trautmann³, R. Brehm¹
¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie und ²Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Universität Gießen, ³Tierärztliche Klinik Dr. Kaiser, Stadtoldendorf

„Gap junctions“, die Connexin (Cx) 43 enthalten, sind im Hoden des Mannes intratubulär zwischen benachbarten Sertoli-Zellen und zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen lokalisiert. Sie werden im Keimepithel wahrscheinlich zum ersten Mal ab der Pubertät exprimiert, assoziiert mit dem Beginn der Spermatogenese. Weiterhin ist bekannt, daß die Entwicklung humaner Keimzell-tumoren (aus präinvasivem Carcinoma *in situ*) mit einer Sertoli-Zell-Dedifferenzierung sowie einer Herunterregulierung der Cx43-Genexpression einhergeht.

Mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), UV-Laser-assistierter Mikrodissektion, *In-situ*-Hybridisierung, Immunhistochemie und Westernblot wurde erstmals das mögliche Auftreten von Cx43 auf mRNA- und Proteinebene im Hoden von präpubertären Hunden, adulten Hunden mit normaler Spermatogenese und bei verschiedenen Formen kaniner Hodentumoren untersucht.

In präpubertären Keimsträngen konnte zwar Cx43-mRNA, jedoch kein Cx43-Protein nachgewiesen werden. Untersuchungen im Keimepithel des adulten Hundes mit normaler Spermatogenese zeigten, daß Cx43-mRNA in Sertoli-Zellen sowie in Keimzellen und Cx43-Protein zwischen Sertoli-Zellen des „Sertoli-Sertoli-junctional-Komplex“ lokalisiert ist. In Hodentumoren zeigte sich ein differenziertes Verteilungs- und Expressionsmuster. So konnte Cx43-mRNA sowohl im kaninen Seminom als auch im Sertoli-Zelltumor detektiert werden, wohingegen Cx43-Protein nur noch zwischen neoplastischen Sertoli-Zellen des Sertoli-Zelltumors, aber nicht mehr zwischen neoplastischen Keimzellen des Seminoms zu finden war.



Erste Ergebnisse mittels RT-PCR zeigten eine klare Expression von Cx43-mRNA im kaninen Hoden.

Da Cx43 als pubertärer Marker im Sertoli-Zelltumor scheinbar nicht herunterreguliert wird, sollen weitere Untersuchungen dazu beitragen, eine Aussage über den Differenzierungszustand der neoplastischen Sertoli-Zellen machen zu können.

Diese Studie wird gefördert durch die Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Assistierte Reproduktion

P08

MECHANISMEN DER EIZELLREIFUNG BEIM PFERD

C. Reich¹, S. Kölle¹, G. Duchamp², C. Lahuec², M. Caillaud², G. Goudet²
¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Universität Gießen, ²INRA-CNRES, Universität Tours-Haras, Nouzilly, Frankreich

Die Erfolgsraten für die *In-vitro*-Maturation (IVM) und *In-vitro*-Fertilisation (IVF) von equinen Oozyten liegen bei 20–30 %. Ziel der Studie war es daher, die Mechanismen der Eizellreifung beim Pferd näher zu charakterisieren und die Reifung *in vivo* und *in vitro* zu vergleichen. Unreife Cumulus-Oozyt-Komplexe (COCs) wurden durch Follikelpunktion und Slicing von Ovarien von Pferden nach der Schlachtung gewonnen. *In vivo* gereifte COCs wurden durch ultraschallgeführte transvaginale Aspiration von präovulatorischen Follikeln von 26 Ponystuten gewonnen. Die IVM erfolgte in „Tissue Culture Medium 199“ mit 20 % Kälberserum und 50 ng/ml EGF. Unreife COCs sowie *in vivo* und *in vitro* gereifte COCs wurden mit Hilfe der Lichtmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie, Immunzytochemie und Histochemie verglichen. Die unreifen COCs weisen zahlreiche runde, dichtgepackte Cumuluszellen auf, die nur durch wenige kurze Fortsätze verbunden sind. Nach der Reifung *ex vivo* weist der COC eine hohe Anzahl an Cumuluszellen auf, die durch eine große Menge extrazellulärer Matrix (ECM) voneinander getrennt, jedoch durch lange zytoplasmatische Fortsätze miteinander verbunden sind.

Die ECM besteht zu einem großen Anteil aus Hyaluronsäure, die in unreifen COCs nur in geringem Maße, nach der Maturation in hoher Menge sowohl von der Eizelle wie von den Cumuluszellen gebildet wird. Zusätzlich lassen sich saure und sulfatierte Glyksaminoglykane (GAGs) nachweisen, die in unreifen COCs nur in geringem Maße in der Eizelle, nach der Reifung *in vivo* in hohem Maße sowohl in der Eizelle wie in den Cumuluszellen synthetisiert werden.

Nach IVM ist die Zahl der Cumuluszellen und die Menge der gebildeten ECM deutlich geringer als nach der *In-vivo*-Maturation. Die Synthese von HyA ist in Eizelle und Cumuluszellen reduziert, die Produktion von GAGs ist in der Eizelle vermindert. Die Cumuluszellen sind nur durch wenig Fortsätze verbunden und weisen eine unregelmäßige Form auf. Während die Zona pellucida (ZP) der Eizelle bei *in vivo* gereiften Eizellen ein dreidimensionales Netzwerk mit gleichmäßig angeordneten, ovalen Poren aufweist, zeigt sie nach der IVM lediglich wenige, unregelmäßige Poren.

Unsere Studien zeigen, daß die Cumuluszellen für die Eizellreifung des Pferdes durch Bildung großer Mengen waserbindender extrazellulärer Matrix eine essentielle Rolle spielen. Veränderungen in Zahl und Funktion der Cumuluszellen führen zu Störungen in der Syntheseleistung der Oocyte und in der Struktur der ZP.

P09

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER NACHWEIS VON LÄSIONEN DER SPERMIIEN-ZENTRIOLE ALS URSACHE FÜR ZELLTEILUNGSARREST IM PRONUKLEUSSTADIUM NACH INTRAZYTOPLASTISCHER SPERMIIENINJEKTION (ICSI)

J. Schröder¹, F. Hofstädter¹, M. Bals-Pratsch², B. Paulmann², S. Seifer², B. Seifert²

¹Institut für Pathologie der Universität Regensburg, ²Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Humangenetik, Regensburg

Einleitung: Bei Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch zeigt sich unter den The-

rapien der „assistierten Reproduktion“ das ICSI-Verfahren als besonders erfolgversprechend. Dessen Effektivität kann jedoch durch zahlreiche Dysfunktionen des Spermiums nachteilig beeinflusst werden.

