

Aus der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
im Zentrum Frauenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss der aktiven Immuntherapie mit Partnerlymphozyten
auf die Schwangerschaftsrate nach Embryotransfer**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Katharina von Hammerstein-Equord
aus Göttingen
Göttingen 2010

Dekan :

I. Berichtstatter:

II. Berichtstatter/in:

III. Berichtstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

Prof. Dr. med. Dr. sc. agr. B. Hinney

Prof. Dr. med. R. Dressel

08.03.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Ungewollte Kinderlosigkeit.....	7
1.2	Extrakorporale Befruchtung	7
1.3	Implantation.....	9
1.4	Immunologie der Frühschwangerschaft	12
1.4.1	HLA-Antigene des Trophoblasten	13
1.4.2	Uterine natürliche Killerzellen (uNK-Zellen)	14
1.4.3	T-Lymphozyten und das Th1/Th2-Paradigma	16
1.4.4	Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen)	18
1.4.5	Hemmung zytotoxischer T-Zellen durch Substratzug.....	20
1.4.6	Apoptoseinduzierende Mechanismen des Trophoblasten	20
1.5	Ursachen früher Embryonenverluste	20
1.5.1	Uterine Ursachen.....	20
1.5.2	Technische Probleme während des Transfers	21
1.5.3	Ursachen auf Seiten des Embryos	21
1.5.4	Gestörtes Hatching	22
1.5.5	Gestörte Implantation	23
1.5.6	Immunologische Ursachen	23
1.6	Möglichkeiten zur Erhöhung der Implantationsrate	25
1.6.1	Assisted Hatching.....	25
1.6.2	Nichtsteroidale Antiphlogistika.....	25
1.6.3	Corticoidtherapie	26
1.6.4	Zytokintherapie	27
1.6.5	Aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten.....	28
1.6.5.1	Vermutete Wirkmechanismen der aktiven Immuntherapie	29
1.6.6	Passive Immuntherapie	30
1.6.6.1	Immuntherapie mit polyvalenten Immunglobulinen.....	30
1.6.6.2	Immuntherapie mit leukozytärem Ultrafiltrat	32
1.7	Ziele der Arbeit.....	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Durchführung der extrakorporalen Befruchtung	33
2.1.1	Hormonelle Stimulation	33
2.1.2	Follikelpunktion	34
2.1.4	IVF-Behandlung	35
2.1.5	ICSI-Behandlung.....	35
2.1.6	Kontrolle nach 24 Stunden	36
2.1.7	Embryotransfer	36
2.1.8	Lutealphase.....	36
2.2	Indikationsstellung zur aktiven Immuntherapie	37
2.3	Aktive Immuntherapie	37
2.3.1	Diagnostik vor aktiver Immuntherapie	37
2.3.2	HLA-Antikörpernachweis	40
2.3.3	Ausschluss von der Immuntherapie	42
2.3.4	Durchführung der aktiven Immuntherapie	42
2.4	Statistische Auswertungen.....	45
3	Ergebnisse	45

3.1	Vergleich des Therapiekollektivs mit dem Kontrollkollektiv	45
3.2	Schwangerschaftsraten	51
3.3	Akute Nebenwirkungen der aktiven Lymphozyten-Immunisierung	55
4	Diskussion	56
5	Zusammenfassung	65
6	Literatur	67

Abkürzungen

Ab	anti-idiotypic antibodies
AK	Antikörper
APCA	anti-paternal cytotoxic antibodies
ASS	Acetylsalicylsäure
CD	Cluster of differentiation
CD95-Ligand	Fas Ligand
CI	confidence interval
CMV	Zytomegalie-Virus
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
DC	dendritische Zellen
DIR	Deutsches IVF-Register
ET	Embryotransfer
Extrakorporale Befruchtung	Sammelbezeichnung für IVF und ICSI
FasL	Fas Ligand = CD95-Ligand
FSH	follikelstimulierendes Hormon
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor
GnRH	Gonadotropin releasing hormon
GvHD	Graft versus Host Disease
HbsAg	Hepatitis-B-surface-Antigen
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
hMG	humanes menopausales Gonadotropin
i.c.	intrakutan
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISP	implantation serine protease
ITher.	Immuntherapie
IVF	in-vitro-Fertilisation
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
KAR	Killer cell activator receptor
KIR	Killer cell inhibitory receptor
LCT	Mikrolymphozytotoxizitätstest
LH	luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia inhibitory factor
LIT	Lymphozyten-Immun-Therapie
Max.	Maximum
mbar	Millibar
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minimum
MLR-Bf	mixed lymphocyte reaction blocking antibodies
Modif.	modifiziert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

OR	odds ratio
PCO	polyzystische Ovarien
PIBF	progesterone induced blocking factor
PLGF	Placental growth factor
PN-Stadien	Pronukleusstadien
Rh	Rhesus
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	recurrent spontaneous abortion
sHLA-G	lösliche Form von HLA-G
Tc-Lymphozyten	zytotoxische T-Lymphozyten
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg-Zellen	regulatorische T- Zellen
uNK-Zellen	Uterine natürliche Killerzellen
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Ungewollte Kinderlosigkeit

In den westlichen Industrienationen sind etwa 10 bis 15 % der Paare ungewollt kinderlos oder nicht in der Lage, die gewünschte Zahl von Nachkommen zu erreichen (Schmidt und Münster 1995). Die Ursachen der ungewollten Kinderlosigkeit lassen sich nicht immer klären. Erkennbare Ursachen sind zu etwa gleichen Teilen auf beide Partner verteilt. Nicht selten finden sich bei beiden Partnern Einschränkungen der Fertilität.

Zu den relativ leicht erkennbaren Sterilitätsursachen gehören Störungen der Ovarfunktion sowie nicht funktionsfähige Tuben bei der Frau sowie eine verminderte Spermaqualität des Partners.

Für die menschliche Reproduktion sind die Tuben von essentieller Bedeutung. Nach der Ovulation nehmen die Fimbrientrichter der Tuben die Eizelle auf. Von der Scheide her wandern die Spermien über den Uterus in den ampullären Teil der Tube zur Eizelle. Anschließend findet dort die Fertilisation der Eizelle statt. Die ersten Teilungen der befruchteten Eizelle zum Embryo erfolgen in der Tube, und erst im Blastozystenstadium gelangt der Embryo in den Uterus, wo anschließend die Einnistung im Endometrium stattfindet.

Auf unterschiedliche Weise kann es zu Beeinträchtigungen der Tubenfunktion kommen. In erster Linie können aufsteigende Infektionen zu Adhäsionen oder Verschlüssen führen. Gelegentlich kommt es auf Grund derartiger Infektionen zu Tuboovarialabszessen, die nur durch Entfernung der Tuben saniert werden können. Weitere Gründe für die Schädigung bzw. Entfernung der Tuben sind die in etwa 1 % aller Schwangerschaften auftretenden Tubargraviditäten.

1.2 Extrakorporale Befruchtung

Bis vor ca. 30 Jahren waren beiderseits fehlende oder irreparabel gestörte Tuben eine nicht behandelbare Sterilitätsursache. Im Jahr 1978 kam es zur ersten Geburt nach Umgehung der Eileiter d. h. durch Befruchtung einer Eizelle außerhalb des Mutterleibes (Steptoe und Edwards 1978). Das Verfahren wird als extrakorporale Befruchtung oder In-vitro-Fertilisation (IVF) bezeichnet. Hierfür erhielt Edwards im Jahr 2010 den medizinischen Nobelpreis.

Die extrakorporale Befruchtung hat sich inzwischen zu einer Routinemethode entwickelt. In Deutschland wurden im Jahre 2007 42.958 Behandlungen durchgeführt (DIR 2007). Sie führten bei einer anzunehmenden „baby-take-home-rate“ von 19 % zu etwa 8.162 Geburten, d. h. zu ca. 1,2 % aller Geburten in Deutschland. Die Anzahl der Geburten in Deutschland betrug im Jahre 2007 684.862 (Statistisches Bundesamt 2007).

Zunächst war allein die tubare Sterilität eine Indikation zur extrakorporalen Befruchtung. Inzwischen sind weitere Indikationen hinzugekommen. Von besonderer Bedeutung war die Entwicklung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) durch Palermo im Jahre 1992 (Palermo et al. 1992). Den Autoren gelang es erstmals, eine Schwangerschaft durch Injektion eines einzelnen Spermiums in das Zytoplasma einer Eizelle zu erzielen. In kurzer Zeit hat sich das Verfahren zur Behandlung der andrologisch bedingten Sterilität durchgesetzt. Von den im Jahre 2007 in Deutschland durchgeführten extrakorporalen Befruchtungen waren 11.255 IVF- und 31.703 ICSI-Behandlungen (DIR 2007). Derzeit wird die extrakorporale Befruchtung – unter diesem Begriff werden IVF und ICSI zusammengefasst – außer bei tubarer und andrologisch bedingter Sterilität vor allem auch bei Endometriose und bei der idiopathischen Sterilität eingesetzt.

Die Erfolgsraten nach extrakorporaler Befruchtung sind in hohem Maße altersabhängig. Die Zahl klinischer Schwangerschaften pro Follikelpunktion beträgt bei jungen Frauen unter 30 Jahren 33,2 % (IVF) bzw. 35,7 % (ICSI). Bei Frauen jenseits des 39. Lebensjahrs beträgt die Schwangerschaftsrate pro Follikelpunktion 15,4 % für IVF- und 12,2 % für ICSI-Behandlungen. Im Mittel werden in Deutschland Schwangerschaftsraten von 26,6 % pro Follikelpunktion erzielt (DIR 2007).

Da bei der extrakorporalen Befruchtung nahezu regelmäßig zwei oder drei Embryonen transferiert werden, ist zur Beurteilung früher Embryonenverluste die Implantationsrate pro transferierten Embryo von Interesse. Nach dem Deutschen IVF-Register 2006 liegt diese Rate bei 17 %, d. h. 83 % der transferierten Embryonen gehen zugrunde (DIR 2006). Ein wesentliches Ziel reproduktionsmedizinischer Forschung ist daher die Reduzierung der Embryonenverluste nach Embryotransfer.

1.3 Implantation

Die ersten Teilungen (Furchungen) erfolgen normalerweise in der Tube. In vivo erreicht der Embryo das Cavum uteri im Morulastadium am 4. bis 5. Tag nach der Konzeption. Bei der extrakorporalen Befruchtung wird der Embryo am 2. oder 3. Tag nach der Konzeption, d. h. im Vier- bis Achtzellstadium, in das Cavum uteri übertragen. Nach weiteren Teilungen zur Morula, im 16- bis 32-Zellstadium, grenzt sich im Inneren der Zellmasse ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum ab. Der Embryo wird jetzt als Blastozyste bezeichnet. Diese Entwicklung umfasst weiterhin die Differenzierung der oberflächlichen Zellen zum Trophoblasten und der inneren Zellen zum Embryo. Am 5. Tag nach der Konzeption hat sich der Embryo zur Blastozyste entwickelt. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Zona pellucida noch intakt, d. h. der Embryo hat bis dahin nicht an Volumen zugenommen. Voraussetzung für die nun folgende Implantation des Embryos ist das Verlassen der Zona pellucida, auch Schlüpfen oder Hatching genannt (Abb.1). Zwei Serin-Proteasen, *implantation serine proteases 1 und 2* (ISP1 und ISP2) sind in den Hatchingvorgang involviert. ISP1 wird vom Embryo, ISP2 von den Drüsen des Uterus gebildet. Diese Enzyme spielen möglicherweise auch eine Rolle bei der Proteolyse von mütterlichem Gewebe während des Prozesses der Invasion (O'Sullivan et al. 2001).

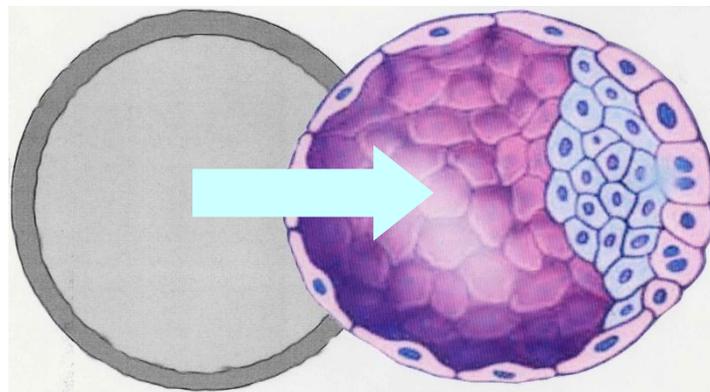


Abb. 1: Hatching (Schlüpfen). Die Blastozyste (rechts) verlässt am ca. 5. – 6. Tag nach der Fertilisation die Zona pellucida (links).
(Ausschnitt modif. nach Abb. 2).

Etwa sechs bis sieben Tage nach der Fertilisation erfolgt die Implantation. Zunächst nehmen Microvilli des Synzytiotrophoblasten mit Mikroausstülpungen des Endometriums, den Pinopodien, Kontakt auf. Diese initiale Adhäsion der Blastozyste an das Endometrium (Apposition) findet vorwiegend an der dorsalen Uteruswand im Bereich des Fundus uteri statt und ist zunächst noch instabil (Abb. 2).

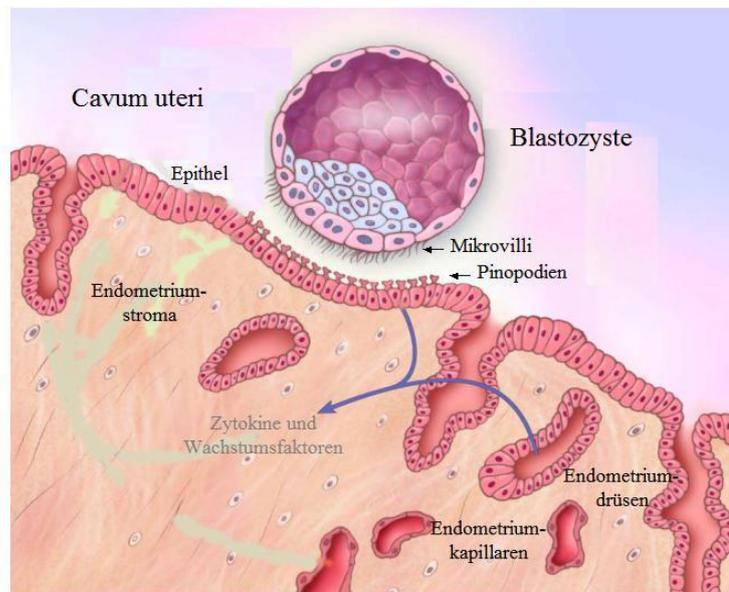


Abb. 2: Blastozyste nach Verlassen der Zona pellucida während der initialen Adhäsion (Apposition) an das Endometrium. Die von der Blastozyste gebildeten Mikrovilli stehen im Kontakt zu den Pinopodien des Endometriums.
Modif. nach Norwitz et al. (2001, S.1401).

Die Invasion führt zur Arrosion von mütterlichen Spiralarterien, durch die der Trophoblast Anschluss an den mütterlichen Blutkreislauf gewinnt. Somit ist die nutritive Versorgung des Embryos, der sich bisher aus eigenen Reserven oder mit Hilfe von Deziduazellen ernährt hat, gewährleistet. Es entsteht der uteroplazentare Kreislauf.

Anschließend penetriert der Synzytiotrophoblast das endometriale Epithel (Abb. 3). Am zehnten postkonzeptionellen Tag schließt sich das Endometrium über der Implantationsstelle; damit ist die Einnistung in die Uteruswand abgeschlossen. Der Zytotrophoblast invadiert das angrenzende Endometrium und das innere Drittel des Myometriums (interstitielle Invasion) sowie die uterinen Gefäße (endovaskuläre Invasion). Es kommt somit zu einem direkten Kontakt des Trophoblasten mit dem mütterlichen Blut (Abb. 4) (Pijnenborg et al. 1981, Norwitz et al. 2001).

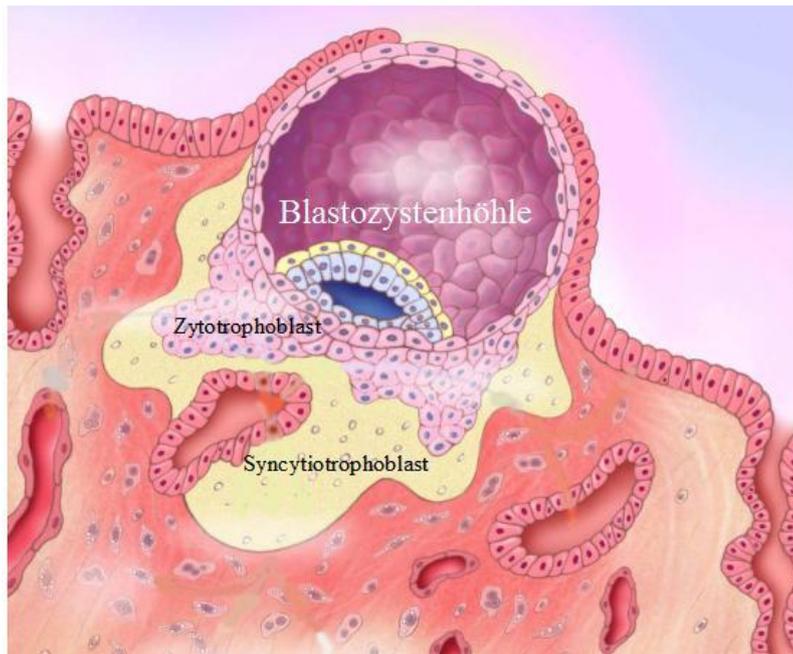


Abb. 3: Penetration des Syncytiotrophoblasten in das endometriale Epithel. Abgegrenzt haben sich der Zytotrophoblast und der Syncytiotrophoblast. Modif. nach Norwitz et al. (2001, S. 1402). Zytotrophoblast und Syncytiotrophoblast bilden die Zytotrophoblastschale.

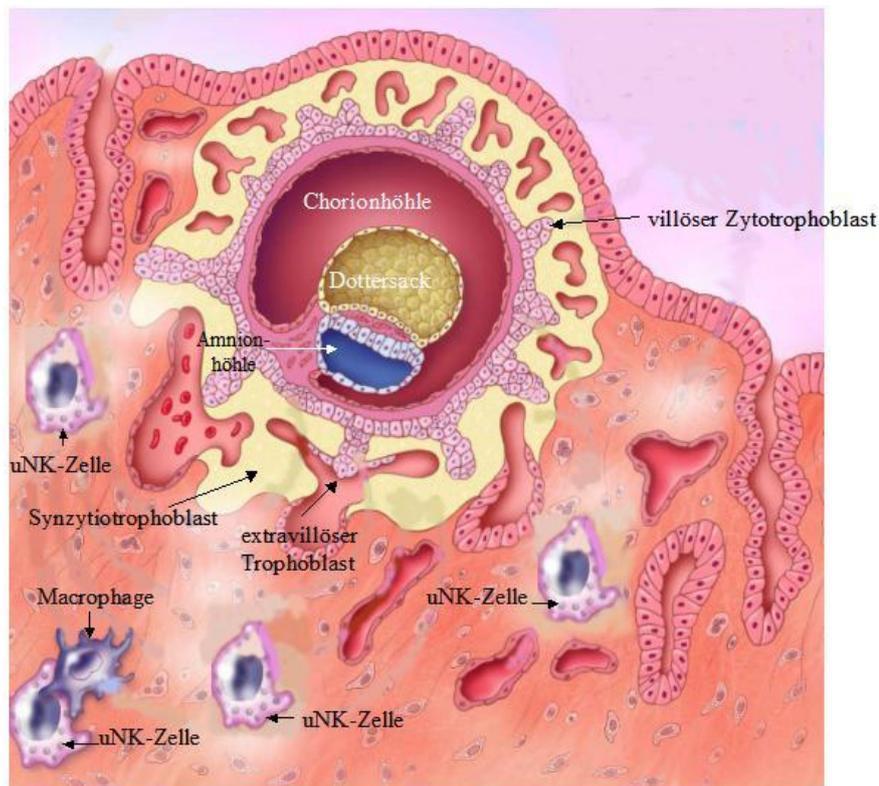


Abb. 4: Abschluss der Implantation. Der Epitheldefekt über dem Trophoblasten hat sich wieder verschlossen. Der Trophoblast hat Kontakt zum mütterlichen Blutsystem. Dargestellt sind der villöse Zytotrophoblast und der Synzytiotrophoblast. Der extravillöse Zytotrophoblast ist noch nicht erkennbar. Modif. nach Norwitz et al. (2001, S.1403).

