Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
München- Großhadern
Klinik der Ludwigs- Maximilians- Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

Auswirkungen von Seminalplasma auf die endometriale Funktion in vitro

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Eva Maria Artman
aus
Altenerding
2008

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. Chr. Thaler
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. A. Holzinger Prof. Dr. med. H. Bartels
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. R. Ochsenkühn
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	24.01.2008

Inhalt

		Seitenzahl
1.	Einleitung	
1.1.	Fragestellung	5
1.2.	Uterus und zyklische Veränderungen des Endometriums	7
1.3.	Ovulation	9
1.4.	Konzeption	11
1.5.	Implantation	12
1.6.	Zytokine	14
1.6.1.	IL- 1ß	16
1.6.2.	IL- 6	17
1.6.3.	IL- 10	18
1.6.4.	TGF- ß1	19
1.6.5.	LIF	20
1.7.	Seminalplasma	21
1.7.1.	Antispermienantikörper (ASA)	23
1.7.2.	Leukozytospermie	24
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Endometriale Epithelzellen	28
2.2.	Aufbereitung der Endometriumzellen	29
2.3.	Anlegen der Zellkulturen	31
2.4.	Aufbereitung von Seminalplasma zur Durchführung der Stimulationsversuche	33
2.5.	Stimulationsversuche	34
2.6.	Ablösen der Zellen	35
2.7.	ELISA- Test	36
2.8.	mRNA Isolierung	37
2.9.	Quantakine mRNA	38
2.10.	Statistische Analyse	39
3.	Ergebnisse	
3.1.	Zytokinnachweis im Seminalplasma	40
3.2.	WHO- Klassifikation der Ejakulate	42
3.3.	Endometriumzellkulturen	43
3.4.	Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand	44
3.4.1.	Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden ohne Stimulation	45
3.4.2.	Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit normalem Seminalplasma	46
3.4.3.	Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit leukozytenhaltigem Seminalplasma	48
3.4.4.	Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit Antispermienantikörper haltigem Seminalplasma	50

	3.5.	mRNA Nachweis in den endometrialen Epithelzellen	52
	3.5.1.	Zytokin-mRNA- Nachweis in den endometrialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden ohne Stimulation	53
	3.5.2.	Zytokin-mRNA- Nachweis in den endomentrialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit normalem Seminalplasma	54
	3.5.3.	Zytokin-mRNA- Nachweis in den endometrialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit leukozytenhaltigem Seminalplasma	55
	3.5.4.	Zytokin-mRNA- Nachweis in den endometrialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit ASA-haltigem Seminalplasma	56
4.		Diskussion	
	4.1.	Zytokine im Seminalplasma	57
	4.2.	Proinflammatorische Zytokine	59
	4.3.	Antiinflammatorische Zytokine	61
	4.4.	Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand und mRNA-Nachweis in den endometrialen Epithelzellen	63
5.		Zusammenfassung	66
6.		Literaturverzeichnis	68
7.		Abkürzungsliste	82
8.		Danksagung	83
9.		Lebenslauf	84

1. Einleitung

1. 1. Fragestellung

Die Nidation der befruchteten Eizelle im Endometrium stellt ein zentrales Ereignis bei der Entstehung einer Schwangerschaft dar. Um diesen Vorgang zu ermöglichen, finden spezifische Veränderungen am Endometrium statt, die unter anderem durch verschiedene Faktoren im Seminalplasma beeinflusst werden (Robertson et al, 1996, 2001). Dazu gehören auch die in unserer Studie untersuchten Zytokine Interleukin (IL)- 1ß, IL- 6, IL- 10, Transforming growth factor (TGF)- ß1 und Leukämie Inhibierender Faktor (LIF).

Bei der Frau kommt es durch postkoitale, uterine Kontraktionen zum Eintritt von Sperma ins Cavum uteri und somit zum Kontakt von Seminalplasma mit der endometrialen Oberfläche (Kunz et al, 1997). Das Seminalplasma bedingt und fördert Spermienüberleben, -transport und -persistenz im weiblichen Genitaltrakt und hat eine ausgeprägte immunregulatorische Komponente (Robertson et al, 2000). Wie im Tierversuch nachgewiesen, löst Seminalplasma am Endometrium eine lokale inflammatorische Reaktion aus. Wenige Stunden nach der Paarung lösen spezifische Faktoren im Seminalplasma, inklusive TGF- ß1, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine aus. Es kommt zur Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, woraus eine klassische Entzündungsreaktion resultiert (Robertson et al, 2001). Der mögliche Zweck dieser Entzündungsreaktion ist es, das Cavum uteri von abgestorbenen Spermien und anderem potentiell infektiösem Material zu reinigen. Ausgelöst wird die inflammatorische Reaktion vor allem durch Komplementfaktoren sowie Leukotrien B_4, Prostaglandin E (PGE) und Prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) (Troedsson et al, 2001). Im Rahmen einer progesteroninduzierten Veränderung des Zytokinmileus klingt diese Entzündungsreaktion 36 bis 48 Stunden postkoital wieder ab und geht in eine immunsuppressive Form über (Robertson et al, 1996; Troedsson et al 2001). Diese lokale Immunsuppression ist notwendig, um eine immunbedingte Abstoßung der Blastozyste zu verhindern und eine erfolgreiche Implantation zu gewährleisten. Klingt die Entzündungsreaktion nicht ab bevor die Blastozyste aus der Tuba uterina in das Cavum uteri gewandert ist, kann eine immunbedingte Abstoßung derselben Ursache

für eine gestörte oder nicht erfolgreiche Nidation sein (Robertson et al, 1996; Troedsson et al, 2001).
Die Fähigkeit von Seminalplasma zur Suppression der Chemotaxis und Phagozytose von polymorphkernigen Neutrophilen konnte im Tierversuch nachgewiesen werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Seminalplasma die inflammatorische Reaktion des Endometriums auf Spermien reguliert. An dieser Regulation sind unter anderem auch Zytokine beteiligt (Troedsson et al, 2001; Robertson et al, 2001, 1996). Im Seminalplasma sind große Mengen diverser Zytokine nachweisbar, unter anderem Interleukin (IL) -1ß, Interleukin (IL) -6, Interleukin (IL) –10 und Transforming Growth Faktor (TGF) -ß1 (Srivastava et al, 1996; v. Wolff et al, 2001). Man vermutet, dass der Kontakt von Seminalplasma mit Endometrium eine mütterliche Immuntoleranz gegenüber väterlichen Antigenen induziert. Seminalplasma hat somit eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Implantation bzw. Vorbereitung des Endometriums auf die Nidation und bei der Entstehung einer stabilen und intakten Schwangerschaft (Robertson et al, 2000).

Etwa 14% aller Paare begeben sich aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches in professionelle medizinische Betreuung (Ochsenkühn et al, 1998). Nur bei einem Teil der Paare führen konservative Behandlungsmethoden zur Schwangerschaft. Es bleibt nur die Möglichkeit der Anwendung assistierter Reproduktionsverfahren wie *in vitro* Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Diese Methoden weisen aber nur Schwangerschaftsraten von 40% auf (Deutsches IVF Register, Jahresbericht 2005). Die Gründe für das Ausbleiben einer Schwangerschaft liegen vermutlich in vielen Fällen an einer gestörten Nidation der Blastozyste im Endometrium. Nach heutigem Kenntnisstand erfordert eine erfolgreiche Implantation ein empfindliches Gleichgewicht von Zytokinen, Hormonen- wie Estradiol und Progesteron- und anderen Mediatoren in endometrialen Epithel-, Stroma- und Immunzellen (v. Wolff et al, 2000; Salamonsen et al, 2000). Möglicherweise sind die niedrigen Schwangerschaftsraten der assistierten Reproduktionsverfahren durch gestörte immunologische Prozesse bedingt, die aufgrund des ausbleibenden Seminalplasmakontaktes mit der endometrialen Oberfläche nicht stattfinden. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Zytokine TGF-ß1, LIF, IL-1ß IL-6 und IL-10 aus dem

Seminalplasma von Patienten mit Leukozytospermie, Antispermienantikörpern und normalem Seminalplasma auf endometriale Epithelzellkulturen untersucht.

1. 2. Uterus und zyklische Veränderungen des Endometriums

Der Uterus ist ein Hohlorgan, dessen Wand aus einer Schicht spiralig angeordneter glatter Muskulatur (Myometrium) und einer das Cavum uteri auskleidenden Mucosaschicht (Endometrium) besteht. Durch die sogenannten Parametrien, dem Lig. rotundum und dem Lig. sacrouterinum wird der Uterus im kleinen Becken stabilisiert. Der Uterus gliedert sich in Corpus und Cervix uteri. Das Corpus uteri liegt intraperitoneal und wird von einer Tunica serosa überzogen. Die Cervix liegt zum größten Teil primär und zu einem kleinen Teil sekundär retroperitoneal. Der in die Vagina reichende Anteil der Cervix uteri wird als Portio vaginalis cervicis bezeichnet. Dort befindet sich der Übergang des unverhornten Plattenepithels der Vagina in das Zylinderepithel des Zervikalkanals. Die Lokalisation der Epithelgrenze ist altersabhängig verschieden. Sie verschiebt sich unter dem Einfluss der Hormone. Bei jungen Mädchen und Frauen im Klimakterium liegt diese Grenze weit im Cervikalkanal, während sie bei der geschlechtsreifen Frau vaginalwärts wandert. In der Cervix uteri befinden sich muköse Drüsen. Die Konsistenz des sezernierten Sekrets ist abhängig von der Zyklusphase. Vor der Ovulation ist das Sekret dünnflüssig, alkalisch, fructosereich und ermöglicht eine problemlose Aszension der Spermien. In der zweiten Zyklushälfte nimmt die Viskosität des Zervixschleimes wieder zu. Somit dient das Zervixsekret auch als Barriere gegen diverse Krankheitserreger. Im Inneren des Uterus befindet sich das Cavum uteri. Dieses ist mit einschichtigem prismatischen Epithel ausgekleidet. Das Endometrium besteht aus zwei Schichten, dem Stratum functionale und dem Stratum basale. Das Stratum functionale gliedert sich in Zona compacta und Zona spongiosa (Pfleiderer et al, 2004; Goerke und Valet et al, 2000). Das Endometrium unterliegt zyklusabhängigen Veränderungen. Es ist ein sich rasch und kontinuierlich veränderndes Gewebe, das auf Steroidhormone und, während des Menstruationszyklus oder während der Frühschwangerschaft, auch auf lokal produzierte Wachstumsfaktoren und Zytokine reagiert (Lass et al, 2001). Unter der Wirkung von Östrogen in der ersten Zyklushälfte kommt es zu einer Proliferation der Zellen im Stratum functionale. Während der zweiten Zyklushälfte, auch Corpus-Luteum-Phase oder Sekretionsphase genannt, die mit der Ovulation beginnt, kommt es unter dem Einfluss von Progesteron zur sekretorischen Umwandlung des Endometriums mit vermehrter Einlagerung von Glykogen und spezifischen Proteinen und zur

Ausbildung von Spiralarterien. Stromazellen in der Zona compacta differenzieren sich zu den so genannten Deziduazellen. Bei Gestagenentzug kontrahieren sich die endometrialen Gefäße und es kommt aufgrund der dadurch entstehenden Ischämie zur Abstoßung und zum Abbluten der oberen Endometriumschicht, der Zona functionalis. Pro Periodenblutung gehen etwa 50 bis 60 ml Blut ab, das durch Enzyme an der Gerinnung gehindert wird. Ein Zyklus dauert etwa 28 Tage (Pfleiderer et al, 2002; Goerke und Valet et al, 2000).

1. 3. Ovulation

Im Ovar befinden sich die weiblichen Keimzellen (Oozyten). Bei der Geburt enthält jedes Ovar eines neugeborenen Mädchens ca. 400.000 Oozyten im Primordialstadium. Diese Anzahl verringert sich durch Atresie und Follikulogenese kontinuierlich. Während der gesamten reproduktiven Phase im Leben der Frau wiederholt sich der Vorgang der Follikelreifung, Corpus luteum- Bildung und -Atresie zyklisch in definierten Stadien. Am Vorgang der Follikelreifung nimmt eine Kohorte von Oozyten im Primordialstadium teil. Jedoch nur eine Eizelle reift unter dem Einfluss von follikelstimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) bis zum Graaf- Follikel heran. Aus den Primordialfollikeln entwickelt sich über die Stufen Primär-, Sekundär und Tertiärfollikel der Graaf- Follikel. Beim Primärfollikel ist die Oozyte von einem einschichtigen Kranz von Follikelepithelien bzw Granulosazellen umgeben, beim Sekundärfollikel liegt die Oozyte in einem mehrschichtigen Kranz von Follikelepithelien. Der Tertiärfollikel mit einem 5- 10mm großen Antrum folliculi im Follikelepithel entwickelt sich schließlich zum reifen Graaf-Follikel mit einem Durchmesser von etwa 15- 20 mm und einem mit Liquor folliculi gefüllten Antrum folliculi. Die proliferierenden Granulosazellen bilden den Cumulus oophorus, der die reife Oozyte enthält. In der ersten Zyklushälfte kommt es zu einem Anstieg des Östrogenspiegels, der kurz vor der Ovulation seinen Höchtswert erreicht. Über einen positiven Feedbackmechaninsmus kommt es zum Sprunghaften Anstieg des luteinisierenden Hormons (LH), was die Ovulation auslöst, die etwa am 14. Zyklustag stattfindet. Nun wird die reife Oozyte wird in die Tuba uterina aufgenommen. Aus den Granulosazellen und Zellen der Theka interna entwickelt sich durch Vaskularisierung aus den umgebenden Gefäßen und unter dem Einfluss von Progesteron und LH das Corpus luteum, welches vor allem Progesteron produziert. Die Umwandlung besteht in einer Zellvermehrung und Gelbverfärbung durch Lipideinlagerung. Bleibt eine Konzeption aus, atrophiert das Corpus luteum zum Corpus albicans. Gleichzeitig fällt der Progesteronspiegel ab und löst so eine Menstruationsblutung aus. Im Falle einer Konzeption bleibt das Corpus luteum jedoch durch den Einfluss des Hormons ß- humanes Choriongonadotropin (ß-HCG) bestehen, welches im Trophoblasen des Embryos gebildet wird. Es wandelt sich zum Corpus luteum gravidarum um und übernimmt im ersten Trimenon die Aufgabe der Progesteronproduktion zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Sobald die

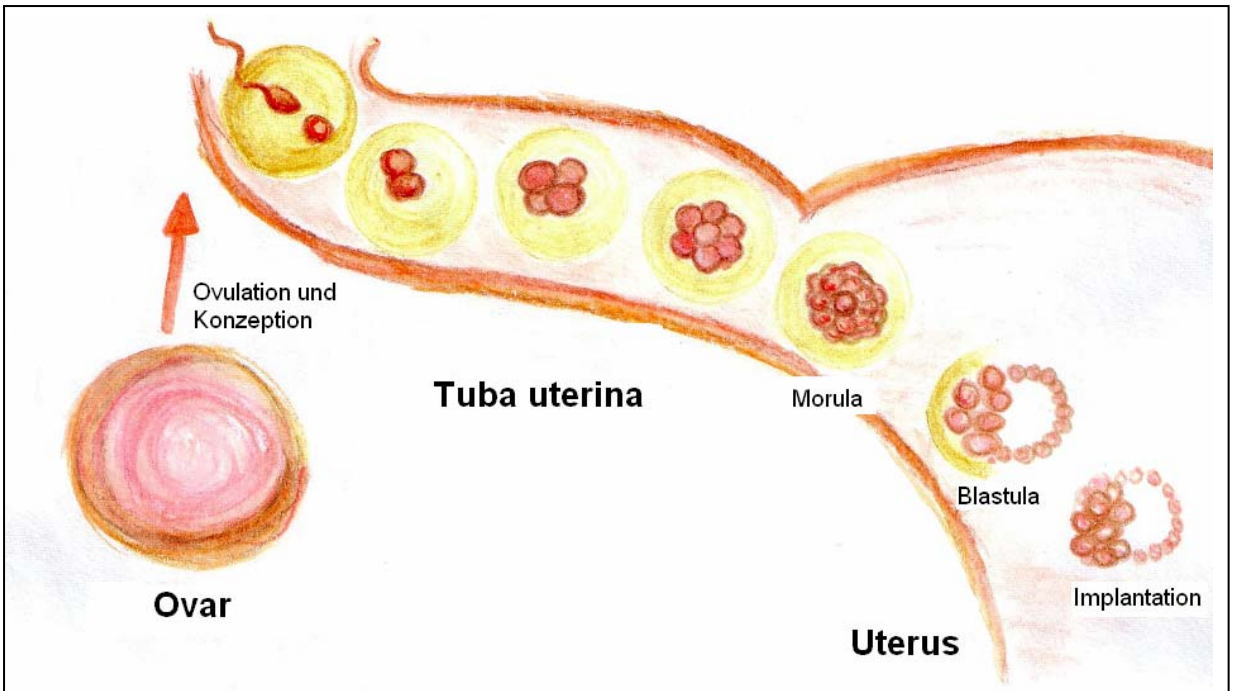
Plazenta soweit ausgebildet ist und diese Aufgabe übernehmen kann, bildet sich das Corpus luteum wieder zurück (Beckwoldt M aus Pfleiderer et al, 2002; Goerke und Valet et al, 2000).

1. 4. Konzeption

Unter der Konzeption versteht man die Befruchtung der reifen Eizelle durch ein Spermium. Da die Oozyte nach der Ovulation maximal 24 Stunden und die Spermien etwa 6 Tage befruchtungsfähig bleiben, liegt der optimale Zeitpunkt für eine Konzeption in der periovulatorischen Phase (Simpson 1995; Waller et al, 1996). Diesen Zeitraum nennt man Konzeptionsfenster. Die Konzeption findet in der Regel im ampullären Teil der Tuba uterina statt. Aufgrund von Kontraktionen der Uterus- und Tubarmuskulatur dringen die Spermien sehr schnell aus der Vagina durch das Cavum uteri in die Tuba uterina vor (Kunz et al, 1997). Dieser Vorgang wird durch die Spermienmotilität untersützt. Um befruchtungsfähig zu werden, müssen die Spermien den Vorgang der Kapazitation durchlaufen, erst dann können sie mittels der lytischen Wirkung des Enzyms Acrosin durch die sogenannte Corona radiata in die reife Eizelle eindringen und diese befruchten. Unmittelbar nach dem Eindringen eines Spermiums verändert sich die Zona pellucida der Oozyte derart, dass keine weiteren Spermien mehr eindringen können. So wird eine Polyspermie verhindert. Die befruchtete Eizelle bezeichnet man als Zygote. Während die Zygote in der Tuba uterina, unterstützt durch die Fimbrienbewegungen des dort befindlichen Flimmerepithels ins Cavum uteri wandert, beginnen Furchung und mitotische Zellteilungen. Aus dem Zweizellstadium entwickelt sich rasch durch weitere Teilungen die Morula, die aus 32 Zellen besteht. Am vierten postkonzeptionellen Tag hat sich aus der Morula ein mit Flüssigkeit gefüllter Hohlraum, die Blastula gebildet (siehe Abb.1.1.). Nun kommt es zu ersten Differenzierungen in eine äußere Trophoblastenschicht und einen innen liegenden, wandständigen Embryoblasten. So erreicht die Blastozyste durch den Einfluß der Tubenperistalik das Cavum uteri. Der hohe Energiebedarf der Blastozyste wird in diesem Zeitabschnitt nur zum Teil durch das Ooplasma gedeckt, bereits während der Tubenwanderung kann die Zygote Sauerstoff und energieliefernde Stoffe aus dem Tubensekret aufnehmen (Beckwoldt M. aus Pfleiderer et al, 2002; Bock K. aus Goerke und Valet et al, 2000).