Die reife humane Oocyte besitzt kein Zentrosom; ist die Fähigkeit des paternalen Zentrosoms zur Induktion der ersten Teilungsspindel in der Zygote beeinträchtigt, bleibt die Syngamie der Pronuklei (PN) aus, was zu einem Arrest in der Embryonalentwicklung führt.

Methoden: Natives Ejakulat (P-Motilität: 50 %) eines 40jährigen Mannes wurde Karnovsky-fixiert, in Kunststoff eingebettet und elektronenmikroskopisch untersucht. Vorausgegangen waren zwei erfolglose ICSI-Zyklen (37 Eizellen: 25-PN-Stadien; Kryo von 12-PN-Stadien), die im Arrest des PN-Stadiums der Zygote endeten (Frau: intakte Funktion der reifen Eizelle, Nachweis durch sog. „spindle-view“ des Polkörpers; ein Embryotransfer mit fraglicher Zellteilung).

Resultate: Zur Darstellung kamen zahlreiche abnorme Spermien (80 %) mit Aberrationen des Akrosomenkomplexes (Agenesie, Dysgenese, Kraterbildung, Vakuolen/membranöse Inklusionen), Kopfdeformationen (Rundformen, Spitzformen, Doppelköpfe, unkompaktiertes Chromatin) sowie multiplen Läsionen des Zentrosoms.

Bei 8 von 11 untersuchten Spermien mit optimal einsehbarer Zentrosomen (73 %) kamen im Querschnitt der Zentriole ein Verlust der Mikrotubuli- (MT-) Tripletten, deren Reduktion zu MT-Doublen/Monomeren bzw. zusätzliche Zentriolenstrukturen zur Darstellung. In längs getroffenen Zentriolen zeigten sich überlange MT, die quer aus dem Spermienhals herausragten.

Schlußfolgerungen: Die beobachteten zentriolären Abberationen sind wahrscheinlich Ursache für eine frühe Störung der Embryonalentwicklung.

Zur Zeit ist bei einer Zentriolenstörung im homologen System keine Therapie möglich. Über erste heterologe Versuche zur Restaurierung der Zentriolenfunktion humaner Spermien unter Einsatz Zytoskelett-stabilisierender Substanzen wurde berichtet.



P10

FRÜHEMBRYONALE ENTWICKLUNGSPAUSE MIT NACHFOLGEND NORMALEM GESTATIONSVERLAUF NACH ICSI UND EMBRYOTRANSFER: EIN FALLBERICHT

R. Ochsenkühn, W. Fait, K. Friese, C. Thaler
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München-Großhadern

Im Rahmen der ICSI und nachfolgendem Embryotransfer (ET) ergibt sich der Konzeptionstermin einer resultierenden Schwangerschaft aus dem Zeitpunkt der Follikelpunktion. Dadurch ist im Regelfall eine sehr exakte Bestimmung des Gestationsalters möglich. Demgegenüber erfolgt die Festlegung des Konzeptionstermins bei spontanen Schwangerschaften meist nur nach der Zyklusanamnese, was oft Unklarheiten mit sich bringt. In diesen Fällen erlauben die frühe embryonale Sonobiometrie sowie die serielle Bestimmung des mütterlichen Serum beta-hCG eine weitgehend exakte Festlegung des Gestationsalters.

Wir berichten über den frühen Schwangerschaftsverlauf einer 39jährigen Patientin, bei der nach ICSI und Embryotransfer (ET) zunächst eine 5tägige Verzögerung von SSL-Entwicklung und hCG-Dynamik auftrat. Im Anschluß an diese Entwicklungspause setzte eine regelrechte Weiterentwicklung der sonographisch dokumentierbaren Embryogenese sowie ein normaler hCG-Verlauf ein. Bei der Patientin besteht aktuell eine unauffällige Gravidität im 2. Trimenon.

Der in Relation zum Punktionstermin um 5 Tage verspäteten Embryogenese könnte eine vorübergehende Entwicklungspause zugrunde liegen. Dieser biologische Mechanismus ist bei verschiedenen Säugetieren gut untersucht und wird als Diapause bezeichnet. Bisher gibt es einige wenige Fallberichte, die das Vorkommen einer Diapause auch im Rahmen der menschlichen Fortpflanzung nahe legen. Die wissenschaftliche Untersuchung einer möglichen humanen Diapause könnte interessante Konzepte zu den Vorgängen bei regelhafter oder gestörter Implantation ergeben. Der Fallbericht weist auch auf

mögliche Probleme des frühzeitigen Schwangerschaftsnachweises im Zusammenhang mit assistierten Reproduktionstechniken hin.

P11

NEUES SONOGRAPHISCHES OVARSORING ZUR PRÄDIKTIVEN EINSCHÄTZUNG DER OVARIELLEN REAKTION IM ERSTEN ART-ZYKLUS

B. Wetzka, A. Maechtel, F. Botsch, A. Wacker, A. Ochsner, F. Geisthövel
CERF Freiburg

Studiendesign: Zur prädiktiven Einschätzung der ovariellen Reaktion auf die Gonadotropinstimulation im nachfolgenden ersten ART-Zyklus wurde ein neues sonographisches Scoring der funktionellen Reserve des unstimulierten Ovars angewendet. Anhand dieses Ovarscores (OS) wurde die entsprechende Gonadotropindosierung mit dem Ziel gewählt, die Abbruchrate zu minimieren, eine ausreichende Anzahl von Oozyten zu gewinnen und ein ovarielles Überstimulationssyndrom (OHSS) zu vermeiden.