1.4 Immunologie der Frühschwangerschaft

Für das mütterliche Immunsystem ist die Schwangerschaft ein Hemiallotransplantat; die Hälfte des fetalen Chromosomensatzes stammt vom für das mütterliche Immunsystem „fremden“ Vater. In der Schwangerschaft sollte es daher, wie bei anderen Allotransplantaten, zur Erkennung des Konzeptus als fremd und zur Abstoßung kommen. In der Mitte des vergangenen Jahrhunderts kam es durch die Arbeiten von Medawar zur Erkenntnis der immunologischen Toleranz und nach Entdeckung des humanen Leukozyten-Antigen-Systems durch Dausset (Dausset 1958) zu grundlegenden Fortschritten auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie.

Der bei allen Säugern vorhandene Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex, MHC) wird beim Menschen als „Human Leukozyten Antigen-System“ (HLA-System) bezeichnet. Der HLA-Gen-Komplex auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 enthält über 200 Gene, etwa 40 dieser Gene kodieren HLA-Antigene. Die auf nahezu allen Körperzellen vorhandenen HLA-Antigene der Klasse I dienen dem Immunsystem zur Erkennung der eigenen Zellen als „Selbst“, daraus resultiert ihre Bedeutung für die Transplantationsimmunologie. HLA-Antigene der Klasse II finden sich auf einer Untergruppe von Immunzellen (B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und Epithelzellen des Thymus).

Zur Klasse I gehören ca. 20 Gene, drei davon – HLA-A, -B und -C – sind von besonderer Bedeutung, sie werden als „klassische“ oder HLA-Ia-Gene bezeichnet. Im Gegensatz zum A,B,0-Blutgruppensystem sind die HLA-Ia-Gene hoch polymorph, d. h. für jedes Gen sind zahlreiche verschiedene Allele bekannt (Delves und Roitt 2000). Die zur Klasse HLA-Ib gehörenden Antigene HLA-G, -E und -F haben dagegen nur wenig Allele (s. 1.4.1).

Die Wahrscheinlichkeit der HLA-Ia-Übereinstimmung zwischen nicht verwandten Personen ist sehr gering. Es stellt sich daher die Frage, wie der Fet als Hemiallotransplantat dem Angriff des mütterlichen Immunsystems entgehen kann.

Im Jahr 1953 publizierte Medawar erste Hypothesen zur Toleranz des Embryos durch das mütterliche Immunsystem. Danach sei die Plazenta eine wirksame immunologische Barriere zwischen der Mutter und dem Feten. Der Konzeptus sei also nicht immunogen. Des Weiteren würde die mütterliche Immunantwort durch die Schwangerschaft abgeschwächt (Medawar 1953).

Diese Hypothesen haben sich z. T. als falsch herausgestellt. Die Plazenta ist keine Barriere zwischen Mutter und Fet. Der Konzeptus ist allerdings nur sehr eingeschränkt immunogen.

1.4.1 HLA-Antigene des Trophoblasten

Während der ersten Teilungen ist der Embryo bis zum Schlüpfen durch die Zona pellucida geschützt (Ewoldsen et al. 1987). Während der nun folgenden Implantation entstehen zunächst der primitive Synzytiotrophoblast und der primitive Zytotrophoblast. Synzytiotrophoblast und der darunter befindliche Zytotrophoblast bilden die Zytotrophoblastschale (Abb. 1.3).

Zytotrophoblastzellen infiltrieren in die Dezidua und das Myometrium. Sie dringen auch in die dezidualen Spiralarterien ein und bilden dort den endovaskulären Trophoblasten. Der endovaskuläre Trophoblast ersetzt das maternale Endothel und sichert die plazentare Durchblutung.

Der Trophoblast kann somit folgendermaßen unterteilt werden (Abb. 1.4):

- villöser Trophoblast,
- Synzytiotrophoblast
- extravillöser Trophoblast.

Synzytiotrophoblast und extravillöser Trophoblast stehen in direktem Kontakt mit dem mütterlichen Blut.

Es hat sich gezeigt, dass der Trophoblast nur ein HLA-Ia-Antigen exprimiert (Sutton et al. 1983, Coady et al. 1999, van den Elsen et al. 2001). Es fand sich lediglich das zur HLA-Ia-Klasse gehörende wenig polymorphe HLA-C auf dem extravillösen Trophoblasten (Loke et al. 1995, King et al. 1996, King et al. 2000b). Auf dem extravillösen Trophoblasten wurden dagegen alle zur HLA-Klasse Ib gehörenden Antigene gefunden: HLA-G (Ellis et al. 1986) und HLA-E und HLA-F (King et al. 2000a). Auf dem villösen Trophoblasten und auf dem Synzytiotrophoblasten sind diese Antigene nicht nachweisbar.

HLA-Ib-Gene haben im Gegensatz zu HLA-Ia-Genen nur wenig Allele: HLA-E hat zwei, HLA-G fünf Allele. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass HLA-Ia-Antigene stets membrangebunden sind, HLA-G kann dagegen sowohl membrangebunden als auch gelöst (sHLA-G) vorkommen. Von den sieben beschriebenen *spliced transcripts* sind vier membrangebunden, drei kommen gelöst vor. Schließlich unterscheiden sich HLA-Ia- und HLA-Ib-AG durch ihr Vorkommen. HLA-Ia-Antigene sind ubiquitär, HLA-Ib-Antigene dagegen gewebs- bzw. organspezifisch (Hunt et al. 2005).

HLA-G scheint bei der Implantation durch Beeinflussung peripherer Immunzellen eine wichtige Rolle zu spielen. Zytotoxische T-Lymphozyten (Tc-Lymphozyten) können z. B. durch sHLA-G supprimiert werden. sHLA-G ist bei frühen Aborten gegenüber normalen Schwangerschaften erniedrigt (Pfeiffer et al. 2000). HLA-G kann die Proliferation von T-Lymphozyten hemmen und Tc-Lymphozyten und uterine natürliche Killerzellen (uNK-Zellen) durch Veränderung der Zytokinsekretion im Sinne eines Shifts von Typ1 zu Typ 2 beeinflussen. Fuzzi et al. untersuchten sHLA-G im Kulturmedium von Embryonen nach extrakorporaler Befruchtung.

Zu Schwangerschaften kam es nur dann, wenn sich im Kulturmedium sHLA-G nachweisen ließ (Fuzzi et al. 2002).

1.4.2 Uterine natürliche Killerzellen (uNK-Zellen)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zerstören infizierte und maligne Zellen. Zur Erkennung und Zerstörung der Zielzellen besitzen NK-Zellen killeraktivierende und killerinhibierende Rezeptoren. Die killeraktivierenden Rezeptoren (KAR) erkennen unterschiedliche Moleküle, die auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen, während die killerinhibierenden Rezeptoren (KIR) HLA-I-Moleküle erkennen. Das Killersignal der KAR wird normalerweise durch das inhibierende Signal der KIR unwirksam gemacht, fehlende HLA-I-Antigene führen zur Zerstörung der Zelle (Delves und Roitt 2000).

Etwa 60 % der im Endometrium vorhandenen Leukozyten sind NK-Zellen. In der Frühschwangerschaft kommt es zu einer deutlichen Zunahme dieser Zellpopulation. Uterine NK-Zellen (uNK-Zellen) ähneln den peripheren NK-Zellen, sie sind jedoch spezifisch für den Uterus und unterscheiden sich von den peripheren NK-Zellen durch ihre Oberflächenantigene. In der Frühschwangerschaft proliferieren die uNK-Zellen unter dem Einfluss von Zytokinen und Steroidhormonen (King et al. 1999, Henderson et al. 2003).

Im Hinblick auf die immunologische Toleranz der Schwangerschaft erscheint die Zunahme der uNK-Zellen in der Frühschwangerschaft paradox, da zunächst angenommen wurde, dass der Trophoblast vor dem Angriff der uNK-Zellen geschützt werden müsse. Quenby und Farquharson fanden bei infertilen Frauen und bei Frauen nach habituellen Aborten, im Vergleich zu fertilen Frauen, präkonzeptionell erhöhte uNK-Zellen im Endometrium (Quenby und Farquharson 2006). Es hat sich allerdings herausgestellt, dass uNK-Zellen durch regulierende Mechanismen einen wesentlichen Beitrag zum Schutz der Schwangerschaft leisten. Obwohl sie sehr zahlreich in der Dezidua vorkommen, greifen sie den Trophoblasten normalerweise nicht an. Dies ist in erster Linie auf die Expression inhibitorischer Rezeptoren zurückzuführen. Diese Rezeptoren, z. B. Immunglobulin-like KIR und lectin-like KIR, binden an HLA-C, HLA-E und HLA-G des Trophoblasten und hemmen damit die lytische Aktivität der uNK-Zellen. Auf peripheren NK-Zellen sind diese inhibitorischen Rezeptoren nicht nachweisbar. Durch Bindung an die inhibitorischen Rezeptoren bilden uNK-Zellen eine Vielzahl von Zytokinen:

- *Macrophage-colony-stimulating factor* (M-CSF) und *Leukemia-inhibitory-factor* (LIF) stimulieren das Trophoblastwachstum. Colony-stimulating Faktoren fördern zusätzlich die Trophoblastzellproliferation und -differenzierung (Loke et al. 1992). LIF unterstützt die Implantation (Stewart et al. 1992).
- *Transforming growth factor- β* (TGF- β) hemmt dagegen die Trophoblastproliferation und -differenzierung (Morrish et al. 1991).
- Weiterhin bilden uNK-Zellen auch Typ-1-Zytokine wie TNF-alpha und IFN-gamma. Diese Zytokine haben eine negative Wirkung auf die Implantation und die Trophoblastinvasion (s. 1.4.3).

1.4.3 T-Lymphozyten und das Th1/Th2-Paradigma

Mütterliche T-Zellen haben in der Dezidua engen Kontakt zum Trophoblasten. Da der Trophoblast jedoch mit Ausnahme von HLA-C keine HLA-Ia-Antigene exprimiert, wird er von den zytotoxischen T-Zellen nicht angegriffen (Abb. 5). HLA-C ist nur wenig polymorph, offenbar spielt es als Ursache der immunologischen Abstoßung keine Rolle (Hunt et al. 2005).

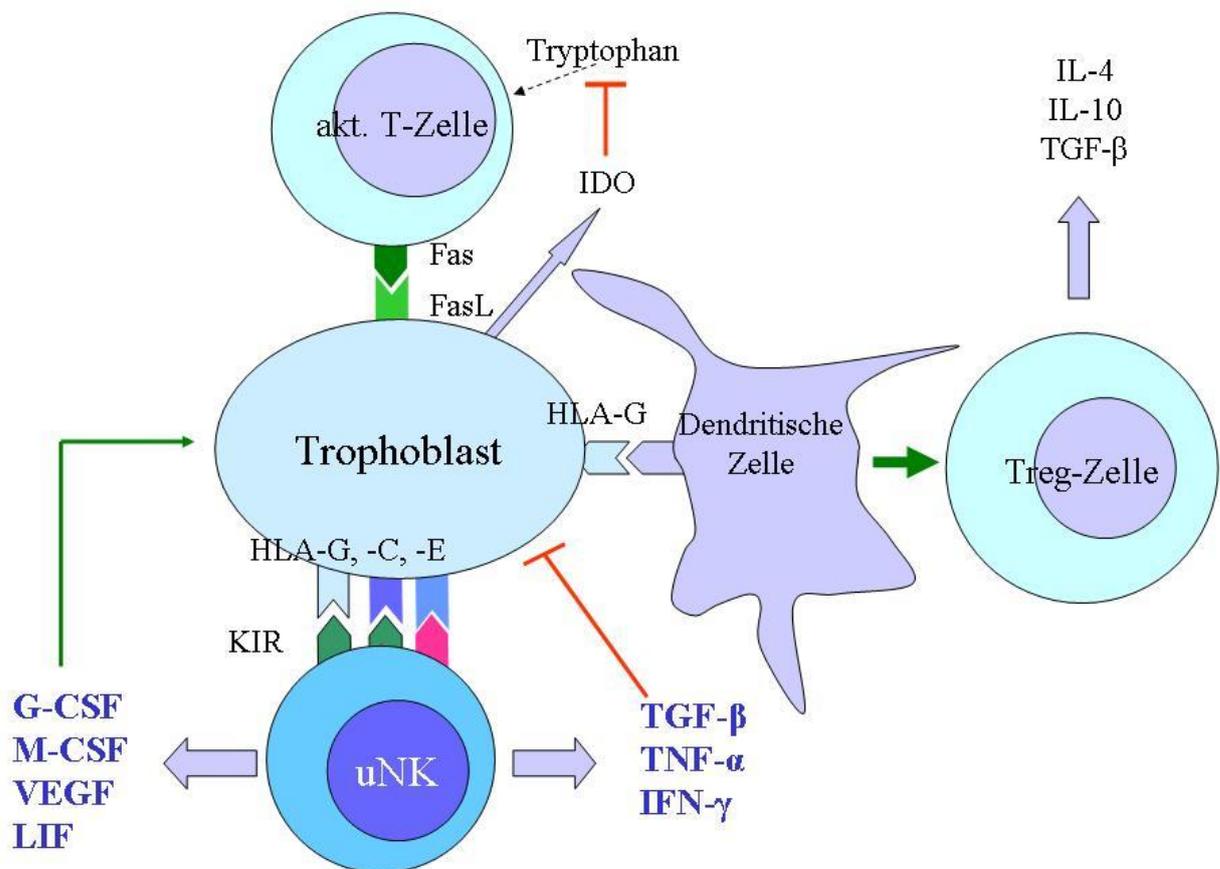


Abb. 5: Schutz des Trophoblasten vor dem mütterlichen Immunangriff. Trophoblastzellen exprimieren HLA-E, HLA-G und HLA-C. Durch Bindung an uNK über inhibitorische Rezeptoren (KIR) wird die uNK-Aktivität moduliert. U. a. bilden die uNK-Zellen schützende, bzw. implantationsfördernde (G-CSF, M-CSF, VEGF und LIF) und implantationshemmende (TGF- β , TNF- α , IFN- γ) Zytokine. Die Bindung von HLA-G an dendritische Zellen fördert die Bildung regulatorischer T-Zellen (Treg-Zellen). Treg-Zellen bilden u. a. IL-4, IL-10 und ebenfalls TGF- β . Über den vom Trophoblasten gebildeten Fas-Liganden (FasL) kommt es zur Apoptose aktivierter T-Lymphozyten. Weiterhin bildet der Trophoblast Indolaminoessigsäure (IDO). IDO katabolisiert das für die Proliferation von T-Zellen erforderliche Tryptophan (Substratzug).

Von Bedeutung ist die Zytokinproduktion der T-Helferzellen. T-Helferzellen werden in Abhängigkeit von ihrer Zytokinbildung in Th-1- und Th-2-Zellen unterschieden:

- Th-1-Zytokine, z. B. TNF- α , IL-2 und IFN- γ wirken inflammatorisch. Sie führen zur Apoptose der menschlichen Trophoblastzellen und fördern weiterhin die Makrophagenaktivität in der Dezidua.
- Th-2-Zytokine, z. B. IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 wirken anti-inflammatorisch. Sie stimulieren das Trophoblastwachstum und die Invasion.

In normal verlaufenden Schwangerschaften dominieren die Th-2-Zytokine, da sie offenbar schwangerschaftsprotektive Eigenschaften besitzen (Lin et al. 1993, Wegmann et al. 1993, Chaouat et al. 1995). Th-1-Zytokine führen dagegen zur plazentaren Nekrose und zur Aktivierung anderer immunkompetenter Zellen und rufen somit eine Abstoßung hervor (Chaouat et al. 1990, Lin et al. 1993, Raghupathy 1997).

Bei Frauen mit ungeklärten habituellen Aborten findet sich gegenüber Frauen mit intakten Schwangerschaften eine Dominanz der Th-1-Zytokine (Piccinni et al. 1998). Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Injektion von Typ-1-Zytokinen bei graviden Mäusen zur Resorption der Schwangerschaft führt (Chaouat et al. 1990). Die intakte Schwangerschaft ist somit vorwiegend ein Th-2-Phänomen, da es zu einer Reduzierung der Th-1- zugunsten der Th-2-Reaktion kommt. IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 haben auf die embryonale Entwicklung einen positiven Einfluss. Zytotoxische T-Lymphozyten können mit den von ihnen produzierten Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ), die embryonale Entwicklung behindern. Bei Persistenz oder Dominanz der zytotoxischen Zytokine drohen dem Trophoblasten Apoptose und Wachstumshemmung (Wegmann et al. 1993).

Eine inflammatorische Th-1-Reaktion ist andererseits für die Implantation unerlässlich. Es wird eine sich selbst regulierende inflammatorische Antwort ausgelöst, die den Defekt an der mütterlich-fetalen Grenzfläche limitiert. Das Th-1-Zytokin TNF- α veranlasst den Trophoblasten zur vascular endothelial growth factor (VEGF) Produktion. VEGF reguliert die Permeabilität der plazentaren Gefäße und die Angiogenese. Beides ist für die Implantation und die Plazentation erforderlich (Chung et al. 2000). Weiterhin induziert TNF- α die Produktion von Interleukin-10 (IL-10), welches die inflammatorische Antwort unterdrückt (Lio et al. 2001). Offenbar schützen die Th-1-Zytokine vor einem exzessiven Eindringen des Trophoblasten in die Dezidua. Chaouat et al. postulieren daher, dass die verschiedenen Zytokine während der Schwangerschaft jeweils zu spezifischen Zeiten

präsent sind und somit regulative Funktionen übernehmen (Chaouat et al. 2002, Chaouat et al. 2003). Somit übernimmt zum Beispiel der *transforming growth factor β* (TGF- β) mit der Unterdrückung der NK-Zellaktivierung eine Th-2-Aktion, jedoch mit der Regulation der Trophoblastproliferation eine Th-1-Aktion. Es zeigt sich also, dass der reguläre Ablauf einer Kaskade von Zytokinen eine bedeutende Rolle spielt. Die Zytokine werden jeweils zu spezifischen Zeiten freigesetzt, und ihre Wirkung hängt unter anderem von dem Zeitpunkt der Freisetzung anderer Zytokine und deren jeweiligem Vorhandensein ab.

