

Ruxandra Boit-Trapcea (geb. Rusu)

Dr. med.

## **Proinflammatorische Cytokine im Seminalplasma: Bedeutung und Rolle in der Diagnostik subklinischer Entzündungen des männlichen Genitaltrakts.**

Geboren am: 12.11.1972 in Temeschburg, Rumänien

Reifeprüfung am: 19.06.1992

Studiengang der Fachrichtung Medizin: WS 92/93 – WS 99/2000

Physikum am: 29.03.1995

Klinisches Studium in: Heidelberg

Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Heidelberg

Staatsexamen am: 24.11.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Frauenheilkunde

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

Subklinische Entzündungen des männlichen Genitaltrakts sind schwer diagnostizierbar und ihre klinische Relevanz ist unklar. Eine mögliche Stimulation des Immunsystems durch subklinische Infektionen des Urogenitaltrakts wird in der Literatur diskutiert. Eine erhöhte Leukozytenanzahl im Sperma gilt als etablierter Parameter zum Nachweis von Entzündungen im Genitaltrakt des Mannes, der Wert der Bakterienkulturen aus dem Ejakulat subfertiler Männer ohne klinische Anzeichen einer genitalen Infektion ist umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier potentielle Entzündungsmarker (Interleukin 8, Interleukin 6, Komplementfaktor C<sub>3</sub>, IgA Antikörper gegen das humane 60 kDa heat shock protein) auf ihre klinische Bedeutung untersucht. Dazu wurden in dieser prospektiven Studie 146 hinsichtlich Genitalentzündungen asymptomatische Paare mit einem unerfüllten Kinderwunsch von im Median 4 Jahren unter Einbeziehung einer Vielfalt von andrologischen und gynäkologischen Parametern untersucht. Diese umfassten Spermogramm, Postcoitaltest (PCT), Spermien-cervicalmucuspentrationstest (SCMPT), Spermienmigrationstest, mikrobiologische Diagnostik bei Mann und Frau, Nachweis von Leukozyten im Ejakulat, lokale Antispermatozoenantikörper sowie spätere Fertilität. Lokale Antispermatozoenantikörper (ASA) wurden mit Hilfe der Mixed-Antiglobulin-Reaktion in solche der Klassen IgG und IgA differenziert.

Die Leukozyten im Ejakulat wurden mittels einer spezifischen immunocytochemischen Färbung nachgewiesen, dadurch war eine gute Differenzierung zwischen Spermienvorstufen und Leukozyten möglich. Eine Leukozytospermie ( $>1 \times 10^6/\text{ml}$ ) war in 5,5% der Ejakulatproben zu finden, ein erhöhter prozentualer Leukozytenanteil ( $>15\%$ ) an den Rundzellen konnte in 22,6% der Fälle nachgewiesen werden.

Das mikrobiologische Screening ergab Bakterien (potentiell pathogene Spezies und Keime der physiologischen Flora) bei der Hälfte der Spermaproben, *Chlamydia trachomatis* (Nachweis mit dem Amplifikationsassayverfahren im Sperma und Urin) sehr selten ( $<1\%$ ).

Das Interleukin 8 (IL-8) wurde mit einem ELISA Kit bestimmt, der Median der Konzentrationen lag in den untersuchten Seminalplasmaproben bei 1257 pg/ml (Range: 251-7854 pg/ml). In 25,6 % der Fälle lagen IL-8 Konzentrationen von  $\geq 2000$  pg/ml vor. Signifikante Beziehungen zwischen IL-8 und einer Leukozytospermie wurden festgestellt ( $r_s = 0,56$ ;  $p < 0,0001$ ), es bestand zusätzlich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der Leukozyten an den Rundzellen im Ejakulat (Leukozytenratio) und IL-8 ( $r_s = 0,51$ ;  $p < 0,0001$ ). Erhöhte IL-8 Werte gingen überzufällig häufiger mit einer eingeschränkten Spermienmotilität ( $<20\%$ ) einher ( $p < 0,03$ ). Die funktionelle Spermienqualität (SCMPT, PCT, Spermienmigrationstest) wurde durch IL-8 nicht negativ beeinflusst. Es gab keine Zusammenhänge zwischen mikrobieller Besiedlung des Ejakulates und IL-8. IL-8 konnte auch die Bildung lokaler ASA nicht beeinflussen. Die andrologischen Untersuchungsbefunde standen ebenfalls in keiner Beziehung zu den IL-8 Ergebnissen.