Methoden: Das Ovarsoring wurde bei 61 Frauen ($33,2 \pm 5,0$ Jahre; BMI $23,7 \pm 4,4$ kg/m²) zwischen dem 3. und 7. Zyklustag (Tag A) mittels Vaginalsonographie durchgeführt. Der OS lag zwischen +2 und -2, dabei wurde ein OS von +2 definiert als max. ovarieller Durchmesser (MOD) von > 30 mm, mehr als 8 Antralfollikel und einer zentralen Echodensität von > 1/3 der Ovarfläche, während ein OS von -2 bei einem MOD von < 20 mm und weniger als 3 Antralfollikeln vergeben wurde. Für die Auswertung wurde der mittlere OS (mOS) der beiden Ovarien einer Patientin verwendet. Mit Hilfe dieses prätherapeutischen OS wurde die initiale Gonadotropindosis im anschließenden ersten ART-Zyklus gewählt, z. B. eine niedrige Dosierung von < 100 IU FSH/d bei Frauen mit mOS von +2 („very high responder“) und eine hohe Dosis von > 250 IU FSH/d bei einem mOS von -2 („very low responder“). Neben dem OS wurden die Serumkonzentrationen von FSH, LH, Inhibin B (Inh) und Testosteron (T) mittels Immunoassays bestimmt. Die Follikelzahl (FZ) am 6. Stimulationstag (Tag B), die bei der Punktion gewonnene Oozytenzahl (OZ) (Tag C) und der MOD

der Ovarien am Tag 10 nach der hCG-Injektion (Tag D) wurden zusammen mit den entsprechenden Serumhormonspiegeln dokumentiert. Am Tag D wurde zusätzlich der Hämatokrit (Hkt) bestimmt. Die statistische Evaluation wurde mittels der Spearman-Korrelation durchgeführt (Korrelationskoeffizient, p). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Ergebnisse: Der mOS beider Ovarien am Tag A lag bei $-0,01 \pm 1,10$. Die folgenden Korrelationskoeffizienten beziehen sich auf den mOS: Das Alter, der FSH/LH- und der FSH/Inh-Quotient waren negativ korreliert ($-0,32$; $p = 0,013$; $-0,49$; $p < 0,0001$; $-0,26$; $p = 0,04$). Die LH- und T-Serumspiegel zeigten eine positive Korrelation ($0,36$; $p = 0,004$; $0,28$; $p = 0,02$). Die initiale FSH-Dosis/d ($80-300$ IU) und die Gesamt-FSH-Menge/Zyklus ($820-4275$ IU) korrelierten negativ ($-0,88$; $p < 0,0001$; $-0,65$; $p < 0,0001$). Am Tag B zeigte der Serum-FSH-Spiegel eine negative ($-0,71$; $p < 0,0001$) und die FZ ($13,0 \pm 9,7$) eine positive ($0,57$; $p < 0,0001$) Korrelation. Die OZ ($9,7 \pm 4,5$) am Tag C ($0,30$; $p = 0,01$) und der MOD am Tag D ($0,38$; $p = 0,0026$) korrelierten positiv. Der maximale Hkt lag bei 42% ($36,7 \pm 3,1$).

Obwohl die Ergebnisse der ART-Zyklen keine direkten Ziele der Studie waren, werden sie als Referenz im folgenden dargestellt: Bei 61 Behandlungszyklen gab es ein Fertilisationsversagen und eine fehlende Follikelentwicklung. Es resultierten 25 fortlaufende Schwangerschaften (21 Einlinge, 4 Zwillinge) und 2 Aborte. In 38 Zyklen wurden 2-PN-Zellen kryokonserviert.

Schlussfolgerungen: Das neue sonographische OS, das die funktionelle Reserve des unstimulierten Ovars evaluiert, sagt zuverlässig die ovarielle Reaktion im anschließenden ersten ART-Zyklus voraus. Durch die Anwendung dieses einfachen klinischen Hilfsmittels kann die adäquate initiale Gonadotropindosis genauer kalkuliert werden, so daß die Abbruchrate minimiert und die Entwicklung eines OHSS vermieden werden kann. In der praktischen Anwendung hat sich diese Methode auch bei endokrinologischen Fragestellungen wie Abklärung einer Oligo-Amenorrhö oder des Perimenopausenstatus bewährt.



P12

INTRAZYTOPLASMATISCHE SPERMIEN-INJEKTION (ICSI) MIT KRYOSPERMA NACH KRYOKONSERVIERUNG VOR ONKOLOGISCHER BEHANDLUNG

B. Paulmann, M. Bals-Pratsch, D. Seifert, B. Seifert

Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Human-genetik, Regensburg

Einleitung: Effektive Tumortherapien (TuT) führen beim Mann nicht selten zu Einschränkungen oder komplettem Verlust der Fertilität. Die Spermakryokonservierung (SKK) ist ein Routineverfahren der Reproduktionsmedizin und sollte jedem Patienten (Pat.) vor einer TuT zur Fertilitätsprotektion (FP) angeboten werden. Die Lebensqualität kann hierdurch erhalten oder gesteigert werden. Weitere Indikationen für die SKK sind Ejakulationsstörungen oder Chemotherapie z. B. bei chronischen Erkrankungen.

Methoden: Im Zeitraum von 01/2001 bis 12/2005 führten wir bei 113 Pat. die SKK durch. Bei 75 Pat. erfolgte die SKK vor einer onkologischen Behandlung (35x Hoden-Tumor [Tu], 17x Lymphome, 14x Leukämie, 3x Gehirn-Tu, 2x Prostata-Tu, 2x Kolon-Tu, 1x Blasen-Tu, 1x Thymus-Tu). Die Pat. waren zum Zeitpunkt der TuT und SKK 15–63 Jahre alt (Median: 26 J.). 7 Pat. (12 %) kamen 1 Monat bis 3 Jahre (Median: 1 J.) später zur ICSI mit Kryosperma (bei TuT 25–63 Jahre; Median: 33).

Resultate: Bei den 7 Pat. (Alter bei ICSI-Behandlung 30–63 Jahre; Median: 34) wurden 12 ICSI-Kryospermazyklen und 3 Kryozyklen (3x Hoden-Tu, 1x Morbus Hodgkin, 1x Blasen-Tu, 1x Gehirn-Tu, 1x Leukämie) 07/2002 bis 05/2006 durchgeführt. Es konnten 8 Schwangerschaften (SS) bei 5 Paaren erreicht werden (1 Frühabort). Die Patientinnen waren bei der ICSI-Behandlung zwischen 23 und 38 Jahre alt (Median: 34). 7 Kinder (1x Gemini) wurden bereits geboren. Darüber hinaus besteht eine fortlaufende SS.

Schlussfolgerungen: Trotz sehr guter TuT-Behandlungserfolge machen derzeit jüngere Tumor-Pat. mit noch nicht begonnener oder abgeschlossener Famili-

enplanung nur in geringem Umfang von der FP Gebrauch [1, 2]. Eine Ursache liegt sicher in der unzureichenden ärztlichen Aufklärung vor der TuT sowie das ungenügende Wissen der onkologisch tätigen Ärzte über die heutigen sehr erfolgreichen Möglichkeiten der ICSI-Methode.