1.4.4 Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen)

In neuerer Zeit haben die früher als Suppressor-T-Zellen bezeichneten regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) zunehmendes Interesse gefunden. Treg-Zellen weisen die Oberflächenmarker CD4 und CD25 auf. Es lassen sich mindestens drei Untergruppen von CD4⁺-regulatorischen T-Zellen unterscheiden: Typ-1-regulatorische T (Tr1)-Zellen, T-Helfer-3 (Th3)-Zellen und CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-(Treg)-Zellen. Alle drei Untergruppen haben die Fähigkeit zur Hemmung der Proliferation und Effektorfunktion anderer T-Zellen. An reproduktiven Vorgängen sind vor allem Treg-Zellen beteiligt (Guerin et al. 2009).

Treg-Zellen können die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF β bilden. Zur Proliferation werden sie durch IL-2 und durch Stimulation über den T-Zellrezeptor angeregt (Sakaguchi et al. 1995).

Treg-Zellen sind an der Unterdrückung autoimmunologischer Vorgänge und der Allograftabstoßung beteiligt. Sie kontrollieren T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entgangen sind, aber dennoch mit Autoantigenen reagieren. Weiterhin begrenzen sie die Dauer und das Ausmaß der T-Zellreaktion mit exogenen Antigenen, unter anderem auch Alloantigenen.

Der Dialog mit spezifischen dendritischen Zellen „tolerogenen dendritischen Zellen“ ist für die Aktivierung und Vermehrung der Treg-Zellen von entscheidender Bedeutung. Verschiedene costimulatorische Signale an dendritische Zellen (DC) können die Treg-vermittelte Suppression hemmen. Entscheidend für die Kontrolle der Treg-Zellen ist die Zytokinumgebung. Wenn DC sich in Gegenwart von TGF β , IL-10, GM-CSF und IL-4 differenzieren, haben sie die Eigenschaften von unreifen DC und induzieren Treg-Zellen mit immunsupprimierender Funktion.

Es hat sich weiterhin gezeigt, dass Treg-Zellen bei der immunologischen Toleranz der Spermatozoen und des Trophoblasten eine wichtige Rolle spielen. Während der Schwangerschaft sind Treg-Zellen im Blut, in der Dezidua und in den Lymphknoten der Abflussgebiete des Uterus erhöht. Störungen der Treg-Zellfunktion können zu ungeklärter Sterilität, zu Fehlgeburten und zur Präeklampsie führen. Im Mausmodell werden bei Abwesenheit von Treg-Zellen allogene Feten abgestoßen, syngene Feten bleiben dagegen intakt (Aluvihare et al. 2004). Weiterhin fanden sich im Mausmodell

bei zu Aborten neigenden Paarungen weniger Treg-Zellen in der Dezidua. Die Zugabe von Treg-Zellen gesunder gravider Mäuse an die zu Aborten neigenden Mäuse verhinderte den Abort (Zenclussen et al. 2005). Aus diesen Befunden lässt sich die Bedeutung der Treg-Zellen für den Erhalt der Schwangerschaft ableiten.

Beim Menschen fanden Sasaki und Mitarbeiter in der Frühgravidität einen Anstieg der dezidualen Treg-Zellen (Sasaki et al. 2004). In anderen Studien fand sich ein Anstieg der peripheren Treg-Zellen in der Frühgravidität mit einem Maximum im zweiten Trimester und einem Abfall post partum (Heikkinen et al. 2004).

Zahlreiche Studien berichten über eine Beziehung zwischen Treg-Zell-Mangel und Schwangerschaftskomplikationen. Im Abortgewebe nach Spontanaborten fanden sich weniger Treg-Zellen als im Gewebe von induzierten Aborten oder im Endometrium nicht schwangerer Frauen (Sasaki et al. 2004, Yang et al. 2008). In einer weiteren Studie fanden sich bei Frauen mit rezidivierenden Spontanaborten (RSA) weniger Treg-Zellen im peripheren Blut und eine erniedrigte Suppressoraktivität gegenüber normal schwangeren Frauen (Jasper et al. 2006). Im Endometrium von Frauen mit ungeklärter Sterilität war die mRNA für Treg-Zellen erniedrigt. Dies lässt vermuten, dass die Konzeptionsfähigkeit durch verminderte Bildung von Treg-Zellen beeinträchtigt wird (Abb. 6). Da antigenpräsentierende Zellen – die gleichzeitig HLA-G exprimieren – in $CD4^+$ -Zellen vorzugsweise Suppressoraktivität induzieren (LeMaoult et al. 2004), besteht die Möglichkeit, dass HLA-G des Trophoblasten ebenfalls die Zahl der Treg-Zellen am Ort der Implantation beeinflusst.

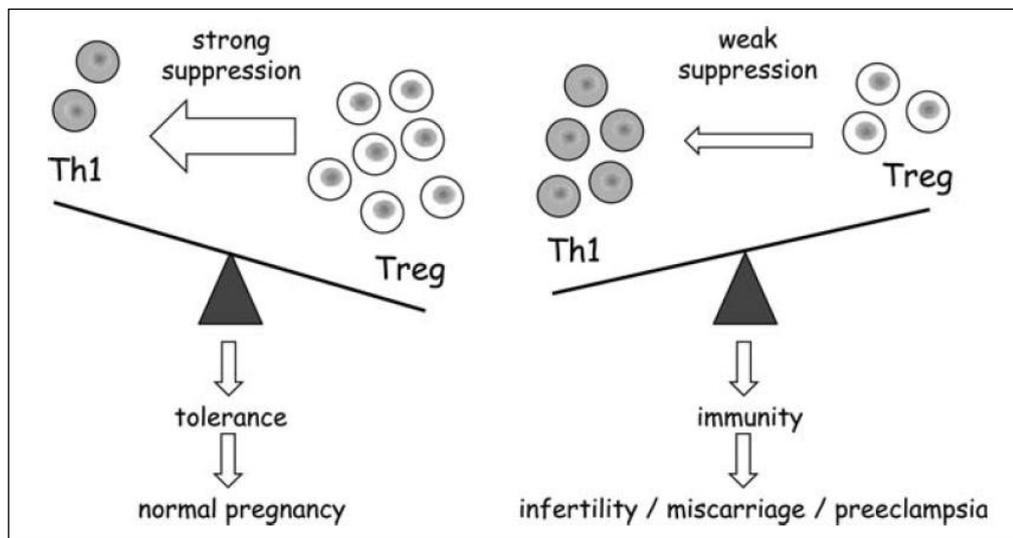


Abb. 6: Ein Mangel an Treg-Zellen oder eine zu geringe suppressive Funktion der Treg-Zellen ist mit Sterilität, habituellen Aborten und Präeklampsie verbunden. Im Mausmodell führt die adäquate Treg-Zellfunktion während normaler Graviditäten zu einem verminderten Th1-vermittelten maternalen Angriff auf den allogenen Konzeptus, Treg-Zell-Mangel führt zur insuffizienten Suppression und zu Th1-vermitteltem Abort. Guerin et al. (2009, S. 524).

1.4.5 Hemmung zytotoxischer T-Zellen durch Substratentzug

Eine mögliche Abstoßung der Schwangerschaft durch zytotoxische T-Zellen wird durch einen weiteren Mechanismus gehemmt: T-Zellen sind auf Tryptophan als Substrat angewiesen. Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katabolisiert Tryptophan und hemmt die T-Zellaktivität durch Substratentzug. Munn und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass IDO sowohl von Makrophagen als auch vom Trophoblasten gebildet wird. Eine experimentelle Hemmung der IDO lässt den Tryptophanspiegel ansteigen, so dass die als Folge dessen ungehemmte T-Zellaktivität bei Mäusen zur Resorption der Feten führt (Munn et al. 1998).

1.4.6 Apoptoseinduzierende Mechanismen des Trophoblasten

Fas oder CD95 wird auf mütterlichen Immunzellen (T-Zellen und NK-Zellen) exprimiert. Da der Trophoblast apoptoseinduzierende Liganden (Fas Ligand = FasL) exprimiert, kommt es sehr wahrscheinlich zur Apoptose eindringender Lymphozyten. Dies wirkt als immunprivilegierender Mechanismus (Runic et al. 1996) und es ist anzunehmen, dass die FasL-Expression des Trophoblasten den Trophoblasten gegen aktivierte Leukozyten schützt (Hammer et al. 1999).

1.5 Ursachen früher Embryonenverluste

In erster Linie kommen folgende Ursachen von Embryonenverlusten nach Embryotransfer in Betracht:

- Uterine Ursachen
- Technische Probleme während des Transfers
- Ursachen auf Seiten des Embryos
- Gestörtes Hatching
- Ursachen auf Seiten des Endometriums
- Unzureichende Immuntoleranz.

1.5.1 Uterine Ursachen

Fehlformen des Uterus sowie Polypen oder Myome können die Einnistung des Embryos stören. Die meisten Auffälligkeiten lassen sich sonographisch erkennen, dennoch wird nach mehrfachem Implantationsversagen eine Hysteroskopie empfohlen, um auch weniger deutliche Auffälligkeiten – vor allem Uterussepten – zu erkennen. In der Mehrzahl der Fälle können submuköse Myome,

Polypen und auch Uterussepten hysteroskopisch entfernt werden. Hinckley et al. berichteten über 1.000 Hysteroskopien vor IVF. Sie fanden u. a. bei 323 Frauen Endometriumpolypen, bei 27 Frauen submuköse Myome, bei 25 Frauen intrauterine Adhäsionen und bei 5 Frauen ein Uterusseptum (Hinckley et al. 2004). Ob alle auffälligen Befunde ein Nidationshindernis darstellen, ist umstritten (Grimbizis et al. 2001).

1.5.2 Technische Probleme während des Transfers

Nach extrakorporaler Befruchtung werden die vorhandenen Embryonen transzervikal mit einem dünnen Katheter in das Cavum uteri transferiert. Als optimaler Ort für das Einsetzen der Embryonen gilt ein Bereich kranial des inneren Muttermundes bis zu einer Distanz von ca. 10 mm kaudal des Fundus. Die Uteruslänge wird vor dem Transfer sonographisch ermittelt. Dennoch können Fehlinterpretationen eine fehlerhafte Position der Katheterspitze zur Folge haben.

Ein atraumatischer Transfer gilt als Voraussetzung für gute Schwangerschaftsraten. Traumatische Transfers sind vor allem auf stark retro- oder anteflektierte Uteri sowie auf Zervikalstenosen zurückzuführen. Verletzungen des Endometriums können zu myometranen Kontraktionen führen und damit die Implantation beeinträchtigen. Ferner kann reichlich vorhandener zervikaler Mucus mit dem Katheter in das Cavum uteri vorgeschoben werden. Ein auf Grund dessen in den Mucus abgesetzter Embryo wird unter Umständen beim Zurückziehen des Katheters mit dem Mucus in den Zervikalkanal verlagert. Ein Teil der Probleme kann durch einen Probetransfer und/oder eine abdominale Ultraschallkontrolle vermieden werden (Brown et al. 2007).

1.5.3 Ursachen auf Seiten des Embryos

Embryonen unterscheiden sich in ihrem Entwicklungspotential. Es gibt daher zahlreiche Ansätze zur Beurteilung der Embryonenqualität mit dem Ziel, die Embryonen mit den besten Entwicklungschancen auszuwählen und zu übertragen. Eine suffiziente Beurteilung der Embryonenqualität gelingt am besten nach dem 4-8-Zellstadium (Desai et al. 2000).

Nach dem Deutschen Embryonenschutzgesetz dürfen nur maximal drei Embryonen pro Zyklus entstehen. Alle entstandenen Embryonen müssen im gleichen Zyklus transferiert werden (ESchG 1990). In Deutschland müssen daher bereits die am ersten Tag nach der Fertilisation entstandenen Vorkernstadien (Pronukleus- oder PN-Stadien) hinsichtlich ihrer potentiellen Entwicklungsfähigkeit ausgewählt werden.

Ein eindeutiges Kriterium für die Beurteilung der PN-Stadien ist die Zahl der Vorkerne. Mehrfach befruchtete Oozyten sind polyploid, dies ist an der Zahl der Vorkerne erkennbar. Polypleide PN-

Stadien werden nicht weiter kultiviert. Allerdings weisen auch diploide PN-Stadien nicht selten Chromosomenanomalien auf. Plachot und Mitarbeiter fanden bei 16 % diploider IVF-Embryonen Chromosomenanomalien (Plachot et al. 1987). In einer Untersuchung von Jamieson und Mitarbeitern betrug die Rate chromosomal aberranter Embryonen ca. 22 % (Jamieson et al. 1994).

Voullaire et al. untersuchten Chromosomenanomalien bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen, keiner Schwangerschaft nach mindestens 10 übertragenen Embryonen, mittels komparativer Genomhybridisierung an Präimplantationsembryonen. Von insgesamt 142 untersuchten Embryonen wiesen 56,3 % Chromosomenanomalien auf (Voullaire et al. 2007).

In einer aktuellen Studie von Vanneste et al. werden Hinweise auf Chromosomeninstabilitäten in der frühen Embryonalentwicklung beschrieben. Es fanden sich häufig segmentale Deletionen, Duplikationen und Amplifikationen reziprok zu Schwesterblastomeren. Dies deutet auf das Vorkommen von Bruch-Fusions-Brückenzyklen hin und lässt postzygote Chromosomeninstabilität als eine entscheidende Ursache von konstitutionellen Chromosomenanomalien vermuten (Vanneste et al. 2009).

In der frühen Embryonalentwicklung findet eine stringente Selektion gegen Chromosomenanomalien statt (Engel et al. 1998). Es ist somit anzunehmen, dass ein wesentlicher Teil der frühen Embryonenverluste chromosomal bedingt ist. Für diese Annahme sprechen u. a. Untersuchungsergebnisse von Materialien aus klinischen Aborten des I. Trimenons. Weitgehend übereinstimmend fanden sich bei etwa 50 % der untersuchten Spontanaborte chromosomale Auffälligkeiten (Boue et al. 1975, Eiben et al. 1990). Im Vordergrund der Chromosomenanomalien stehen Trisomien, Triploidien, Monosomie X, Tetraploidien und strukturelle Chromosomenanomalien (Eiben et al. 1990).

Wenngleich somit ein wesentlicher Anteil von Implantationsversagen durch Chromosomenanomalien erklärt werden kann, stellt sich doch die Frage nach den weiteren Ursachen der Embryonenverluste, die laut DIR mit ca. 83 % anzunehmen sind. Diese Verluste sind zu nicht exakt abschätzbaren Anteilen auf Störungen in der frühen Embryonalentwicklung zurückzuführen (Balaban und Urman 2006). Weiterhin sind Störungen des Endometriums und vermutlich auch immunologisch bedingte Abstoßungsreaktionen verantwortlich.

1.5.4 Gestörtes Hatching

Für den Embryo ist das Verlassen der Zona pellucida (Schlüpfen oder Hatching) eine essentielle Voraussetzung für die Implantation. Störungen dieses Vorgangs werden für Implantationsversagen verantwortlich gemacht. Es wird vermutet, dass es vor allem bei älteren Patientinnen zu einer

Verhärtung der Zona pellucida kommt. Das Hatching kann somit unterbleiben, die Implantation des Embryos wird dadurch verhindert.

1.5.5 Gestörte Implantation

Die Implantation des Embryos in das Endometrium findet nur während eines definierten Zeitraums und nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen statt. Nur innerhalb dieses Implantationsfensters besteht eine Rezeptivität des Uterus, und nur dann ist die Einnistung der Blastozyste in das Endometrium möglich. In einem normalen menschlichen Zyklus beginnt die Apposition der Blastozyste sechs Tage nach dem LH-Peak und ist etwa 10 Tage nach dem LH-Peak abgeschlossen (Lessey 2000).

Zur Erhöhung der Erfolgsraten einer extrakorporalen Befruchtung werden die Ovarien mit hohen Gonadotropindosen stimuliert. Diese Stimulation führt zu unphysiologisch hohen Östradiol- und Progesteronspiegeln. Das Endometrium reagiert darauf mit vorzeitigen postovulatorischen sekretorischen Veränderungen und einer asynchronen Entwicklung des Drüsen- und Stromagewebes in der mittleren Lutealphase (Fanchin et al. 1995, Basir et al. 2001, Bourgain et al. 2002). Es folgt eine embryo-endometriale Asynchronität mit einer gegenüber natürlichen Zyklen reduzierten Implantationsrate (Macklon und Fauser 2000).

Während des Implantationsfensters bildet das Endometrium Pinopodien. Diese Ausstülpungen befinden sich an der apikalen Oberfläche des luminalen Endometriumepithels (Nikas 1999b). Bei fertilen Frauen zeigte sich, dass die Pinopodienbildung und -regression vom Progesteroneinfluss abhängt (Stavreus-Evers et al. 2001). Verzögerte oder ungenügende Ausbildung von Pinopodien könnte Folge eines hormonell inadäquaten Endometriums sein, beziehungsweise Folge einer Asynchronizität im endometrialen Reifungsprozess. Unter ovarieller Stimulation im IVF-Zyklus erscheinen die Pinopodien etwa ein bis zwei Tage früher als im unstimulierten Zyklus, d. h. es kommt zu einer Verschiebung des Implantationsfensters in IVF-Zyklen (Nikas 1999a). Somit würde ein frühzeitig gereiftes rezeptives Endometrium einem noch unfertig entwickelten Embryo gegenüberstehen.

1.5.6 Immunologische Ursachen

Transplantiertes Gewebe eines genetisch fremden Individuums (Allograft) wird von den T-Zellen des Empfängers als fremd erkannt. Die Erkennung der fremden HLA-I-Moleküle führt zu einer abstoßenden Immunreaktion und damit zur Zerstörung des Allografts. Da es sich bei der Schwangerschaft um ein Hemiallotransplantat handelt – die vom Vater stammenden Antigene sind

für das mütterliche Immunsystem fremd – wurde nach den Überlegungen von Medawar eine der Transplantatabstoßung vergleichbare Reaktion für die Abstoßung der Schwangerschaft bei habituellen Aborten verantwortlich gemacht (Medawar 1953, Beer et al. 1981, Taylor und Faulk 1981). Die inzwischen vorliegenden Untersuchungen über HLA-Antigene des Trophoblasten haben diese Vorstellung allerdings in den Hintergrund treten lassen.

Zahlreiche Mechanismen zum Schutz des Embryos vor dem mütterlichen Immunangriff wurden bereits dargestellt. Angesichts der Komplexität ist jedoch ein Versagen der Schutzmechanismen mit der Folge einer immunologischen Abstoßungsreaktion nicht auszuschließen. Diese Möglichkeit wurde zunächst für Frauen mit wiederholten (habituellen) Aborten angenommen. Es wurde vermutet, dass die Erkennung der immunologisch fremden paternalen Antigene durch das mütterliche Immunsystem zur Abstoßung führen müsse, die Abstoßung jedoch durch eine gleichzeitig erfolgende Schutzreaktion verhindert würde (s. Abb. 7).