1. 5. Implantation

Neben der Konzeption spielt die Implantation bei der menschlichen Fortpflanzung eine zentrale Rolle. Eine erfolgreiche Implantation beruht auf einer komplexen Interaktion zwischen der sich entwickelnden Blastozyste und dem Endometrium (Lass et al. 2001). Die Synchronisation dieser beiden Vorgänge ist besonders sechs bis sieben Tage nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle von großer Bedeutung, da in diesem Zeitraum, dem Nidations- oder Implantationsfenster, die Einnistung der Blastozyste im Endometrium stattfindet. Dieser Vorgang dauert etwa fünf bis sechs Tage (Bock K. aus Goerke und Valet et al, 2000; Beckwoldt M. aus Pfleiderer et al, 2002). Die Implantation wird durch eine breitflächige Verklebung der Blastozyste mit dem Endometrium eingeleitet. Um das Endometrium auf die folgende Implantation vorzubereiten, werden von Endometrium und Blastozyste Zytokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle sezerniert (Lindhard et al, 2002). Unter dem Einfluss proteolytischer Enzyme dringt die wachsende Blastozyste durch das Uterusepithel in das nun stark aufgelockerte Stroma, des zu diesem Zeitpunkt hochaufgebauten (8-10mm) Endometriums, ein. Beim Eindringen in die Schleimhaut kollabiert die prall gefüllte Höhle der freien Blastozyste. Der sich verdickende Trophoblast wandert tiefer in die Schleimhaut, während die Trophoblastenzellen die Deziduazellen des Endometriums auflösen und die freiwerdenden Proteine, Lipide und Kohlenhydrate resorbieren. Bereits in der Zona compacta kommt das invasive Wachstum der Blastozyste zum Stillstand. Über dem einsinkenden Implantat bildet sich ein Fibringerinnsel welches Schlußkoagulum genannt wird. Durch vom Rand einwachsendes Endometrium wird der Defekt zum Abheilen gebracht. Bisweilen kann es in der Nidationsphase zu so genannten Nidationsblutungen kommen (Beckwoldt M aus Pfleiderer et al, 2002; Bock K. aus Goerke und Valet et al, 2000). Während dieser Phase bestehen enge Wechselwirkungen zwischen der Blastozyste und dem Endometrium. Dies ist nötig bis eine Vaskularisierung des Trophoblasten eingetreten ist. Der Implantationsvorgang wird durch zahlreiche hormonelle und andere Faktoren beeinflusst. Unter anderem spielen Zytokine hierbei eine Rolle (Robertson et al, 2003). Da schon vor der Konzeption neben Spermien auch Seminalplasma in direkten Kontakt mit dem Endometrium tritt, können die darin enthaltenen Zytokine Einfluss auf die Vorgänge während der Implantation am Endometrium nehmen (Robertson et al, 2003; Kunz et al, 1997).



Konzeptionstag	0	1	2	3	4	5	6
Zyklustag	14	15	16	17	18	19	20

Abb. 1.1. Konzeption und Implantation mit Angabe des Konzeptionstages im Vergleich zum Zyklustag

1. 6. Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe, welche als Mediatoren bei Zellwachstum, Entzündungsreaktionen, Immunprozessen, Zelldifferenzierung und -reparatur fungieren. Sie werden während der Effektorphase der natürlichen und der spezifischen Immunität gebildet und dienen dazu, Immunantwort und Entzündungsreaktion zu regulieren (Abbas et al, 1996). Da sie Intensität und Dauer einer Entzündungsreaktion beeinflussen, muss ihre lokale Konzentration eng an das Vorhandensein von Fremdmaterial angepasst werden. Die Mehrzahl der bekannten Zytokine hat parakrine oder sogar autokrine Funktion (Roitt et al, 1997). Unter Umständen kann die Konzentration der ausgeschütteten Zytokine aber auch so groß sein, dass ein endokriner Effekt zustande kommt (Roitt et al, 1997).

Zytokine im Seminalplasma werden vor allem von Leukozyten im Nebenhoden produziert. Ihre Produktion ist autonom und unabhängig von Hormonkonzentrationen im Serum (Sterzl et al, 2003). Die Zytokinsekretion ist ein selbstlimitierender Vorgang, da Zytokine nicht als präformierte Moleküle gelagert werden können und die mRNA, die für die Zytokine kodiert, relativ instabil ist und daher rasch abgebaut wird. Somit wird eine transiente Zytokinsynthese sichergestellt (Sterzl et al, 2003). Zytokine wirken auf verschiedene Zelltypen. Diesen Effekt nennt man Pleiotropismus. Oftmals hat ein Zytokin verschiedenartige Effekte auf die Zielzelle, die gleichzeitig, aber auch im Abstand von Minuten, Stunden oder Tagen auftreten können. Auch wird die Synthese von bestimmten Zytokinen von anderen Zytokinen beeinflusst, wie beispielsweise die Synthese von IL- 6 durch IL- 1ß induziert werden kann (Abbas et al, 1996). In vitro beeinflussen Zytokine die Spermienmotilität, (Hill et al, 1987; Eisermann et al, 1989; Dousset et al, 1997) und reduzieren die Fähigkeit der Spermien die Oozyte zu penetrieren. (Buch et al, 1994, Rajaserkaran et al, 1995) Einige dieser Polypeptide sind nachweislich in die Regulation testikulärer Funktionen involviert (Eggert- Kruse et al, 2001). Eventuell spielen inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukine eine Rolle bei latenten asymptomatischen oder chronischen urogenitalen Infektionen, welche in Zusammenhang mit der männlichen Infertilität stehen können (Gruschwitz et al, 1996). Allerdings ist die klinische Relevanz noch nicht geklärt (Gruschwitz et al, 1996). Zusätzlich zu ihrer Funktion im Immunsystem spielen die Zytokine eine

wichtige Rolle bei der Modulation der neuroendokrinen Kontrolle der Reproduktion. So sind sie vermutlich in die Funktion von Sexualhormonen als lokale Mediatoren und bei der Spermatogenese als parakrine Faktoren involviert (Eggert- Kruse et al, 2001).

In dieser Studie wurden IL-1ß, IL-6, IL-10, TGF -ß1 und LIF im Seminalplasma und ihre Wirkung auf endometriale Zellen untersucht.

1. 6. 1. Interleukin (IL)- 1ß

IL- 1ß, ein 17,5 kDa großes Protein, dient vor allem der Vermittlung von Entzündungsantworten im Rahmen der natürlichen Immunität. Es gehört zur Gruppe der *akuten Phase Proteine*. Der aktivierte mononukleäre Phagozyt ist der Hauptproduzent dieses Interleukins, aber auch andere Zelltypen wie Epithel- und Endothelzellen produzieren IL- 1ß (Abbas et al, 1996).

Die biologische Wirkung von IL- 1ß hängt von der freigesetzten Zytokinmenge ab. In geringen Konzentrationen wirkt es hauptsächlich lokal als Entzündungsmediator und induziert unter anderem die Synthese von IL- 6. Im menschlichen Endometrium wird IL- 1ß aktiv produziert (Lindhard A. et al, 2002). Auch menschliche Blastozysten produzieren IL- 1ß noch vor der Implantation (de los Santos et al, 1996, 1998). Die Sekretion von IL- 1ß ist die erste Antwort der Blastozyste auf das rezeptive Endometrium und induziert die Synthese von anderen Zytokinen wie z. B. LIF und IL- 6. Indem die Zytokine an ihren Rezeptor binden, bewirken sie Veränderungen in den Expressionsmustern von Adhäsions- und Antiadhäsionsmolekülen, die essentiell für die Bindung der Blastozyste an das Endometrium sind. (Lindhard A. et al, 2002)

Es ist bewiesen, dass IL- 1ß eine bedeutende Rolle in der Physiologie von Ovarien und Hoden spielt (de los Santos et al, 1998). Unter anderem wurde eine reverse Korrelation zwischen IL- 1ß Konzentration und progressiv motilen Spermien gefunden (Gruschwitz et al, 1996)

1. 6. 2. Interleukin (IL)- 6

IL- 6 ist ein etwa 26 kDa großes Zytokin. Es wird als Antwort auf IL- 1 von mononukleären Phagozyten, Gefäßendothelzellen, Fibroblasten und anderen Zellen synthetisiert. Auch IL- 6 gehört zu den *akute Phase Proteinen*. Im Verlauf der B-Zellreifung dient es für die aktivierte B- Zelle als Wachstumsfaktor. Außerdem kann IL- 6 das Wachstum von vielen somatischen Zellhybriden und malignen Plasmazell - Linien fördern. In vitro Experimente weisen darauf hin, dass IL- 6 auch als Co-Stimulator für T- Zellen und Thymozyten dient (Abbas et al, 1996). IL- 6 scheint im Zusammenhang mit Infektionen des männlichen Genitaltrakts eine große Rolle zu spielen. Im Seminalplasma von Männern mit Leukozytospermie finden sich erhöhte Konzentrationen von IL- 6 im Vergleich zu Männern ohne Leukozytospermie (Friebe et al, 2003).

In menschlichen Granulosazellen findet sich ebenfalls IL- 6. Es spielt vermutlich eine Rolle bei der Modulation der ovariellen Funktionen, indem es die Steroidgenese und Follikulogenese beeinflusst. (Garrido et al, 2001). IL- 6 wird unter anderem von endometrialen Zellen synthetisiert (Cork et al, 2002). Zusammen mit dem Leukämieinhibierenden Faktor (LIF) erreichen die Konzentrationen von IL- 6 ihr Maximum um die Implantationsphase. Bei infertilen Frauen und Frauen mit rezidivierenden Aborten finden sich erniedrigte Konzentrationen von IL- 6 (Cork et al, 2002; Charnock- Jones et al, 1994, Laird et al, 1997, Lim et al, 2000)

1. 6. 3. Interleukin (IL)- 10

IL- 10 ist ein 18 kDa schweres Zytokin, welches zu den antiinflammatorischen Zytokinen zählt (Abbas et al, 1996). Ursprünglich wurde IL- 10 als ein sekretorisches Produkt von T- Helferzellen identifiziert, das die Produktion verschiedener Th- 1 assoziierter Zytokine inhibiert und somit die Aktivierung von Makrophagen verhindert bzw erschwert (Viganò et al, 2002).
Uterine natürliche Killerzellen (uNK) sezernieren nachweislich IL- 10. Seine Funktion im Rahmen der menschlichen Fortpflanzung besteht in der Protektion des Fetus vor schädlichen mütterlichen Immunreaktionen (Viganò et al, 2002). In Kombination mit IL- 6 und TGF- ß begünstigt IL- 10 eine Implantation und fördert die maternale Immuntoleranz gegenüber dem fetalen Allograft (Viganò et al, 2002)
Frauen mit erniedrigten IL- 10 Konzentrationen erleiden häufiger Aborte im ersten Schwangerschaftstrimenon (Arnold et al, 1999). Zudem wurde bei Frauen mit unerklärten habituellen Aborten gezeigt, dass in vitro deutlich niedrigere Konzentrationen von IL- 10 auf eine Stimulation mit Trophoblastenantigenen sezerniert wurden als bei normal fertilen Frauen (Viganò et al, 2002). Somit zeigt sich, dass die Bedeutung von uterinem IL- 10 vor allem in der Begünstigung der Implantation und dem Schutz des Fetus vor schädlichen mütterlichen Immunreaktionen liegt. Humanes Seminalplasma steigert die Freisetzung von IL- 10 im Endometrium, was das Spermienüberleben im weiblichen Genitaltrakt begünstigt (Denison et al, 1998, 1999).

1. 6. 4. Transforming Growth Faktor (TGF)- ß1

Ursprünglich wurde der Transforming Growth Faktor (TGF) auf dem Gebiet der Tumorforschung entdeckt. Man beobachtete, dass Tumore, die diesen Faktor in großen Mengen synthetisieren und exprimieren, sich der körpereigenen Immunabwehr erfolgreich entziehen können (Abbas et al, 1996). Die Familie der TGF- ß ist eine Gruppe von multifunktionalen Zytokinen. Sie beeinflussen sowohl Zellproliferation und -differenzierung als auch physiologische Vorgänge wie Angiogenese, Immunfunktionen, Steroidogenese, Umstrukturierung von Gewebe und Zellreparatur (Godkin et al, 1998).

Der native TGF- ß1 ist ein homodimeres Protein von 28 kDa. In einer latenten Form synthetisiert, muss er erst durch Proteasen aktiviert werden, wie sie zum Beispiel im sauren Milieu des weiblichen Genitaltraktes gefunden werden (Abbas et al, 1996). Im humanen Endometrium findet sich eine TGF- ß1 Expression in allen Zelltypen. TGF- ß1 reguliert die Trophoblasteninvasion und -proliferation. Im Tierversuch wurden hohe Konzentrationen von TGF- ß1 in der Grenzschicht zwischen invasiven Trophobastenzellen und endometrialen Epithelzellen gefunden. Humane Zytotrophoblastenzellen werden durch TGF- ß1 zur Produktion von onkofetalem Fibronectin stimuliert, welches bei der Verknüpfung von Trophoblast und Endometium eine Rolle spielt (Godkin et al, 1998).

1. 6. 5. Leukämieinhibierender Faktor (LIF)

Der Leukämie- inhibierende Faktor (LIF) wird von T- Lymphozyten, mesenchymalen Zellen, Monozyten und Tumorzellen synthetisiert. LIF ist ein Glykoprotein aus 180 Aminosäuren mit einem Molakulargewicht zwischen 38 und 67 kDa (kiloDalton), abhängig von der Glykosilierung. Unter anderem hat LIF pleiotrope Funktionen, wie z. B. die Förderung der Differenzierung von IL- 3 abhängigen, hämatopoetischen Stammzellen sowie die Hemmung der Lipoproteinlipase in Adipozyten. Zudem induziert LIF in der Leber die Produktion von *akute Phase Proteinen* (Gemsa et al, 1997; Abbas et al, 1996).

Im Endometrium wird LIF abhängig von der Zyklusphase exprimiert. Die LIF-Konzentration im Endometrium ist während der proliferativen Phase relativ niedrig, steigt nach der Ovulation, mit der Höchstkonzentration um das Implantationsfenster, an und bleibt dann bis zum Zyklusende relativ hoch, bevor sie wieder auf Basisniveau abfällt. Falls es zu einer Implantation kommt, wird die glanduläre Expression von LIF auf ein niedriges Niveau gesenkt, gleichzeitig wir eine gesteigerte Produktion von LIF mRNA in dezidualen Leukozyten am Implantationsort beobachtet (Lass et al, 2001). Bei Fehlern im Molekülaufbau von LIF ist die Implantation gestört (Stewart et al, 1992). Der Leukämieinhibierende Faktor (LIF) ist ein obligatorischer Faktor bei der Nidation der Blastozyste. (Lindhard et al, 2002).

LIF kann auch im Menstruationsblut nachgewiesen werden. Bei fertilen Frauen ist die LIF- Konzentration signifikant höher als bei Frauen mit unerklärter Infertilität. (Lass et al, 2001)

1. 7. Seminalplasma

Der größte Anteil des Ejakulates besteht aus Seminalplasma. Es wird in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes gebildet, dazu gehören die paarig angelegten Vesiculae seminales, die Prostata und die Glandula bulbourethralis (Cowper´sche Drüse). Das produzierte Sekret (Seminalplasma) ist reich an Fruktose, die in den Vesiculae seminales produziert wird, Zytokinen aus Leukozyten im Nebenhoden, Prostaglandinen und Vitamin C. Der pH Wert des Seminalplasmas liegt mit etwa 7,3 im schwach alkalischen Bereich. Die alkalischen Sekrete stammen aus der Bläschendrüse (Pfleiderer et al, 2002; Sterzl et al, 2003).
Ein suppressiver Effekt von Seminalplasma auf Lymphozyten wird schon seit Längerem beobachtet. Man vermutet, dass hierin der Grund für die immunologische Akzeptanz von Spermien als immunfremdes Material im weiblichen Genitaltrakt liegt (Nocera et al, 1993, 1995) und dadurch schädigende Immunantworten auf Spermienantigene verhindert werden (Robertson et al, 2001). Das im Seminalplasma nachgewiesene Zytokin TGF-ß supprimiert zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Diese Vorgänge könnten für die Toleranz des weiblichen Genitaltrakts gegenüber den körperfremden Proteinen im Ejakulat verantwortlich sein. (Mule et al, 1988; Su et al, 1991; Lucas et al, 1990). TGF- ß1 wird im sauren Milieu des weiblichen Genitaltraktes aktiviert. (Nocera et al, 1995).
Die Zytokine Interleukin (IL)- 1ß, IL- 6 und IL- 10 reduzieren nachweislich die Penetrationsfähigkeit der Spermien in die Oozyte. (Wincek et al., 1991).
Es finden sich immer mehr Anhaltspunkte dafür, dass humanes Seminalplasma eine bedeutende Rolle im Rahmen der Implantation spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Seminalplasma in vitro T- und B- Zellproliferation, Killerzellaktivität sowie die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen und Makrophagen supprimiert (Thaler, 1989). Durch Interferenz mit IgG-Fc-vermittelten Effektorfunktionen können durch Seminalplasma *in vitro* für die väterlichen Antigene potentiell schädliche Immunreaktionen kontrolliert werden (Thaler, 1992). Klinische Anzeichen hierfür wurden von Bellinge et al gefunden. Bei Patientinnen, die sich einer IVF-Behandlung unterzogen, wurde während der Konzeptionsphase Sperma intravaginal plaziert. Es konnte dadurch eine Implantationsrate von 53% erreicht werden, im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der sich eine Implantationsrate von nur 23% fand (Bellinge et al, 1986). In einer Placebo- kontrollierten Studie, in der

seminalplasmagefüllte Kapseln oder Placebo intravaginal plaziert wurden, fand sich eine Implantationsrate von 80% in der Verumgruppe, verglichen mit 67% in der Plazebogruppe (Coulam and Stern, 1995). Tremellen et al fanden ähnliche Schwangerschaftsraten in beiden Gruppen, aber signifikant vitalere Embryonen in der 6- 8 Schwangerschaftswoche bei Patientinnen, die während der Implantationsphase Geschlechtsverkehr hatten (Tremellen et al, 2000).

1.7.1. Antispermien Antikörper (ASA)

Antispermienantikörper (antisperm antibodies = ASA) können in Zusammenhang mit der Entstehung männlicher Infertilität stehen, da sie die Motilität der Spermien herabsetzen können (Bandoh et al, 1992; Francavilla et al, 1997). Zudem können Antispermienantikörper mit der Akrosomenreaktion und der Bindung des Spermiums an die Zona pellucida der Oozyte interferieren (Bandoh et al, 1992; Francavilla et al, 1997). ASA können spontan auftreten, als Folge einer entzündlichen Reaktion oder nach einer Vasektomie (Hjort 1999). Etwa die Hälfte aller vasektomierten Männer entwickelt postoperativ ASA (Urry et al, 1990). Es werden Antikörper der IgG- und IgA- Klasse gefunden (Lombardo et al, 2001).Bei etwa 5% aller infertilen Männer werden Autoantikörper gegen Spermien nachgewiesen (Lombardo et al, 2001).

1.7.2. Leukozytospermie

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Leukozyten im Seminalplasma und Entzündungen des männlichen Urogenitaltraktes. In Studien wurde festgestellt, dass sich bei der Mehrheit aller fruchtbaren Männer Leukozyten im Seminalplasma finden. Der größte Prozentsatz fällt dabei den Granulozyten zu. (Aitken et al, 1995). Die WHO legt einen Normwert von $<1x10^6$ Leukozyten/ ml für die Leukozytospermie fest. Bisher wurde die Rolle der Leukozyten im Ejakulat noch nicht vollständig geklärt. Tomlinson et al nehmen an, dass Leukozyten die Fertilität steigern, indem sie abnorme oder degenerierte Spermien vernichten und Hydroxyperoxid, einen vermutlich wichtigen Faktor bei der Kapazitation, produzieren (Tomlinson et al, 1993). Möglicherweise hat eine zu hohe Leukozytenkonzentration jedoch negative Effekte. Eine zu hohe Konzentration an Hydroxyperoxid übersteigt die antioxidative Kapazität des Seminalplasmas. Gegebenenfalls liegen einer extremen Leukozytospermie aber auch andere pathologische Vorgänge wie Epididymitis, virale Infektionen, abnorme Spermien oder chemische Irritationen zugrunde, die eine Infertilität bedingen (Yanushpolski et al, 1995).