Literatur:

1. Tournaye H. Storing reproduction for oncological patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 27: 133–6.
2. Revel A, Haimov-Kochmann R, Porat A, Lewin A, Simon A, Laufer N, Gino H, Meirou D. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection success rates with cryopreserved sperm from patients with malignant disease. *Fertil Steril* 2005; 84: 118–22.

P13

ASSISTIERTE REPRODUKTION (ART) BEIM POLYZYSTISCHEN OVARYSYNDROM (PCOS) UND METFORMIN

S. Fink, N. Geneidy, M. Bals-Pratsch, B. Seifert

Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Human-genetik, Regensburg

Einleitung: Das PCOS ist ein komplexes Krankheitsbild und häufig mit metabolischen Störungen assoziiert. Oft sind die Schwangerschaftsraten (SSR) bei ART niedriger als bei Patientinnen (Pat.) ohne PCOS. Die Begleitmedikation mit Metformin bei PCOS im Rahmen von ART-Zyklen ist heutzutage klinische Routine.

Methodik: In einer retrospektiven Studie wurden die Ergebnisse bei ART bei 275 Pat. mit PCOS und 3166 Pat. ohne PCOS verglichen. Es wurden 8187 aufeinanderfolgende Zyklen zwischen 1998 und 2005 mit der *In-vitro*-Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) ausgewertet.

In einer Subanalyse wurde der Einfluss von Metformin auf die Ergebnisse von PCOS-Pat. mit Insulinresistenz (Insulinsensitivitätsindex ISI < 6) untersucht (94 Behandlungszyklen mit vs. 252 ohne Metformin).

Resultate: PCOS-Pat. hatten einen signifikant höheren Body-Mass-Index, jüngeres Alter, weniger andere Sterilitätsursa-

chen, längere Stimulationsdauer, niedrigere Gonadotropindosen und mehr reife Oozyten.

Die SSR über alle Zyklen wie auch nach IVF war bei PCOS-Pat. höher (32,9 % vs. 25,3 % bzw. 38,1 % vs. 28,3 %). Besonders unter- und übergewichtige Pat. mit PCOS hatten signifikant bessere Ergebnisse als Pat. ohne PCOS. Die SSR nahm kontinuierlich mit der Anzahl der ART-Zyklen bei Pat. ohne PCOS ab, nicht aber bei PCOS.

Bei PCOS-Pat. erbrachte die Begleitmedikation mit Metformin eine Steigerung der klinischen SSR, die jedoch kein Signifikanzniveau erreichte. Bemerkenswert war allerdings eine Senkung der Frühabortrate von 24,5 % auf 17,6 %.

Schlussfolgerungen: Das Alter der PCOS-Pat. war in > 50 % der Fälle < 30 Jahre. Pat. ohne PCOS waren durchschnittlich 31,7 Jahre alt. Bei diesen Pat. lagen signifikant mehr andere Sterilitätsfaktoren, Tubenfaktor oder Endometriose vor. PCOS-Pat. haben somit eine günstige Prognose bei ART.

Reproduktionsendokrinologie

P14

NON-HLA-ANTIKÖRPER BEI PATIENTINNEN MIT REZIDIVIERENDEN SPONTANABORTEN

N. Rogenhofer, R. Assef, M. Fileki, K. Friese, C. Thaler

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München-Großhadern

Einleitung: Eine Gruppe von Patientinnen (Pat.) mit rezidivierenden Spontanaborten (RSA) produziert Antikörper (AK), die offenbar pathogenetisch relevant sind. Wichtig ist die Abgrenzung dieser Antikörper gegenüber anti-paternalen AK gegen klassische anti-Human Leukocyte Antigens-(HLA-) A, -B, -C, da diese häufig im dritten Trimenon normaler Schwangerschaften auftreten. Chorionkarzinomzellen JEG-3 sind negativ für klassisches HLA, jedoch exprimieren sie das weitgehend monomorphe HLA-G. Wir haben untersucht, ob RSA-Pat. vermehrt anti-Trophoblast-AK (non-HLA-A, -B, -C) produzieren und



ob diese AK gegen HLA-G gerichtet sind.

Material und Methoden: Wir analysierten Seren von 105 RSA-Pat. mit mindestens 2 konsekutiven Spontanaborten vor der 20. Schwangerschaftswoche. Als Kontrolle dienten 60 gesunde Schwangere ohne Fehlgeburten. In allen Fällen diente die Durchflußzytometrie als Untersuchungsmethode (FACS-Scan; Beckton Dickinson, Heidelberg). Die JEG-3-Expression für klassisches HLA wurde mittels des monoklonalen TP25.99 AK (Maus IgG1, von Dr. S. Ferrone, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY) analysiert, die HLA-G-1- und HLA-G-5-Expression mittels des MEM-G/9- (Maus IgG1-) Antikörpers (Abcam, Cambridge, UK). Zusätzlich wurde die Anti-JEG-3-Aktivität von RSA- und Kontrollseren analysiert. Um eine HLA-G-Spezifität in den RSA-Seren zu untersuchen, wurde ein durchflußzytometrischer Blocking-Assay verwendet: Hierbei wurden JEG-3-Zellen zunächst mit den Seren reaktiver Patientinnen inkubiert und anschließend auf eine verminderte Reaktivität gegenüber MEM-G9-AK getestet. Die statistische Auswertung erfolgte nach einem 95 %-Konfidenzintervall und Fisher's-Exact-Test.

Ergebnisse: Unsere Untersuchungen bestätigten, daß JEG-3-Zellen HLA-G1 und -G5 exprimieren, aber negativ für HLA-A, -B, -C sind. RSA-Patientinnen reagierten signifikant stärker mit JEG-3-Zellen als die Kontrollgruppe (16,2 % vs. 3,3 %; $p = 0,011$). Im Blocking-Assay fand sich kein Hinweis auf eine Reaktivität JEG-3-positiver RSA-Seren gegen HLA-G1 oder -G5.

Schlußfolgerungen: Patientinnen mit wiederholten Fehlgeburten produzieren im Gegensatz zu Kontrollpatientinnen ohne Fehlgeburten anti-Trophoblast-Antikörper. Diese Antikörper sind offenbar weder gegen klassisches HLA (-A,-B,-C) noch gegen das trophoblast-spezifische HLA-G1 oder -G5 gerichtet.