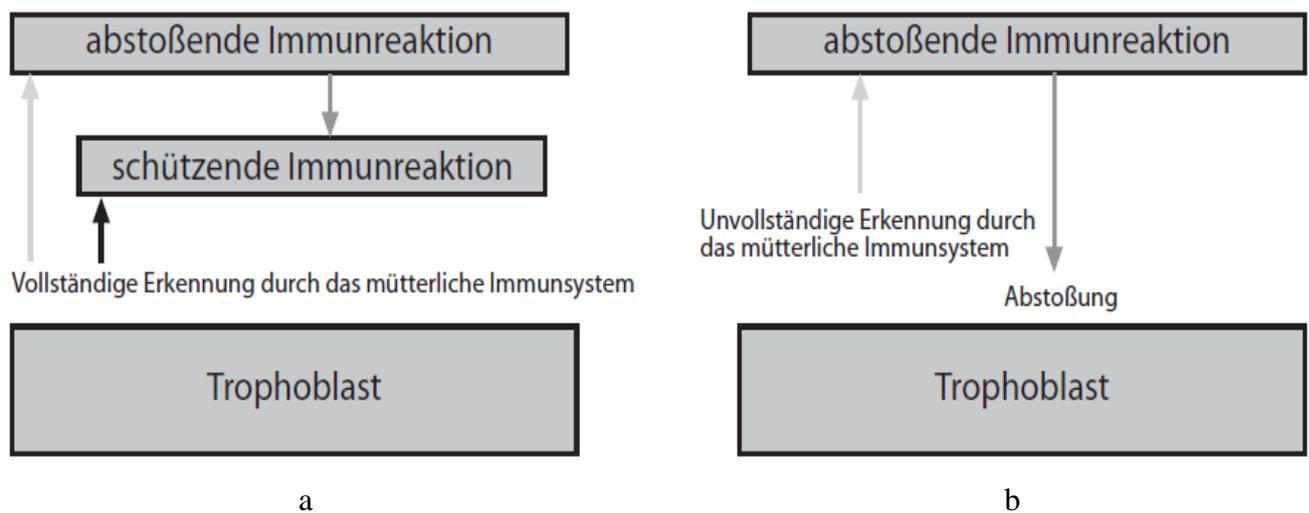


Abb. 7: Schematische Darstellung des Schutzes der Schwangerschaft vor der mütterlichen Immunreaktion.
 a: Die Schwangerschaft wird vollständig erkannt und führt zur Induktion einer abstoßenden und schützenden Immunreaktion.
 b: Die Schwangerschaft wird unvollständig erkannt, die Bildung der schützenden Reaktion unterbleibt, und die Schwangerschaft wird abgestoßen. Hinney (2001, S. 348).

Zu einer fehlerhaften Erkennung der Schwangerschaft sollte es insbesondere dann kommen, wenn die HLA-Merkmale beider Partner eine hohe Übereinstimmung, d. h. ein überzufällig hohes HLA-Sharing, aufwiesen. In derartigen Fällen sollte die zu hohe Ähnlichkeit der HLA-Antigene die Bildung der erforderlichen Schutzreaktion verhindern. Ältere Untersuchungen hatten bei Paaren mit

habituellen Aborten ein hohes HLA-Sharing nachweisen können, welches die Annahme immunologischer Ursachen habitueller Aborte unterstützte (Gerencer et al. 1979).

1.6 Möglichkeiten zur Erhöhung der Implantationsrate

1.6.1 Assisted Hatching

Im Jahr 1989 berichteten erstmals Malter und Cohen über eine steigende Implantationsrate durch assistiertes Hatching bei IVF-Embryonen. Die Zona pellucida wurde vor den Transfer mechanisch, enzymatisch oder durch einen Laser eröffnet (partial-zona-dissection). Das partielle Eröffnen sollte den folgenden Schlüpfprozess verbessern (Malter und Cohen 1989). Seif et al. untersuchten in einer Cochrane Analyse 28 Studien zum *assisted hatching*. Zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe gab es keinen Unterschied der Raten an Lebendgeburten. Sieben kontrollierte Studien ergaben eine OR für Lebendgeburten von 1.13, (95 % CI 0.83 bis 1.55). In diesen sieben Studien waren auch die Schwangerschaftsraten gleich (OR 1.13, 95 % CI 0.83 bis 1.54).

Unter Einschluss von 16 Studien "*more robust in methodology*" fand sich eine knapp signifikante Erhöhung der Schwangerschaftsraten durch *assisted hatching* (OR 1.20, 95 % CI 1.00 bis 1.45, P = 0.05) (Seif et al. 2006).

1.6.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika

Nichtsteroidale Antiphlogistika hemmen die Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure durch die Hemmung der Cyclooxygenase. Die Hemmung der Thrombozyten-Cyclooxygenase führt zu einer Verschiebung des Prostacyclin-Thromboxanverhältnisses zugunsten von Prostacyclin. Prostacyclin ist ein Gegenspieler von Thromboxan, da es eine Vasodilatation und keine Aggregation der Thrombozyten bewirkt. Es vermindert somit die Vasokonstriktion und die Thrombozytenaggregation mit der Folge einer verbesserten Uterusperfusion. Weiterhin kann der durch nichtsteroidale Antiphlogistika verminderte Prostaglandinspiegel die durch den Embryotransfer möglicherweise ausgelösten Kontraktionen vermindern und zu einer Relaxation des Uterus führen.

Eine prospektive, randomisierte Studie von Waldenström et al. untersuchte 2004 den Einfluss von *low-dose* ASS auf die Implantationsrate bei IVF-Behandlungen. Den Patientinnen wurden jeweils 75 mg ASS vom Tag des Embryotransfers bis zum Schwangerschaftstest verabreicht. Die Geburtenrate stieg bei den mit ASS therapierten Patientinnen um 4% an (Waldenström et al. 2004).

In einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden placebokontrollierten Studie untersuchten Moon et al. 2004 die Auswirkungen einer Piroxicam-Therapie vor Embryotransfer (einmalige Gabe

von 10 mg). Es fand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der Implantations- und Schwangerschaftsraten unter Piroxicam (Moon et al. 2004). Untersucht wurden 188 Embryotransfers und 78 Kryoembryotransfers. In der Therapiegruppe mit 94 Embryotransfers bzw. 39 Kryoembryotransfers wurde 10 mg Piroxicam oral ein bis zwei Stunden vor dem Embryotransfer verabreicht. In der Kontrollgruppe mit der gleichen Anzahl an Embryotransfers wurde ein Placebo gegeben. In der Therapiegruppe zeigten sich eine Implantationsrate von 18,7% und eine Schwangerschaftsrate von 46,8%, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer Implantationsrate von 8,6% und einer Schwangerschaftsrate von 27,6%.

In einer weiteren Studie von Päckilä et al. (2005) wurden insgesamt 374 Patientinnen unter IVF-Therapie eingeschlossen. Die Therapiegruppe mit 186 Patientinnen erhielt 100mg ASS oral, die Kontrollgruppe mit 188 Patientinnen erhielt Placebo. Die medikamentöse Therapie begann am ersten Tag der ovariellen Stimulation und wurde bei positivem Schwangerschaftstest bis zur Geburt fortgeführt. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der klinischen Schwangerschaftsraten von 23,7% versus 25,5% zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. In einer Studie von Lambers et al. (2009) wurden insgesamt 169 Patientinnen unter IVF-Therapie mit rezidivierendem Implantationsversagen behandelt. Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit tubarer Sterilität. In der Therapiegruppe erhielten 84 Patientinnen mit Beginn der ovariellen Stimulation 100mg ASS oral, die Kontrollgruppe mit 85 Patientinnen erhielt ein Placebo. Es ergab sich eine klinische Schwangerschaftsrate von 35,4% in der Therapie- und eine von 31% in der Kontrollgruppe. Es kam zu keiner signifikanten Verbesserung der Schwangerschaftsrate unter *low-dose*-ASS-Medikation bei Patientinnen mit rezidivierendem Implantationsversagen. In einem Cochrane-Review aus dem Jahre 2007 zur Gabe von *low-dose* Aspirin vor ET wurden Daten von 1.240 Patientinnen aus sieben Studien ausgewertet. In dieser großen Studie fand sich kein signifikanter Unterschied der klinischen Schwangerschaftsraten zwischen Therapie- und Kontrollgruppen. Die Autoren kommen daher zu der Schlussfolgerung, dass eine ASS-Therapie vor Embryotransfer nicht empfohlen werden kann (Poustie et al. 2007).

1.6.3 Corticoidtherapie

Eine Verbesserung der Implantation wird auch durch Gabe von Corticoiden angestrebt. Als Folge der Corticoidgabe werden eine immunmodulatorische Wirkung zur Reduktion der NK-Zellzahl, eine Normalisierung der Zytokinexpression im Endometrium und eine Suppression der endometrialen Entzündungsreaktion angenommen. In einer Cochrane-Analyse von 13 Studien, in denen die Gabe von Glucocorticoiden nach IVF oder ICSI zum Zeitpunkt der Implantation mit dem Verzicht auf Corticoide verglichen wurde, zeigte sich bei der Lebendgeburtenrate kein Unterschied zwischen den

beiden Gruppen (OR 1.21, 95 % CI 0.67 bis 2.19). Beim Vergleich der Schwangerschaftsraten zeigte sich ebenfalls kein Vorteil der Glucocorticoidtherapie (13 Studien; OR 1.16, 95 % CI 0.94 bis 1.44). Vorteilhaft erwies sich die Medikation allein in einer Subgruppenanalyse von 650 Frauen nach IVF (6 Studien, OR 1.50, 95 % CI 1.05 bis 2.13). Die Autoren schließen aus diesem Ergebnis, dass die Glucocorticoidgabe nach extrakorporaler Befruchtung keine signifikante Verbesserung des klinischen Erfolgs erwarten lässt, wenngleich die Therapie bei IVF-Patientinnen (im Gegensatz zu ICSI-Patientinnen) eine grenzwertige Erhöhung der Schwangerschaftsraten erkennen ließ (Boomsma et al. 2007).

1.6.4 Zytokintherapie

LIF: Das Zytokin Leukemia inhibitory factor (LIF) moduliert reproduktive Funktionen auf verschiedenen Ebenen. Während der embryonalen Entwicklung reguliert es die Migration von GnRH-Neuronen, beim Erwachsenen ist es an der GnRH-Freisetzung und der Regulation der LH- und Prolaktinsekretion beteiligt. Eine besondere Rolle wird LIF bei der Implantation zugeschrieben. Das während des Implantations-Fensters von den Pinopodien gebildete LIF beeinflusst offenbar den sich implantierenden Embryo, da der Embryo LIF-Rezeptoren exprimiert. Bei Mäusen führt LIF-Mangel zu Implantationsstörungen. Bei fertilen Frauen gilt eine hohe LIF-Expression als Indikator für ein rezeptives Endometrium. Recombinant hergestellter LIF (r-LIF, Emfilermin®) wurde zur Verbesserung der Implantationsrate bei wiederholtem Implantationsversagen eingesetzt (Aghajanova 2010). Nach ermutigenden Ergebnissen von Pilotstudien folgte eine randomisierte, doppelblinde Multicenterstudie. Frauen mit mindestens zwei erfolglosen extrakorporalen Befruchtungen erhielten vom Zeitpunkt des Embryotransfers sieben Tage lang tgl. 150 µg r-LIF. Diese Studie konnte keinen Vorteil der r-LIF-Therapie nachweisen. Bei 102 mit r-LIF behandelten Frauen kam es zu 18 Schwangerschaften (17,6 %), von 47 mit Placebo behandelten Frauen wurden 16 schwanger (34 %) (Brinsden et al. 2009).

TNF- α -Blocker: Th1-Zytokine – u. a. TNF- α – gelten nach dem Th1/Th2-Konzept als implantationshemmend. Zur Therapie von Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen und erhöhtem Th1/Th2-Verhältnis wurde daher in einer kleinen Studie ein TNF- α -Blocker (Adalimumab, Humira®) verabreicht. Winger et al. behandelten 6 dieser Patientinnen vor erneuter IVF mit 2 x 40 mg Humira®. Im folgenden IVF-Zyklus wurden 3 Patientinnen schwanger, alle Schwangerschaften wurden ausgetragen. In einer Kontrollgruppe ohne Adalimumab-Behandlung wurde von 5 Frauen keine schwanger. Die beiden Gruppen waren jedoch nur teilweise vergleichbar,

außerdem erfolgten Zusatzbehandlungen mit Heparin und ASS. Die zahlreichen möglichen Nebenwirkungen der TNF- α -Blocker-Behandlung werden nicht erwähnt (Winger et al. 2009).

G-CSF: Durch Bindung von HLA-C und -E über inhibitorische Rezeptoren an uterine NK-Zellen (KIR) wird unter anderem G-CSF gebildet (s. Abb. 1.5). G-CSF scheint eine besondere Bedeutung für die Implantation zu haben. Würfel et al. untersuchten eine Gruppe von Patientinnen mit wiederholtem Implantationsversagen bzw. ungeklärter Sterilität. Bei 78 % dieser Patientinnen fehlten aktivierende Rezeptoren (2 DS I, 2 DS 3 und 3 DS 5) für KIR. Diese Patientinnen wurden mit G-CSF (Lanogrostim, Granocyte®) behandelt. Die Autoren erzielten in dieser Gruppe durch G-CSF-Therapie hohe Schwangerschaftsraten: Nach Blastozystentransfer (Tag 5 nach Befruchtung) kam es in 42 Behandlungszyklen zu 31 klinischen Schwangerschaften (73,8 %), die Abortrate betrug 38,7%. Nach früherem Embryotransfer (Tag 2 nach Befruchtung) wurden 8 von 19 Patientinnen schwanger (42 %), es kam zu drei Aborten (Würfel et al. 2001). Möglicherweise wird die Implantation durch die G-CSF-bedingte Erhöhung der Treg-Zellzahl gefördert (Scarpellini und Sbracia 2009). (s. Kap. 1.6.5.1)

1.6.5 Aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten

Unter der Annahme immunologischer Ursachen habitueller Aborte wurden in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Strategien zur Abortprophylaxe entwickelt. Die Parallelen zur Organtransplantation führten zur Immuntherapie mit Partnerlymphozyten. Unter anderem hatte es mit der zunehmenden Durchführung von Nierentransplantationen Hinweise darauf gegeben, dass vorausgegangene Bluttransfusionen von Fremdspendern an Empfänger von Nierentransplantaten zur Verlängerung der Überlebenszeit von Nierentransplantaten führen (Festenstein et al. 1976).

Beer et al. behandelten 1981 in einer Pilotstudie drei Frauen bei Zustand nach habituellen Aborten präkonzeptionell mit Partnerlymphozyten. Indikation zur Therapie war ein ungewöhnlich hohes HLA-Sharing beider Partner (mehr als drei übereinstimmende HLA-Antigene). Zwei der drei Frauen wurden anschließend schwanger und trugen die nachfolgende Schwangerschaft aus. Beer begründete seine Therapie mit der Hypothese, die Partner seien sich hinsichtlich ihrer HLA-Antigene zu ähnlich, so dass das Immunsystem der Schwangeren die Schwangerschaft daher nicht als immunologisch fremd erkennen würde. Eine von ihm postulierte Schutzreaktion würde daher nicht induziert. Somit käme es zur Abstoßung der Schwangerschaft (s. auch Abb. 7, S. 24). Die „Drittortimmunisierung“ mit Partnerlymphozyten sollte die erforderliche Schutzreaktion induzieren (Beer et al. 1981, Beer et al. 1985).

Taylor und Faulk behandelten zur gleichen Zeit ebenfalls drei Patientinnen mit fremden Lymphozyten. Auf Grund des von ihnen entwickelten Konzepts der „*trophoblast-lymphocyte-crossreactive antigens*“ (TLX-Antigene) behandelten sie die Frauen während der Schwangerschaft mit Drittspenderlymphozyten. Alle drei Frauen trugen die Schwangerschaft aus (Taylor und Faulk 1981).

Weite Verbreitung fand die aktive Immuntherapie durch eine 1985 im Lancet publizierte Studie. Mowbray et al. hatten in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie 49 Frauen mit ungeklärten habituellen Aborten in der Frühschwangerschaft behandelt. Nach Ausschluss bekannter Abortursachen galt die Abwesenheit zytotoxischer Antikörper gegen T- und B-Lymphozyten des Partners als Hauptkriterium für die Aufnahme in die Studie. Im Therapiearm erhielten die Frauen Lymphozyten des Partners, im Placeboarm Lymphozyten aus Eigenblut. Von den mit Partnerlymphozyten therapierten Frauen trugen 17 von 22 die nächste Schwangerschaft aus, im Placeboarm waren es nur 10 von 27. Der Unterschied war im χ^2 -Test signifikant ($\chi^2 = 6,39$; $p = 0,01$) (Mowbray et al. 1985).

1.6.5.1 Vermutete Wirkmechanismen der aktiven Immuntherapie

Der exakte Mechanismus der Immuntherapie mit paternalen Lymphozyten ist unklar. Unter der Annahme eines ungewöhnlich hohen HLA-Sharings der Partner wurde zunächst angenommen, dass niedrige Spiegel von anti-paternal cytotoxic antibodies (APCA), anti-idiotypic antibodies (Ab2) und mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) bei RSA Paaren für die Hyporeagibilität verantwortlich seien (Mowbray et al. 1985). Manche Autoren vermuteten, dass die aktive Immuntherapie als Immunogen zur Verstärkung der mütterlichen Immunreaktion und zur Induktion verschiedener humoraler AK als immunologische Regulatoren zum Erhalt der Schwangerschaft dient. Es wurde ferner angenommen, dass humorale AK (APCA, Ab2 and MLR-Bf), die als Ergebnis der aktiven Immuntherapie gebildet werden, die fetalen HLA-Antigene maskieren und sie vor dem Angriff der maternalen T-Zellen schützen. Bei den als Folge der aktiven Immuntherapie gebildeten MLR-Bf handelt es sich um IgG3. Diese AK sind mit dem Erfolg der Schwangerschaft bei RSA assoziiert (Pandey et al. 2003).

Die aktive Immuntherapie führt weiterhin zu einer T-Zell-Suppression (Behar et al. 1993, Matsubayashi et al. 2000) und zu einer Abnahme des mütterlichen IL-2-Rezeptors (Kilpatrick 1992) mit der Folge einer Verschiebung der Th1- zur Th2-Typ Immunität (Hayakawa et al. 2000).

Check et al. berichteten über einen Anstieg von progesteroninduzierten BF (PIBF) bei Frauen mit RSA nach aktiver Immuntherapie. PIBF spielen möglicherweise durch Regulation des Th2-Shifts eine signifikante Rolle beim Erhalt der Schwangerschaft (Check et al. 1997).

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Implantationsraten und zur Senkung der Abortraten ist durch Erhöhung der Treg-Zellzahl, bzw. durch Aktivierung der Treg-Zellen zu erwarten. Es ist anzunehmen, dass die Exposition mit Trophoblastantigenen bei Frauen mit ungeklärter Sterilität oder RSA zur Boosterung der Treg-Zellzahl und damit zu einer erhöhten Immuntoleranz führt (Guerin et al. 2009). Tierexperimentelle Studien unterstützen dieses Konzept: Bei zu Aborten neigenden Mäusen (CBA/J x DBA/2) verhindern erhöhte Treg-Zellzahlen die Resorption (Zenclussen et al. 2005). Zum Zeitpunkt der Konzeption verabreichtes TGF β erhöht die vaginale Treg-Zellzahl und führt damit ebenfalls zu einer Senkung der Resorptionsrate im Mausmodell (Clark et al. 2008). In einer ersten klinischen Studie wurde RSA-Patientinnen G-CSF (Filgrastim[®]) zur Erhöhung der Treg-Zellzahl in den ersten 30 Tagen der Schwangerschaft verabreicht. Diese Therapie führte zu einer höheren Rate ausgetragener Schwangerschaften (Scarpellini und Sbracia 2009). Ein anderer Ansatz besteht darin, dendritische Zellen *in vitro* mit den HLA-Antigenen des Partners zu primen. Dieser Ansatz wurde bereits im Mausmodell erfolgreich zur Vermeidung der Graft versus host disease angewandt (Sato et al. 2003).

