

Isabelle Dorothée Kiefer

Dr. med.

## **Die klinische Bedeutung von TNF- $\alpha$ und IL- 1 $\beta$ im Seminalplasma und CRP im Serum subfertiler Männer**

Geboren am 13. 04. 1978 in Baden-Baden

Staatsexamen am 12. 11. 2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Gynäkologie

Doktormutter: Frau Prof. Dr. med. W. Eggert-Kruse

Subklinische Entzündungen des männlichen Genitaltrakts sind schwer diagnostizierbar und ihre klinische Bedeutung unklar. Ihr Einfluss auf das Immunsystem und auf die Fertilität wird in der Literatur diskutiert. Der Wert von Bakterienkulturen aus dem Ejakulat subfertiler Männer ohne Anzeichen einer genitalen Infektion ist umstritten. Als etablierter Parameter zum Nachweis von Genitalentzündungen des Mannes gilt eine erhöhte Leukozytenzahl im Ejakulat. Allerdings ist ein vermehrtes Vorkommen von Leukozyten nicht immer als pathologisch zu werten. Es kann auch nur Ausdruck unspezifischer immunologischer Aktivität sein. Die klinisch relevanten Grenzwerte sind umstritten und die Bestimmung mittels immunzytochemischer Methoden ist aufwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei potentielle Entzündungsmarker auf ihre klinische Bedeutung für die Fertilitätsdiagnostik subfertiler Männer untersucht: Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) und Interleukin- 1 $\beta$  (IL- 1  $\beta$ ) im Seminalplasma und das C-reaktive Protein (CRP) im Serum. Es sollte geprüft werden, ob die untersuchten Parameter in Zusammenhang zu einer geminderten Spermienqualität - ermittelt durch ein Spermogramm gemäß WHO-Kriterien - stehen oder, ob es Assoziationen zur Spermienfunktion gibt. Die Spermienfunktion wurde in vivo mittels des Postkoitaltest (PCT) und in vitro durch den Spermien-Cervical-Mucus-Penetrationstest (SCMPT) ermittelt. Der SCMPT wurde mit Zervikalmucus (CM) und Sperma der zu untersuchenden Partner durchgeführt und auch in gekreuzten Ansätzen mit Donor-Sperma bzw. Donorinnen-Mucus. Ausserdem sollte untersucht werden, wie sich die Konzentrationen der drei Entzündungsmarker in Bezug zu dem mit immunzytochemischen Methoden bestimmten Leukozytenanteil im Ejakulat als klassischem Parameter genitaler Infekte verhalten, wie auch zum Vorkommen lokaler Antispermatozoenantikörper (ASA) der Klassen IgG und IgA im Mixed- Antiglobulin- Reaction- Test (MAR)- Test.

In dieser prospektiven Studie wurden insgesamt 276 Paare mit einem im Median drei Jahren andauernden unerfüllten Kinderwunsch untersucht. Die Fertilitätsdiagnostik beinhaltete neben den oben genannten Messungen ein breites mikrobiologisches Screening, eine umfassende Anamnese und die klinische Untersuchung beider Partner. Die Schwangerschaftsrate bis sechs Monate nach Abschluss der Studie wurde mit einbezogen. Die Befunde dieser umfangreichen Diagnostik wurden auf Zusammenhänge zu TNF-  $\alpha$ , IL- 1  $\beta$  und CRP untersucht. Die Konzentrationen von TNF-  $\alpha$  und IL- 1  $\beta$  im Seminalplasma wurden mittels ELISA-Kit bestimmt. Für die Messung von CRP im Serum wurde ein kommerzielles Testkit zur Immunnephelometrie angewandt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Chi-Quadrat- Tests bzw. des zweiseitigen Fisher's Exact- Test, des Wilcoxon-Tests sowie mit dem Spearman- Rank- Tests.

Der Median der TNF-  $\alpha$ -Konzentrationen lag in den untersuchten Seminalplasma-Proben bei 18,7 pg/ml (Range: 0,1pg/ml - 144,4 pg/ml). Die Untersuchung der Spermienqualität ergab, dass bei 5,8% der Patienten eine Oligozoospermie (< 20 Mio/ml) vorlag. Eine reduzierte Motilität (Asthenozoospermie: < 20% progressiv motile Spermatozoen) war bei 21,9% der untersuchten Männer festzustellen. Die Spermienqualitätskriterien des Spermioграмms sowie die klinischen Parameter und die anamnestische Untersuchungsbefunde standen in keinem deutlichen Zusammenhang zu TNF-  $\alpha$ . Eine Leukozytospermie fand sich bei 6,3% der Ejakulate. Ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration von TNF-  $\alpha$  und dem Vorkommen von Leukozyten im Ejakulat sowie eine signifikante Korrelation zum prozentualen Leukozytenanteil ( $r_s = 0,21$ ;  $p < 0,03$ ) war festzustellen. Bezüglich der Spermienfunktion zeigte der PCT negative Ergebnisse bei 17,4% und deutlich eingeschränkte Ergebnisse bei weiteren 17,4% der Paare. Der SCMPPT fiel bei 61,2% der Testansätze (CM der Frauen/ Sperma ihrer Partner) adäquat aus. Die funktionelle Spermienqualität zeigte in der Testung in vivo wie auch in der Testung in vitro keine Assoziation zur TNF-  $\alpha$ -Konzentration. Im IgG- MAR- Test waren 13,1% der Spermaproben positiv (MAR  $\geq 30\%$ ). Es konnte klar gezeigt werden, dass kein signifikanter Bezug zwischen TNF-  $\alpha$  und dem Nachweis lokaler Antispermatozoenantikörper bestand. Die Schwangerschaftsrate der Paare stand in dieser prospektiven Studie ebenfalls nicht in Zusammenhang zu TNF-  $\alpha$ .