P15

METFORMIN VS. ACARBOSEANWENDUNG BEI FRAUEN MIT POLYZYSTISCHEM OVARYSYNDROM (PCOS): PROSPEKTIV-RANDOMISIERTE DOPPELBLINDSTUDIE

A. Hanjalic-Beck¹, B. Gabriel², C. Niemyer¹, C. Keck², M. Schories³, C. Tempfer⁴, H. Zahradnik¹
¹Universitäts-Frauenklinik Freiburg, ²Serono International, Genf, Schweiz, ³Klinik für Endokrinologie, Bethesda Spital, Basel, Schweiz, ⁴Universitäts-Frauenklinik, AKH Wien, Österreich

Einleitung: Das polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) stellt eine der häufigsten endokrinologischen Erkrankungen bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter dar (ca. 5–10 %). Sie ist häufig durch eine Hyperinsulinämie gekennzeichnet. Infolgedessen kommt der Behandlung der Hyperinsulinämie beim PCOS besondere Bedeutung zu. Ziel dieser Studie war es, die Wirkung und die Verträglichkeit zweier Antidiabetika – Metformin und Acarbose – bei Patientinnen mit PCOS hinsichtlich der Ovulation und der metabolischen/hormonellen Veränderungen zu überprüfen.

Methoden: Es wurden 75 Patientinnen mit PCOS (NIH 1990) rekrutiert, für die prospektive Anwendung mit Metformin ($n = 37$) (1700–2550 mg/d) vs. Acarbose ($n = 38$) (200–300 mg/d) randomisiert und insgesamt über 12 Wochen behandelt. Bei allen Patientinnen wurden vor und nach der Therapie ein oraler Glukosetoleranztest mit Insulinbestimmung durchgeführt sowie metabolisches und hormonelles Profil bestimmt. Die Ovulationsrate wurde durch regelmäßige Progesteronkontrollen bestimmt. Das Menstruationsmuster und die subjektiven Nebenwirkungen wurden vor und nach der Therapie abgefragt.

Resultate: Body-Mass-Index (BMI) und Alter beider Gruppen waren vor der Therapie gleich. Die Ovulationsrate betrug am Ende der Studie in der Metformin-Gruppe 70 % und in der Acarbose-Gruppe 55 % ($p = 0,185$). Entsprechend besserte sich auch die Zyklusregelmäßigkeit (67 % unter Metformin vs. 76 % unter Acarbose; $p = 0,321$). Obwohl in der Metformin-Gruppe eine signifikante Reduktion des BMI, der Nüchtern-Insulin/Glukose-Ratio und des Cholesterin-

spiegels beobachtet wurde, konnten wahrscheinlich aufgrund der kurzen Behandlungsdauer keine signifikanten Unterschiede bezüglich der metabolischen Parameter oder der Hormonwerte zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Verträglichkeit der Therapie mit Acarbose war besser im Vergleich zu Metformin, die Abbruchrate war jedoch in beiden Therapiegruppen gleich.

Schlußfolgerungen: In dieser Studie zeigte sich sowohl unter Metformin als auch unter Acarbosebehandlung eine deutliche Verbesserung der Ovulationsrate und der Zyklusregelmäßigkeit. Die Behandlung mit Acarbose wurde im Vergleich zu Metformin besser vertragen. Signifikante Veränderungen der hormonellen oder der metabolischen Parameter konnten wir bei dieser relativ kurzen Behandlungsdauer nicht feststellen.

P16

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZU WACHSTUM UND DIFFERENZIERUNG IN RINDERPLAZENTOMEN AUS MOET- BZW. IVF-TRÄCHTIGKEITEN

M. Gruhn¹, M. Kowalewski¹, S. Kölle², S. Hiendleder³, H. D. Reichenbach⁴, M. Weppert⁴, B. Hoffmann¹, G. Schuler¹
¹Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz und ²Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Universität Gießen, ³Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, ⁴Institut für Tierzucht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub

Einleitung: Beim Rind wird als Folge der Anwendung verschiedener biotechnologischer Verfahren, wie der *In-vitro*-Fertilisation (IVF), der *In-vitro*-Produktion (IVP) sowie des somatischen Klonens bei den resultierenden Graviditäten gehäuft ein Syndrom verschiedener Anomalitäten beobachtet, welches vor allem durch einen teilweise erheblichen fetalen Überwuchs gekennzeichnet ist (Large-offspring-Syndrom, LOS). Die Pathogenese des LOS ist immer noch weitgehend unklar, offensichtlich beruht sie jedoch auf einer Störung epigenetischer Mechanismen während der Reprogram-



mierung des Genoms in der frühen embryonalen Phase. Über die im Rahmen des LOS auftretenden Aberrationen der Plazenta sowie deren mögliche Bedeutung für den fetalen Überwuchs liegen bisher nur wenige Informationen vor. Gegenstand der eigenen Untersuchungen an Plazenten aus LOS-positiven bzw. -negativen Graviditäten waren daher Parameter mit bekannter bzw. vermuteter Beziehung zu plazentarem Wachstum und Differenzierung.

Methoden: LOS-Graviditäten (n = 11) wurden mittels IVF erzeugt. Die Kontrollträchtigkeiten (n = 5) entstammten aus Embryotransfers nach Superovulation („multiple ovulation embryo transfer“, MOET). Die Entnahme von Plazentomen erfolgte bei allen Versuchstieren unmittelbar nach der Schlachtung am 80. Graviditätstag.

Resultate: Signifikante Gruppenunterschiede ergaben sich für die mittels Realtime-RT-PCR gemessene Estrogen Receptor Related Receptor β - (ERR β -) spezifische mRNA-Konzentration sowie für die – nach Immunfärbung für die aktivierte Caspase 3 – ausgezählte Apoptosehäufigkeit mit jeweils höheren Werten bei den LOS-Trächtigkeiten. Bei den radioimmunologisch in Allantois- bzw. Amnionflüssigkeiten gemessenen Konzentrationen an freien und konjugierten Estrogenen sowie an Progesteron waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Auch die mittels Realtime-RT-PCR gemessenen ErbB3- bzw. wachstumshormonrezeptorspezifischen mRNA-Konzentrationen sowie der nach Lektinfärbung bestimmte Anteil der Trophoblastriesenzellen (TGC) an der Gesamtzahl der Trophoblastzellen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Schlussfolgerungen: Aufgrund der bei anderen Spezies nachgewiesenen Bedeutung des ERR β für die Trophoblastzellendifferenzierung kann vermutet werden, daß das LOS des Rindes mit einer Alteration der TGC-Differenzierung assoziiert ist. Darauf deutet auch die erhöhte Apoptosehäufigkeit in den Plazentomen hin, da die terminal differenzierten schwach invasiven TGC des Rindes nach Invasion in das mütterliche Epithel apoptotisch zugrunde gehen.