Ob es durch die aktive Immuntherapie zu einer Erhöhung der Treg-Zellzahl im Endometrium kommt, wurde bisher nicht untersucht. Die dargestellten Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass verschiedene Störungen der Schwangerschaft durch gleichartige immunologische Veränderungen verursacht werden können. Zu diesen Störungen gehören Implantationsversagen, wiederholte Aborte und Präeklampsie.

Es lag daher nahe, die zur Prophylaxe habitueller Aborte etablierte aktive Immuntherapie auch zur Therapie des wiederholten Implantationsversagens einzusetzen.

1.6.6 Passive Immuntherapie

1.6.6.1 Immuntherapie mit polyvalenten Immunglobulinen

Der mit der aktiven Immuntherapie verbundene Aufwand und die möglichen Risiken – vor allem die mögliche Übertragung von Infektionen – führten zur Entwicklung der passiven Immuntherapie. Unter der Annahme, dass die postulierten „schützenden Antikörper“ auch in polyvalenten Immunglobulinen enthalten sein sollten, führten Müller-Eckhardt et al. eine Pilotstudie an 20 Patientinnen mit habituellen Aborten durch. In einer Folgeschwangerschaft wurden die Frauen ab der 5. SSW alle drei Wochen intravenös mit polyvalenten Immunglobulinen (IVIG) behandelt.

Zum Zeitpunkt der Publikation waren elf gesunde Kinder geboren, 5 Frauen waren noch schwanger, drei davon im III. Trimenon. Es war zu lediglich drei Aborten und einer Extrauterin gravidität gekommen (Müller-Eckhardt et al. 1989).

Auf Grund der ermutigenden Ergebnisse folgte nachfolgend in Deutschland eine doppelblinde, randomisierte, placebokontrollierte Multicenterstudie. Insgesamt wurden 64 Frauen mit Zustand nach drei und mehr Aborten und keiner ausgetragenen Gravidität (primäre habituelle Aborte) in die Studie eingeschlossen. 33 Frauen erhielten während einer Folgeschwangerschaft IVIG als Verum, 31 Frauen erhielten 5 %iges Humanalbumin als Placebo. In der Verumgruppe trugen 20 Frauen die Schwangerschaft aus (60,6 %), in der Placebogruppe waren es 21 Frauen (67,7 %). Nachfolgende Studien führten zu ähnlichen Ergebnissen, ein signifikanter Vorteil der IVIG-Therapie konnte in keiner Studie festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der 2003 von Scott publizierten Cochrane-Analyse von 8 kontrollierten Studien (s. Abb. 8).

Fig. 03 Intravenous immune globulin

04.01 Live birth rate

Review: Immunotherapy for recurrent miscarriage

Comparison: 04 Intravenous immune globulin

Outcome: 01 Live birth rate

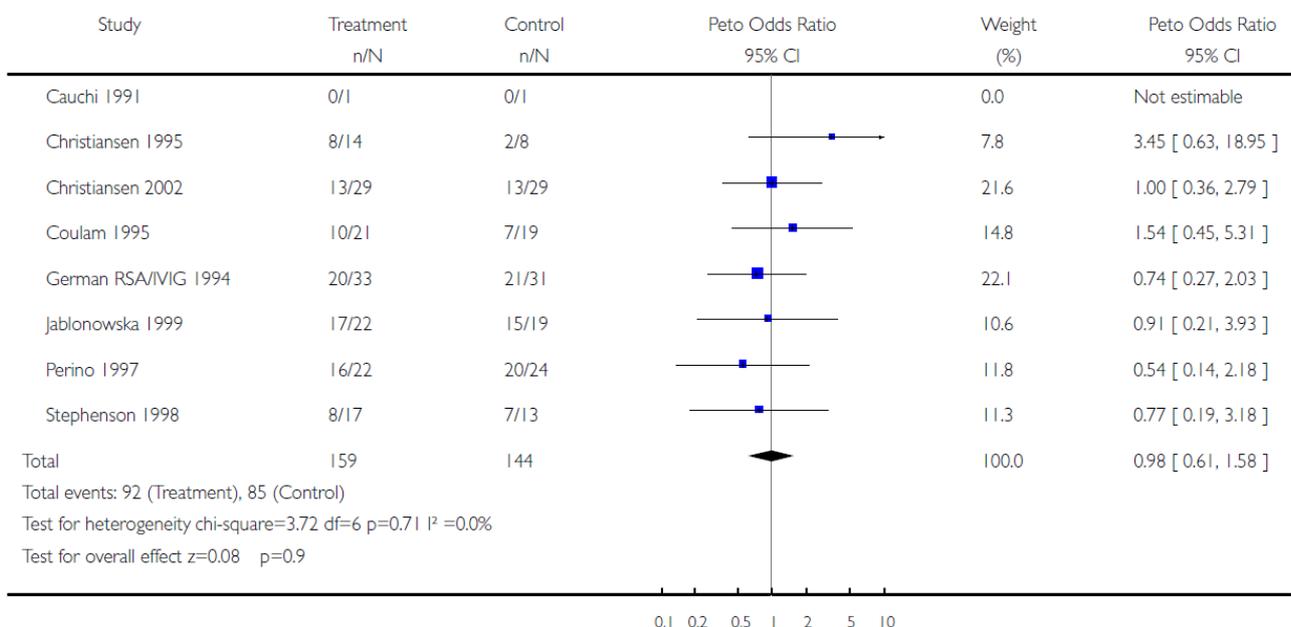


Abb. 8: Lebendgeburten nach passiver Immuntherapie mit IVIG und nach Placebobehandlung. Auswertung von 8 kontrollierten Studien. Scott (2003, S. 18).

1.6.6.2 Immuntherapie mit leukozytärem Ultrafiltrat

1999 wurde ein Ultrafiltrat aus Leukozyten (LeukoNorm®, Firma Cytochemia) u. a. zur Therapie von Frauen nach habituellen Aborten und zur Förderung der Implantation nach extrakorporaler Befruchtung zugelassen. Als wirksame Bestandteile wurden die von den Leukozyten gebildeten Wachstumsfaktoren angegeben. Eine erste Studie zur Therapie des wiederholten Implantationsversagens nach extrakorporaler Befruchtung wurde 2001 von Würfel et al. publiziert. In die Studie aufgenommen wurden Patientinnen, bei denen mindestens drei erfolglose Embryotransfers durchgeführt wurden. Ausgeschlossen wurden Endokrinopathien, uterine Fehlbildungen sowie Autoantikörpersyndrome.

Insgesamt führte Würfel drei Studien durch. Die Studien unterschieden sich im Hinblick auf die Häufigkeit und den Zeitpunkt der Gabe von LeukoNorm® im Rahmen der IVF/ICSI-Behandlung. Die Schwangerschaftsraten lagen bei niedrigen Patientenzahlen in allen drei Studienprotokollen höher als im Vergleichskollektiv. Von der dritten Studie liegen nur vorläufige Ergebnisse vor. Das Präparat wurde ab der Eizellentnahme an fünf folgenden Tagen appliziert. Bei insgesamt 20 behandelten Patientinnen kam es zu 11 Schwangerschaften, davon 8 klinische. Bei den 20 unbehandelten Patientinnen resultierten dagegen nur 4 klinische Schwangerschaften (Würfel et al. 2001).

Nach einer Entscheidung des Paul-Ehrlich-Instituts aus dem Jahr 2006 ist der therapeutische Nutzen des Präparats nicht ausreichend belegt. Das Präparat wurde deshalb vom Markt genommen.

1.7 Ziele der Arbeit

Im Zeitraum von 1987 bis 2002 wurde den in der Universitätsfrauenklinik Göttingen behandelten Kinderwunschpaaren nach drei oder mehr erfolglosen extrakorporalen Befruchtungen eine aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten zur Erhöhung der Konzeptionswahrscheinlichkeit angeboten.

Das Angebot wurde nur von einem Teil der Paare wahrgenommen. Es ergab sich dadurch die Möglichkeit, die Schwangerschaftsrate der Frauen, die eine Immuntherapie erhalten hatten, mit der Schwangerschaftsrate der Frauen, die auf die Immuntherapie verzichtet hatten, zu vergleichen.

In einer retrospektiven Untersuchung sollen die Schwangerschaftsraten beider Kollektive miteinander verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Durchführung der extrakorporalen Befruchtung

Zur Erzielung ausreichender Schwangerschaftsraten wird die extrakorporale Befruchtung im hormonell stimulierten Zyklus durchgeführt, d. h. durch hormonelle Stimulation der Ovarien werden mehrere Follikel zur Reife gebracht. Die extrakorporale Befruchtung ist zwar auch im natürlichen Zyklus möglich, da jedoch im Spontanzzyklus nur jeweils eine Oozyte gewonnen werden kann, sind die Schwangerschaftsraten mit 7,6 % pro Zyklus unzureichend (Fahy et al. 1995).

2.1.1 Hormonelle Stimulation

Die Stimulation der Ovarien erfolgt mit urinären oder rekombinanten Gonadotropinen. Zunächst war lediglich urinäres hMG (humanes Menopausengonadotropin) – eine Mischung aus etwa gleichen Teilen LH und FSH – verfügbar. In der Folgezeit ergab sich eine bessere Wirksamkeit von reinem FSH. Diese FSH-Präparate werden durch Separation von FSH aus urinärem hMG und seit 1995 gentechnologisch hergestellt (rekombinantes FSH, Gonal-F[®], Merck Serono, Darmstadt; Puregon[®], Organon/Essex Pharma, München).

Unter der hormonellen Stimulation kommt es bei ansteigendem Östradiolspiegel in etwa 10 – 20 % der Behandlungszyklen zur vorzeitigen Ausschüttung von LH bei noch nicht ausgereiften Follikeln. In diesen Fällen muss die Behandlung abgebrochen werden. Zur Vermeidung des vorzeitigen LH-Anstiegs hat sich die rechtzeitige Downregulation der Hypophyse durch GnRH-Analoga bewährt (DIR 2007). Verwendet wird Triptorelin (Decapeptyl[®], Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel); 0,1 mg werden täglich subcutan verabreicht. Mit der Therapie wird in der Lutealphase des Vorzyklus begonnen (langes Protokoll). Der „flare-up-Effekt“, d. h. die nach Gabe des Analogons zunächst erhöhte Gonadotropinausschüttung, findet somit vor Beginn der hormonellen Stimulation statt.

Die Dosierung der Gonadotropine beginnt nach sonographischem Ausschluss von Ovarialzysten zwischen dem 2. und 4. Tag des Folgezyklus unter GnRH-Therapie und erfolgt individuell. Im Mittel werden 150 IE FSH täglich subkutan verabreicht. Bei sehr jungen Frauen und vor allem bei Neigung zu polyzystischen Ovarien (PCO) wird eine geringere Dosis verwendet. Bei Frauen jenseits des 38. Lebensjahres wird mit einer höheren Dosis begonnen. Zusätzliche Parameter für die Wahl der Dosis sind das sonographische Bild der Ovarien und ggf. die Erfahrungen aus einem vorausgegangenem Zyklus. Bei der sonographischen und hormonellen Kontrolle des Follikelwachstums nach ca. 6 Stimulationstagen wird die FSH-Dosis ggf. korrigiert (s. Abb. 9).

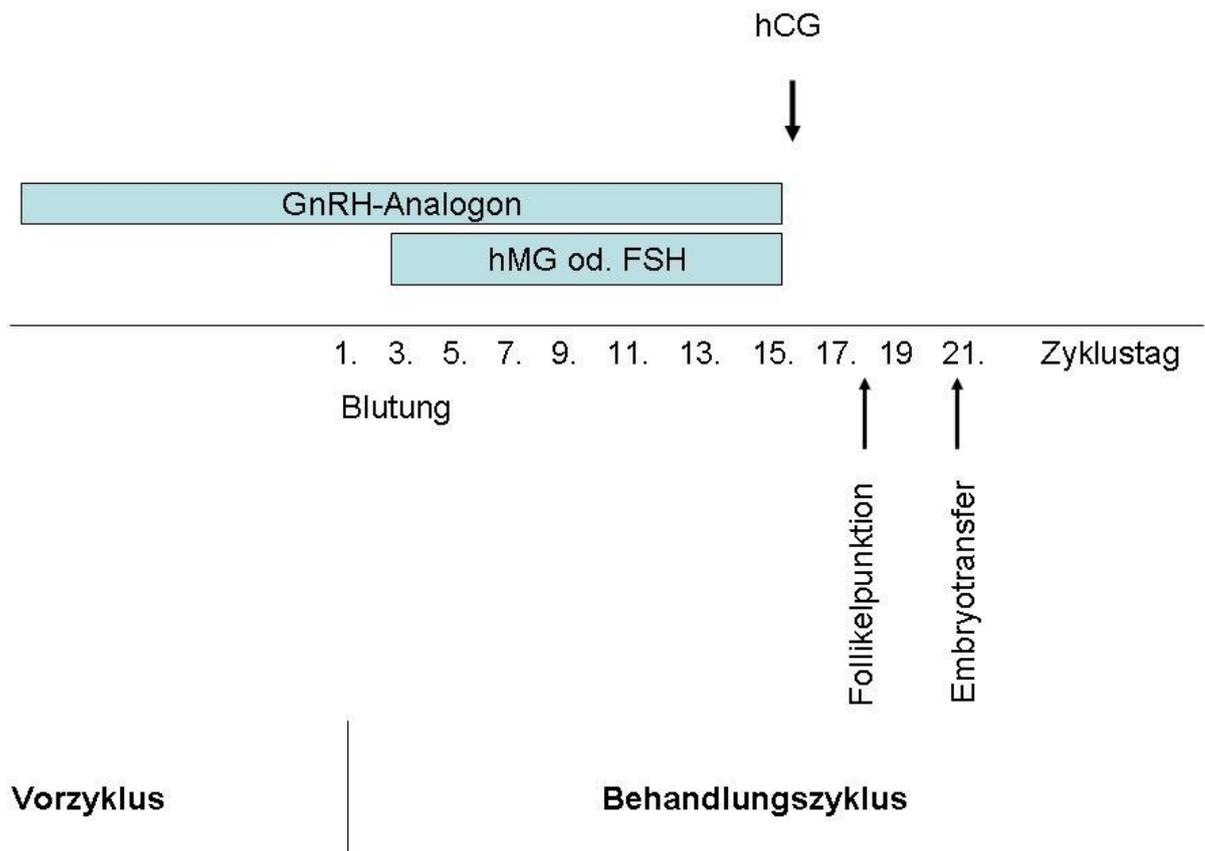


Abb. 9: Schema der hormonellen Stimulation zur extrakorporalen Befruchtung. In der Lutealphase des Vorzyklus (Zyklus vor hormoneller Stimulation) beginnt die tägliche Gabe eines GnRH-Analogons. Am 3. Tag des Behandlungszyklus beginnt die zusätzliche hMG- oder FSH-Therapie. Bei einer Follikelgröße von ca. 18 mm wird hCG i. m. injiziert. 36 Stunden nach hCG-Gabe erfolgt die Follikelpunktion. Zwei oder drei Tage nach IVF- oder ICSI-Therapie werden zwei (maximal drei) Embryonen transferiert.

2.1.2 Follikelpunktion

Die Follikelpunktion erfolgt unter Ultraschallkontrolle in Kurznarkose. Mit einer Einmalnadel (Innendurchmesser 1,4 mm) werden die Follikel unter vaginalsonographischer Sicht mit -300 mbar (Vakuumpumpe Fa. Labotect Göttingen, Deutschland) abgesaugt. Die gewonnene Follikelflüssigkeit wird unmittelbar anschließend durchgemustert. Unter dem Stereomikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) ist der Oozyten-Kumuluskomplex bei 50facher Vergrößerung gut erkennbar. Der Komplex wird in die Kulturlösung (IVF Universalmedium, Medicult[®], MediCult, Jyllinge, Dänemark) überführt und in 4-Loch-Schalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) im Brutschrank (Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) bei 37 °C unter 5 % CO₂ in Luft begast und kultiviert. Pro Punktion werden im Mittel 9,3 Oozyten gewonnen.

2.1.3. Spermienpräparation

Nach der Gewinnung durch Masturbation wird das Ejakulat zur Verflüssigung für ca. 10 Minuten in den Wärmeschrank gestellt. Mit einer Tuberkulinspritze (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) werden dann ca. 10 µl Ejakulat auf eine Makler-Zählkammer (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) übertragen und unter dem Mikroskop beurteilt (Gesamtzahl an Spermatozoen; Zahl pro ml Ejakulat; Gesamtmotilität in %; progressive Motilität in %).

Das Ejakulat wird anschließend mit Universalmedium (Medicult®) gemischt und zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 0,5 ml Universalmedium überschichtet und für 30 min im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit schwimmen die motilen Samenzellen in das überschichtete Medium auf (Swim-up-Verfahren). Das Medium mit den darin enthaltenen Spermatozoen wird dann vorsichtig abgenommen und für die IVF bzw. ICSI benutzt.

2.1.4. IVF-Behandlung

Von dem nach der Eizellpunktion gewonnenen und mit Hilfe der Swim-up-Technik aufgearbeiteten Ejakulat werden 2-5 Stunden nach der Follikelpunktion 1×10^5 motile Spermatozoen mit steriler Eppendorf-Spritze (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in die mit Kulturmedium (Merck, Darmstadt, Deutschland) und den Eizell-Kumulus-Komplexen gefüllten Löcher der 4-Loch-Schale pipettiert. Danach erfolgt eine Kulturperiode von 24 h im Brutschrank bei 37 °C unter 5 % CO₂ in Luft.

2.1.5 ICSI-Behandlung

Bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) werden die Oozyten vier Stunden nach Gewinnung mit Hilfe des Enzyms Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteurpipetten von den sie umgebenden Granulosazellen befreit und in Mediumtropfen übertragen. Nach der Präparation kann der Reifegrad der Oozyten am Vorhandensein des ersten Polkörpers festgestellt werden. Unreife Eizellen (fehlender Polkörper) werden nicht weiter behandelt. Die auf dem Boden einer Petrischale (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) liegenden Mediumtropfen sind mit einer Schicht von Mineralöl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) überdeckt, die das Medium vor Auskühlung und pH-Veränderungen schützt. In einen weiteren Tropfen werden Samenzellen des Ehemannes nach Ejakulataufarbeitung gegeben. Unter dem Mikroskop erfolgt bei 200facher Vergrößerung mit Hilfe eines Mikromanipulators (Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland) das Einfangen eines Spermatozoons und dessen Injektion durch eine Mikropipette (Ø 5 µm) (Eppendorf, Hamburg,

Deutschland) in das Ooplasma. Nach der Injektion werden die Oozyten, wie bei der IVF, für weitere 24 Stunden kultiviert.