Das Interleukin 6 (IL-6) wurde auch mit einem ELISA Kit bestimmt, der Median der Konzentrationen im Seminalplasma lag bei 15 pg/ml (Range: 3,3 pg/ml-520 pg/ml). In 27% der Fälle lagen IL-6 Konzentrationen von  $\geq 30$  pg/ml vor. Leukozytenratio ( $r_s = 0,56$ ;  $p < 0,0001$ ) und Leukozytenanzahlen ( $r_s = 0,65$ ;  $p < 0,0001$ ) pro ml Ejakulat korrelierten signifikant mit den Interleukin 6 Konzentrationen. IL-6 und IL-8 korrelierten deutlich miteinander ( $r_s = 0,81$ ;  $p < 0,0001$ ). Es bestand kein Zusammenhang zwischen IL-6 mit den Spermiogrammbefunden, mit dem PCT oder dem SCMPT, mit der mikrobiellen Besiedlung des Ejakulates oder mit dem Vorkommen lokaler ASA. Erhöhte IL-6 Konzentrationen waren signifikant häufiger bei reduzierten Spermienmigrationstestergebnissen anzutreffen ( $p < 0,03$ ).

Der Komplementfaktor  $C_3$  konnte in 37,7% der Fälle im Seminalplasma mit der Methode der radialen Immunodiffusion nachgewiesen werden, in 25,4% der Proben wurde eine  $C_3$  Konzentration von mehr als 0,01 g/l gemessen und in 14,8% der Proben eine Konzentration von mehr als 0,02 g/l. Es bestanden signifikante Zusammenhänge zwischen  $C_3$ , Leukozytenanzahl im Ejakulat ( $p < 0,02$ ) und Leukozytenratio ( $p < 0,002$ ). Die proinflammatorischen Cytokine IL-8

( $p < 0,001$ ) und IL-6 ( $p < 0,002$ ) korrelierten deutlich mit dem Komplementfaktor C<sub>3</sub>. Es ergaben sich keine Zusammenhänge zwischen C<sub>3</sub> mit der Spermienqualität, den Spermienfunktionstesten oder einer späteren Fertilität. Es waren ebenfalls keine Zusammenhänge zwischen C<sub>3</sub>, mikrobiellem Screening im Ejakulat oder lokaler ASA erkennbar.

7% der Patienten hatten im Seminalplasma mit der ELISA Methode IgA Antikörper gegen das humane 60 kDa heat shock Protein (HSP60-IgA AK ‚positiv‘). HSP60-IgA AK korrelierten mit der Leukozytenanzahl pro ml Ejakulat ( $p < 0,01$ ), aber nicht mit der Leukozytenratio. Signifikante Korrelationen wurden zwischen HSP60-IgA AK mit IL-8 ( $p < 0,03$ ), IL-6 ( $p < 0,02$ ) und C<sub>3</sub> ( $p < 0,05$ ) erzielt. Zusammenhänge mit den Spermioigrammparametern, der funktionellen Spermienqualität (SCMPT, PCT und Spermienmigrationstest) und der Fertilität, sowie mit der Bildung lokaler Antispermatozoenantikörper und mikrobiologischer Besiedlung des Ejakulates wurden ausgeschlossen.

Die in dieser Arbeit festgestellten signifikanten Zusammenhänge zwischen proinflammatorischen Cytokinen und den Leukozyten im Ejakulat, als ‚klassische‘ Entzündungsmarker, sprechen dafür, den Nachweis von IL-8 und IL-6 als Screening zur Diagnostik subklinischer Entzündungen des männlichen Genitaltrakts einzusetzen. Die Bestimmung der Interleukine, insbesondere von IL-8, zeigte sich hier als klinisch wichtiger als der Nachweis von C<sub>3</sub> oder von HSP60-IgA AK. Durch Bestimmung dieser Interleukine im Seminalplasma ließen sich möglicherweise jene Patienten selektionieren, welche von einer ausgedehnten mikrobiologischen Diagnostik Vorteile haben könnten. Dadurch könnten wichtige Informationen im Hinblick auf die Samenqualität (bei Bestimmung von IL-8) und auf Entzündungsursachen des Genitaltrakts bei asymptomatischen Patienten, gewonnen werden. Obwohl zukünftige Studien nötig sein werden um die spezifischen Mechanismen und ihre Bedeutung für das Fertilisationspotential der Spermatozoen unter in-vivo und in-vitro Bedingungen der Konzeption zu etablieren, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Interleukinkonzentrationen im Seminalplasma als relevante Marker für subklinische Entzündungen / Infektionen des männlichen Genitaltrakts erscheinen.