2. Material und Methoden

Die verwendeten Materialien werden im Folgenden in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

Material	**Hersteller/ Bezugsquelle**
Chloroform	Sigma
Collagenase	Sigma
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dulbeccos modified eagle´s medium Nutrient Mixture F- 12 HAM	Sigma
Eppendorf- cups	Eppendorf
FCS (fetales Kälberserum)	Invitrogen
Filter für steriles Pumpen	Falcon
GlycoBlue™ Coprecipitant	Ambion
Handschuhe, steril	Hartmann
HCl	Sigma
HEPES	Sigma
Insulinspritzen	Braun
Isoamylalkohol	Sigma
Kulturplatteneinsätze Millicell CM	Millipore
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	Becton Dickinson Labware
NaOH	Sigma
Natriumbicarbonat	Sigma
Nystatin „Lederle“, steriles Pulver	ICN
Östrogen	Sigma

PBS	Dulbecco
Pinzetten, steril	Falcon
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen, serologisch	Falcon
Pipettus	Falcon
Progesteron	Sigma
Quantikine HS human IL- 1ß	R&D Systems
Quantikine HS human IL- 6	R&D Systems
Quantikine HS human IL- 10	R&D Systems
Quantikine human LIF	R&D Systems
Quantikine human TGF- ß1	R&D Systems
Quantikine mRNA IL- 1ß	R&D Systems
Quantikine mRNA IL- 6	R&D Systems
Quantikine mRNA IL- 10	R&D Systems
Quantikine mRNA TGF- ß1	R&D Systems
Skalpelle Gr 10	Feather
Skalpelle Gr 11	Feather
Spectra/ Por membrane, MWCO 3500	Spectrum Medical Industries
Trizol	Sigma
Trypsin	Sigma
Unterlage, steril	Moelnyke
UVette	Eppendorf
Zellkulturflaschen	Flacon
Zellkulturplatten	Falcohn

Zellsieb, Porengrösse 40µm	Falcon
Zellsieb, Porengrösse 180µm	Falcon
Zentrifugenröhrchen 10ml	Falcon
Zentrifugenröhrchen 20ml	Falcon
Zienam	MSD

2. 1. endometriale Epithelzellen

Die endometrialen Epithelzellen stammten von 10 Patientinnen aus der Universitäts-Frauenklinik Großhadern in München, dem KH Dritter Orden in München, dem KH Harlaching in München und dem Kreiskrankenhaus Erding, die jeweils dort hysterektomiert wurden. Geeignetes Material konnte von prämenopausalen Patientinnen, die zwischen dem 14. und 21. Zyklustag und ohne Malignom hysterektomiert wurden, gewonnen werden. Die Patientinnen wurden überwiegend aufgrund von Myomen hysterektomiert.

Die Patientinnen haben der Verwendung ihres Endometriums zu wissenschaftlichen Zwecken schriftlich zugestimmt. Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt (Ethikkommision der LMU München, Projektnummer 178/02).

Die histologische Beurteilung des Endometriums wurde durch die Studie nicht beeinträchtigt, da nur ein Teil des Endometriums entnommen wurde.

2. 2. Aufbereitung des Endometriums

Der exstirpierte Uterus wurde unter sterilen Bedingungen direkt post operativ unter Anwesenheit des zuständigen Pathologen der Länge nach eröffnet. Aus dem Cavum uteri wurde das Endometrium mit einem Skalpell Gr. 10 von ca. der Hälfte der Fläche abgeschabt und in HAMS- Nährmedium gegeben. Durch dieses Vorgehen konnte das Übersehen eines zufällig vorliegenden Endometriumkarzinoms minimalisiert und gleichzeitig genügend Zellmaterial für die Zellkulturen gewonnen werden.
Im Labor wurde das gewonnene Material unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale mit zwei Skalpellen Gr. 11 mechanisch zerkleinert. Mit 500 µl Collagenase versetzt erfolgte die Inkubation des Endometriums nun in einer Zellkulturflasche für 1,5 Std. bei 37° C im Wasserbad. Dadurch lösten sich die Zellen aus dem Zellverband.
Anschließend wurde das Material mit einer serologischen Pipette 2 ml mehrmals aufgesaugt und wieder ausgeblasen, um durch die Scherkräfte noch mehr Zellen aus ihrem Verband zu lösen. Um die epithelialen Endometriumzellen von anderen vorhandenen Zellarten wie z.B. Granulosazellen oder Erythrozyten zu trennen, wurde das gesamte Material zuerst durch ein Zellsieb mit 180 µm Porengröße gefiltert, wobei z.B. Bindegewebe im Sieb hängen blieb. Dann wurde die Zellsuspension nochmals durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße gefiltert. In diesem Zellsieb blieben nun die epithelialen Endometriumzellen hängen. Das Zellsieb wurde mit HAMS- Medium mit 10 % FCS (fetales Kälberserum) gut gespült und die Zellsuspension mit einer serologischen Pipette aufgenommen, in ein steriles Falcon-Röhrchen gegeben und bei 600 Upm für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und die Zellen wurden in 10 ml HAMS- Medium aufgenommen und nochmals für 10 Min bei 600 Upm zentrifugiert.

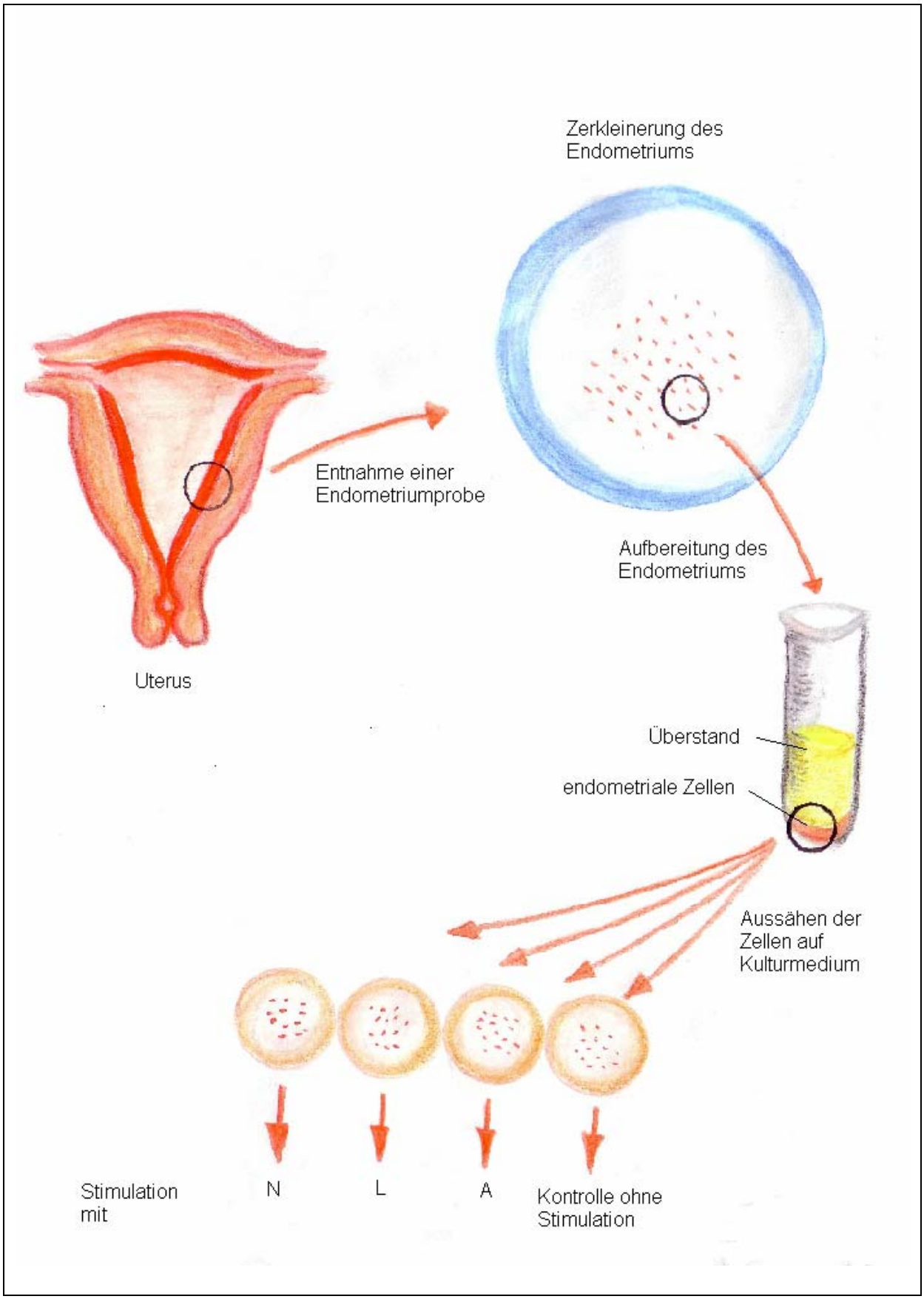


Abb.2.1 Aufbereitung der endometrialen Zellen und Anfertigung der Zellkulturen
N= normales Seminalplasma, L= leukozytenhaltiges Seminalplasma,
A= antispermienantikörperhaltiges Seminalplasma, jeweils 10 %ig.

2. 3. Anlegen der Zellkulturen

Die Zellen wurden auf mit Matrigel beschichtete 12 mm Millicell Culture Plate Inserts, die in eine 24 Well Zellkulturplatte eingebracht wurden, ausgesät. Aufgrund der starken interzellulären Adhäsionen, war es nicht möglich immer die gleiche Zellzahl pro Well auszusäen, was eventuell die Konzentrationsunterschiede in den Zytokinmessungen im Zellkulturüberstand erklärt. Um die methodenbedingten Schwankungen teilweise auszugleichen wurden alle Proben doppelt angesetzt und bestimmt. In die Wells wurden je 500 µl HAMS- Medium mit 10 % FCS, 1% Progesteron 10^{-5} molar und 1% Östradiol 10^{-7} molar gegeben. Die bestückten Kulturplatten wurden bei 37° C und 5% CO_2 Begasung im Brutschrank inkubiert. Um ein möglichst gutes Zellwachstum zu erreichen, fand nach jeweils 24 Std ein Mediumwechsel statt. Das Zellwachstum wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert.

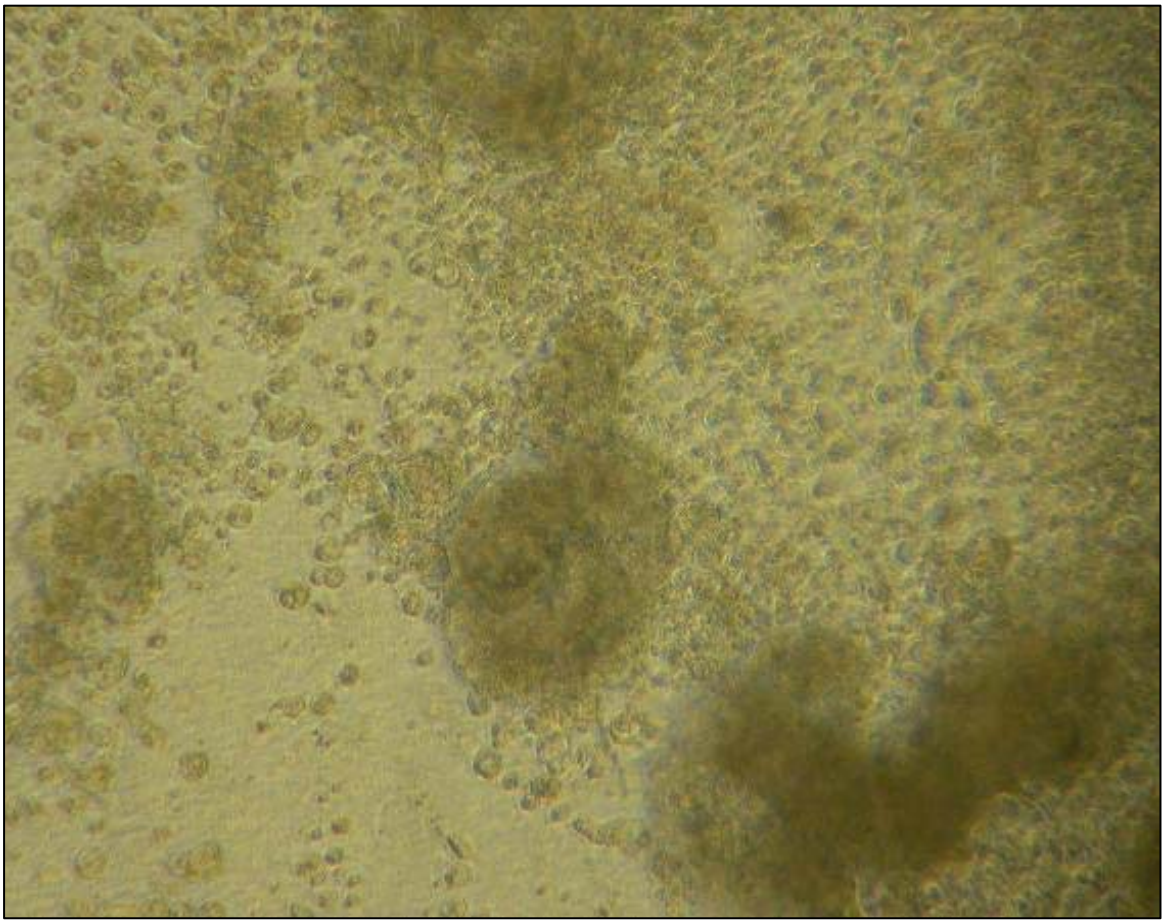


Abb.2.2. Endometriumzellkultur

2. 4. Aufbereitung von Seminalplasma zur Durchführung der Stimulationsversuche

Das verwendete Seminalplasma stammte von Probanden, die eine Spermaprobe im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik abgegeben hatten. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten lag jeweils vor.

Die Spermaproben wurden in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt und gepoolt.

1. Proben ohne Leukozyten (normales Seminalplasma)
2. Proben mit mehr als 10^6 Leukozyten /ml
3. Proben mit Antikörpern gegen Spermien

Die Seminalplasmapools wurden zunächst bei 100.000 g bei 4° C für 60 Min ultrazentrifugiert. Anschließend wurde jeweils der Überstand in sterile Eppendorfgefäße transferiert und über eine SpectraPor®- molecular porous membrane 3500 MWCO über 24 Std mit steriler DPBS dialysiert. Dadurch konnten Moleküle, mit einer Molekülgröße kleiner als 3500, z.B. Prostaglandine, aus dem Seminalplasma entfernt werden. Zytokine mit größerem Molekulargewicht verblieben im Dialysat. Somit wurden Überlagerungen der Wirkungen unterschiedlicher immunologisch aktiver Moleküle vermieden. Nach dem Aliquotieren der Proben wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20° C aufbewahrt.

2. 5. Stimulationsversuche

Es wurden nur Zellkulturen für die Studie verwendet, bei denen sich über 5 Tage ein gleichmäßiger Zellrasen gebildet hatte. Für den Stimulationsversuch wurde dem HAMS- Medium mit 1% FCS, 1% Progesteron 10^{-5} molar und 1% Östradiol 10^{-7} molar, 10% des jeweiligen Seminalplasmas zugefügt. Eine Zellkulturplatte enthielt jeweils 16 mit epithelialen Endometriumzellen beimpfte Wells. Zur Kontrolle wurden jeweils acht Wells nicht stimuliert. Die übrigen Wells wurden mit Nährmedium, welches zu 10% mit dem jeweiligen Seminalplasma versetzt war stimuliert. Nach 3 bzw. 24 Std wurde der Versuch beendet. Sowohl Zellen als auch Zellkulturüberstand wurden asserviert und bei -20° C gelagert.

2. 6. Ablösen der Zellen

Das Versuchsmedium wurde aus den Wells abpipettiert, in sterile Eppendorfgefäße gegeben und bei -20° C eingefroren. Auf die Zellen wurden je 100 µl Trypsin gegeben und 10 Minuten bei 37 ° C inkubiert. Mit 300 µl HAMS-Medium mit 10 % FCS erfolgte das Herauslösen der Zellen aus ihren Inlets. Anschließend wurden die Zellen in sterile Eppendorfgefäße gegeben. Jedes Inlet wurde mit 400 µl sterilem DPBS nachgespült. Die Eppendorfgefäße wurden in der Zentrifuge bei 12.000 g für 10 Min zentrifugiert. Nun erfolgte die Trockenpipettierung der Pellets. Der Überstand wurde verworfen und mit 800 µl sterilem DPBS bei 12.000 g für 10 Min gewaschen. Abermals wurde das Pellet trockenpipettiert und bis zur RNA Isolierung bei -20° C gelagert.

2. 7. ELISA- Test

In den Versuchsmedien wurden mittels Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verschiedene Interleukine nachgewiesen. Die ELISA Technik basiert auf dem *Antikörper- Sandwich-* Prinzip. Ein spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Interleukin ist an eine Mikrotiterplatte gebunden. Daran bindet nun das Interleukin als Antigen. Nach der Inkubationszeit wird ungebundenes Antigen ausgewaschen. Zugegebenes Konjugat bindet nun wiederum an das gebundene Antigen, nach einer weiteren Inkubationszeit wird überschüssiges Konjugat ausgewaschen. Nach Zugabe eines Konjugat bindenden Antikörpers wird erneut inkubiert. Um nun die Konzentration an gebundenem Interleukin nachweisen zu können, wird ein Verstärker zugegeben und nochmals inkubiert. Es findet in Abhängigkeit von der Menge an gebundenem Antigen eine Farbreaktion statt. Nach Zugabe einer Stopp-Lösung wird die optische Dichte mittels Photometer bestimmt. Es wird eine Standard- Reihe mit definierten Konzentrationen angelegt. Alle Standards und Proben werden doppelt angelegt und gemessen. Für diese Studie wurden IL- 1ß, IL- 6, IL- 10, TGF- ß1 und LIF im Versuchsmedium bestimmt.

2. 8. mRNA- Isolierung

Um die Syntheseleistung der Zellen im Stimulationsversuch nachzuweisen wurde zunächst die mRNA (messenger ribonucleinacid) aus den Zellen isoliert und anschließend die jeweilige Menge an spezifischer mRNA gemessen. Die bei -20° C gelagerten Zellpellets wurden in 800 µl Trizol aufgenommen und nach 10 Min Einwirkzeit mit einer Insulinspritze aufgelöst, um die Zellen in Trizol zu homogenisieren. Das Trizol zerstörte die Zellwände und ermöglichte das Herauslösen der RNA. Nach Zugabe von 160 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol- Gemisches im Verhältnis 49:1 wurde das Eppendorfgefäß für 15 Sek von Hand geschüttelt und anschließend für 15 Min. bei 12.000 g zentrifugiert. Es entstanden zwei Phasen eine obere, wässrige Phase und eine untere, ölige Phase. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Um die RNA sichtbar zu machen, wurden 1,6 µl Glyco- Blue®, ein Farbstoff, der RNA anfärbt zugegeben. Nach Zugabe von 400 µl Isopropanol je Eppendorfgefäß wurden diese über Nacht bei -20°C gelagert, damit die RNA ausfallen konnte. Am nächsten Tag wurden die Eppendorfgefäße bei 12.000 g 10 Min lang zentrifugiert. Es bildete sich ein blaues Pellet, das trockenpipettiert und mit 800 µl 75%igem Ethanol bei 12.000 g für 5 Min gewaschen wurde. Das Pellet wurde erneut trockenpipettiert und nun zum weiteren Trocknen für 20 Min offen bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurd das Pellet in 60 µl RNAse freiem Wasser aufgenommen und photometrisch gemessen. Zum spezifischen Nachweis mittels Quantikine mRNA® (Colorimetric mRNA Quantitation) wurden 4 bis 8 µg RNA pro Test benötigt.

2. 9. Colorimetrische mRNA Quantifikation

Quantikine mRNA®

Der Quantikine mRNA- Test basiert auf dem Prinzip eines ELISA. 2 µg der isolierten mRNA wurden mit einer zytokinspezifischen Sonde in die Wells einer unbeschichteten Hybridisierungsplatte gegeben und 1 Std im Wasserbad bei 65° C inkubiert. Dann wurden aus jedem Well der Hybridisierungsplatte 150 µl in die sogenannte *Captureplatte* überführt. Die *Captureplatte* ist mit einem Streptavidin Antikörper beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 1 Std wurde die Platte gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Nun wurden pro Well 200 µl Konjugat zugegeben und erneut 1 Std inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden 50 µl Substratlösung in jedes Well pipettiert und nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit wurden 50 µl Verstärkerlösung zugegeben. Nach einer 30- minütigen Einwirkzeit wurde die Farbreaktion mit 50 µl einer Stopp-Lösung unterbrochen und die optische Dichte photometrisch gemessen. Auch hier wurde eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen angefertigt, Standards und Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung gemessen. Für diese Studie wurde RNA von IL- 1ß, IL- 6, IL- 10 und TGF- ß1 gemessen.