2.1.6 Kontrolle nach 24 Stunden

24 Stunden nach Fertilisation werden die Oozyten bei 50facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop beurteilt. Als Zeichen der stattgefundenen Fertilisation lassen sich zu diesem Zeitpunkt zwei Vorkerne (Pronuklei) nachweisen, triploide Vorkernstadien werden verworfen. Maximal drei Pronukleusstadien dürfen weiter kultiviert werden. Die daraus entstehenden Embryonen müssen nach dem Deutschen Embryonenschutzgesetz im gleichen Zyklus, in dem sie entstanden sind, in den Uterus der Frau, von der die Oozyten stammen, übertragen werden. Um das Mehrlingsrisiko zu reduzieren, werden vorzugsweise nur zwei Embryonen pro Zyklus übertragen, d. h. es dürfen daher auch nur zwei PN-Stadien weiter kultiviert werden. Überzählige PN-Stadien können auf Wunsch des behandelten Paares kryokonserviert und in späteren Zyklen wieder aufgetaut und transferiert werden. „Überzählige Embryonen“ entstehen nicht.

2.1.7 Embryotransfer

48, bzw. 72 Stunden nach Gewinnung der Eizellen werden die entstandenen Embryonen in den Uterus der Patientin transferiert. Dazu werden alle vorhandenen Embryonen in die Spitze eines mit Kulturlösung gefüllten Katheters (Wallace Transferkatheter, Smith Medical, Grasbrunn, Deutschland) aufgenommen. Der Katheter wird möglichst schonend in die Gebärmutter eingeführt. Die Gebärmutterlänge wird zuvor sonographisch ermittelt. Die Spitze des Katheters wird zur Mitte der Gebärmutterhöhle vorgeschoben, dabei wird darauf geachtet, dass der Fundus nicht berührt wird. Die Embryonen werden anschließend mit möglichst geringem Flüssigkeitsvolumen (ca. 20 µl) in das Cavum uteri entlassen.

2.1.8 Lutealphase

Auf Grund der vorausgegangenen Downregulation der Hypophyse mit dem GnRH-Analogen ist wegen der unterdrückten LH-Ausschüttung eine gestörte Lutealfunktion mit erniedrigten Progesteronwerten zu erwarten. Zur Verbesserung der Einnistungsbedingungen wird daher Progesteron substituiert. Die Substitution erfolgt als vaginale Applikation von 3 x 2 Kapseln Utrogest[®] täglich (600 mg Progesteron) (Dr. Kade/Besins Pharma GmbH, Berlin) oder Crinone[®] 8% täglich (90 mg Progesteron) (Merck/Serono, Darmstadt) während der gesamten Lutealphase (14 Tage). Die beiden Präparate haben eine unterschiedliche Galenik. Die Wirksamkeit ist daher trotz unterschiedlicher Progesteronmengen gleich.

2.2 Indikationsstellung zur aktiven Immuntherapie

Die Indikation zur aktiven Immuntherapie mit Partnerlymphozyten wird nach mindestens dreimaligem erfolglosem Transfer von jeweils zwei bis drei als gut beurteilten Embryonen gestellt. Unter diesen Umständen wird die Möglichkeit einer immunologischen Störung der Implantation vermutet.

In der Universitätsfrauenklinik Göttingen und der Abteilung für Immunologie der Universität Göttingen werden seit 1984 aktive Immuntherapien bei Patientinnen mit habituellen Aborten durchgeführt (Neumeyer et al. 1985), seit 1987 werden auch Paare mit mehrfachem Implantationsversagen nach Embryotransfer behandelt.

Für die Indikationsstellung zur aktiven Immuntherapie mit Partnerlymphozyten stehen die Anamnese der Patientin sowie die Ergebnisse labormedizinischer Parameter im Vordergrund. Ein spezifischer immunologischer Test zur Auswahl der Paare existiert nicht. Die Indikation zur Therapie stützt sich somit auf eine Ausschlussdiagnostik.

2.3 Aktive Immuntherapie

2.3.1 Diagnostik vor aktiver Immuntherapie

Zur Diagnostik vor Immuntherapie gehört die Untersuchung des Serums beider Partner auf Virusinfektionen wie Hepatitis, HIV, Lues und CMV (HbsAg, HCV-Ak, HIV-1, -2-Ak, CMV-IgG, -IgM) und auf systemische Autoimmunerkrankungen bzw. Kollagenosen der Patientin. Des Weiteren werden zytotoxische antilymphozytäre HLA-Antikörper, erhöhte Anticardiolipinantikörper und Lupus-Antikoagulanzen bei der Patientin ausgeschlossen.

Als weitere Voruntersuchung werden die HLA-Moleküle der Klasse I (HLA-A, -B, -C) und die Moleküle der Klasse II (HLA-DR, -DQ) bei der Patientin und ihrem Partner typisiert. Bei HLA-Homozygotie des Partners und HLA-Haplotyp-Übereinstimmung mit der Patientin wird die aktive Immuntherapie wegen eines nicht völlig auszuschließenden Risikos der transfusionsassoziierten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) – einer Reaktion immunologisch kompetenter Zellen in einem Transplantat gegen das Gewebe eines genetisch nicht identischen Empfängers (Katz et al. 1992) – nicht durchgeführt. Zusätzlich wird die Patientin auf lymphozytotoxische HLA-Antikörper (antipaternale Antikörper) getestet (Mikro-Lymphozytotoxizitäts-Test nach Terasaki), (Terasaki und McClelland 1964). Der Nachweis dieser Antikörper ist ein Ausschlusskriterium für die aktive Immuntherapie, da in diesem Fall nicht von einer immunologisch bedingten Ursache des Implantationsversagens ausgegangen wird.

Zu den Risiken der Therapie zählen die Risiken jeder Übertragung von Blut- und Blutbestandteilen. So kann auch bei der Immunisierung mit Lymphozyten eine anaphylaktische Reaktion auftreten.

Der Partner weist in der Regel nicht die gleiche Blutgruppe wie die Partnerin auf und ist zudem oft Rh-inkompatibel. Eine sorgfältige Abtrennung der Erythrozyten vor Übertragung der Lymphozyten ist daher erforderlich. Weiterhin erhalten Rh-negative Frauen nach einer Immuntherapie mit Lymphozyten eines Rh-positiven Partners eine Anti-D-Immunprophylaxe.

Ein weiteres immunologisches Problem stellt die Bildung von irregulären erythrozytären, leukozytären beziehungsweise thrombozytären Antikörpern dar sowie die transfusionsassoziierte GvHD. Darüber hinaus besteht ein Risiko in der Übertragung von Infektionskrankheiten.

Bevor die Lymphozytensuspension zur Verwendung freigegeben wird, müssen die in Tab. 1 aufgelisteten Laboruntersuchungen durchgeführt werden.

	Partner	Patientin
Voruntersuchung	Anti-HIV 1/2 Anti-HCV HbsAg Lues-Serol. Anti-CMV Blutbild Blutgruppe (ABO/Rh/K) HLA I/II Antikörpersuchtest (Erythrozyten) Antikörpersuchtest (Thrombozyten) HLA-Antikörpersuchtest nach Terasaki	Anti-HIV 1/2 Anti-HCV HbsAg Lues-Serol. Anti-CMV Blutbild Blutgruppe (ABO/Rh/K) HLA I/II HLA-Antikörpersuchtest nach Terasaki
Immuntherapie	Anti-HIV 1/2 Anti-HCV HbsAg Lues-Serologie Anti-CMV HIV-RNA HCV-RNA HBV-DNA Blutbild Blutgruppe	Schwangerschaftstest
4 Wochen nach Therapie		HLA-Antikörpersuchtest nach Terasaki Cross-match Antikörpersuchtest (Erythrozyten) Antikörpersuchtest (Thrombozyten) Blutgruppe

Tab. 1: Diagnostik vor und nach aktiver Immuntherapie: Beide Partner werden einer serologischen HLA-Typisierung unterzogen. Die Testung auf antipaternale HLA-Antikörper ist Bestandteil des Mikrolymphozytotoxizitätstests nach Terasaki. Diese Testung erfolgt vor der aktiven Immuntherapie und vier Wochen danach. Weiterhin erfolgt die Testung auf Virusinfektionen.

2.3.2 HLA-Antikörpernachweis

Der Mikro-Lymphozytotoxizitäts-Test nach Terasaki (Terasaki und McClelland 1964) beruht auf der Komplement-vermittelten Zytolyse von Lymphozyten durch HLA-spezifische Antikörper. Voraussetzung für die Bindung des Antikörpers ist das Vorhandensein des entsprechenden Antigens auf der Lymphozyten-Zellmembran. Die Durchführung des Mikrolymphozytotoxizitätstest, Abb. 10, ist komplementabhängig und bildet die Grundlage für die serologische Bestimmung von HLA-Klasse I/II-Merkmalen sowie des Nachweises von HLA-Antikörpern. Hierbei werden die Komplementfaktoren durch Immunkomplexe von IgG und IgM aktiviert und vermitteln nachfolgend eine Zytolyse von Lymphozyten durch HLA-spezifische Antikörper. Die zytotoxisch geschädigte Zellmembran wird durchlässig für bestimmte Farbstoffe.

HLA-Antikörper können sowohl gegen HLA-Klasse-I, als auch gegen HLA-Klasse-II-Merkmale gebildet werden und sind in der Regel IgG-Antikörper. Der Nachweis solcher Antikörper ist ein Ausschlusskriterium für die aktive Immuntherapie.

Prinzip: Vitale Lymphozyten werden bei Inkubation mit zytotoxischen Antikörpern in Gegenwart von Komplement lysiert, wenn sie das korrespondierende HLA-Antigen an der Zelloberfläche besitzen. Der Nachweis der zytotoxischen Reaktion erfolgt im Färbeausschlussverfahren. Die lysierten Lymphozyten nehmen den Farbstoff auf (positive Reaktion), während die vitalen Zellen ungefärbt bleiben (negative Reaktion).

Material: Lymphozyten aus 5ml CPD-Vollblut (Citrat-Phosphat-Dextrose).

Durchführung: Terasaki-Platten (72 Kavitäten) (NUNC Brand Products, Langenselbold, Deutschland) mit Öl beschichten. In jede Kavität wird 1 µl Antiserum getropft. Die Isolierung der zu untersuchenden Lymphozyten erfolgt durch Dichtegradientenzentrifugation (Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) mit 2000 UpM. Anschließend werden 1 µl (ca. 2.000 Lymphozyten) der Zellaufschwemmung in jede Kavität gegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Zugabe von 5 µl Komplement (Merck, Darmstadt, Deutschland) und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min. Danach werden 5 µl Farbstoff Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und die Reaktion durch 5 µl Formalin (Merck, Darmstadt, Deutschland) gestoppt. Unter einem Umkehr-Phasenkontrast-Mikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena) mit Objektiv 10 x, Okular 10 x, erfolgt die Ablesung in 100facher Vergrößerung. Es werden die vitalen Zellen (nicht angefärbt) von den toten Zellen (angefärbt durch Eosin, welches nach Zerstörung der

Zellmembran in die Zellen penetriert), unterschieden. Der prozentuale Anteil der toten Zellen wird ermittelt und in einem Scorewert angegeben, s. Tab. 2.

Zytolyse in %	Scorewert
0-20	1 negativ
20-40	2 schwach positiv
40-60	4 positiv
60-80	6 positiv
80-100	8 positiv

Tab. 2: Auswertung des LCT-Test: der prozentuale Anteil der toten Zellen wird ermittelt und als Scorewert angegeben

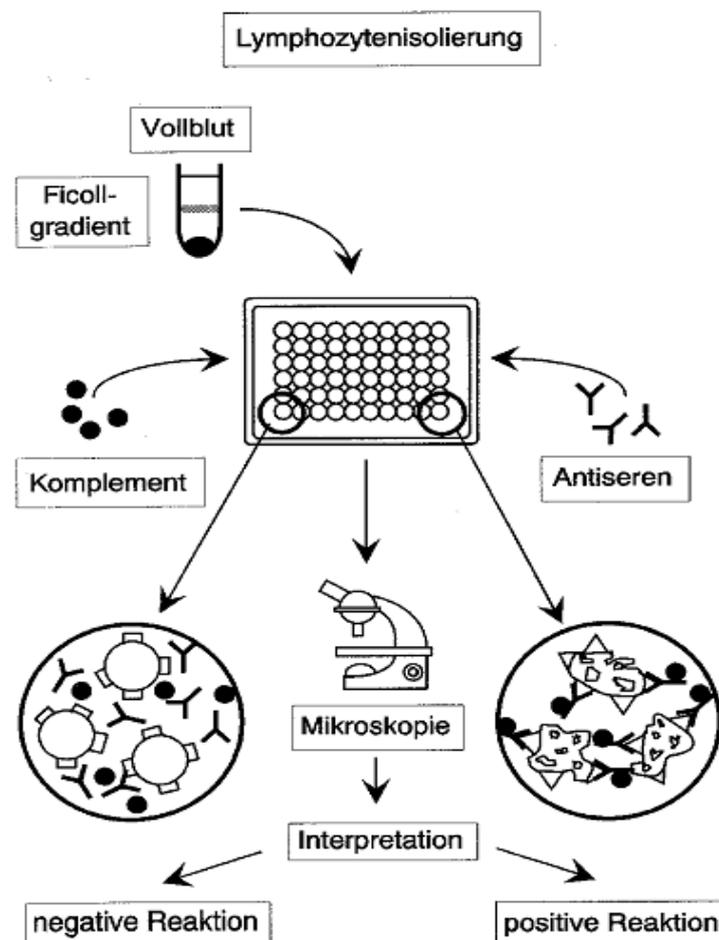


Abb. 10: Darstellung des Mikrolymphozytotoxizitätstest (LCT): Vitale Lymphozyten werden bei Inkubation mit zytotoxischen Antikörpern in Gegenwart von Komplement lysiert, wenn sie das korrespondierende HLA-Antigen an der Zelloberfläche besitzen. Der Nachweis der zytotoxischen Reaktion erfolgt im Färbessausschlussverfahren. Die lysierten Lymphozyten nehmen den Farbstoff auf (positive Reaktion), während die vitalen Zellen ungefärbt bleiben (negative Reaktion).

2.3.3 Ausschluss von der Immuntherapie

Ausschlusskriterien für eine aktive Immuntherapie sind ein positiver Nachweis zytotoxischer antilymphozytärer HLA-Antikörper, bekannte systemische Autoimmunerkrankungen bzw. Kollagenosen der Patientin, Virusinfektionen, maligne Grunderkrankung sowie HLA-Übereinstimmung zwischen den Partnern. Im Rahmen dieser Diagnostik mussten 4 Patientinnen aufgrund von Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose, M. Basedow, Glomerulonephritis sowie Antiphospholipidsyndrom) ausgeschlossen werden. Bei 2 Partnern wurde eine Virushepatitis neu diagnostiziert. Bei einer Patientin lagen zytotoxische antilymphozytäre HLA-Antikörper vor.

2.3.4 Durchführung der aktiven Immuntherapie

Die Infektionsdiagnostik erfolgt bei beiden Partnern entsprechend den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten. Aus 50 ml CPD-Vollblut (Citrat-Phosphat-Dextrose) des Partners werden über einen Ficollgradienten (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) in der Laminarflowbox (Spetec GmbH, Erding, Deutschland) 30-50 Millionen Lymphozyten separiert und in 1ml 0,9 % NaCl-Lösung suspendiert. Die Applikation erfolgt nach Vorliegen der aktuellen infektionsdiagnostischen Befunde des Spenders innerhalb weniger als 24 Stunden nach der Blutspende durch intrakutane Injektion an 10-15 Punktionsstellen an einem der Unterarme der Patientin. Danach wird die Patientin über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde beobachtet. Nach ca. vier Wochen erfolgt die Kontrolle des Immuneffektes anhand des HLA-Antikörpernachweises unter Verwendung von Spender-Lymphozyten. Bei stark positivem Nachweis von HLA-AK entfällt eine weitere Behandlung. Bei schwachem oder negativem Testergebnis wird eine zweite Immuntherapie 6-10 Wochen nach der ersten Behandlung durchgeführt. Die Behandlung ist nach der zweiten Immuntherapie abgeschlossen. Danach sollte im Verlauf des nächsten halben Jahres eine Gravidität angestrebt werden. Eine kurze schematische Darstellung des Immunisierungsprotokolls und der Vorgehensweise bei Immuntherapie zeigen Abbildungen 11 und 12.

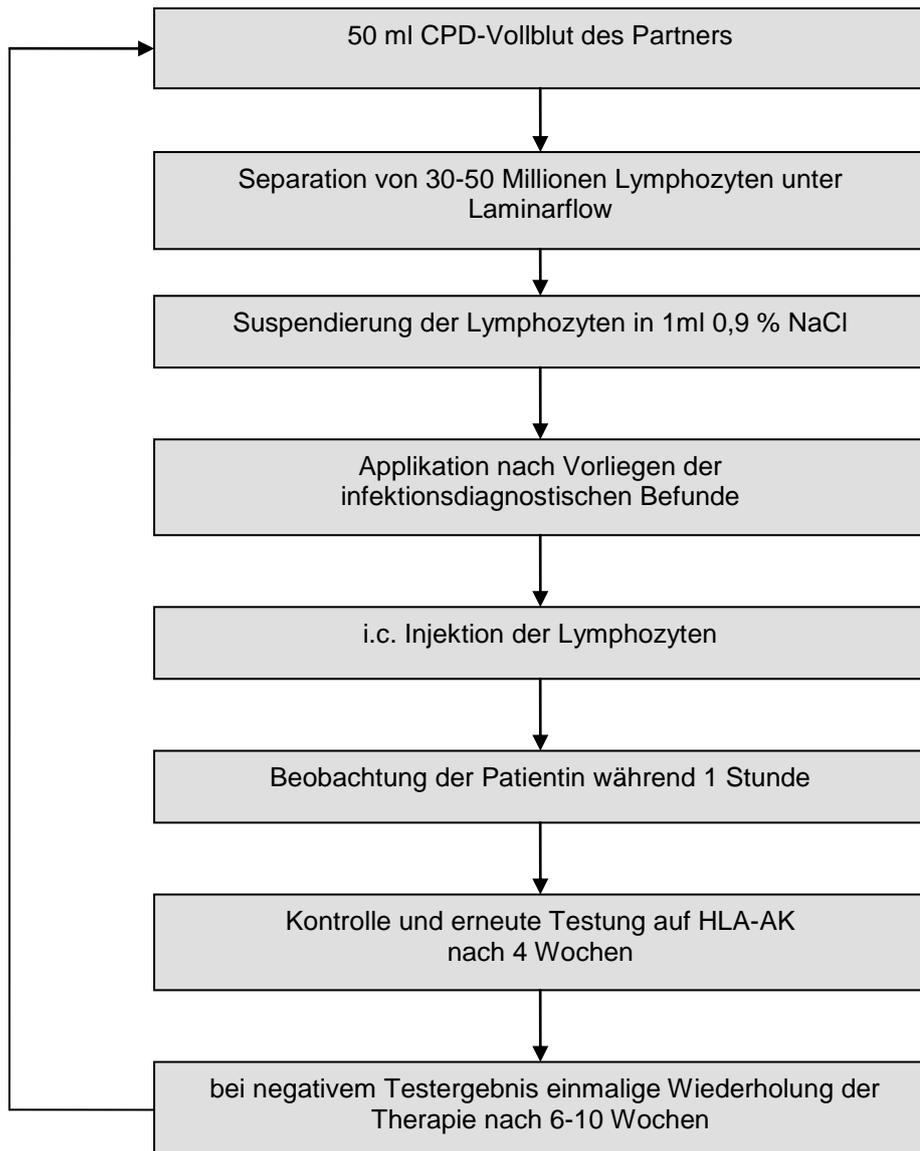


Abb. 11: **Immunisierungsprotokoll:** Am Tag der Immuntherapie wird bei der Patientin ein Schwangerschaftstest durchgeführt. Bei bestehender Schwangerschaft wird keine Immuntherapie durchgeführt. Bei negativem Ausfall des Schwangerschaftstestes wird der Partner gemäß den Kriterien für eine Blutspende nochmals untersucht. Bei Eignung zur Spende werden dem Mann 100 ml Vollblut entnommen. Aus diesem Blut werden die Lymphozyten isoliert. Nach Freigabe des Lymphozytenpräparates wird bei der Frau die Immuntherapie durchgeführt. Unter Herz-Kreislauf- und Temperaturüberwachung erfolgt die intracutane Injektion mit ca. 1 - 2,5 ml Lymphozytensuspension auf 10-20 Injektionsstellen am Unterarm verteilt. Die Kontrolle der AK-Bildung erfolgt ca. 4 Wochen nach der ersten Immuntherapie. Bei stark positivem Nachweis von HLA-AK entfällt eine weitere Behandlung. Bei schwachem oder negativem Ausfall des HLA-AK-Nachweises wird eine zweite Immuntherapie 6 - 10 Wochen nach der ersten Behandlung durchgeführt. Sie erfolgt entsprechend der ersten Behandlung. Die Behandlung ist nach der zweiten Immuntherapie abgeschlossen.

