

Cordula Beck  
Dr. med.

## **Die klinische Bedeutung einiger Zytokine im Seminalplasma sowie deren Einfluss auf die In-vitro-Interaktion zwischen menschlichen Spermien und Cervikalmukus – Eine klinisch-experimentelle Studie**

Geboren am 23.09.1969

Reifeprüfung am 19.05.1989

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1990 bis WS 1997

Physikum am 07.09.1992

Klinisches Studium an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Praktisches Jahr im Evangelischen Krankenhaus Bad Godesberg (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)

Staatsexamen am 24.11.1997 an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Promotionsfach: Frauenheilkunde

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

Subklinische Infektionen des männlichen Genitaltraktes sind nicht einfach zu diagnostizieren, so dass die Untersuchung weiterer klinisch relevanter Entzündungsparameter, neben etablierten Markern wie einer erhöhten Leukozytenzahl im Ejakulat, eine wichtige Rolle zukommt. Die Bedeutung einer mikrobiellen Besiedelung des Spermas subfertiler Männer ohne klinische Anzeichen einer Genitalinfektion ist umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurden als potentielle Entzündungsparameter die Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz untersucht. Ein anderer wichtiger Aspekt dieser Studie war die Überprüfung möglicher negative Effekte dieser Zytokine auf die funktionelle Spermienkapazität in vitro mit Hilfe des Spermien-Cervikal-Mukus-Penetrations-Test (SCMPT). Dafür wurden nur Cervikalmukus-Proben optimaler Qualität (Zervixindex nach Insler 10 – 12) nach einer standardisierten Östrogenbehandlung der Frauen verwendet. Aus den Spermaproben der Männer wurde direkt nach Liquefizierung ein Spermogramm nach WHO-Kriterien erstellt. Es wurden IL-6 (0,06 – 222 ng/ml), IL-8 (12,5 – 2500 ng/ml), TNF-alpha (0,0064 – 64 pmol/ml), sowie eine kleine Testserie mit Interleukin-3 (IL-3, 4 – 40 ng/ml), bzw. IL-3 (4 – 400 ng/ml) in Kombination mit IL-8 (6,2 – 62,5 ng/ml) gewählt, um ihre Bedeutung für die Spermienpenetrationsfähigkeit im SCMPT zu prüfen.

Zur Klärung dieser Zusammenhänge wurden in dieser prospektiven Studie 128 Paare, ohne klinische Anzeichen einer akuten Genitalinfektion, mit einem unerfüllten Kinderwunsch von im Median 4 Jahren unter Einbeziehung einer Vielfalt unterschiedlicher Parameter untersucht. Dies beinhaltete andrologische und gynäkologische Befunde, Spermogramm (WHO-Kriterien), lokale Antispermatozoen-Antikörper (ASA, MAR-Test), mikrobiologische und serologische Diagnostik, Bestimmung der polymorphonukleären Granulozytenelastase (PMN-Elastase) im Seminalplasma, Nachweis von Leukozyten im Ejakulat (Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode), Postcoitaltest (PCT), Spermien-Cervikal-Mukus-Penetrations-Test nach Kremer (SCMPT) sowie die Fertilität innerhalb eines Jahres. Statistische Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Wilcoxon-Test, Chi-Quadrat-Test, Fischer's Exact Test sowie Friedman-Test.

Die Seminalplasma-Konzentrationen der untersuchten Zytokine wurden mit einem ELISA-Testkit (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) bestimmt. Der Median der IL-6 Konzentration lag bei 10,8 pg/ml (Range 0,2 – 213,6 pg/ml) und war deutlich niedriger als der