2.10. Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon Test für verknüpfte Objekte verwendet. Signifikanz wurde für $p < 0,05$ (*) definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Zytokinnachweis im Seminalplasma

Im aufbereiteten Seminalplasma wurden die Zytokine IL-1ß, IL- 6, IL-10 und TGF-ß1 nachgewiesen. Um Abweichungen bei der Stimulation der endometrialen Epithelzellen zu vermeiden wurden die zur Stimulation verwendeten Seminalplasmata jeweils gepoolt. In den Pools wurden die Zytokinkonzentrationen gemessen, die Messungen wurden jeweils doppelt durchgeführt. Die Konzentrationen [pg/ml] für die proinflammatorischen IL- 1ß und IL- 6 waren bei Patienten mit Leukospermie und ASA signifikant ($p<0,01$) höher als in der Kontrollgruppe. Hingegen waren die Konzentrationen der anti- inflammatorischen Zytokine IL- 10 und TGF- ß1 in der Leukozyten- und Antikörpergruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe ($p< 0,01$). LIF war mit den angewendeten Tests nicht nachweisbar. Die Nachweisgrenze des verwendeten ELISA- Tests für LIF liegt bei <8 pg/ml.

.

	IL-1ß	IL-6	IL-10	TGF-ß1	LIF	
Normales Seminalplasma	7,3	2,4	9,5	958,3	nn	n= 9
Leukozytenhaltiges Seminalplasma	25,7	13,3	3,0	516,0	nn	n= 9
ASA- haltiges Seminalplasma	12,5	12,75	5,4	725,6	nn	n= 7

Tabelle 3.1. Konzentrationen der verschiedenen Zytokine in den verwendeten Seminalplasmapools in [pg/ml] ASA= Anti- Spermien- Antikörper, nn= nicht nachweisbar, n= die Anzahl der verwendeten Seminalplasmata für den jeweiligen Pool.

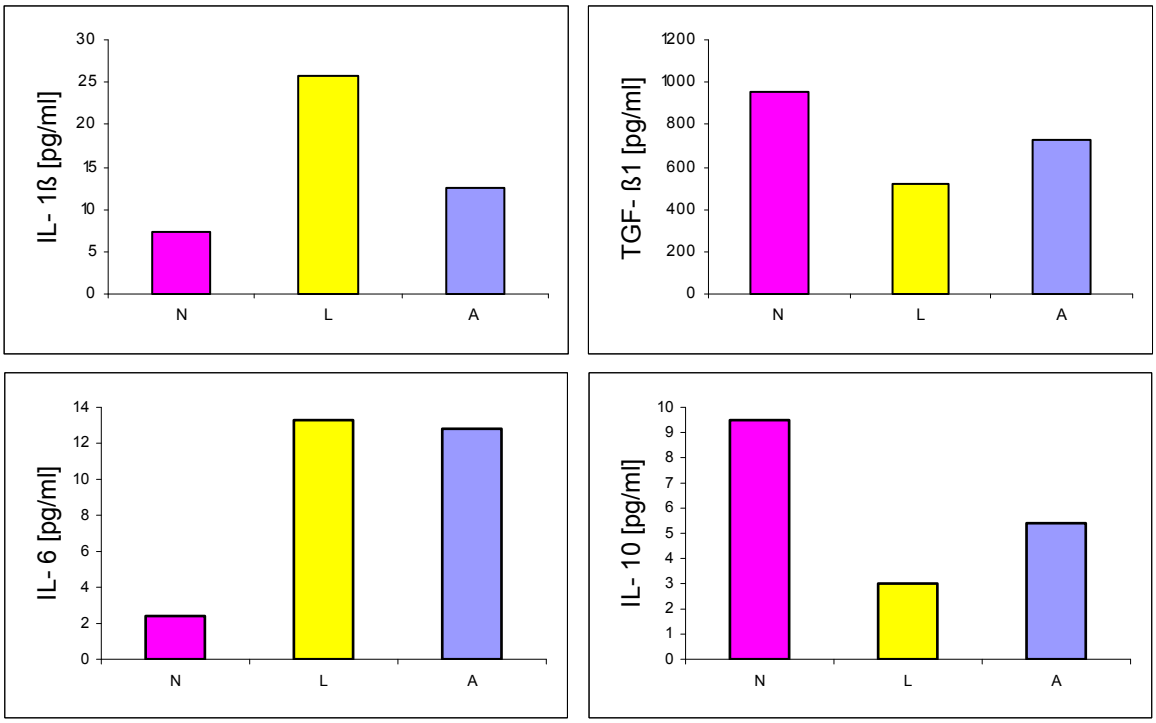


Abb. 3.1. Seminalplasmakonzentrationen der pro- inflammatorischen Interleukine IL- 1ß und IL-6 und der anti- inflammatorischen Interleukine TGF- ß1 und IL- 10 in [pg/ml] in normalem Seminalplasma (**N**), in leukozytenhaltigem Seminalplasma (**L**) und in anti- spermien- Antikörper- haltigem Seminalplasma (**A**).

.

3.2. WHO- Klassifikation der Spermaproben

Die Spermaproben aus denen das Seminalplasma gewonnen und gepoolt wurde, wurden zuvor mittels „swim up“- Methode, einem Migrationsverfahren, bei dem motile Spermien während einer Inkubationsphase in ein überschichtetes Medium schwimmen, aufbereitet und nach WHO- Einteilung klassifiziert.

Probanden- Nr.	WHO a %	WHO b %	WHO c %	WHO d %
normales Seminalplasma				
1	35	20	15	30
2	35	15	5	45
3	10	20	10	60
4	40	10	5	45
5	50	20	10	20
6	30	30	10	30
7	0	35	5	60
8	35	30	10	25
9	30	30	15	25
leukozytenhaltiges SP				
10	50	10	10	30
11	35	20	15	30
12	35	20	10	35
13	11	15	8	66
14	0	0	0	12
15	28	20	12	40
16	27	22	20	31
17	21	23	9	47
18	41	9	8	42
ASA haltiges SP				
19	34	11	11	44
20	48	10	7	35
21	6	38	12	44
22	22	15	12	51
23	39	10	12	39
24	27	40	7	26
25	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt

Tabelle 3.2. Einteilung der Ejakulatproben nach WHO- Kriterien, **SP=** Seminalplasma, **ASA=** Anti-Spermien- Antikörper
Motilität: WHO a: linear- progressiv (schnelle Vorwärtsbewegung), WHO b: progressiv (langsame, ungeordnete Vorwärtsbewegung), WHO c: nicht progressiv (nur lokale Beweglichkeit), WHO d: immotil (keine Beweglichkeit)

3.3. Endometriumzellkulturen

Das Wachstum der Zellen in den Kulturen wurde täglich mikroskopisch überprüft. Nur Zellkulturen mit flächenbildendem Wachstum wurden für die Stimulationsversuche verwendet.

3.4. Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand

IL- 1ß, IL- 6, IL- 10, TGF- ß1 und LIF werden von endometrialen Zellen synthetisiert und abgegeben. Diese Zytokine können im Zellkulturüberstand quantitativ gemessen werden. Es wurden jeweils nach 3 und 24 Stunden die Konzentrationen der einzelnen Zytokine gemessen. Nach 24 Stunden ist die Zytokinkonzentration höher als nach 3 Stunden. Die Syntheseleistung und damit die nachweisbare Konzentration nimmt unter Stimulation mit Seminalplasma zu.

3.4.1. Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden ohne Stimulation [pg/ml]

Kultur Nr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h	LIF 3h	LIF 24h
1	9,2	15,1	5,3	7,0	13,8	27,7	4,3	16,0	20,4	67,8
2	19,5	40,0	2,3	7,6	16,7	22,5	7,3	13,7	10,5	35,0
3	21,1	32,2	6,3	23,2	18,8	22,5	4,2	5,9	23,6	88,3
4	5,9	19,0	2,2	5,8	23,0	35,5	3,6	14,5	24,1	65,5
5	5,0	15,9	7,8	16,0	16,3	33,5	4,1	15,4	6,4	18,3
6	7,8	10,0	4,6	7,6	13,0	22,8	3,4	8,8	9,0	57,5
7	12,9	8,4	4,8	6,8	14,2	23,0	1,6	5,5	9,0	28,0
8	12,6	19,6			9,7	24,0	1,1	5,3	21,3	61,3
9	8,5	6,9			7,5	23,2	0,9	4,5		
MW	11,4	18,5	4,8	10,6	14,8	26,0	3,4	10,0	15,5	52,7
SP	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0	-0
KMW	11,4	18,5	4,8	10,6	14,8	26,0	3,4	10,0	15,5	52,7

Tabelle 3.3. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert, SP= Zytokinkonzentration im Seminalplasma, KMW= korrigierter Mittelwert (Mittelwert- Zytokinkonzentration im Seminalplasma

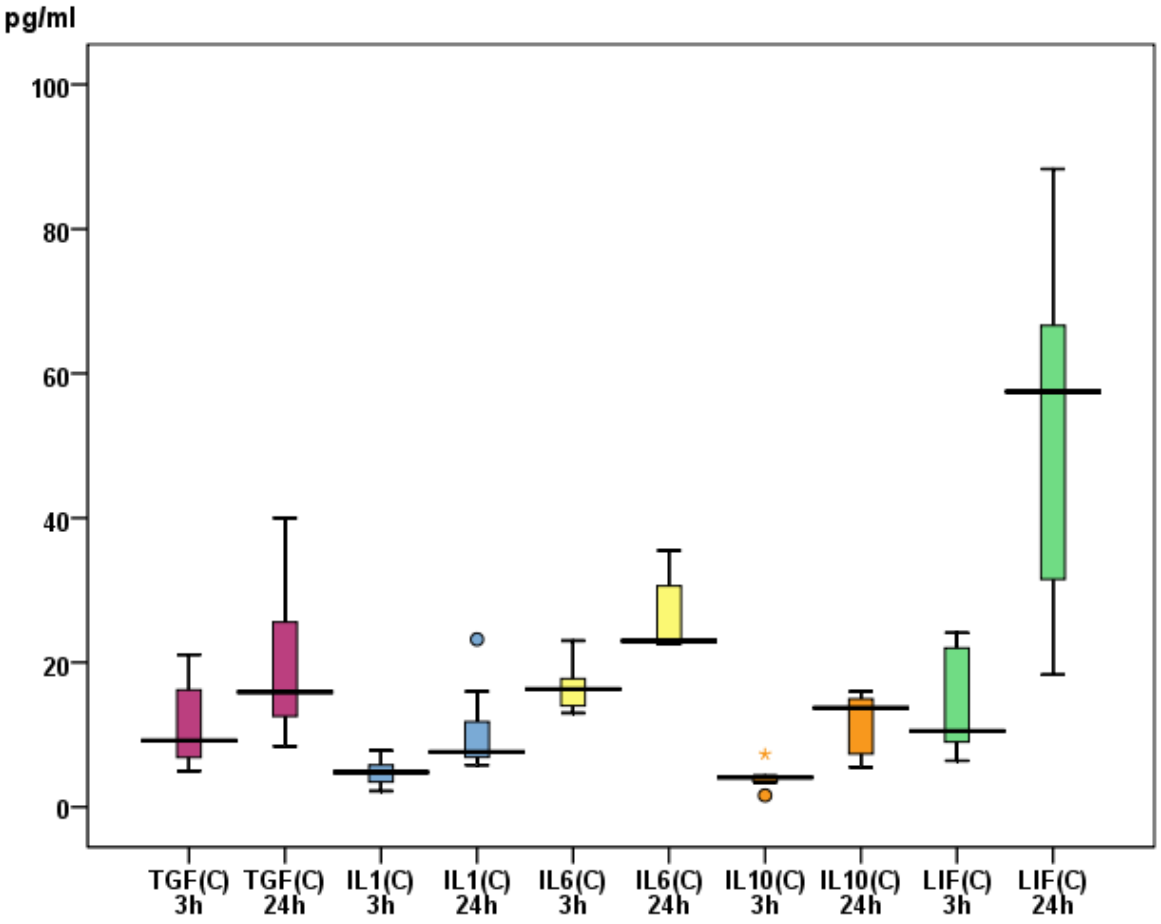
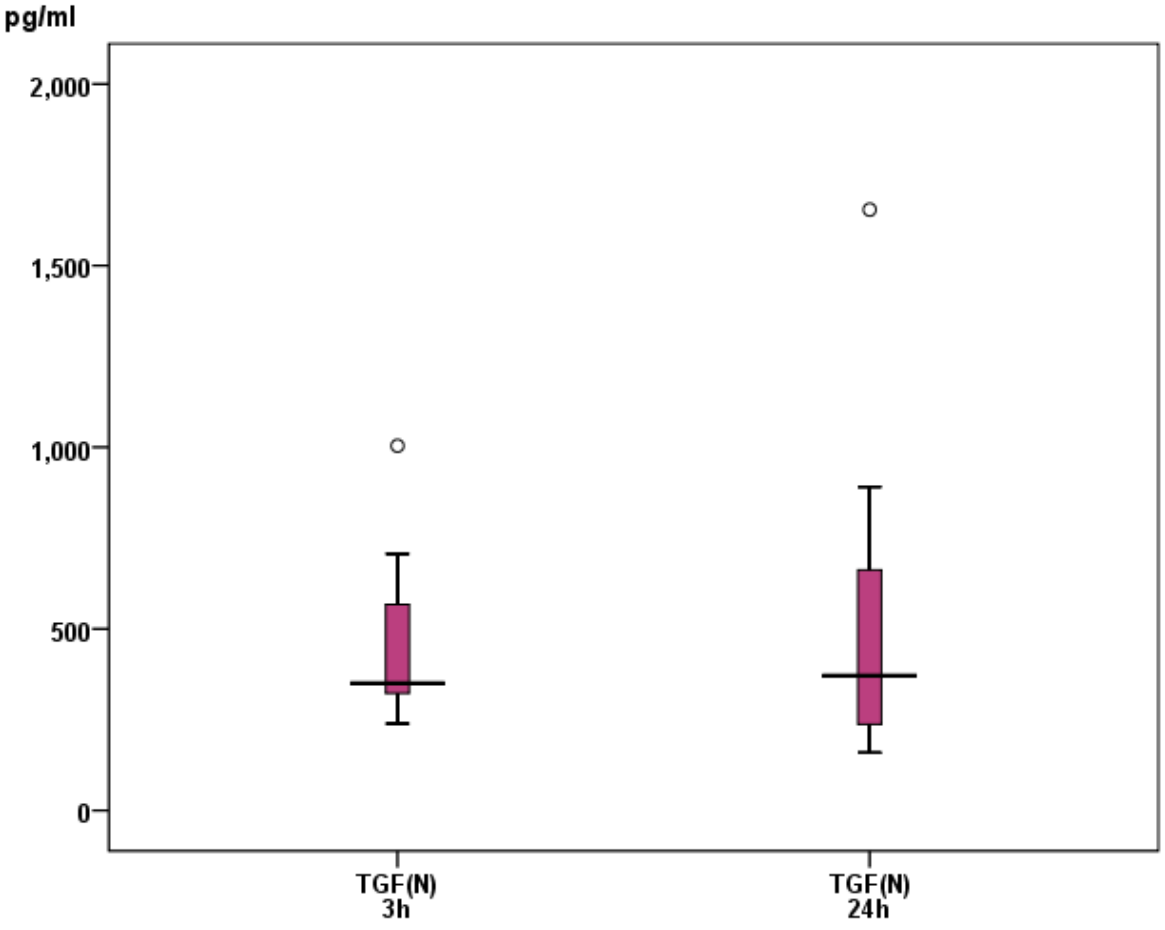


Abb 3.3. Proteinkonzentrationen [pg/ml] von IL-1ß, IL-6, IL-10, TGF-ß1 und LIF im Kulturmedium nach 3 h und 24 h ohne Stimulation durch Seminalplasma. Die Konzentrationen nach 24 h- sind signifikant höher ($p<0,05$) als nach 3 h
Farbkodierung: TGF-ß1, IL- 1ß, IL-6, IL-10, LIF

3.4.2.Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit normalem Seminalplasma (N) [pg/ml]

Kultur Nr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h	LIF 3h	LIF 24h
1	707,0	891,0	4,0	24,5	25,3	37,9	4,4	13,6	11,6	41,6
2	1004,0	159,0	1,8	8,7	10,8	28,8	8,9	12,8	8,9	77,2
3	239,0	1654,0	3,9	48,0	16,7	29,5	5,4	4,7	20,0	57,2
4	350,0	371,0	4,0	14,3	19,2	29,1	3,6	17,7	11,6	49,2
5	326,0	212,0	6,4	68,3	17,0	14,7	5,0	15,9	0,00	0,9
6	427,0	263,0	8,3	13,6	13,7	19,8	3,8	15,5		
7	319,0	433,0	7,7	14,5	13,9	24,0	2,7	4,3		
8										
9										
MW	482,0	569,0	5,2	27,4	16,7	26,3	4,8	12,1	10,4	45,2
SP	-96,0	-96,0	-0,7	-0,7	-0,2	-0,2	-1,0	-1,0	-0	-0
KMW	368,0	473,0	4,5	26,7	16,5	26,1	3,8	11,1	10,4	45,2

Tabelle 3.4. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert, SP= Zytokinkonzentration im Seminalplasma, KMW= korrigierter Mittelwert (Mittelwert-Zytokinkonzentration im Seminalplasma), N= nomales Seminalplasma



.