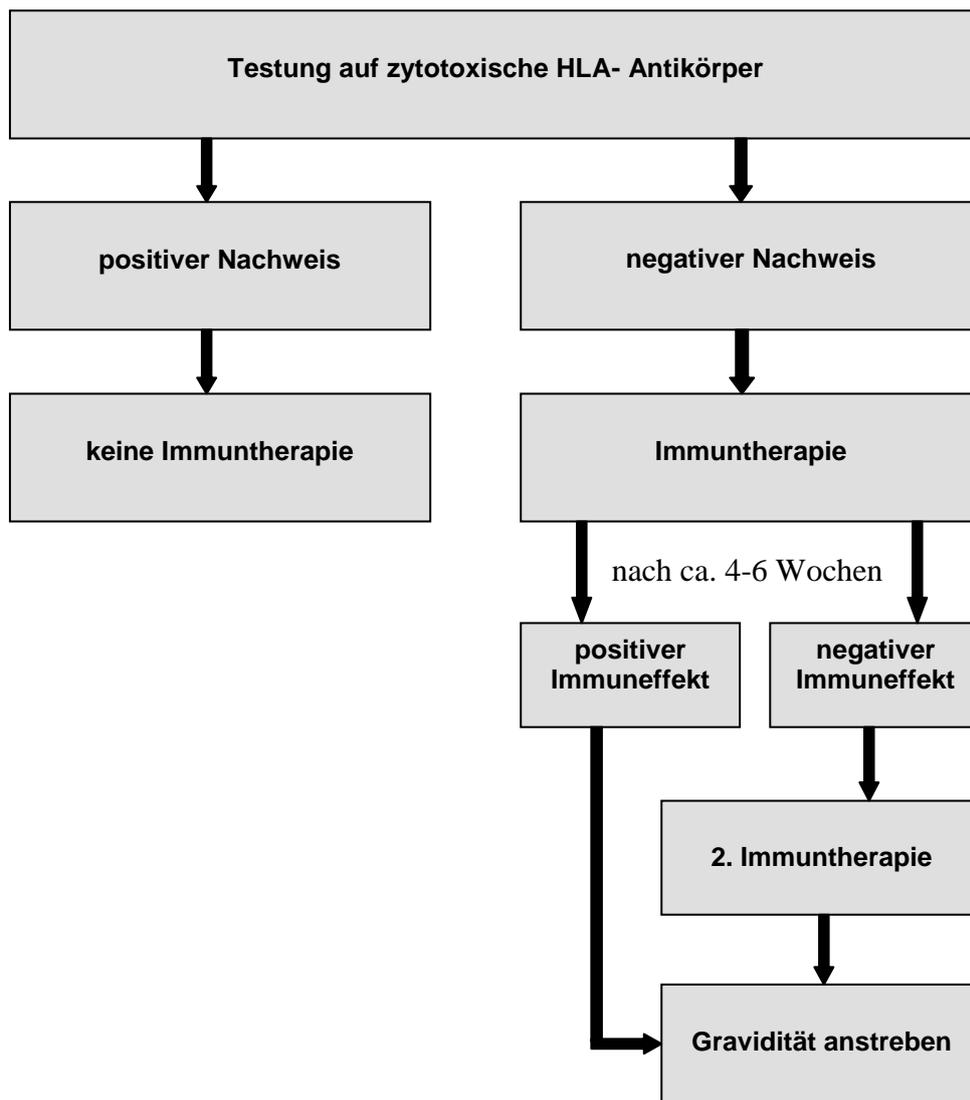


Abb. 12: Vor der aktiven Immuntherapie erfolgt eine Blutgruppenbestimmung und HLA-Typisierung. Außerdem werden das Vorliegen von HLA-Antikörpern sowie weiterer Antikörper gegen Blutgruppenmerkmale untersucht. Liegen bei dieser Voruntersuchung bereits HLA-Antikörper vor, so wird auf eine Immuntherapie verzichtet. Bei Fehlen dieser Antikörper ist eine Behandlung angebracht. 4 Wochen nach der ersten Behandlung wird das Blut der Patientin auf das Auftreten einer Immunreaktion anhand von HLA-Antikörpern untersucht. Bei positivem Ausfall soll eine Gravidität angestrebt werden, bei negativem oder schwachem Testausfall wird eine zweite Behandlung durchgeführt, während bei einem deutlichen Testergebnis nach der ersten Therapie keine weitere Immunisierung notwendig ist.

2.4 Statistische Auswertungen

Für die Statistik wurde das Computerprogramm STATISTICA für Windows, Version 9.0. StatSoft, Inc. Tulsa, USA verwendet. Zum Vergleich der Erfolgsraten im Therapiekollektiv mit der im Kontrollkollektiv wurde der Chi-Quadrat-Test genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich des Therapiekollektivs mit dem Kontrollkollektiv

In Abbildung 13 ist das Patientinnenkollektiv der retrospektiven Auswertung dargestellt. Von 72 Patientinnen mit 3 oder mehr erfolglosen Embryotransfers hatten 39 Frauen vor der nächsten IVF- oder ICSI-Behandlung eine Immuntherapie erhalten, 33 Frauen mit gleichen Voraussetzungen erhielten keine Immuntherapie, sie gelten daher als Kontrollgruppe.

In den Tabellen 3 und 4 sind alle Patientinnen der Therapie- bzw. Kontrollgruppe aufgeführt.

Angegeben sind das Alter der Patientin zu Beginn der Behandlung, die Indikation zur IVF-, bzw. ICSI-Behandlung, die Anzahl der vor dem Index-ET (d. h. des ersten ET nach Immuntherapie, bzw. des letzten ET, falls keine Immuntherapie durchgeführt wurde) durchgeführten Transfers mit Angabe der Zahl übertragener Embryonen, der Zahl der beim Index-ET übertragenen Embryonen und des Ergebnisses des Index-ET (Schwangerschaft eingetreten oder nicht eingetreten).

In Tabelle 5 werden beide Kollektive miteinander verglichen. 39 Patientinnen wurden nach mindestens drei erfolglosen ET mit einer Immuntherapie behandelt. 33 Patientinnen hatten ebenfalls vor dem letzten ET mindestens drei erfolglose ET, wurden aber nicht behandelt. Die Altersverteilung ist in beiden Gruppen nahezu gleich (s. Abb. 14). Die Zahl der vor dem Index-ET übertragenen Embryonen ist in beiden Kollektiven vergleichbar (s. Abb. 15). Vergleichbar sind auch die Indikationen zur IVF- bzw. ICSI-Behandlung. Alle Unterschiede sind nicht signifikant.

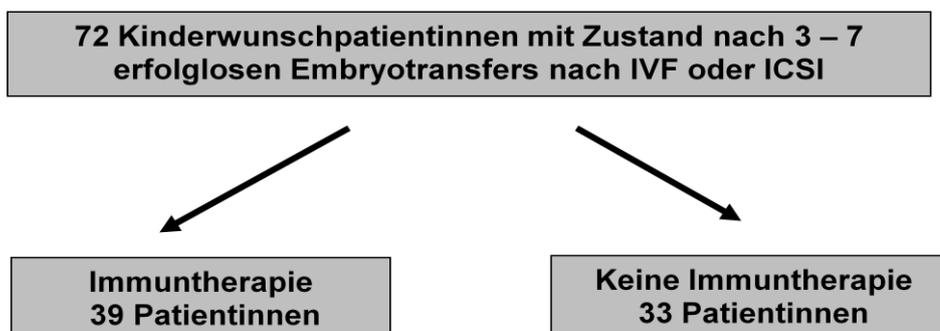


Abb. 13: Aufteilung des Patientinnenkollektivs in Therapie- und Kontrollgruppe.

Alter [J]	Indikation	ET1	ET2	ET3	ET4	ET5	ET6	ET7	ITher.	ETX	Grav.
32	tubar	1	3	3					ja	3	0
35	tubar	3	2	3					ja	3	0
40	tubar	3	3	2					ja	3	0
30	idiopathisch	3	3	2					ja	3	1
32	idiopathisch	2	1	3					ja	3	1
35	idiopathisch	3	3	3					ja	3	0
34	idiopathisch	1	2	3					ja	3	1
34	idiopathisch	3	3	2					ja	2	1
38	idiopathisch	1	3	3					ja	3	0
35	Endometriose	3	3	3					ja	3	0
34	andrologisch	2	2	2					ja	2	1
37	andrologisch	3	3	3					ja	3	0
36	andrologisch	1	2	3					ja	1	0
34	andrologisch	3	3	3					ja	3	0
35	tubar	2	3	3	3				ja	3	0
38	tubar	3	2	1	2				ja	2	0
27	tubar	1	2	2	2				ja	2	0
34	tubar	2	2	2	2				ja	2	0
31	tubar	3	3	3	3				ja	3	0
31	tubar	1	3	2	3				ja	3	0
37	tubar	2	2	1	3				ja	1	0
30	tubar	3	1	3	2				ja	2	0
37	idiopathisch	3	3	3	3				ja	3	1
39	idiopathisch	1	2	3	2				ja	1	1
31	idiopathisch	3	3	3	3				ja	3	0
36	Endometriose	2	2	1	2				ja	3	1
37	andrologisch	3	3	3	3				ja	3	0
31	andrologisch	2	2	2	2				ja	3	0
29	andrologisch	3	3	2	3				ja	2	0
27	andrologisch	1	3	3	3				ja	3	1
32	andrologisch	1	3	3	3				ja	3	0
28	tubar	2	3	3	2	3			ja	3	0
36	tubar	3	3	3	2	3			ja	3	0
39	tubar	3	3	3	2	3			ja	3	0
33	andrologisch	3	3	1	3	3			ja	3	0
36	tubar	2	3	2	3	2	3		ja	2	1
35	tubar	2	1	3	2	2	2		ja	1	0
28	idiopathisch	3	3	3	3	3	1		ja	3	0
35	idiopathisch	3	3	3	3	1	2	3	ja	3	0

Tab. 3 : **Therapiegruppe (n = 39)**. Patientinnen, bei denen nach mindestens drei vorausgegangenen, erfolglosen Embryotransfers vor einem weiteren Embryotransfer eine aktive Immuntherapie durchgeführt wurde. Angegeben sind Alter der Patientin zu Beginn der Behandlung, die Indikation zur extrakorporalen Befruchtung, die Anzahl der pro Embryotransfer übertragenen Embryonen, die Zahl der im Indexzyklus (nach Immuntherapie) übertragenen Embryonen und das Ergebnis des Indexzyklus (1 = Schwangerschaft, 0 = keine Schwangerschaft).

Alter [J]	Indikation	ET1	ET2	ET3	ET4	ET5	ET6	ET7	ITher.	ETX	Grav.
36	tubar	3	2	3					nein	3	1
33	tubar	3	3	3					nein	3	1
37	tubar	3	3	3					nein	3	0
34	tubar	1	2	1					nein	3	0
32	tubar	3	3	3					nein	2	1
30	tubar	3	3	1					nein	3	1
36	tubar	2	3	3					nein	3	0
34	tubar	3	3	2					nein	3	1
36	tubar	3	2	3					nein	3	0
39	tubar	3	3	3					nein	3	1
35	tubar	2	2	2					nein	3	1
36	tubar	1	1	1					nein	1	0
40	idiopathisch	2	2	2					nein	2	0
40	andrologisch	1	1	3					nein	3	1
32	andrologisch	3	2	3					nein	1	1
38	andrologisch	2	2	3					nein	3	0
33	andrologisch	1	3	2					nein	2	0
28	andrologisch	2	3	2					nein	2	1
38	tubar	1	1	1	2				nein	3	0
31	tubar	1	3	3	3				nein	3	0
32	tubar	3	3	3	3				nein	1	0
39	tubar	2	2	2	2				nein	1	0
31	tubar	2	2	3	2				nein	3	0
35	idiopathisch	3	2	3	3				nein	2	0
35	idiopathisch	1	3	3	1				nein	3	0
35	idiopathisch	2	2	2	2				nein	1	0
29	andrologisch	2	3	3	3				nein	3	1
36	andrologisch	2	2	3	2				nein	3	0
30	tubar	2	2	3	1	2			nein	3	1
34	tubar	3	3	3	3	3			nein	2	0
38	andrologisch	2	2	3	3	3			nein	2	0
35	tubar	3	3	3	3	3	1	3	nein	3	1
34	tubar	3	1	2	3	2	2	1	nein	3	0

Tab. 4: **Kontrollgruppe (n = 33)**. Patientinnen, bei denen nach mindestens drei vorausgegangenen, erfolgreichen Embryotransfers vor einem weiteren Embryotransfer keine aktive Immuntherapie durchgeführt wurde. Angegeben sind Alter der Patientin zu Beginn der Behandlung, die Indikation zur extrakorporalen Befruchtung, die Anzahl der pro Embryotransfer übertragenen Embryonen, die Zahl der im Indexzyklus (Vergleich zur Therapiegruppe) übertragenen Embryonen und das Ergebnis des Indexzyklus (1 = Schwangerschaft, 0 = keine Schwangerschaft).

	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
Patientinnen (n)	39	33
Alter (Median)	34	35
3 ET vor Index ET	14	18
4 ET vor Index ET	17	10
5 ET vor Index ET	4	3
6 ET vor Index ET	3	0
7 ET vor Index ET	1	2
vor Index ET übertragene Embryonen		
Mittelwert	2,49	2,37
Median	2,57	2,50
Indikationen		
tubar	16 (41,0 %)	21 (63,6 %)
andrologisch	10 (25,6 %)	8 (24,2 %)
Endometriose	2 (5,1 %)	0
idiopathisch	11 (28,2 %)	4 (12,1 %)

Tab. 5: Vergleich von Therapiegruppe und Kontrollgruppe bezüglich des Patientinnenalters, der Anzahl übertragener Embryonen und der Indikationen

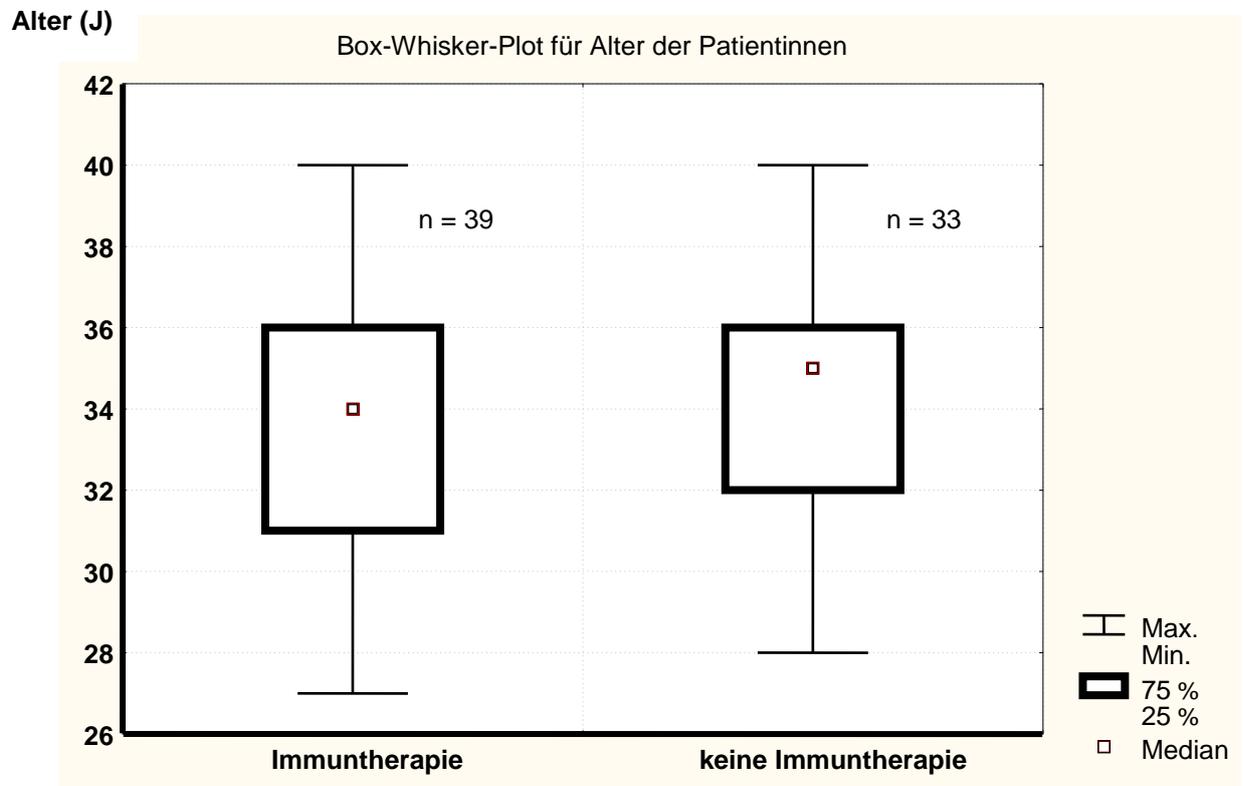


Abb. 14: Altersvergleich der beiden Patientinnenkollektive

Anzahl

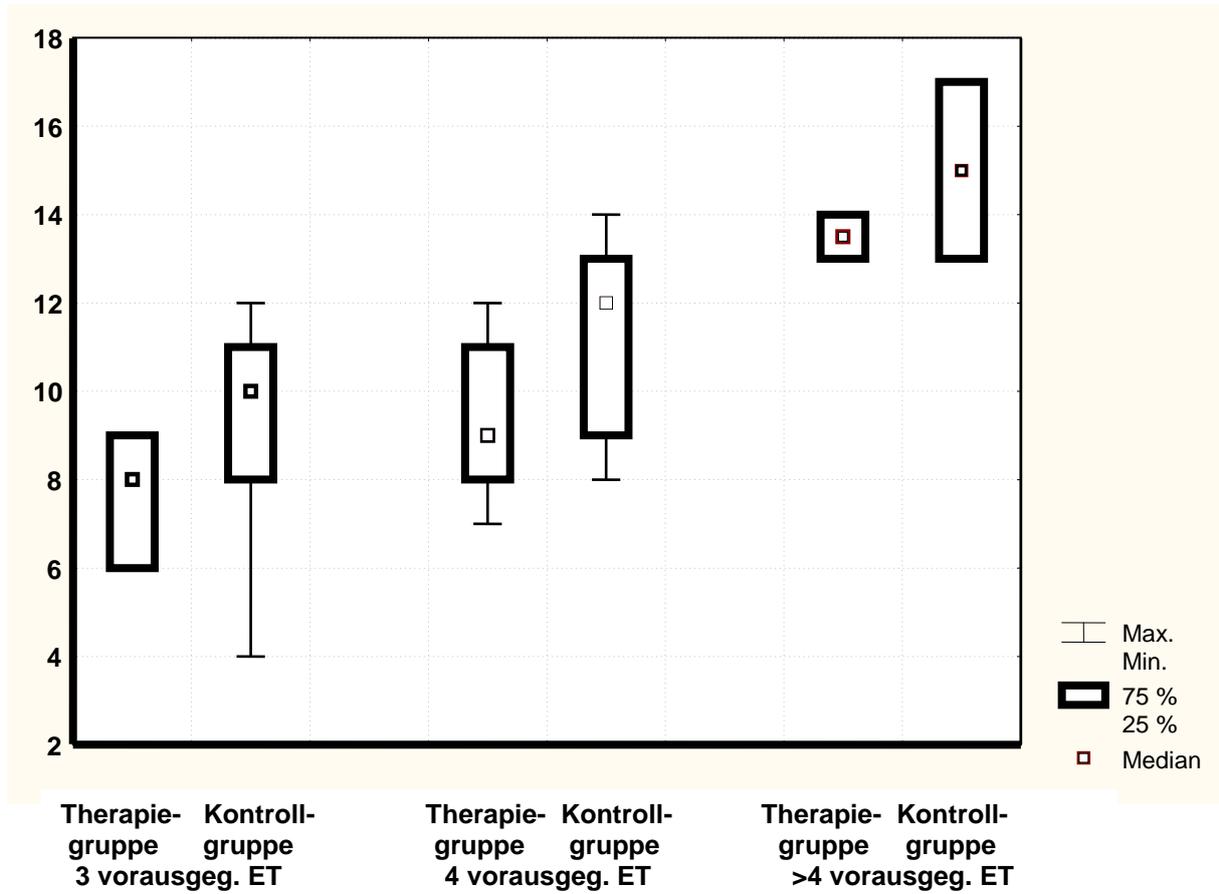


Abb. 15: Gegenüberstellung der Anzahl in der Therapie- und Kontrollgruppe übertragener Embryonen vor dem Indexzyklus.