Median der IL-8-Konzentration (2068 pg/ml, Range 378 – 15019 pg/ml). Es zeigte sich ein bedeutsamer Zusammenhang zwischen beiden Interleukinen ( $p < 0,001$ ). Eine signifikante Beziehung wurde auch zwischen IL-6 und der PMN-Elastase festgestellt ( $p < 0,001$ ). Die Konzentration der PMN-Elastase im Seminalplasma wurde mit Hilfe der Immunoaktivierungs-Methode bestimmt und lag im Median bei 109,4  $\mu\text{g/l}$  (Range 5,3 – 3020  $\mu\text{g/l}$ ). Es bestand eine signifikante Beziehung zwischen IL-6 und den prozentualen Leukozytanteilen an den Rundzellen im Ejakulat (Leukozytenratio) ( $p < 0,02$ ). Erhöhte IL-6 Werte gingen überzufällig häufig mit einer eingeschränkten Spermienmorphologie ( $p < 0,01$ ) sowie -vitalität ( $p < 0,05$ ) einher. Die Spermienfunktion im PCT und SCMPT sowie experimentellen SCMPT blieb von der IL-6 Konzentration im Seminalplasma unbeeinflusst. Pathologische Untersuchungsbefunde im Genitalbereich ( $p < 0,004$ ) sowie anamnestische Belastung durch Hitze ( $p < 0,001$ ) und Dauer des Kinderwunsches ( $p < 0,04$ ) standen in wichtigem Zusammenhang mit IL-6. Eine mikrobielle Besiedelung des Ejakulates, der Nachweis von ASA im Sperma oder *Chlamydia trachomatis*-Antikörpern im Serum spielte im Zusammenhang mit IL-6 keine Rolle. Auch ließ sich kein Zusammenhang mit der Fertilität der Paare nach 6 Monaten und IL-6 im Seminalplasma der Männer erkennen.

Die Seminalplasmakonzentration von IL-8 stand ebenfalls in signifikantem Zusammenhang mit der Leukozytenratio ( $p < 0,05$ ). Zwischen IL-8 und dem Spermavolumen ( $p < 0,01$ ), sowie der Morphologie ( $p < 0,04$ ) und Vitalität ( $p < 0,005$ ) der Spermien gab es eine signifikante Beziehung. Auf die funktionelle Spermienkapazität im PCT und SCMPT und experimentellen SCMPT hatte IL-8 keine wesentlichen Einflüsse. Anamnestisch angegebene Hitzeexposition ( $p < 0,004$ ) und andrologische Untersuchungsbefunde im pathologischen Bereich ( $p < 0,03$ ) standen in einer statistisch relevanten Beziehung zu IL-8. Auch hier spielten eine mikrobielle Besiedelung des Ejakulates, der Nachweis von ASA im Sperma oder *Chlamydia trachomatis*-Antikörpern im Serum keine wesentliche Rolle. Männer, deren Partnerin innerhalb eines halben Jahres nach der Ejakulatuntersuchung schwanger wurden, hatten niedrigere IL-8-Konzentrationen im Seminalplasma als die übrigen ( $p < 0,04$ ).

Bei der Bestimmung der Konzentration von TNF-alpha im Seminalplasma zeigten sich signifikante Zusammenhänge mit der Spermienanzahl ( $p < 0,03$ ) und -vitalität ( $p < 0,006$ ). TNF-alpha konnte die funktionelle Spermienkapazität im PCT, SCMPT und experimentellen SCMPT nicht negativ verändern. Ein reduziertes Hodenvolumen links ( $p < 0,005$ ) sowie eine Hitzeexposition in der Vorgeschichte ( $p < 0,02$ ) kamen überzufällig häufig mit erhöhten TNF-alpha Werten vor. Für alle weiteren gemessenen Parameter ergaben sich keine statistisch relevanten Ergebnisse, insbesondere nicht im Hinblick auf die Leukozytenratio.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwischen IL-6, IL-8 sowie TNF-alpha und der Spermaqualität ein wichtiger Zusammenhang besteht. Im experimentellen Ansatz des In-Vitro-Modells konnte jedoch kein direkter, schädlicher Einfluss auf die funktionelle Spermienkapazität bei in vitro Zusatz beobachtet werden. Da dies jedoch nicht ausschließt, dass diese Zytokine in vivo eine wichtige Rolle bezüglich der Spermienpenetration spielen, sind weitere Studien diesbezüglich nötig. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen insbesondere einen wichtigen Zusammenhang zwischen IL-6, bzw. IL-8 mit der Leukozytenratio und PMN-Elastase-Konzentration im Seminalplasma. Durch Bestimmung dieser Zytokine im Seminalplasma könnte möglicherweise eine Untergruppe von asymptomatischen Patienten selektiert werden, welche von einem ausgedehnten mikrobiellen Screening profitieren könnte. Obwohl künftige Studien notwendig sind, um die spezifischen Mechanismen der Zytokinwirkungen im männlichen Genitaltrakt zu erforschen, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Seminalplasma-Konzentrationen von IL-6 und IL-8 als klinisch relevante Screening-Parameter zur Diagnostik subklinischer Entzündungen des männlichen Genitaltraktes erscheinen.