P17

ZYKLUSspezifISCHE UNTERSCHIEDE IN DER EXPRESSION THROMBOZYTÄRER UND ENDOTHELIALER MIKROPARTIKEL

B. Toth¹, K. Nikolajek¹, A. Rank², R. Nieuwland³, P. Lohse⁴, K. Friese¹, C. Thaler¹

¹Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, ²Medizinische Klinik III und ³Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München-Großhadern, ⁴Institut für Klinische Chemie, AMC Amsterdam, Niederlande

Einleitung: Mikropartikel (MP) sind kleinste Membranpartikel, welche bei Aktivierung oder Apoptose von zirkulierenden Blutzellen und Endothelzellen freigesetzt werden. MP sind in der Lage, die Gerinnung aktiv und passiv zu stimulieren sowie bioaktive Moleküle in andere Zellen zu transferieren. In dieser prospektiven Studie wurden erstmals zyklusspezifische Unterschiede in der MP-Expression und Subtypisierung untersucht.

Methoden: Bei 23 gesunden Frauen (keine Pille, kein Nikotin, keine Thrombose) wurde anhand der Menstruationsanamnese und der Progesteronwerte die Einteilung in die folliculäre (Zyklustag 1–10, Progesteron ≤ 1 ng/ml; n = 14) oder luteale Phase (letzte 14 Zyklustage, Progesteron ≥ 6 ng/ml; n = 9) vorgenommen. Zusätzlich wurden die Thrombozytenwerte bestimmt. MP wurden anhand der charakteristischen durchflußzytometrischen Verteilung identifiziert und mit Hilfe der CellQuest™ Software analysiert. Zellspezifische Marker dienen der Analyse des Ursprungsortes der MP (Thrombozyten: CD61; aktivierte Thrombozyten: CD62P, CD63; Endothelzellen: CD144; aktivierte Endothelzellen: CD62E). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

Resultate: Das Durchschnittsalter betrug 31 Jahre. Die Thrombozytenkonzentration war bei Frauen in der Lutealphase (Mittelwert 247 G/l, 190–350 G/l) statistisch signifikant höher im Vergleich zu Frauen in der Follikularphase (314 G/l, 233–404 G/l) (p = 0,013). Die Konzentration an Annexin-, CD61-, CD62E-, CD62P- und CD63E-positiven MP war bei Frauen in der Lutealphase gegenüber

der Follikularphase statistisch signifikant erhöht: (Median \pm Standardabweichung, Follikularphase vs. Lutealphase), Annexin-positiv: ($4,7 \times 10^9/l \pm 2,3$ vs. $7,6 \times 10^9/l \pm 2,1$; p = 0,04), CD61-positiv: ($2,7 \times 10^9/l \pm 1,5$ vs. $6,2 \times 10^9/l \pm 2,3$; p = 0,001), CD63-positiv: ($0,08 \times 10^9/l \pm 0,1$ vs. $0,5 \times 10^9/l \pm 2,9$; p = 0,01), CD62P-positiv: ($0,05 \times 10^9/l \pm 0,07$ vs. $0,2 \times 10^9/l \pm 0,2$; p = 0,02), CD62E-positiv: ($0,3 \times 10^9/l \pm 1,6$ vs. $0,5 \times 10^9/l \pm 0,3$; p = 0,05). Durchschnittlich 72 % der MP waren thrombozytären und 15 % endothelialen Ursprungs.

Schlussfolgerungen: Gegenüber der Follikelphase steigt in der Lutealphase die Konzentration an thrombozytären und endothelialen MP an. Dieser Effekt findet sich auch für die Subgruppe MP-aktivierter Thrombozyten und aktivierter Endothelzellen. Möglicherweise sind MP wesentliche Faktoren, welche das Gerinnungssystem vor Beginn einer Menstruationsblutung oder in Vorbereitung einer Schwangerschaft prokoagulatorisch beeinflussen. Der Trigger dieser Effekte, insbesondere der Einfluß einzelner Sexualsteroiden auf die MP-Expression, ist Gegenstand unserer aktuellen Untersuchungen.

P18

INZIDENZ EINES GESTATIONS-DIABETES (GDM) BEI FRAUEN MIT POLYZYSTISCHEM OVARYSYNDROM (PCOS)

M. Blasi¹, M. Bals-Pratsch¹, B. Zietz², B. Seifert¹, J. Nusser³

¹Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Humanogenetik, ²Abteilung für Innere Medizin II, Goldberg-Klinik, Kelheim GmbH, ³Diabetologische Schwerpunktpraxis, Regensburg

Einleitung: PCOS, mit ca. 10 % eine der häufigsten Infertilitätsursachen, ist oft von Insulinresistenz, Gestationsdiabetes (GDM) und Typ-II-Diabetes (DM) begleitet. Die Inzidenz eines GDM bei PCOS ist bisher nicht bekannt.

Methoden: 73 (45 primär; 28 sekundär) infertile Patientinnen (Pat.) mit PCOS, Alter: 22–40 Jahre (J) (Median: 31 J) und Body-Mass-Index (BMI) 18,3–43,2 (Median: 27,3) erhielten von 5/2003 bis 8/2005 einen oralen Glukosetoleranz-



test (oGTT) mit Bestimmung der Insulinsensitivität: 43 waren insulinresistent (Insulinsensitivitätsindex (ISI) < 6, 2 hatten einen manifesten DM. Die nachfolgenden spontanen oder durch Kinderwunschbehandlung erzielten Schwangerschaften (SS) und Geburten dieser Pat. wurden in einem retrospektiven Follow-up bis 11/05 ausgewertet. 55 Pat. wurden diabetologisch beraten. 18 Pat. ohne Insulinresistenz mit unauffälligem oGTT präkonzeptionell wurden nicht diabetologisch mitbetreut.