Abb 3.4. Proteinkonzentrationen [pg/ml] von TGF-ß1 im Kulturmedium nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch normales Seminalplasma (N).
Farbkodierung: TGF-ß1, IL- 1ß, IL-6, IL-10, LIF

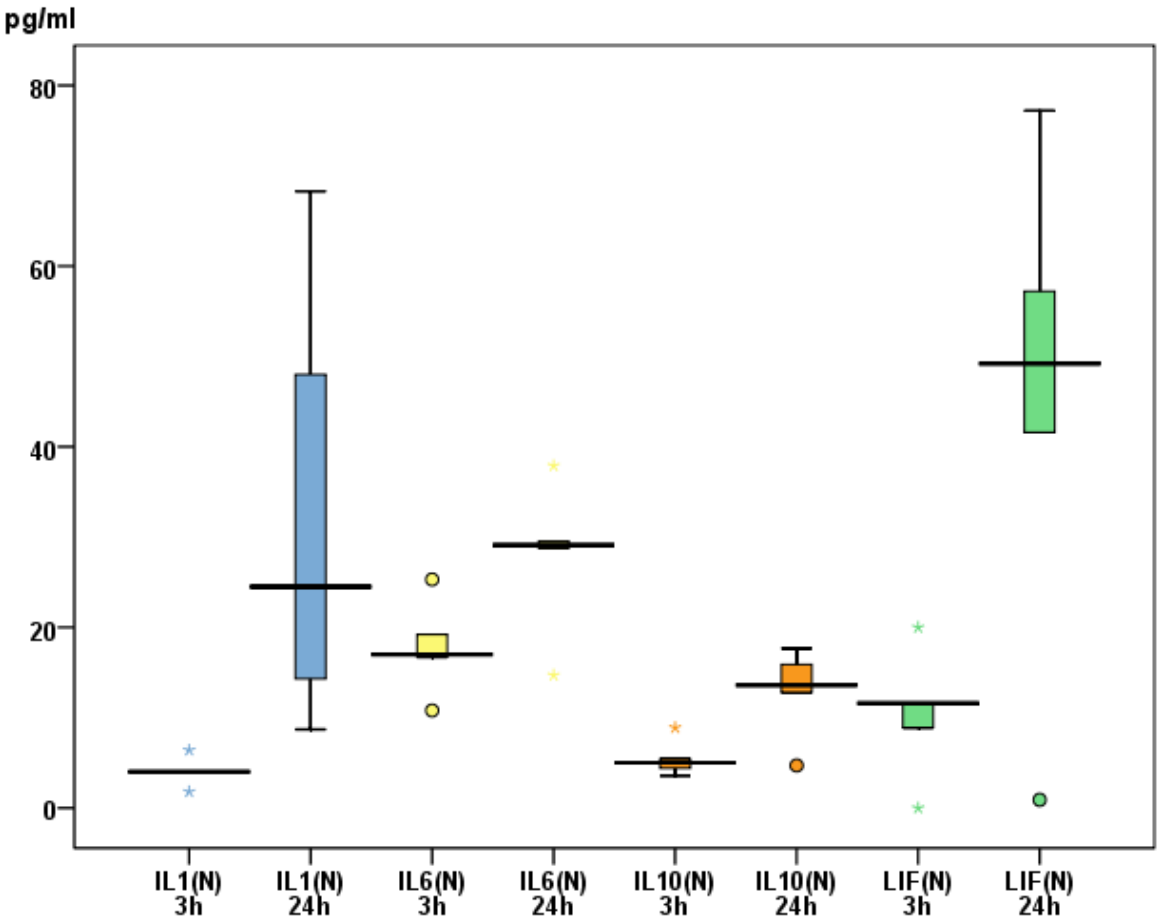


Abb 3.5. Proteinkonzentrationen [pg/ml] von IL-1ß, IL-6, IL-10 und LIF im Kulturmedium nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch normales Seminalplasma (N). Die Konzentrationen nach 24 h sind z.T. signifikant höher ($p<0,05$) als nach 3 h
Farbkodierung: TGF-ß1, IL- 1ß, IL-6, IL-10, LIF

3.4.3. Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit leukozytenhaltigem Seminalplasma (L)[pg/ml]

Kultur Nr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h	LIF 3h	LIF 24h
1	173,0	262,0	10,5	3,0	19,4	28,1	5,3	23,4	12,2	46,6
2	677,0	249,0	1,9	22,0	29,5	31,6	9,4	18,4	19,4	81,1
3	183,0	41,0	4,0	60,5	17,7	30,7	4,5	7,3	21,6	77,8
4	381,0	332,0	3,5	14,8	35,0	37,1	4,1	14,1	18,3	57,8
5	355,0	343,0	5,5	82,5	20,7	20,5	4,3	14,7	11,1	0,00
6	353,0	338,0	4,0	11,7	17,2	26,5	3,9	11,4	17,5	64,5
7	280,0	280,0	3,6	12,0	13,2	24,4	2,0	6,2	20,0	34,0
8	52,0	55,0					1,0	5,0	24,5	85,5
9	271,0	500,0					1,4	5,0		
MW	303,0	267,0	4,7	29,5	21,8	28,4	4,0	11,7	18,1	55,9
SP	-52,0	-52,0	-2,6	-2,6	-1,3	-1,3	-0,3	-0,3	-0	-0
KMW	251,0	215,0	2,1	29,9	20,5	27,1	3,7	11,4	18,1	55,9

Tabelle 3.5. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert, SP= Zytokinkonzentration im Seminalplasma, KMW= korrigierter Mittelwert (Mittelwert-Zytokinkonzentration im Seminalplasma), L= leukozytenhaltiges Seminalplasma

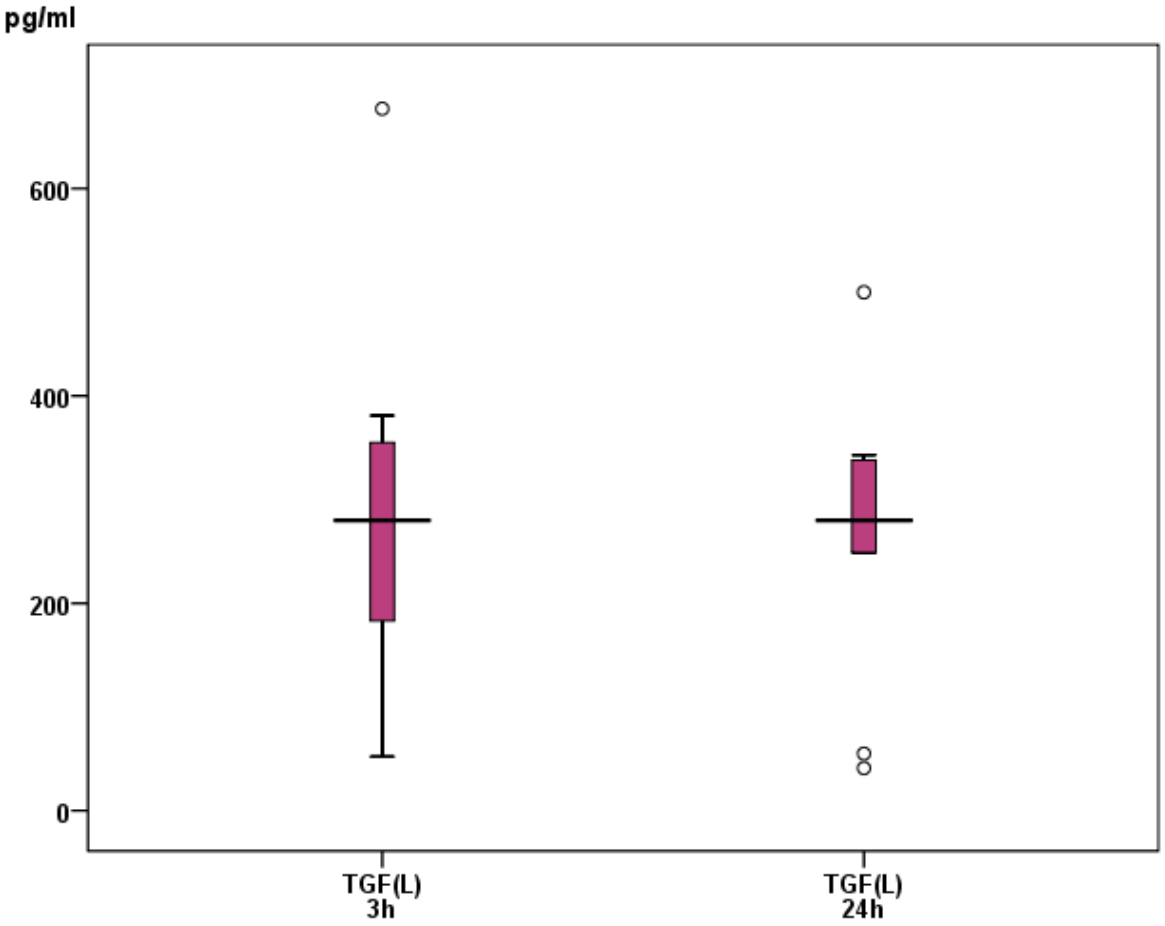


Abb 3.6. Proteinkonzentrationen [pg/ml] von TGF-ß1 im Kulturmedium nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch leukozytenhalitges Seminalplasma (L).
Farbkodierung: TGF-ß1

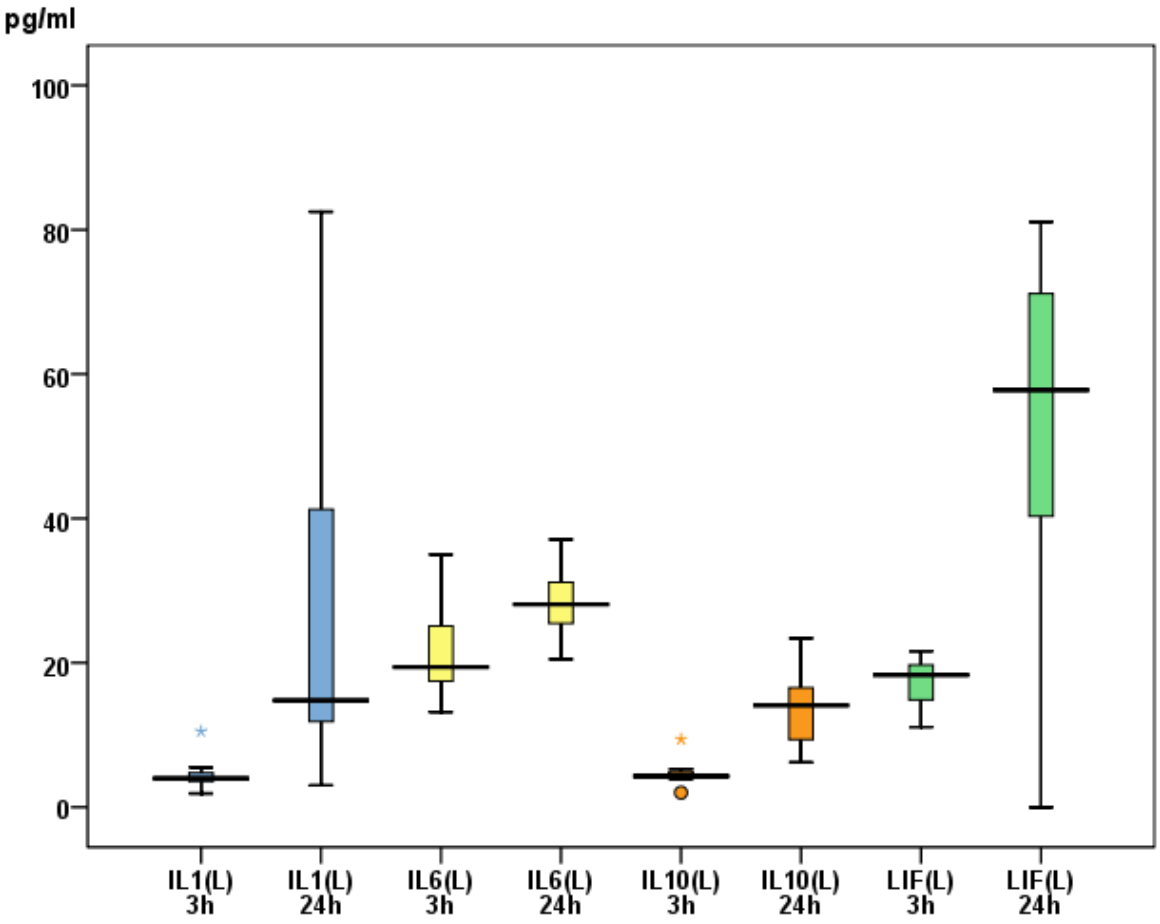


Abb 3.7. Proteinkonzentrationen [pg/ml] von IL-1ß, IL-6, IL-10 und LIF im Kulturmedium nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch leukozytenhalitges Seminalplasma (L). Die Konzentrationen nach 24 h sind z.T. signifikant höher ($p<0,05$) als nach 3 h
Farbkodierung: IL- 1ß, IL-6, IL-10, LIF

3.4.4. Zytokinnachweis im Zellkulturüberstand nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit antispermienantikörperhaltigem Seminalplasma (A) [pg/ml]

Kultur Nr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h	LIF 3h	LIF 24h
1										
2										
3										
4										
5										
6	116,0	110,0	2,6	15,0	20,9	25,6	3,1	6,0		
7	309,0	324,0	2,1	3,6	19,9	25,4	1,1	6,4	14,5	59,5
8	309,0	299,0	3,6	6,5	13,8	25,5	1,4	5,9	11,5	51,5
9	127,0	136,0	2,6	7,2	9,0	23,5	1,5	5,2	15,0	84,5
MW	215,0	217,0	2,7	8,1	15,9	25,0	1,8	5,9	13,7	65,2
SP	-73,0	-73,0	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-0,5	-0,5	-0	-0
KMW	142	144,0	1,4	6,8	14,6	23,7	1,3	5,4	13,7	65,2

Tabelle 3.6. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert, SP= Zytokinkonzentration im Seminalplasma, KMW= korrigierter Mittelwert (Mittelwert-Zytokinkonzentration im Seminalplasma), A= antispermienantikörperhaltiges Seminalplasma

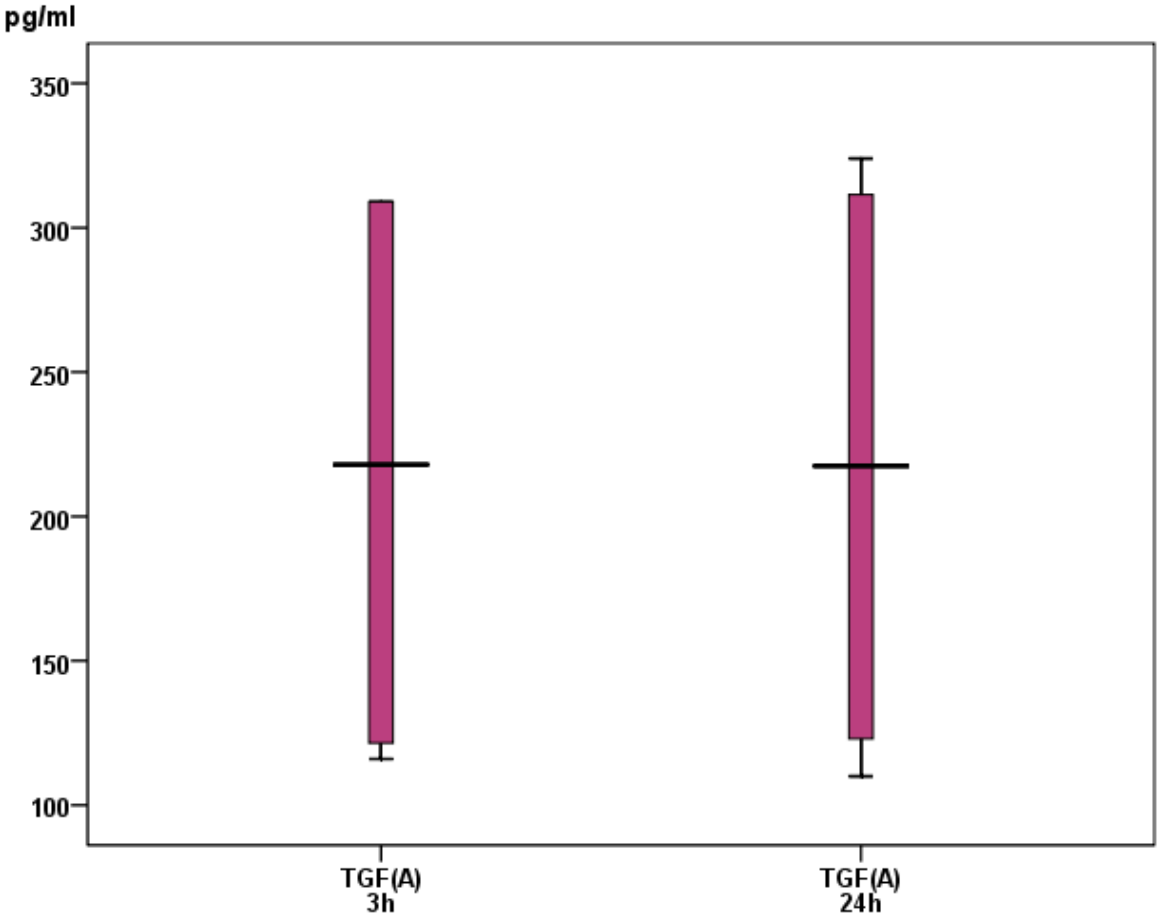


Abb 3.8. Proteinkonzentrationen [pg/ml] von TGF-ß1 im Kulturmedium nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch antispermien Antikörperhaltiges Seminalplasma (A). Farbkodierung: TGF-ß1

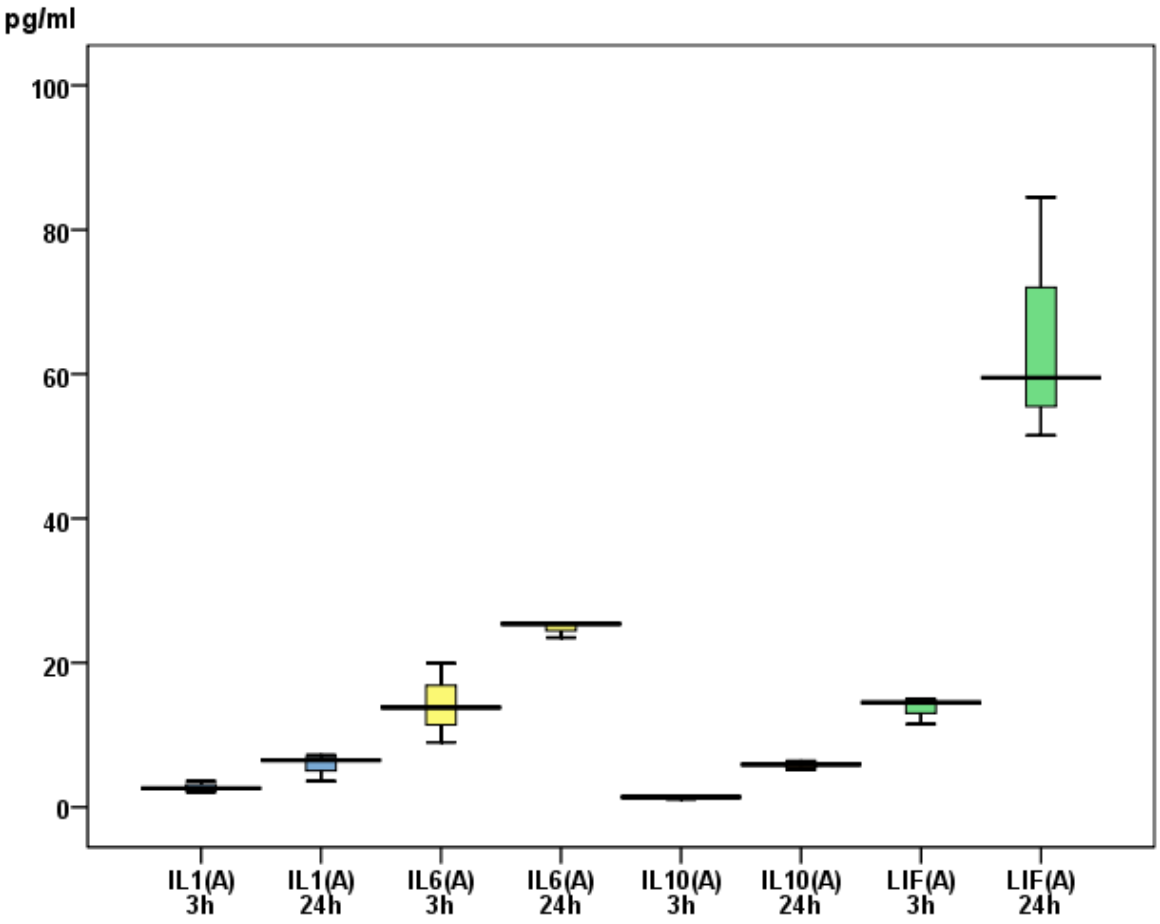


Abb 3.9. Proteinkonzentrationen [pg/ml] von TGF-ß1, IL-1ß, IL-6, IL-10 und LIF im Kulturmedium nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch antispermien Antikörperhaltiges Seminalplasma (A). Die Konzentrationen nach 24 h sind z.T. signifikant höher ($p<0,05$) als nach 3 h Farbkodierung: IL- 1ß, IL-6, IL-10, LIF

3.5. mRNA- Nachweis in den endometrialen Epithelzellen

Die mRNA für IL- 1ß, IL- 6, IL- 10, und TGF- ß1 wird jeweils nach 3 und 24 Stunden isoliert und die Konzentrationen gemessen. Nach 24 Stunden ist die mRNA-Konzentration höher als nach 3 Stunden. Unter Stimulation mit Seminalplasma nehmen die Konzentrationen zu.