Die Konzentrationen von IL- 1 $\beta$  lag im Median bei 37,8 pg/ml (Range: 3pg/ml - 361,7 pg/ml). Es zeigte sich eine Korrelation zu TNF-  $\alpha$  ( $p < 0,0001$ ). IL- 1 $\beta$  korrelierte signifikant mit den Leukozyten im Ejakulat. Dies zeigte sich bezüglich der prozentualen Leukozytenratio ( $r_s = 0,36$ ;  $p = 0,0002$ ), der Leukozytenkonzentration pro Milliliter ( $r_s = 0,34$ ;  $p < 0,001$ ) wie auch in Bezug zur absoluten Leukozytenzahl im Ejakulat ( $r_s = 0,34$ ;  $p < 0,001$ ). Eine beeinträchtigte Spermienqualität oder Funktion war nicht in Bezug zu erhöhten Interleukinkonzentrationen zu sehen. IL- 1 $\beta$  stand in keinem Zusammenhang zu den Ergebnissen der mikrobiologischen Diagnostik. Das Vorkommen lokaler ASA und die Rate eingetretener Schwangerschaften hingen nicht mit der IL- 1 $\beta$ -Konzentration im Seminalplasma zusammen.

Das C- reaktive Protein (CRP) wurde im Serum bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen ergaben einen Median von 1 mg/l (Range: 0,2 mg/l - 33,3 mg/l). Es bestanden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen CRP und den Leukozyten im Ejakulat – weder zu ihrem absoluten Vorkommen im Ejakulat noch zu ihrem prozentualen Anteil. Die Spermienqualität oder die Spermienfunktion waren bei erhöhten CRP-Werten nicht beeinträchtigt. Andere Zusammenhänge zu klinischen Parametern oder anamnestischen Untersuchungsbefunden stellten sich nicht deutlich dar. Allerdings ging die Keimbesiedlung im Zervixbereich der Frauen überzufällig häufig mit erhöhten CRP- Spiegeln im Serum ihrer Männer einher. Dies zeigte sich bezüglich potentiell pathogener aerober Keime ( $p = 0,02$ ) insbesondere *E-coli* ( $p = 0,04$ ) und potentiell pathogener anaerober Keime ( $p < 0,01$ ) wie auch in Bezug zu erhöhten vaginalen pH- Werten der Partnerinnen, ohne dass sich dieser Zusammenhang als signifikant erwies.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen insbesondere einen Zusammenhang der beiden im Seminalplasma gemessenen Zytokine TNF-  $\alpha$  und IL- 1 $\beta$  zu den Leukozyten im Sperma. Signifikante Assoziationen der Zytokinkonzentrationen zur Spermaqualität waren nicht zu erkennen, wobei sich diese Feststellung auf Untersuchungen an Patienten ohne klinische Anzeichen einer genitalen Infektion bezieht. Wie sich diese Verhältnisse an klinisch symptomatischen Patienten darstellt, müsste in zukünftigen Studien geklärt werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Messung von TNF-  $\alpha$  und IL- 1 $\beta$  an asymptomatischen Patienten Informationen über entzündliche Vorgänge im männlichen

Genitaltrakt gibt und als Marker zur Diagnostik subklinischer Genitalinfekte sinnvoll sein kann.

Für die Bestimmung von CRP im Serum konnten keine Zusammenhänge zur Leukozytenkonzentration im Sperma festgestellt werden, wie auch keine signifikanten Zusammenhänge zur mikrobiellen Besiedlung im Genitaltrakt der Männer erkennbar waren. Deshalb ist CRP im Serum nicht als Routineparameter zur Diagnostik subklinischer Infekte geeignet. Der CRP-Wert der Männer war signifikant höher, wenn potentiell pathogene Keime im Genitaltrakt ihrer ebenfalls asymptomatischen Partnerinnen nachweisbar waren. Dieser Assoziation sollte weiteres Interesse gelten.