Resultate: Bei 58 der 73 PCOS-Pat. traten 101 SS auf, davon 9 Mehrlings-SS (8 Gemini-, 1 Drillings-SS) ferner 31 Aborte. Bei diesen 58 Pat. konnten 69 Geburten mit insgesamt 79 Kindern verzeichnet werden. 17 Pat. wurden spontan schwanger, 8 nach Ovarstimulation (OI), 17 nach OI und intrauteriner Insemination (IUI), 17 nach *In-vitro*-Fertilisation (IVF), 30 nach IVF + intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) und 12 nach einem Kryoembryotransfer. Bei 14 Pat. wurde ein GDM festgestellt (11 Frauen mit Insulinresistenz [ISI < 6], 3 mit normaler Insulinsensitivität [ISI > 6]). Der Median für das Geburtsgewicht betrug 2985 g (Range: 825–4630 g). 8 Kinder (6 Mütter) hatten ein Geburtsgewicht von > 4000 g, wobei 2 Mütter präkonzeptionell einen ISI < 6 und 4 Mütter einen ISI > 6 zeigten. Jeweils eine Mutter mit einem ISI > 6 bzw. < 6 entwickelte einen GDM.

Schlussfolgerungen: Jede 5. Pat. mit PCOS entwickelt einen GDM, sodaß ein Screening für dieses Risikokollektiv notwendig ist. Da ein generelles Screening auf GDM bislang nicht Bestandteil der Vorsorge bei Schwangeren ist, muß von einer hohen Dunkelziffer unerkannter und unbehandelter GDM-Fälle bei PCOS und/oder Infertilität ausgegangen werden.

Gynäkologie

P19

PROGESTERONEINFLUSS AUF DEN GEFÄSSFLÄCHEN- UND GEFÄSSDICHTINDEX DES HUMANEN ENDOMETRIUMS AUF DER CHORIOALLANTOISMEMBRAN

I. Juhasz-Böss¹, O. Ortmann¹, E. Malik²
¹Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Regensburg am Caritas Krankenhaus St. Josef, Universität Regensburg, ²Oldenburger Frauenklinik, Klinikum Oldenburg GmbH, Oldenburg

Einleitung: Die Chorioallantoismembran (CAM) ist ein mögliches Modell zum Studium der Implantation des Endometriums. Eine wichtige Voraussetzung für die Implantation ist die Angiogenese, die einer komplexen Steuerung u. a. durch Steroide und Zytokine unterliegt. Untersucht wurde der Einfluß von Progesteron auf die Gefäßdicke und die Gefäßfläche im Zeitverlauf.

Methoden: Endometrium von 9 gesunden Patientinnen aus der Proliferationsphase wurde für 24 h je zur Hälfte in normalem und in progesteronhaltigem Nährmedium kultiviert und anschließend auf die CAM transplantiert. Je 6 Präparate von normalem und Progesteron ausgesetztem Endometrium jeder Patientin sowie native CAM wurden für weitere 24 h, 48 h, 72 h und 96 h kultiviert. Eine computergestützte Auswertung des Gefäßflächenindex (GFI) und Gefäßdickeindex (GDI) wurde vorgenommen.

Resultate: Sowohl der GFI als auch der GDI des normalen und des Progesteron ausgesetzten Endometriums sowie der nativen CAM steigen im Zeitverlauf signifikant an. In progesteronhaltigem Nährmedium kultiviertes Endometrium hat nach 48 h einen signifikant höheren GDI als normales Endometrium ($p < 0,05$), dieser Unterschied ist jedoch im weiteren Zeitverlauf nicht mehr nachweisbar. Hinsichtlich des GFI unterscheiden sich die beiden Endometriumgruppen zu keinem Zeitpunkt der Beobachtung signifikant voneinander. Beide Endometriumgruppen unterscheiden sich jeweils signifikant bzgl. des GDI und GFI von der nativen CAM ($p < 0,05$).

Schlussfolgerungen: In Progesteronmedium kultiviertes Endometrium induziert vergleichbar mit normalem Endometrium eine Angiogenese auf der CAM. Der GDI des Progesteron ausgesetzten Endometriums steigt nach 48 h signifikant gegenüber normalem Endometrium an. Progesteron hat neben weiteren Faktoren einen Einfluß auf die Angiogenese von Endometrium.

P20

AUSWIRKUNGEN VON LEISTUNGSSPORT (SCHWIMMEN) AUF DIE SEXUALFUNKTION BEI JUNGEN FRAUEN

B. Zietz¹, S. Schnabel², A. Schäffler², J. Schölmerich²
¹Abteilung für Innere Medizin II, Goldberg-Klinik Kelheim GmbH, ²Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universität Regensburg

Einleitung: Bei Leistungssportlerinnen ist das Syndrom der „female athlete triad“ mit den Symptomen Eßstörungen, Zyklusstörungen und Osteoporose bekannt.

Methoden: Bei 23 Leistungsschwimmerinnen (10–19 Jahre) untersuchten wir in 5 verschiedenen Trainingsphasen (Ruhe- [Ru], Ausdauer- [A], Sprint- [Sp] und Wettkampfphase [W]) vor und während der Qualifikation für die Bayerischen Meisterschaften im Schwimmen 17 β -Estradiol (E), IGF-1, Cortisoltagessrhythmik im Speichel, Leptin und IL-6 ermittelten die tägliche Kalorienaufnahme und bestimmten die Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzanalyse.

Resultate: Bei mittlerem Menarchealter von 12,3 Jahren hatten 7 Schwimmerinnen noch keine Regelblutung. Von den 16 Schwimmerinnen mit Menstruation nahmen 7 Kontrazeptiva ein, 7 gaben Zyklusstörungen an. E nahm während der A-, Sp- und W-Phase gegenüber Ru nicht signifikant ab (30,3 pg/ml [Ru], 25,4 pg/ml [A], 25,5 pg/ml [Sp], 27,7 pg/ml [W]). Es fanden sich Korrelationen zwischen BMI und E ($p = 0,044$ [S]) und dem Fettanteil in der Nahrung und E ($p = 0,034$). E war positiv zu IGF-1 ($p = 0,003$ [Sp]) und der Cortisolkonzentration im Tagesprofil ($p = 0,031$ [S]) korreliert, nicht jedoch zu IL-6 und Leptin.