3.5.1. Zytokin-mRNA- Nachweis in den endometrialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden ohne Stimulation [amol/ml]

Kultur Nr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h
1	15,7	39,8	22,3	78,7	17,1	43,9	7,2	19,4
2	11,2	32,1	24,9	75,0	11,7	39,2	11,3	15,2
3	9,6	26,3	15,6	89,8	9,9	34,5	13,8	21,1
4	14,8	29,5	28,5	67,1	14,8	42,6	12,4	19,7
5	8,6	32,4	31,5	74,3	10,5	27,2	2,4	18,0
6	17,2	27,5	23,9	81,9	17,1	34,7	16,5	10,3
7	8,5	28,0	34,3	67,6	11,9	29,7	9,9	18,6
8	12,7	38,9	12,2	71,5			18,4	21,5
9	13,1	25,5	25,5	81,5			10,7	24,7
MW	12,4	31,1	24,3	76,4	13,3	36,0	11,4	18,7

Tabelle 3.7. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert

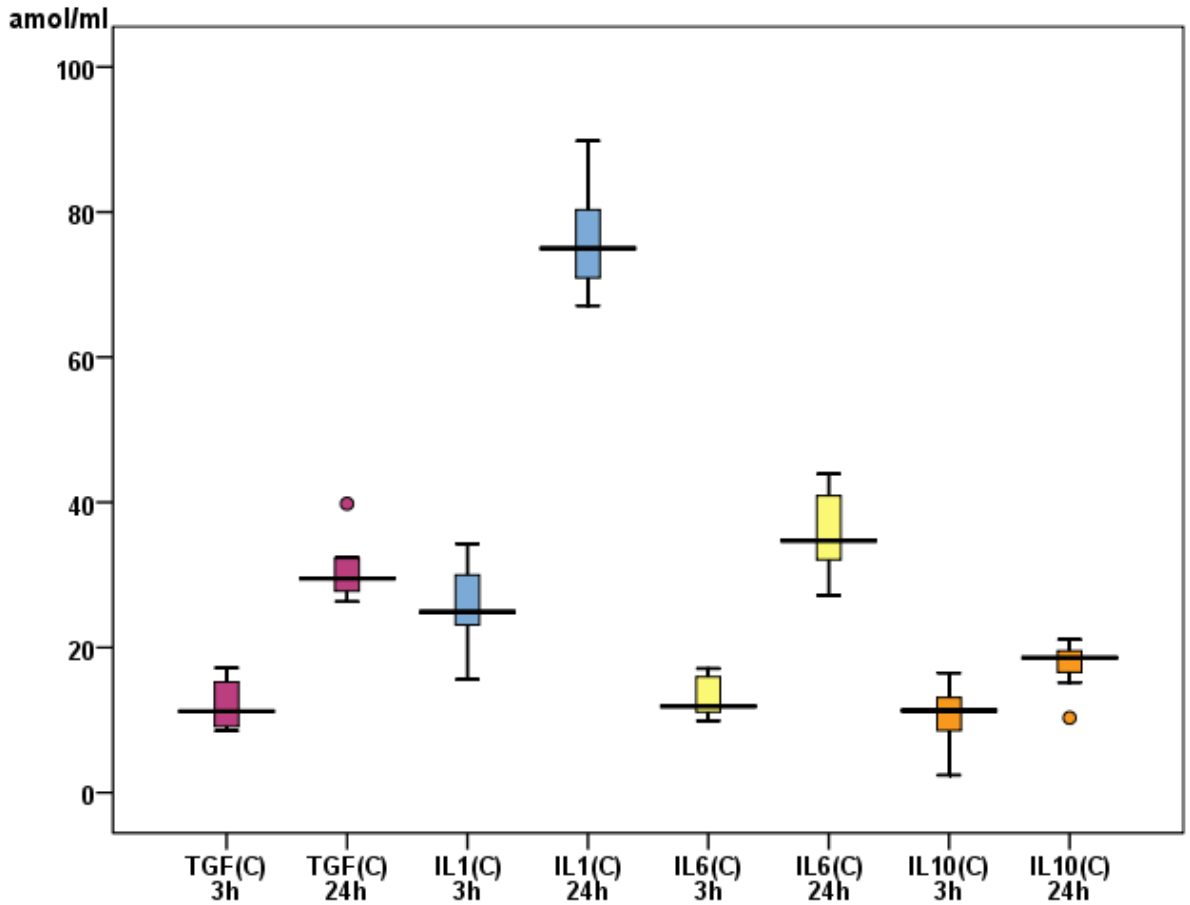


Abb 3.10. mRNA- Konzentrationen [amol/ml] von TGF-ß1, IL-1ß, IL-6, IL-10 und LIF in den endometrialen Epithelzellen nach 3 h und 24 h ohne Stimulation durch Seminalplasma. Die Konzentrationen nach 24 h sind höher als nach 3 h
Farbkodierung: TGF-ß1, IL- 1ß, IL-6, IL-10

3.5.2. Zytokin-mRNA- Nachweis in den endomentrialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit normalem Seminalplasma (N) [amol/ml]

Kultur Nr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h
1	53,2	71,8	67,3	152,1	32,7	71,1	33,7	41,1
2	45,3	76,6	78,9	122,3	29,2	84,3	22,7	45,7
3	44,8	73,2	61,0	132,4	36,2	89,8	19,7	49,9
4	47,8	84,4	67,9	126,3	33,6	69,5	26,5	47,2
5	51,1	90,4	71,8	156,5	37,2	94,4	25,6	43,2
6	33,1	71,1	79,2	118,7	36,9	83,7	33,5	47,9
7	45,3	88,5	82,3	127,4	48,7	89,9	26,3	53,8
8								
9								
MW	45,8	79,4	72,6	133,7	36,4	83,2	26,9	47,0

Tabelle 3.8. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert, N= normales Seminalplasma

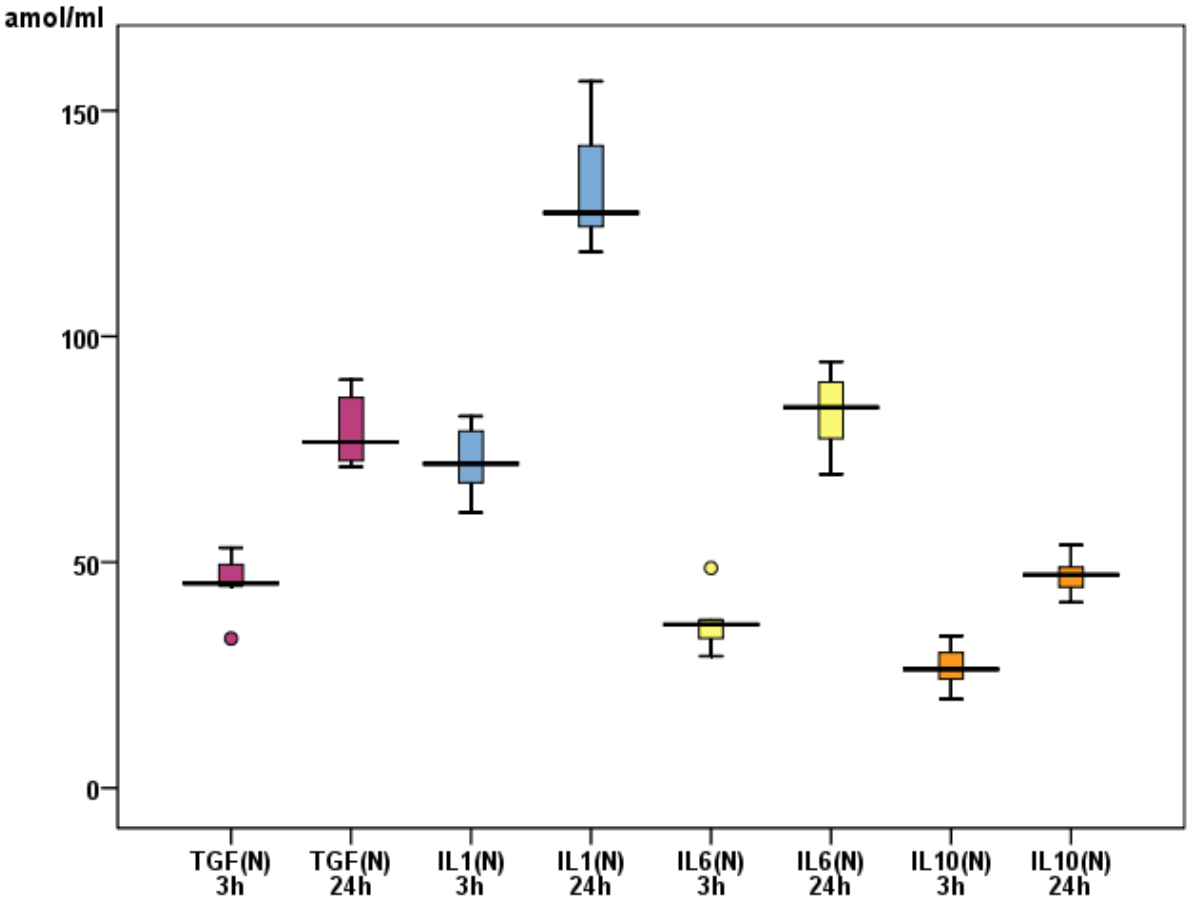


Abb 3.11. mRNA- Konzentrationen [amol/ml] von TGF-ß1, IL-1ß, IL-6, IL-10 und LIF in den endometrialen Epithelzellen nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch normales Seminalplasma (N). Die Konzentrationen nach 24 h sind höher als nach 3 h. Farbkodierung: TGF-ß1, IL- 1ß, IL-6, IL-10

3.5.3. Zytokin-mRNA- Nachweis in den endometreialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit leukozytenhaltigem Seminalplasma (L) [amol/ml]

Kultur Nr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h
1	42,3	81,7	78,6	139,1	28,9	85,3	25,2	50,7
2	56,7	84,0	81,9	139,7	37,6	73,4	27,6	61,3
3	52,9	69,1	72,7	127,8	39,6	77,4	35,3	53,5
4	39,9	74,0	65,6	141,2	41,1	79,4	31,0	56,3
5	49,3	85,5	91,1	138,7	48,6	91,3	31,5	56,8
6	61,8	78,4	60,1	128,3	41,5	78,6	25,3	45,7
7	49,1	77,0	75,0	161,3	31,5	83,1	19,6	50,3
8	47,3	88,3	76,1	129,9	36,8	73,9	19,7	49,5
9	67,2	71,6	74,2	137,6	25,7	93,4	31,3	67,8
MW	51,8	78,8	75,0	138,2	36,8	81,8	27,4	54,7

Tabelle 3.9. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert, L= leukozytenhaltiges Seminalplasma

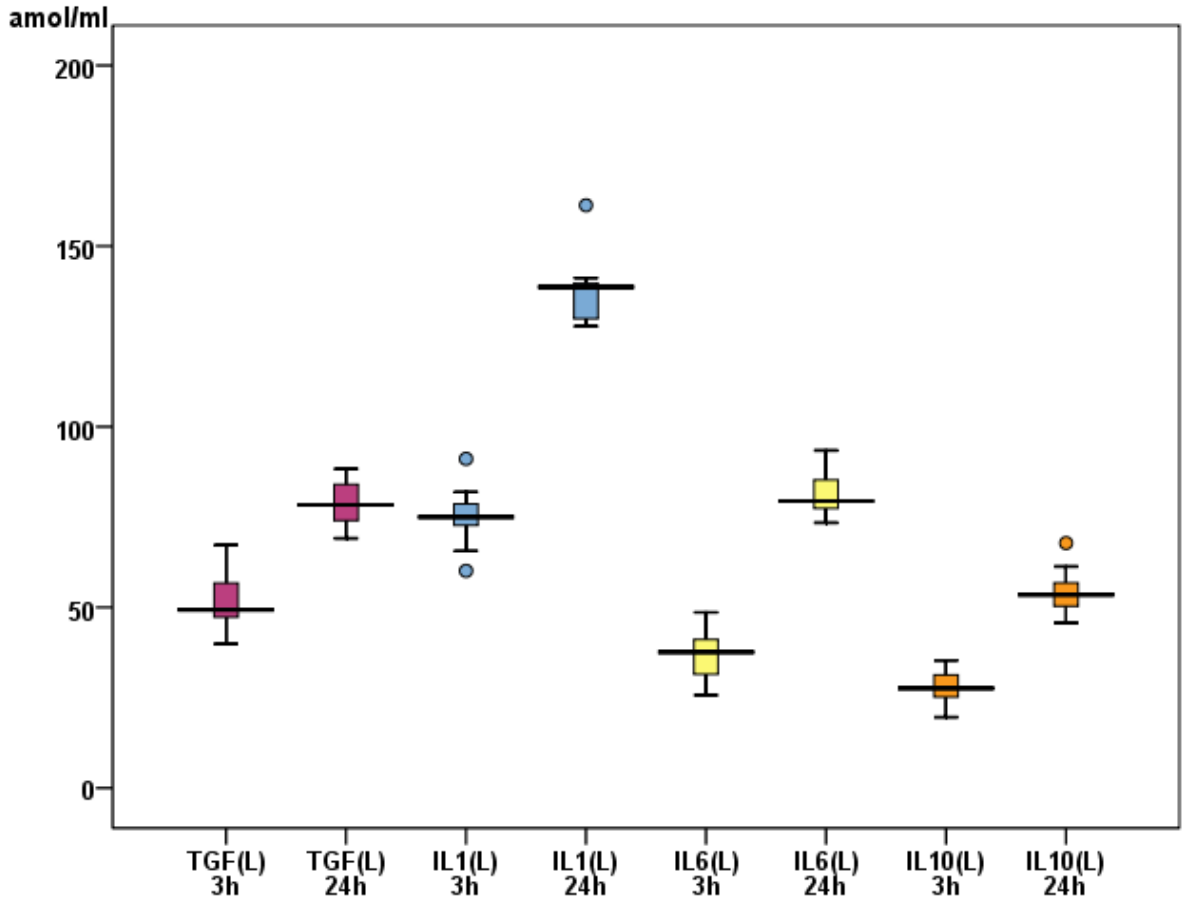


Abb 3.12. mRNA- Konzentrationen [amol/ml] von TGF-ß1, IL-1ß, IL-6, IL-10 und LIF in den endometrialen Epithelzellen nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch leukozytenhaltiges Seminalplasma. Die Konzentrationen nach 24 h sind höher als nach 3 h
Farbkodierung: TGF-ß1, IL- 1ß, IL-6, IL-10

3.5.4. Zytokin-mRNA- Nachweis in den endometrialen Epithelzellen nach 3 und 24 Stunden nach Stimulation mit antispermienantikörperhaltigem Seminalplasma (A) [amol/ml]

KulturNr	TGF 3h	TGF 24h	IL1 3h	IL1 24h	IL6 3h	IL6 24h	IL10 3h	IL10 24h
1								
2								
3								
4								
5								
6	41,2	83,2	65,6	143,7	49,5	95,3	16,4	46,2
7	55,1	76,0	71,7	187,9	38,6	83,4	30,0	57,9
8	51,5	79,4	64,1	137,8	27,1	69,2	27,4	58,7
9	34,1	85,2	82,9	177,9	41,9	77,9	28,8	45,8
MW	45,5	81,0	71,1	162,0	39,3	81,5	25,7	52,2

Tabelle 3.10. TGF= TGFß- 1, IL1= IL-1ß, IL6= IL-6, IL10= IL 10, MW= Mittelwert, A= antispermienantikörperhaltiges Seminalplasma

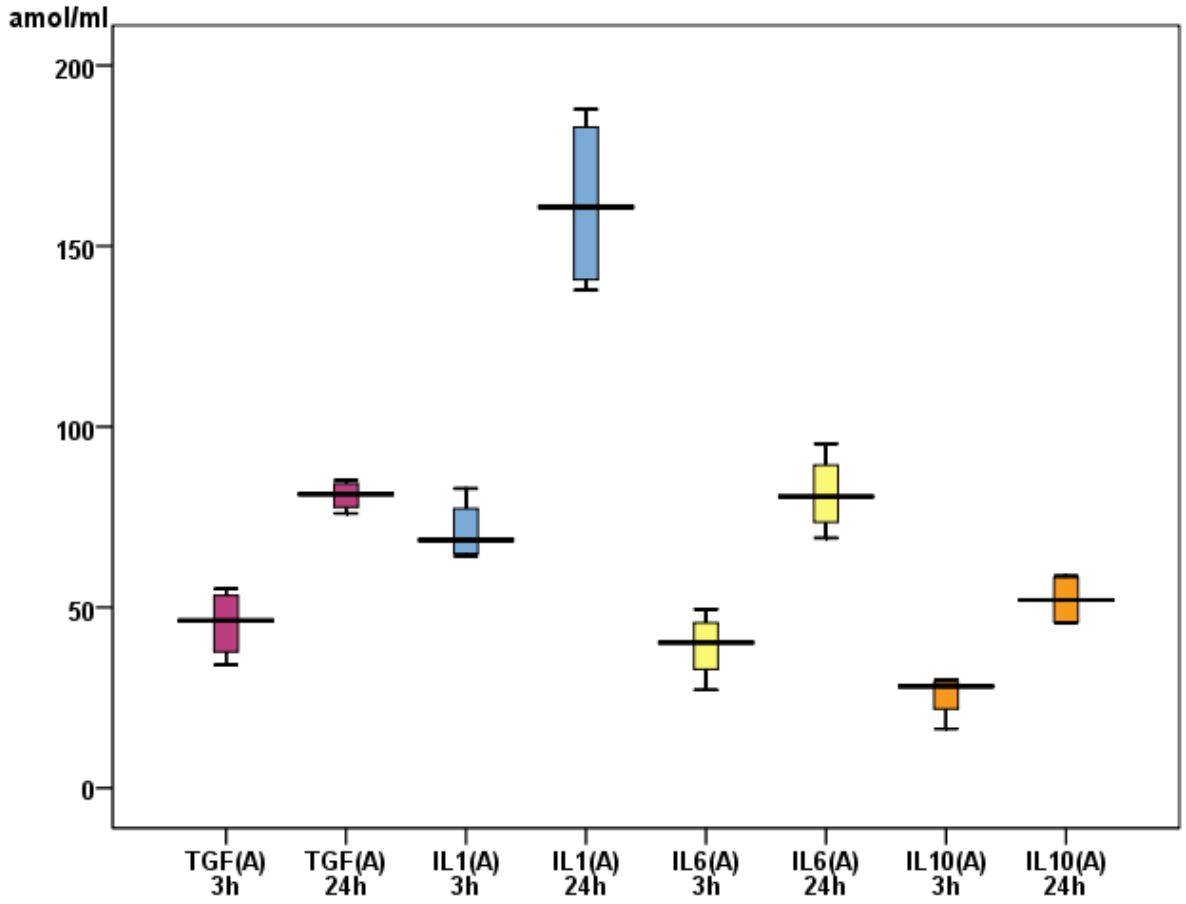


Abb 3.13. mRNA- Konzentrationen [amol/ml] von TGF-ß1, IL-1ß, IL-6, IL-10 und LIF in den endometrialen Epithelzellen nach 3 h und 24 h mit Stimulation durch anti-spermienantikörper- haltigem Seminalplasma. Die Konzentrationen nach 24 h sind höher als nach 3 h.
Farbkodierung: TGF-ß1, IL- 1ß, IL-6, IL-10

4. Diskussion

4.1. Seminalplasma

In dieser Arbeit wurden die möglichen Regulationsmechanismen der endometrialen Funktion durch Stimulation mit Seminalplasma an Hand eines *in vitro* Modelles untersucht. Ausgehend von Vorarbeiten, in denen ein potentieller „priming“ Effekt durch Seminalplasma auf die endometriale Funktion bezüglich der Implantationsfähigkeit gezeigt werden konnte (Gutsche et al, 2003), haben wir die Untersuchungen auf Männer mit Sub- bzw Infertilität aufgrund von ASA oder Leukozytospermie ausgeweitet. Die WHO legt einen Normwert von $<1x10^6$Leukozyten/ml für die Leukozytospermie fest. Eine pathologische Leukozytospermie findet sich in ca 20% im Rahmen männlicher Infertilität. Die Ursache hierfür sind unter anderem Epididymitis, Prostatitis oder andere urogenitale Infektionen, abnorme Spermien oder chemische Irritationen (Yanushpolski et al, 1995, Aitken et al, 1995).

Bei etwa 5% aller infertilen Männer werden Autoantikörper gegen Spermien nachgewiesen. Antispermienantikörper (ASA) stehen in Zusammenhang mit der Entstehung männlicher Infertilität, da sie die Motilität der Spermien herabsetzen können. Zudem können Spermienantikörper mit der Akrosomenreaktion und der Bindung des Spermiums an die Zona pellucida der Oozyte interferieren (Bandoh et al, 1992, Francavilla et al, 1997). ASA können spontan auftreten, als Folge einer entzündlichen Reaktion oder nach einer Vasektomie (Hjort 1999). Etwa die Hälfte aller vasektomierten Männer entwickelt postoperativ ASA (Urry et al, 1990). Es werden Antikörper der IgG- und IgA- Klasse gefunden (Lombardo et al, 2001).Im ASA- und leukozytenhaltigen Seminalplasma finden sich unterschiedliche Konzentrationen in den Zytokinen IL- 1ß, IL- 6, IL- 10 und TGF- ß1.

Im Rahmen der physiologischen Interaktionen zwischen humanem Seminalplasma und Endometrium, die der Implantation der Blastozyste vorrangehen, geht man davon aus, dass die im Seminalplasma enthaltenen Zytokine einen wichtigen Faktor darstellen (Robertson et al, 2005). Aus Vorarbeiten von Gutsche et al. geht hervor, dass die endometriale Rezeptivität durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird (Gutsche et al, 2003, 2002). Unter anderem spielen auch Zytokine bei der

endometrialen Regulation eine bedeutende Rolle (Horowitz et al, 1993; Simón et al, 1993; Tabibzadeh et al, 1995; Torry et al, 1996; Vandermolen and Gu, 1996; Arici et al, 1998; Zhao and Chegini, 1999). Um eine mögliche Erklärung zu finden, warum die Schwangerschaftsraten im Zusammenhang mit Leukozytospermie und ASA deutlich erniedrigt sind und ob die Zytokinregulation in den Epithelzellen durch verschiedene Seminalplasmen anders beeinflusst wird, wurden unterschiedliche Seminalplasmagruppen untersucht und miteinander verglichen.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die Zytokinexpression in den endometrialen Epithelzellen durch Stimulation mit Seminalplasma zunimmt. Es wurde sowohl ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL- 1ß und IL- 6, als auch der antiinflammatorischen Zytokine IL- 10 und TGF-ß1, beobachtet. Im gepoolten und dialysierten Seminalplasma wurden die Zytokine IL- 1ß, IL- 6, IL- 10, TGF- ß1 und LIF gemessen. Unsere Ergebnisse zeigen unterschiedliche Zytokinkonzentrationen in Abhängigkeit von anderen Seminalplasmaparametern wie erhöhte Leukozytenzahl und der Anwesenheit von ASA (Antispermienantikörper).

4.2. Proinflammatorische Zytokine

Unsere Daten zeigen im Seminalplasma mit erhöhter Leukozytenzahl und Antispermienantikörpern um den Faktor 3,5 bzw 1,7 erhöhte Konzentrationen für IL-1ß und um den Faktor 5,5 bzw 5,3 erhöhte Konzentrationen für IL- 6.

In einer Studie von Dousset et al. wurde ein ähnlicher Anstieg für IL- 1ß in einer Gruppe, z.T. aufgrund von Infektionen infertiler Patienten beobachtet (Dousset et al, 1997). Leukozyten und erhöhte Konzentrationen von IL-1ß und IL-6 finden sich vor allem bei Patienten mit urogenitalen Infektionen (Gruschwitz et al, 1996). Eine andere Studie konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede in den IL- 1ß Konzentrationen bei fertilen und subfertilen Patienten feststellen (Papadimas et al, 2002). Friebe et al fanden einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von IL- 6 in Seminalplasma und stattgehabten Infektionen der akzessorischen Drüsen mit enger Korrelation zur Leukozytenzahl. Dies lässt auf eine IL- 6 Expression durch Leukozyten schliessen. Aber auch Prostata und Samenbläschen nehmen vermutlich an der IL- 6- Produktion teil (Friebe et al, 2003). Andere Studien konnten zeigen, dass eine umgekehrte Korrelation zwischen IL- 6 und Spermienkonzentration bei infertilen Patienten besteht, und dass in einer Gruppe fertiler Männer die Konzentration von IL- 6 im Seminalplasma signifikant niedriger war als in einer Gruppe infertiler Männer (Furuya et al, 2003).

Comhaire et al beobachteten 1994 eine positive Korrelation zwischen Leukozytenzahl im Seminalplasma und den Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (Comhaire et al, 1994). Leukozyten sind somit als Quelle der Produktion proinflammatorischer Zytokine denkbar. Somit wäre eine erhöhte Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen im leukozytenhaltigen Seminalplasma zu erwarten.
Da die Leukozytenzahl im ASA- haltigen Seminalplasma nicht erhöht war, aber die Konzentrationen von IL- 1ß und IL- 6, sind seminale Leukozyten wohl nicht die einzige Quelle der Zytokinproduktion. Verschiedene Zellen im Hoden und im Urogenitaltrakt sind mögliche Produzenten von Zytokinen (Friebe et al, 2003, Robertson et al, 2005). In dieser Studie findet sich keine Erklärung, warum die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1ß und IL-6 im ASA- haltigen Seminalplasma im Vergleich zum normalem Seminalplasma erhöht sind. Somit

stellen Leukozyten wohl nicht den einzigen Syntheseort für Zytokine im männlichen Urogenitaltrakt dar.

4.3. Antiinflammatorische Zytokine

In unserer Studie waren die anti- inflammatorischen Zytokine IL- 10 und TGF- ß1 im Seminalplasma mit ASA und erhöhter Leukozytenzahl im Vergleich zum normalen Seminalplasma in niedrigeren Konzentrationen vorhanden. Im normalen Seminalplasma finden sich im Vergleich zu leukozytenhaltigem Seminalplasma um den Faktor 3,2 höhere Konzentrationen an IL- 10 und um den Faktor 1,8 erhöhte Konzentrationen an TGF- ß1. Im Vergleich zu ASA- haltigem Seminalplasma sind im normalen Seminalplasma die Konzentrationen von IL- 10 und TGF-ß1 um den Faktor 1,8 bzw 1,3 erhöht. Im Seminalplasma finden sich hohe Konzentrationen an TGF-ß1, wobei hier kein Unterschied zwischen normalen und infertilen Individuen festzustellen ist (Loras et al, 1999).

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass TGF- ß1 immunosuppressive Aktivität besitzt (Ochsenkühn et al, 2006). Die in anderen Studien beschriebene Suppression der T- und B- Zellproliferation, Neutrophilen-,und Makrophagenaktivität und Killerzellaktivität durch Seminalplasma (Thaler 1989) könnte möglicherweise ein Effekt von TGF- ß1 sein. Dieses Zytokin ist im normalen Seminalplasma das quantitativ am meisten vertretene und kann unterschiedliche immunosuppressive Aktivitäten entwickeln (Godkin et al, 1998). Erhöhte Konzentrationen von TGF-ß1 im normalen Seminalplasma gegenüber leukozytenhaltigem und ASA- haltigem Seminalplasma können mit einer fertilitätsfördernden Wirkung verbunden sein, denn TGF-ß supprimiert zytotoxische T- Lymphozyten und natürliche Killerzellen, die für die Toleranz des weiblichen Genitaltrakts gegenüber körperfremder Proteine im Ejakulat mit verantwortlich sind (Mule et al, 1988; Su et al, 1991; Lucas et al, 1990).

Die in unserer Arbeit festgestellte inverse Korrelation von IL- 10 Konzentration zur Leukozytenzahl im SP wird durch die Ergebnisse von Huleihel und Kollegen unterstützt (Huleihel et al, 1999), welche eine signifikante Reduktion von IL- 10 bei Männern mit kombinierter Leukozytospermie und abnormen Spermienparametern (Oligoasthenoteratozoospermie) beobachteten. Im Gegensatz hierzu waren in einer vorangegangenen Studie erhöhte seminale Leukozyten mit erhöhten IL- 10-Konzentrationen assoziiert (Ochsenkühn et al, 2006), vergleichbar mit den

Ergebnissen von Rajaserakan et al (Rajaserakan et al, 1996). Unterschiedliche Probandengruppen könnten hierfür die Erklärung sein. Da die IL- 10 Konzentration im Seminalplasma generell sehr niedrig ist, könnten einzelne Proben mit erhöhter IL-10- Konzentration in einen SP- Pool das Ergebnis beeinflussen. IL- 10 ist ein Produkt von Monozyten, regulatorischen T- Lymphozyten und epithelialen Zellen im männlichen Genitaltrakt (de Waal Malefyt and Moore 1998). Ein Anstieg der IL- 10 Konzentration wurde auch im Seminalplasma von Männern mit chron. Prostatitis beobachtet, ungeachtet der Leukozytenzahl (Miller et al, 2002). Probanden mit chronischer Prostatitis wurden in unsere Studie nicht aufgenommen. Aus Vorarbeiten von Gutsche et al geht hervor, dass die endometriale Rezeptivität durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Neben Prostaglandinen spielen unter anderem auch Zytokine bei der endometrialen Regulation eine bedeutende Rolle (Gusche et al, 2003).

Im Rahmen der physiologischen Interaktionen zwischen humanem Seminalplasma und Endometrium, die der Implantation des Embryos vorrangehen, geht man davon aus, dass die im Seminalplasma enthaltenen Zytokine einen wichtigen Faktor darstellen (Robertson et al, 2005). Sie fördern vermutlich in ihrem Zusammenspiel zunächst das Spermienüberleben und erleichtern anschließend die Elimination von überschüssigen Spermien und Zelldetritus aus dem weiblichen Genitaltrakt und ermöglichen somit die Entstehung einer Schwangerschaft (Denison F. C. et al. 1999). Um eine mögliche Erklärung zu finden, warum die Schwangerschaftsraten im Zusammenhang mit Leukozytospermie und ASA im Vergleich zu normalem Seminalplasma deutlich erniedrigt sind, und ob die Zytokinregulation in den Epithelzellen durch verschiedene Seminalplasmagruppen anders beeinflusst wird, wurden die Effekte unterschiedlicher Seminalplasmagruppen auf die endometrialen Epithelzellen untersucht und miteinander verglichen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zytokinexpression in den endometrialen Epithelzellen durch Stimulation mit Seminalplasma zunimmt. Es wurde sowohl ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL- 1ß und IL- 6, als auch der antiinflammatorischen Zytokine IL- 10 und TGF-ß1, beobachtet.

4.4 Zellkulturüberstand und mRNA- Nachweis in den endometrialen Epithelzellen

Es wurden die Zytokine IL- 1ß, IL- 6, IL- 10, TGF- ß1 und LIF im Zellkulturüberstand und die mRNA für IL- 1ß, IL- 6, IL- 10 und TGF- ß1 in den endometrialen Epithelzellen nachgewiesen. Die jeweiligen Konzentrationen in stimulierten endometrialen Epithelzellen wurden mit den Konzentrationen der nicht stimulierten Zellen verglichen. Ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen, sowohl im Zellkulturüberstand als auch in den Zellen ohne Stimulation, mit einem in dieser Versuchsreihe gemessenen Anstieg nach 3 Stunden und einem weiteren Anstieg nach 24 Stunden, zeigt, dass die endometrialen Epithelzellen auch ohne Stimulation Zytokine synthetisieren. Dies konnte bereits in einer vorangegangenen Studie von Gutsche et al. 2003 gezeigt werden (Gutsche et al, 2003) und kann als Zeichen für die Syntheseaktivität der endometrialen Epithelzellen gesehen weden. In den stimulierten Zellen war die Zunahme der IL- mRNA deutlich höher als in den nicht stimulierten Zellen.

Unabhängig von der Seminalplasmagruppe zeigte sich ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand und der mRNA in den Epithelzellen die mit Seminalplasma stimuliert wurden, im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen.

Es wurden IL- 1ß, IL- 6, IL- 10, TGF- ß1 und LIF ausgewählt, da diese Zytokine im Rahmen der Implantation eine wichtige Rolle spielen (Tabibzaeh et al, 1995; von Wolff et al, 2002a; Simón et al, 1993; Charnock- Jones et al, 1994; Sengupta et al, 2003; Laird et al, 1997; Lim et al, 2000; Makhseed et al, 2000; Kojima et al, 1994; Sachdeva et al, 2001; Stewart 1994; Laird et al, 2000; Arici et al, 1995).

Unsere Hypothese, dass die Konzentrationen unterschiedlicher pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Endometrium durch das Seminalplasma subfertiler Männer unterschiedlich stimuliert würde, hat sich nicht bestätigt. SP von Männern mit normalem Sperma steigerte die mRNA- Produktion aller gemessenen Zytokine und der Proteine IL- 1ß und TGF- ß1 signifikant. Geringere Konzentrationen von IL- 1ß und IL- 10 in der ASA- Gruppe erreichten keine statistische Signifikanz, wohl

aufgrund der geringen Anzahl von Proben. Es ist nicht klar, ob eine Inkubation mit SP länger als 24 Stunden die Expression der Proteine weiter gesteigert hätte. Weitere Studien werden notwendig sein, um diese Frage zu beantworten.

In vorrangehenden Studien (Gutsche et al, 2003; v. Wolff et al, 2001) zeigte die Inkubation von Epithelzellen mit einzelnen Zytokinen wie TGF- ß1, IL- 8 und VEGF, welche im Seminalplasma in hohen Konzentrationen gefunden werden eine herabgesetzte Stimulation der mRNA- Expression, verglichen mit komplettem Seminalplasma. Diese Experimente zeigen, dass die Zytokinexpression in humanen Endometriumszellen in vitro nicht ausschliesslich durch einzelne Zytokine reguliert wird. Wir schliessen daraus, dass die Regulation der endometrialen Zytokinexpression in vitro durch ein breites Spektrum verschiedener Mediatoren im Seminalplasma beeinflusst wird (Gutsche et al, 2004). Die Regulation der epithelialen Zytokinproduktion durch Seminalplasma wurde bei Mäusen und Kaninchen beobachtet. Tremellen et al. beschrieben die Stimulation von epithelialem GM- CSF durch Seminalplasma und rekombinantem TGF-ß. GM- CSF, welches in das Uteruslumen injiziiert wurde, zeigte eine dosisabhängige Akkumulation in endometrialen Makrophagen und Granulozyten (Tremellen et al, 1998; Robertson et al, 2000). Eine Entzündungsreaktion durch Seminalplasma wurde ebenfalls in Pferdeendometrium beobachtet (Trodesson et al. 2001). Als Beleg dafür, dass Seminalplasma eine Entzündungsreaktion hervorruft, fanden wir eine Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen wie IL- 1ß, IL- 6 und LIF in Epithelzellen durch humanes Seminalplasma. Das Zytokinspektrum war jedoch anders als das von Tremellen et al. beschriebene (Tremellen et al. 1998). Die Unterschiede sind vermutlich auf die verschiedenen Spezies und technische Unterschiede zurückzuführen. Robertson et al. nahmen an, das Seminalplasma die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch endometriale Epithelzellen im äußeren Zervikalkanal oder im Bereich der zervikalen Ektopie hervorruft und dadurch eine postkoitale Entzündungsreaktion induziert (Robertson et al. 2002). Die zervikalen Entzündungszellen könnten dann die lokale uterine Immunreaktion verändern, was direkten Einfluß auf die Blastozystenfunktion nimmt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Seminalplasma die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, aber auch anti- inflammatorischer Zytokine in den

endometrialen Epithelzellen in vitro stimuliert. Um die klinische Relevanz von Seminalplasma im Rahmen einer erfogreichen Implantation zu analysieren, sind weitere Studien wie vaginale und zervikale Applikation von Seminalplasma bei Patienten, die sich einer in- vitro- Fertilisation unterziehen, nötig.

5. Zusammenfassung

Seminalplasma spielt bei der menschlichen Fortpflanzung eine wichtige Rolle. Aufgrund seiner immunologischen Funktionen ermöglicht es einerseits das Überleben der Spermien im weiblichen Genitaltrakt und bereitet andererseits das Endometrium auf die Implantation des Embryos vor (Roberston et al, 2003). Außerdem beeinflussen Zytokine die Spermienmotilität (Hill et al, 1987; Eisermann et al, 1989; Dousset et al, 1997) und reduzieren u. a. die Fähigkeit der Spermien die Oozyte zu penetrieren (Buch et al, 1994; Rajaserkaran et al, 1995). Auch während des Implantationsvorgangs der Blastozyste üben Zytokine aus dem Seminalplasma einen Einfluss aus (Robertson et al, 2003). Bereits vor der Konzeption tritt neben den Spermien das Seminalplasma, und damit auch die darin enthaltenen Zytokine in direkten Kontakt mit der endometrialen Oberfläche (Robertson et al, 2003; Kunz et al, 1997). Auch im Zusammenhang mit der männlichen Infertilität werden Zytokine gefunden (Gruschwitz et al, 1996). In einer Studie von Dousset et al wurde ein Anstieg für IL- 1ß in einer Gruppe, z.T. aufgrund von Infektionen infertiler Patienten beobachtet (Dousset et al, 1997). Leukozyten und erhöhte Konzentrationen von IL-1ß und IL-6 finden sich vor allem bei Patienten mit urogenitalen Infektionen (Gruschwitz et al, 1996)

.

In dieser Studie wurde die Wirkung von Seminalplasma auf das Endometrium zwischen dem 14. und 21. Zyklustag, dem sog. Implantations- oder Nidationsfenster, geprüft. Es wurden drei verschiedene Seminalplasmagruppen verwendet. Mit normalem Seminalplasma, Seminalplasma mit erhöhter Leukozytenzahl und antispermienantikörperhaltigem Seminalplasma in jeweils 10%iger Konzentration wurden die endometrialen Zellen stimuliert. Die Reaktion der Zellen wurde an der Konzentration der von den Zellen produzierten mRNA von Interleukin (IL-) 1ß, IL- 6, IL- 10, LIF (Leukemia Inhibitory Faktor) und TGF- ß1 (Transforming Growth Faktor) gemessen. Als Nachweis für die Syntheseleistung der Zellen fand sich bereits ohne Stimulation ein Anstieg der Zytokinkonzentration sowohl im Zellkulturüberstand als auch eine Zunahme der mRNA in den epithelialen Endometriumzellen nach 3 und 24 Stunden. Nach Stimulation mit Seminalplasma konnten zum Teil signifikant höhere Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand und mRNA- Konzentrationen in den Epithelzellen nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den verschiedenen

Seminalplasmagruppen wurden jedoch nicht festgestellt. Die Synthese der nachgewiesenen Zytokine wird also durch Seminalplasma stimuliert. Hierdurch findet eine Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation der Blastozyste statt (Robertson et al, 2003). In den verschiedenen Seminalplasmagruppen fanden sich unterschiedliche Konzentrationen für die Zytokine TGF- ß1, IL- 1ß, IL- 6 und IL- 10. Für die proinflammatorischen Zytokine IL- 1ß und IL- 6 fanden sich erhöhte Konzentrationen im Seminalplasma mit erhöhter Leukozytenzahl bzw mit Antispermien Antikörpern, die anti- inflammatorischen Zytokine IL- 10 und TGF- ß1 waren hier im Vergleich zum normalen Seminalplasma in niedrigeren Konzentrationen vorhanden.

Zusammenfassend haben die verschiedlichen Seminalplasmata keine Unterschiede in der Zytokinproduktion der endometrialen Epithelzellen gezeigt. Jedoch wird grundsätzlich die Syntheseleistung der Epithelzellen durch Stimulation mit Seminalplasma stimuliert, was wohl im Sinne einer Vorbereitung des Endometriums auf die Nidation der Blastozyste zu verstehen ist.

6. Literaturverzeichnis

Abbas A. K. (Hrsg), Lichtman A. H., Pober J. S.
Immunologie übersetzt von Stadler B. M., Hess M.
Verlag Hans Huber, 1996

Aitken R. John, Baker H. W. Gordon
Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans?
Hum Reprod 1995, Vol. 10, No. 7, 1736-1739,

Aitken T. J., Buckingham D. W., Brindle J., Gomez E., Baker H. W. G., Irvine D. S.,
Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leucocytes in washed sperm preparations and seminal plasma
Hum Reprod 1995, 10 in press

Arici, A, Seli, E., Senturk, L.M., Gutierrez, L.S., Oral, E. and Taylor, HS. Interleukin-8 in the human endometrium.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998, 83, 1783–1787

Arnold L. L., Doherty T. M., Flor A. W., Simon J. a., Chou J. Y., Chan W. Y., Mansfiels B. C.,
Pregnancy- specific glycoprotein gene expression in recurrent aborters: a potentioa correlation to interleukin- 10 expression
Am J Reprod Immun 1999, 41(3), 174-182

Bandoh R., Yamano S., Kamada M., Daitoh T., Aono T.,
Effect of Sperm immobilizing antibodies on the acrosome reaction of human spermatozoa
Fertil Steril 1992, 57 (2); 387- 392

Bellinge, B.S., Copeland, C.M., Thomas, T.D., Mazzucchelli, R.E., O'Neil, G. and Cohen, M.J.
The influence of patient insemination on the implantation rate in an *in vitro*

fertilization and embryo transfer program.
Fertil. Steril. 1986, 46, 252–256

Buch J. P., Kolon T. F., Maulik N. et al.
Cytokines stimulate lipid membrane peroxidation of human sperm
Fertil Steril1994, 62; 186- 188

Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M., Fenwick, P. and Smith, S.K.
Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time.
J. Reprod. Fertil.1994, 101, 421–426

Comhaire F. H., Mahmoud A. M. A., Depuydt C. E. et al.,
Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist´s viewpoint
Hum Reprod Update 1999, 5; 393- 398

Comhaire F., Bosmans E., Ombelet W., Punjabi U., Schoonjans F.,
Cytokines in semen of normal men and of patients with andriological diseases
Am J Reprod Immun 1994, 31; 99- 103

Cork B. A., Tuckerman E. M., Li T. C., Laird S. M.
Expression of interleukin (IL)- 11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL- 11, IL- 6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro
Mol Hum Reprod 2002, 8 (9): 841- 848

Coulam C.B. and Stern J.J.
Effect of seminal plasma on implantation rats.
Early Pregnancy 1995, 1, 33–36.