Reproduktionsgenetik

P21

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG MÄNNLICHER KEIMZELLSPEZIFISCHER CREM-ISOFORMEN

S. Jaspers^{1,3}, B. Gellersen², R. Kempf², A. Samaleco², M. Bergmann¹, K. Steger³
¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Universität Gießen, ²Endokrinologikum Hamburg, ³Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universität Gießen

Einleitung: Es ist bekannt, daß der Transkriptionsfaktor cAMP-responsive element modulator (CREM) eine essentielle Rolle für die Spermatogenese spielt. Durch alternative Promotorverwendung, alternatives Spleißen, und alternative Translationsinitiation entstehen bei der CREM-Genexpression funktionell unterschiedliche CREM-Proteine mit aktivierendem oder reprimierendem Potential auf die Zielgenexpression [1]. Kürzlich haben wir zwei neue Isoformen (CREM-02-F-G-H-Ib und CREM-02-G-H-Ib) in verschiedenen Keimzelltypen bei normaler und gestörter Spermatogenese beschrieben [2], bei denen das bekannte offene Leseraster unterbrochen ist [3]. Ziel der Untersuchung war es, diese Isoformen unter dem Aspekt der Bindungsfähigkeit und einer Aktivator- bzw. Repressorfunktion näher zu charakterisieren.

Methoden: Im Westernblot wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von humaner Hoden-RNA (BD Biosciences) exprimierte Proteine der Isoformen CREM-02-F-G-H-Ib und CREM-02-G-H-Ib analysiert. Eine sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit der *in vitro* translatierten Proteine wurde daraufhin mittels Gelshiftanalyse nach Inkubation mit einer fluoreszenzmarkierten CRE-Sequenz überprüft. Weiterhin wurde die Spezifität der Protein-DNA-Komplexe durch Konkurrenzexperimente und

Supershiftanalysen bestimmt. Die funktionelle Aktivität der Isoformen wurde in Transfektionsexperimenten unter Verwendung eines Luziferase-Reportergens getestet.

Resultate: Während von der Isoform CREM-02-F-G-H-Ib ein Protein voller Länge mit Translationsinitiation in Exon 02 sowie eine kürzere Form exprimiert wurde, entstanden von der Isoform CREM-02-G-H-Ib Proteine erst ab Exon G. Translationsprodukte beider CREM-Isoformen wiesen eine sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit auf. Die Luziferase-Reportergen-Analyse zeigte, daß die Proteinkinase-A-abhängige Stimulierung nach Co-Expression von CREM-02-F-G-H-Ib nicht, aber von CREM-02-G-H-Ib inhibiert wurde.

Schlußfolgerungen: Obwohl das bekannte Leseraster bei den oben genannten Isoformen unterbrochen ist, wird durch die Nutzung eines zusätzlichen ATGs in 5' Richtung zum bekannten Startcodon ein Protein synthetisiert, das an die DNA binden kann. Die Luziferase-Reportergen-Analyse wies auf eine vorwiegende Repressorfunktion der von Isoform CREM-02-F-G-H-Ib translatierten Proteine hin.

Literatur:

- Behr R, Weinbauer GF. cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? *Int J Androl* 2001; 24: 126–35.
- Blöcher S, Fink L, Bohle RM, Bergmann M, Steger K. CREM activator and repressor isoform expression in human male germ cells. *Int J Androl* 2005; 28: 215–23.
- Gellersen B, Kempf R, Sandhowe R, Weinbauer GF, Behr R. Novel leader exons of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator (CREM) gene, transcribed from promoters P3 and P4, are highly testis-specific in primates. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 965–76.

Molekulare Biomedizin

P22

BEDEUTUNG DES WACHSTUMSHORMONREZEPTORS BEI DER EMBRYOMATERNALEN UND FETOMATERNALEN INTERAKTION

S. Kölle¹, M. Gruhn², M. Kowalewski², B. Hoffmann², G. Schuler²

¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie- und Embryologie und ²Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Universität Gießen

Das Wachstumshormon (GH) beeinflusst Zellwachstum und Zelldifferenzierung vor und nach der Geburt. Die Rolle von GH für die frühe embryomaternale Kontaktaufnahme sowie für die Ausbildung der Karunkeln und Kotyledonen in der bovinen Plazenta ist bisher ungeklärt. Ziel der Studie war es daher, die Expression der für den Wachstumshormonrezeptor kodierenden mRNA im Verlauf der Trächtigkeit zu quantifizieren und die Translation des GHR-Proteins in den maternalen und fetalen Anteilen der Plazenta zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurden die Uterusschleimhaut von 2,5; 3,5; 4,5 und 5,5 Tage trächtigen Kühen sowie die Plazentome von Kühen mit einer Trächtigkeitsdauer von 80, 110, 120, 140, 150, 160, 180, 220, 240 und 260 Tagen und die Plazentome von Kühen unmittelbar vor und nach der Geburt untersucht. Die präpartale Phase 24–36 Stunden vor der Geburt wurde durch Analyse des Progesteronwertes bestimmt. Mittels quantitativer Real-time-RT-PCR konnten wir zeigen, daß das GHR-Transkript bereits 2,5 Tage p. c. im Endometrium synthetisiert wird. Zu diesem Zeitpunkt wird die für GHR kodierende mRNA auch in den Blastomeren des frühen Embryos produziert. Im Endometrium ist das GHR-Protein im Epithel, in den Drüsen und in der glatten Muskulatur der Gefäße lokalisiert. Nach Ausbildung der Plazenta steigt die Produktion der für GHR kodierenden mRNA in den Plazentomen bis zum 180. Tag der Trächtigkeit an und bleibt dann zunächst konstant. Das GHR-Protein wird zu Beginn der Trächtigkeit sowohl in den fetalen einkernigen Trophoblastzellen wie in den maternalen Karunkel-epithelzellen in gleichem Maße synthetisiert.



Die Riesenzellen sind stets GHR-negativ. Mit zunehmender Trächtigkeitdauer wird die GHR-Synthese zunehmend von den fetalen Zellen übernommen. 24–36 Stunden vor der Geburt steigt die relative Genexpression von GHR in den Plazentomen um das Dreifache. Das Rezeptorprotein wird zu diesem Zeitpunkt

fast ausschließlich vom fetalen Anteil der Plazenta produziert, das maternale Epithel ist weitgehend zurückgebildet.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Wachstumshormon bereits in den ersten Tagen des embryonalen Lebens die Interaktion zwischen Kon-

zeptus und maternalem Epithel moduliert. Während der gesamten Trächtigkeit ist GHR bei der Entwicklung der Plazentome involviert. Da die GHR-Genexpression präpartal deutlich ansteigt, ist davon auszugehen, daß GH auch an der Induktion des Geburtsvorgangs beteiligt ist.

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](#)