De los Santos M. J., Anderson D. J., Racowsky C., Simón C., Hill J. A.
Expression of interleukin- 1 system genes in human gametes

Biol Reprod 1998, 59: 1419- 1424

De los Santos M. J., Mercader A., Francés A., Portolés E., Remohí J., Pellicer A., Simón C.
Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin- 1 system during embryonic development
Biol Reprod 1996, 54: 563- 574

De Waal Malefyt R., Moore KW. 1998. In Interleukin 10, ed. A. Thomson pp 333-64. San Diego, CA: Academic Press

Denison F. C., Grant V. E., Calder A. A., Kelly R. W.,
Seminal plasma components stimulate interleukin- 8 and interleukin- 10
Mol Hum Reprod 1999, 5 (3); 220-226

Deutsches IVF Register, Jahresbericht 2005

Dousset B., Hussenet F., Daudin M., Bujan L., Foliguet B., Nabet P.
Seminal cytokine concentrations (IL- 1ß, IL- 2, IL- 6, sR IL- 2, sR IL- 6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility
Hum Reprod 1997, Vol. 12, No. 7, 1476- 1479

Eggert- Kruse W., Boit R., Rohr G., Aufenanger J., Hund M., Strowitzki T.
Relationship of seminal plasma interleukin (IL) -8 and IL-6 with semen quality
Hum Reprod 2001, Vol. 16, No. 3, 517-528

Eggert- Kruse W., Neuer A., Clussmann C., Boit R., Geissler W., Rohr G., Strowitzki T.
Seminal antibodies to human 60 kd heat shock protein (HSP 60) in male partners of subfertile couples
Hum Reprod 2002, Vol. 17, No. 3, 726-735

Eisermann J., Register K. B., Strickler R. C., Ciollins J. L.,

The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro
J Androl 1989, 10; 270- 274

Francavilla F, Romano R, Sntucci R, Marrone V, Properzi G, Ruvolo G
Interference of antisperm antibodies with the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and its relationship with the inhibition of ZP binding
Fertil Steril 1997 jun 67 (6) 1128-33

Friebe K., Bohring C., Skrzypek J., Krause W.
Levels of interleukin- 6 and interleukin- 8 in seminal fluid of men attending an andrological clinic
Andrologia 2003, 35, 126- 129

Furuya Y, Akashi T, Fuse H.
Soluble Fas and interleukin-6 and interleukin-8 levels in seminal plasma of infertile men
Arch Androl 2003, Nov-Dec;49(6):449-52

Garrido N., Albert C., Krüssel J. S., O´Connor J. E., Remohí J., Simón C., Pellicern A.,
Expression, production and secretion of vascular endothelial growth factor and interleukin- 6 by granulosa cells is comparable in women with and without endometriosis
Fertil Steril 2001; 76 (3), 568- 575

Gemsa D., Kalden J. R., Resch K.,
gegründet von Vorlaender K.- O.
Kapitel 4; Zytokine von Flad H.- D., Gemsa D.
Immunologie; Grundlagen- Klinik- Praxis
Georg Thieme Verlag 1997, 45- 64

Godkin J. D., Doré J. J. E.
Transforming growth factor ß and the endometrium
Rev Reprod 1998, 3: 1-6

Goerke K., Valet A. (Hrsg), Bock K., Steller J., Zorr A.
Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe
Urban und Fischer 4. Auflage, April 2000

Gruschwitz M. S., Breznischek R., Breznischek H- P.
Cytokine Levels in the Seminalplasma of Infertile Males
J Androl 1996 March/April, Vol. 17, No.2

Gutsche S., von Wolff M., Strowitzki T., Thaler C.J.
Seminalplasma induces mRNA expression of IL- 1ß, IL- 6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro
Mol Hum Reprod 2003, 9, 785- 791

Gutsche, S., von Wolff, M., Strowitzki, T. et al.
Transforming growth factor-ß1 in seminal plasma might facilitate opening the window of implantation.
Hum. Reprod 2002, 17, 6

Hill J. A., Haimovici F., Politch J. A., Anderson D. J.,
Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters
Fertil Steril 1987, 47; 640-645

Hjort T.
Antisperm antibodies: Antispermantibodies and infertility: an unsolvable question?
Hum Reprod 1999 Oct, 14 (10) 2423-6

Horowitz G.M., Scott R.T. Jr, Drews M.R., Navot D. and Hofmann G.E.
Immunohistochemical localization of transforming growth factor-alpha in human endometrium, decidua and trophoblast.
J Clin Endocrinol Metab 1993, 76, 786–792

Huleihel M., Lunefeld E., Levy A. et al.
Distinct expression levels of cytokines and soluble cytokine receptors in seminal plasma of fertile and infertile men
Fertil Steril 1996, 66; 135- 139

Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T.
Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta.
Biol Reprod 1994 Apr;50(4):882-7

Kunz G., Beil D., Deininger H., Einspanier A., Mall G., Leyendecker G.
The uterine peristaltic pump. Normal and impeded sperm transport within the female genital tract
Adv Exp Med Biol 1997, 424: 267-277

Laird, S.M., Tuckerman, E., Li, T.C. and Bolton, A.E.
Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14.
Hum Reprod 1994, 9, 1339–1343

Laird, S.M., Tuckerman, E.M., Dalton, C.F., Dunphy, B.C., Li, T.C. and Zhang, X.
The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture.
Hum Reprod 1997, 12, 569–574

Lass A., Weiser W., Munafo A., Loumaye E.,
Leukemia inhibitory factor in human reproduction
Fertil Steril 2001 Dec., 76 (6); 1091- 1096

Leyendecker G., Kunz G., Wildt L., Beil D., Deininger H.
Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility
Hum Reprod 1996, 11, 1542- 1551

Lim, K.J.H., Odukoya, O.A., Ajjan, R.A., Li, T.C., Weetman, A.P. and Cooke, I.D.
The role of T-helper cytokines in human reproduction.
Fertil Steril 2000, 73, 136–142

Lindhard A.MD, Bentin- Ley U. MD, PhD, Ravn V. MD, DMSc, Islin H. MSc, PhD, Hviid T. MD, PhD, Rex S. MD, Bangsboll S. MD, Sorensen S. MD, DMSc
Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation
Fertil Steril 2002 August, Vol. 78, No. 2, 221-233

Lombardo F, Gandini L, Dondero F, Lenzi A,
Antisperm immunity is natural assisted reproduction
Hum. Reprod. Update 2001 Sept- Oct 7(5) 450-6, Review

Loras B., Vételé F., El Malki A., Rollet J., Soufrir J- C., Benahmed M.
Seminal transforming growth factor- ß in normal and infertile men
Hum Reprod 1999, Vol. 14, No. 6, 1534- 1539

Lucas C., Bald L. N., Fendly B. M., Mora- Morms M., Figari I. S., Patzer E., Palladino M.A.,
The autocrine production of transforming growth factor- ß1 during lymphocyte activation: a study with monoclonal antibody bassed ELISA.
J Immunol 1990; 145:1415- 1422

Maksheed M, Raghupathy R, Azizieh F, Farhat R, Hassan N, BandarA
Circulating cytokines and CD 30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortion
Hum Reprod 2000 Sept, 15 (9) 2011-7

Miller L. J., Fischer K. A., Goralnick S. D., Litt M., Burleson J. A., Albertsen P., Kreutzer D. Z.
Nerve growth factor and chronic prostatitis/ chronic pelvic pain syndrome
Urology 2002, 59(4), 603-608

Mule JJ., Schwarz S., Roberts A. B., Sporn M. B., Rosenberg S. A.,
Transforming growth factor- ß inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells.
Cancer Immunol Immunother 1988; 26:95-100

Nocera M., Chu M. T.,
Characterisation of Latent Transforming Growth Factor –ß From Human Seminal Plasma,
American Journal of Reproductive Immunology, 282-291, 1995

Nocera M., Chu M. T.,
Transforming growth factor ß as an immunosupressive protein in human seminal plasma
Am J Reprod Immunol 1993, 30; 1-8

Ochsenkühn R., Nieschlag E.,
Therapeutische Möglichkeiten bei Infertilität des Mannes
Münch Med Wschr 1998, 140: 628- 633

Ochsenkühn R., O´Connor A.E., Hirst J., Baker H.G., de Kretser D.M., Hedger M.P.
Examination of the relationship between immunosuppressive activity and immunoregulatory cytokines in seminal plasma: effects of sperm autoimmunity and seminal leukocytes.
J Reprod Immunol 2006, 71, 57-74

Papadimas J, Goulis DG, Sotiriades A, Daniilidis M, Fleva A, Bontis JN, Tourkantonis A.
Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in normal/infertile men.
Arch Androl. 2002 Mar-Apr;48(2):107-13

Pfleiderer A. (Hrsg), Breckwoldt M (Hrsg), Martius G. (Hrsg) et al.,
Gynäkologie und Geburtshilfe- sicher durch Studium und Praxis

Thieme Verlag, 4. korrigierte Auflage 2001

Rajasekaran M., Hellstrom W. J. G., Naz R. K., Sikka S. C.,
Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia
Fertil Steril 1995, 64; 166- 171

Robertson S. A.
Control of the immunological environment of the uterus
Rev Reprod 2000, 5, 164-174

Robertson S. A., Bromfield J. J., Tremellen K. P.,
Seminal „priming“ for protection from pre- eclampsia- a unifying hypothesis
J Reprod Immunol 2003, 59, 235- 265

Robertson S. A., Ingman W. V., O´Leary S., Sharkey D. J., Tremellen K. P.,
Transforming growth factor beta- a mediator of immune deviation in seminal plasma
J Reprod Immunol 2002 Oct- Nov, 57 (1-2); 109-128

Robertson S. A., Mau V. J., Tremellen K. P., Seamark R. F.
Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice
J Reprod Fertil 1996, 107, 265-277

Robertson S. A., O´Connell A. C., Hudson S. N., Seamark R. F.
Granulocyte- macrophage colony- stimulating factor (GM- CSF) targets myeloid leukocytes in the uterus during the post- mating inflammatory response in mice
J Reprod Immunol 2000, 46, 131- 154

Robertson S. A., Redman C. W., McCracken S. A., Hunt J. S., Dimitriadis E., Moffett- King A., Chamley L.
Immune modulators of implantation and placental development- A workshop report
Placenta 24 Supplement A 2003, Trophoblast Research, Vol. 17, 16-20

Robertson S. A., Seamark R. F.
Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor (GM- CSF): One of a Family of Epithelial Cell- derived Cytokines in the Preimplantation Uterus
Reprod Fertil 1992 Dez., 4, 435- 448

Robertson S. A., Sharkey D. J.
The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy
Immunology 2001, Vol. 13, 243- 254

Roitt I.,
„The Production Of Effectors“
Essential Immunology 9th Edition, Chapter 10 179-200, 1997

Sachdeva G, Patil V, Katham RR, Manjramkar DD, Kholkute SD, Puri CP
Expression profiles of leukemia inhibitory factor, transforming growth factor beta 2 (TGF- beta 2) and TGF- beta 2 receptor in infertlie bonnet monkeys
Biol Reprod 2001 Jul. 65 (1) 1-8

Salamonsen L. A., Dimitriadis E., Robb L.
Cytokines in implantation
Semin Reprod Med, 18: 299-310, 2000

Simón C., Frances A., Piquette G. N., el Danasouri I., Zurawski G., Dang W., Polan M. L.
Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin 1 receptor antagonist
Endocrinol 1994, 234 (2). 521- 528

Simón, C., Piquette,G.N., Frances, A. and Polan, M.L.
Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle.
J Clin Endocrinol Metab 1993, 77, 549–555

Simpson J. L.

Pregnancy and the timing of intercourse
N Engl J Med 1995, 333 (25), 1563- 1565

Srivastava MD, Lippes J, Srivastava BI
Cytokines of the human reproductive tract
Am J Reprod Immunol 1996 Sept, 36: 157-166

Sterzl I., Hampl R., Hill M., Hrdá P., Matucha P.
Immunomodulatory cytokines in human seminal plasma correlate with immunomodulatory steroids
Steroids 2003, 68, 725- 731

Stewart C. L., Kaspar P., Brunet L. J., Bhatt H., Gadi I., Kontgen F., Abbondanzo S. J.,
Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor
Nature 1992, 359: 76- 79

Su H. C., Leite- Morris K. A., Braun L., Biron C. A.,
A role of transforming growth factor- ß1 in regulating natural killer cells and T lymphocyte proliferative responses during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus.
J Immunol 1991; 147:2717-2727

Tabibzadeh, S., Santhanam, U., Sehgal, B. and May, L.T.
Cytokine-induced production of IFN-ß/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells.
J. Immunol. 1989, 142, 3134–3139

Thaler C. J.
Immunological role for seminal plasma in insemination and pregnancy
Am. J. Rprod. Immunol. 1989 Nov- Dez; 21(3-4):147-50

Thaler C. J., McIntyre J. A., Faulk W. P.

Immunogenic studies of soluble Fc receptor (CD16) antigens in human seminal plasma
Tissue Antigens, 1991 March; 37(3):121-6

Tomlinson M. J., Barratt C. L. R., Cooke I. D.,
Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests that they are not a cause of male infertility
Fertil Steril 1993; 60: 1069- 1075

Torry, D.S., Holt, V.J., Keenan, J.A., Harris, G., Caudle, M.R.and Torry, R.J
Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium.
Fertil Steril 1996, 66, 72–80

Tremellen K. P., Seamark R. F., Robertson S. A.
Seminal transforming growth factor ß1 Stimulates granulocyte- macrophage colony- stsimulating factor production and inflammatory cell reccruitment in the murine uterus.
Biol Reprod 1998, 58: 1217- 1225

Troedsson M. H. T., Loset K., Alghamdi A. M., Dahms B., Crabo B. G.
Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen
An Reprod Sci 2001, 68, 273- 278

Urry R. L., Heaton J. B., Moore M. et al.
A fifteen- year study of alterations in semen quality occuring after vasectomy reversal
Fertil Steril 1990; 53 (2): 341- 345

Vandermolen, D.T. and Gu, Y.
Human endometrial expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and its receptor, stimulation of endometrial G-CSF production by interleukin-1 beta and G-CSF inhibition of choriocarcinoma cell proliferation.
Am J Reprod Immunol 1996, 36, 278–284

Viganò P., Somigliana E., Mangioni S., Vignali M., Vignali M., Di Blasio A. M.
Expression of interluekin 10 and ist receptor is up- regulated in early pregnant versus cycling human endometrium
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87 (12):5730- 5736

von Wolff M., Gutsche S., Strowitzki T., Thaler C. J.
Increased endometrial expression of pro- inflammatory cytokines by seminal plasma: priming for implantation
Poster für ESHRE- meeting 2001

von Wolff M., Stieger S., Lumpp K., Bucking J., Strowitzki T., Thaler C. J.,
Endometrial interleukin- 6 in vitro is not regulated directly by female steroid hormones but by proinflammatory cytokines and hypoxia
Mol Hum Reprod 2002; 8 (12), 1096-1102

von Wolff M., Thaler C. J., Strowitzki T., Broome J., Tabibzadeh S.
Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion
Mol Hum Reprod 2000, 6: 627-634

Waller D. K., Sweeney A. M., Strickler R. C., HilgersnT. W., Mishell D. R., Wilcox A. J., Weinberg C. R., Baird D. D., Simpson J. L.
Pregnancy and the timing of intercourse
N Engl J Med 1996, 334, 1266- 1268

Wincek T. J., Meyer T. K., Meyer M. R., Kuehl T. J.,
Absence of a direct effect of recombinant tumor necrosis factor- α on human sperm function and murine preimplantation development
Fertil Steril 1991; 2: 765- 769

Yanushpolski E. H., Politch J. A., Hill J. A., Anderson D. J.
Antibiotic therapy and leucocytospermia a prospective randomized controlled study

Fertil Steril 1995; 63: 142- 147

Zhao Y. and Chegini, N.
The expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and receptors in human endometrium.
Am. J Reprod Immunol 1999, 42, 303–311

7. Abkürzungsliste

LIF	Leukämieinhibierender Faktor. Leukemia inhibitory factor
TGF	Transforming growth factor
IL	Interleukin
SP	Seminalplasma
ASA	Antispermien Antikörper
TNF	Tumornekrose Faktor
PGE	Prostaglandin E
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
IVF	In vitro Fertilisation
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
LH	Luteinisierendes Hormon
ß HCG	ß humanes Choriongonadotropin
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
KDa	Kilo Dalton
Th	T- Helferzellen
uNK	Uterine Natürliche Killerzellen
FCS	Fetales Kälberserum
Hepes	Hemi- Sodium- Salt
PBS	Phosphate buffered saline
HAMS Medium	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium Nutrient Mixture HAM
Upm	Umdrehungen pro Minute
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay

8. Danksagung

Herrn Dr. med. R. Ochsenkühn danke ich für die Unterstützung und Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. C.J. Thaler danke ich für die Überlassung des Themas.

Den Abteilungen für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Universitätsklinik Großhadern, des Krankenhauses Dritter Orden München, des Krankenhauses Harlaching und des Kreiskrankenhauses Erding danke ich für die Zusammenarbeit

Des weiteren danke ich den MTA des Forschungslabors der Frauenklinik Großhadern.

Herrn Jack Artman danke ich für die Unterstützung und die Hilfe bei computertechnischen Problemen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Artman
Vornamen:	Eva Maria
Geburtsname:	Bauer
Geburtsdatum und – ort:	19.10.1976 in Altenerding
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Schulbildung

09/ 1983- 08/ 1987	Grundschule Dorfen
09/ 1987- 08/ 1996	Gymnasium Dorfen
06/1996	Abitur

Studium

05/1998- 03/2000	vorklinischer Studienabschnitt, LMU- München
03/ 2000	ärztliche Vorprüfung
ab 04/2000	klinischer Studienabschnitt, TU- München
03/ 2001	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/ 2003	zweiter Abschnitt der ärzlichen Prüfung
04/2004	dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktika

07/ 1996- 12/ 1996	Volontariat im Kinderheim „Hogar Sagrado Corazon“ in Montero, Bolivien
02/ 1997- 04/ 1997	Arbeit im Wohn- und Pflegeheim der Barmherzigen Brüder in Algasing
05/ 1997- 07/ 1997	Pflegepraktikum im Krankenhaus für Naturheilweisen in München Harlaching
08/ 1997- 04/ 1998	Freiwilliges Soziales Jahr im städtischen Krankenhaus München Schwabing- Dermatologie

Famulaturen

08/ 2000- 09/ 2000	Infectious Diseases, Harbor UCLA Medical Center, Los Angeles, USA
09/ 2000- 10/ 2000	Unfallchirurgie, Kreiskrankenhaus Erding
04/ 2001- 05/ 2001	Allgemeinchirurgie, Kreiskrankenhaus Erding
08/ 2001- 09/ 2001	Medicina general y Medicina familiar, Centro de Salud- Hospital, Independencia, Bolivia
02/ 2002- 03/ 2002	Gynäkologie und Geburtshilfe,

Kreiskrankenhaus Erding

Praktisches Jahr

04/ 2003 –03/ 2004

1. Tertial Innere Medizin im KKH Alt-/ Neuötting

2 .Tertial Gynäkologie im Frauenspital Fontana in Chur, Schweiz

3. Tertial Chirurgie im der TU- München Rechts der Isar

Beruf

05/2004- 10/2004 ÄiP in der II. medizinischen Klinik am Klinikum Landshut

seit 10/2005 Assistenzärztin in der II. medizinischen Klinik am Klinikum Landshut

seit 06/2002 Doktorarbeit im Forschungslabor der Frauenklinik der Universitätsklinik der LMU München am Klinikum Großhadern