3.2 Schwangerschaftsraten

In der Therapiegruppe wurden 10 von 39 Frauen schwanger. Dies entspricht einer Schwangerschaftsrate von 25,6 %. In der Kontrollgruppe wurden von 33 Frauen 13 schwanger (39,4 %) (s. Tab. 6 und Abb. 16). Der Unterschied ist im Chi²-Test statistisch nicht signifikant ($p = 0,21$).

In Tab. 6 und in Abb. 17 sind weiterhin die Schwangerschaftsraten nach der Anzahl zuvor durchgeführter ET untergliedert. Es gibt keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

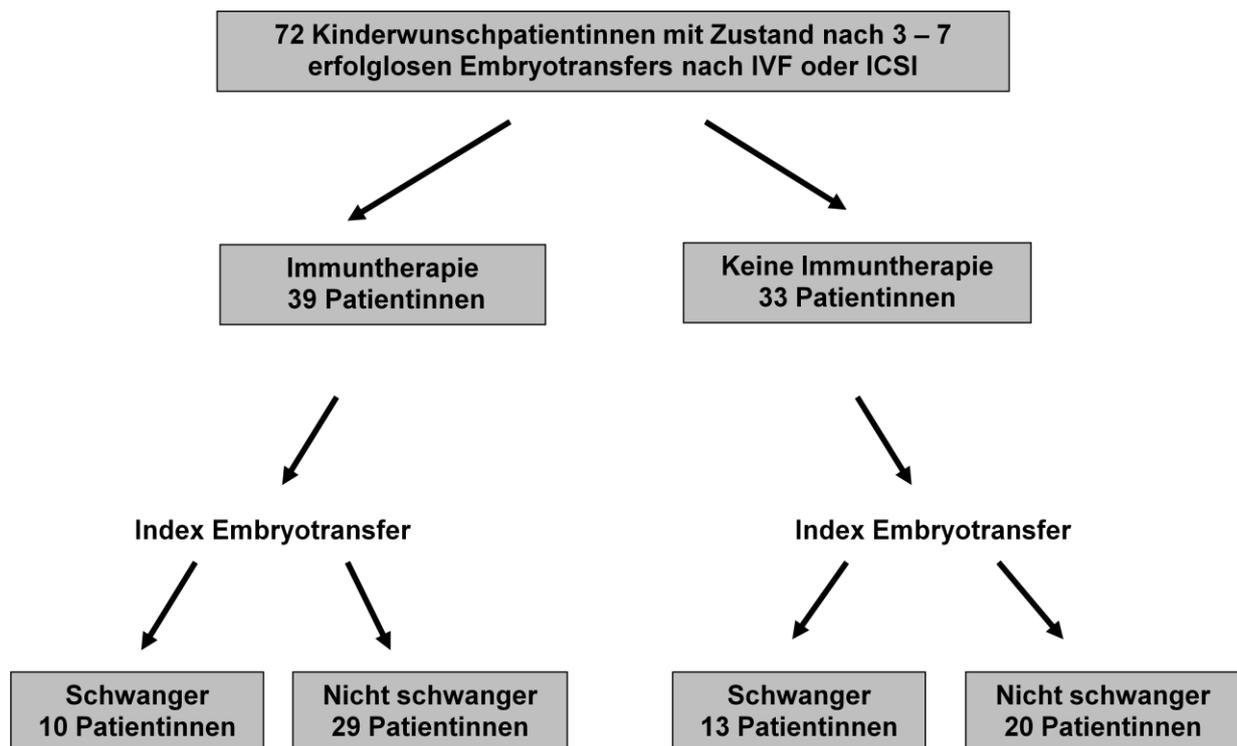


Abb. 16: Schwangerschaftsraten nach Index Embryotransfer mit und ohne vorausgegangene Immuntherapie

	Therapiegruppe	Kontrollgruppe	Chi ² -Test
Gesamt			
n	39	33	
Schwangerschaften (%)	10 (25,6 %)	13 (39,4 %)	p = 0,2124
3 vorausgegangene ET			
n	14	18	
Schwangerschaften (%)	5 (35,7 %)	10 (55,5 %)	p = 0,2645
4 vorausgegangene ET			
n	17	10	
Schwangerschaften (%)	4 (23,5 %)	1 (10 %)	p = 0,3821
> 4 vorausgegangene ET			
n	8	5	
Schwangerschaften (%)	1 (12,5 %)	2 (40 %)	p = 0,2523

Tab. 6: Schwangerschaften in der Therapie- und Kontrollgruppe

In Tabelle 7 sind die Schwangerschaftsraten in Therapie- und Kontrollgruppe nach Indikationen getrennt ausgewertet. Bei tubarer Sterilität wurde in der Therapiegruppe lediglich eine von 16 Frauen schwanger, in der Kontrollgruppe waren es dagegen 9 von 21. Dieser Unterschied ist im Chi²-Test signifikant (p = 0,0130). Die Schwangerschaftsraten bei andrologischer und idiopathischer Sterilität weisen zwischen Therapie- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede auf, allerdings sind die Gruppengrößen sehr klein. Dies gilt insbesondere auch für die Indikation Endometriose.

Angesichts des nicht erwarteten Unterschieds der Schwangerschaftsraten mit und ohne Immuntherapie bei tubarer Sterilität werden die beiden Gruppen hinsichtlich des Alters der Patientinnen und der Anzahl der vor und beim Index-ET übertragenen Embryonen in Tab. 8 miteinander verglichen. Es finden sich keine Unterschiede.

Indikation	Immuntherapie	nicht schwanger	schwanger	Chi ²
tubar	ja	15	1	
	nein	12	9	p = 0,0130
andrologisch	ja	8	2	
	nein	4	4	p = 0,1797
idiopathisch	ja	5	6	
	nein	4	0	p = 0,0565
Endometriose	ja	1	1	
	nein	0	0	

Tab. 7: Schwangerschaftsraten in der Therapie- und Kontrollgruppe nach Indikationen getrennt.

	Immuntherapie	Mittelwerte
Alter der Patientinnen mit tubarer Sterilität	ja	34,0 Jahre
	nein	34,4 Jahre
Übertragene Embryonen vor Index-ET	ja	10,2
	nein	9
beim Index-ET übertragene Embryonen	ja	2,4
	nein	2,6

Tab. 8: Vergleich der Patientinnen mit tubarer Sterilität hinsichtlich des Alters der Patientinnen und der Anzahl der vor und beim Index- ET übertragenen Embryonen.

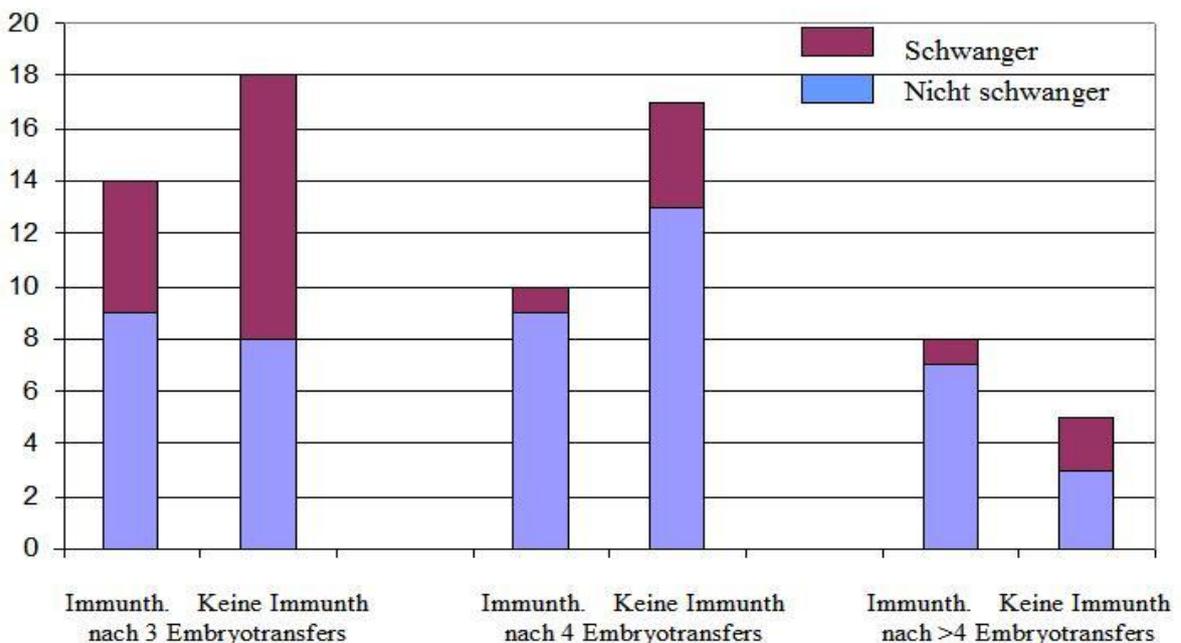


Abb. 17: Darstellung der Schwangerschaftsraten in der Therapie- und Kontrollgruppe.

In Tab. 9 und Abb. 18 sind die Schwangerschaftsraten beider Patientenkollektive in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen dargestellt. Es wurden drei Gruppen gebildet: < 30 Jahre, 30-35 Jahre und 36-40 Jahre. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind gering. Die zu erwartende Abnahme der Schwangerschaftsraten mit zunehmendem Alter lässt sich an beiden Kollektiven nicht nachweisen.

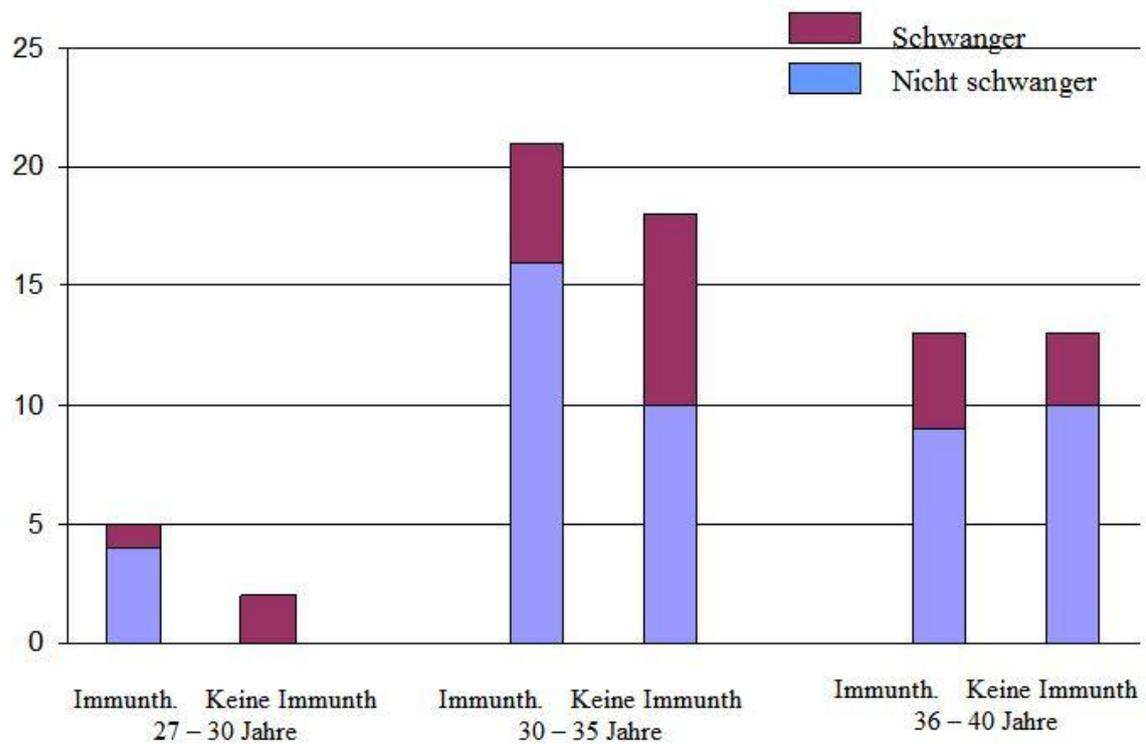


Abb. 18: Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Alter der Patientin.

	Therapiegruppe	Kontrollgruppe
< 30 Jahre n	5	2
Schwangerschaften (%)	1 (20 %)	2 (100,0 %)
30 – 35 Jahre n	21	18
Schwangerschaften (%)	5 (23,8 %)	8 (44,4 %)
36 – 40 Jahre	13	13
Schwangerschaften (%)	4 (30,8 %)	3 (23,1 %)

Tab. 9: Schwangerschaftsraten in Abhängigkeit vom Alter der Patientin.

3.3 Akute Nebenwirkungen der aktiven Lymphozyten-Immunisierung

In Bezug auf die Nebenwirkungen ist die aktive Lymphozyten-Immunisierung mit einer Schutzimpfung vergleichbar, zumal beide Maßnahmen bei gesunden immunkompetenten Personen durchgeführt werden. Die Immunisierung kann zu örtlichen und systemischen Beschwerden führen.

Die vorliegenden Daten basieren auf subjektiven Angaben der 39 behandelten Patientinnen sowie auf ärztlichen Kontrolluntersuchungen nach erfolgter Immuntherapie. Typischerweise prägte sich im Laufe der ersten Woche nach der Behandlung eine entzündliche Lokalreaktion aus, die vorwiegend in Rötung, Juckreiz und Schwellung bestand und binnen drei Wochen abflaute. Hiervon betroffen zeigten sich 30 der 39 Patientinnen (77%). Bei einer Patientin (2,6%) zeigten sich noch einige Wochen nach Therapie im Bereich der Injektionsstellen leicht livide, kleine Makulae, die jedoch ohne Narbenbildung abheilten. Zu den normalen Impfreaktionen gehören außerdem Fieber bis 38°C (rektal gemessen), Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen, Schwellung der regionalen Lymphknoten sowie gastrointestinale Symptome. Sie werden auf die Bildung von Immunkomplexen oder Ausschüttung von Zytokinen zurückgeführt und sind bei 2 - 10% der Impflinge zu erwarten (ACIP 1996). In unserem Patientinnenkollektiv wurden einzelne dieser Symptome bei 2 Patientinnen (5 %) beobachtet. Eine anaphylaktische Reaktion, ebenso wie eine Graft versus Host-Reaktion, wurde in unserem Kollektiv nicht beobachtet.

4 Diskussion

Die extrakorporale Befruchtung hat sich seit der ersten erfolgreichen Behandlung im Jahre 1977 (Stephoe und Edwards 1978) zu einer Standardtherapie der weiblichen und männlichen Sterilität entwickelt. In Deutschland werden derzeit etwa 1,2 % aller Kinder nach extrakorporaler Befruchtung geboren. Die mittlere Schwangerschaftsrate lag im Jahr 2007 bei 28,9 % pro Embryotransfer (DIR 2007). Trotz dieser scheinbar guten Ergebnisse sind die Schwangerschaftsraten pro übertragenen Embryo nicht zufriedenstellend. Im Mittel entwickeln sich nur 17 % aller übertragenen Embryonen zu einer Schwangerschaft (DIR 2006). Die Gründe für die geringen Schwangerschaftsraten sind vielschichtig. Genannt seien u. a. Probleme beim Embryotransfer, chromosomale Auffälligkeiten des Embryos, Probleme beim Verlassen der Zona pellucida (gestörtes Hatching), mangelhafte oder nicht zeitgerechte Entwicklung des Endometriums und Störungen bei der Implantation.

Bereits zu Beginn der Implantation kommt der Embryo in engen Kontakt zum mütterlichen Immunsystem. Dieser Kontakt ist nicht unproblematisch, da die Gene des Embryos nur zur Hälfte von der Mutter stammen. Die andere Hälfte stammt dagegen von dem für das Immunsystem der Mutter fremden Vater.

Die Auseinandersetzung des Embryos mit dem mütterlichen Immunsystem ist seit den ersten Arbeiten zu dieser Frage von Medawar (Medawar 1953) Thema kontroverser Diskussionen. Zunächst wurden die für das Immunsystem der Mutter fremden HLA-Antigene des Embryos für mögliche Abstoßungsreaktionen verantwortlich gemacht. Die ersten Studien betrafen Paare, bei denen es zu wiederholten (habituellen) Aborten gekommen war. In verschiedenen Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass die HLA-Antigene der Partner bei diesen Paaren überzufällig häufig übereinstimmen. Dieses HLA-Sharing wurde nachfolgend als mögliche immunologische Ursache habitueller Aborte angenommen. Eine Hypothese zur immunologischen Ursache habitueller Aborte ist in Abb. 6, S. 19 dargestellt. Die zu große Ähnlichkeit der HLA-Antigene sollte die Bildung einer zum Schutz der Schwangerschaft erforderlichen Immunreaktion verhindern. Als Folge dessen würden die als fremd erkannte HLA-Antigene – wie bei der Transplantatabstoßung – zur Abstoßung der Schwangerschaft führen. Die Art der „schützenden Immunreaktion“ war weitgehend unklar, u. a. wurde die Bildung „schützender Antikörper“ postuliert.

Unter der Annahme, dass die komplette Erkennung der Schwangerschaft bei zu hohem HLA-Sharing unterbleibt, wurden zur Induktion der Schutzreaktion verschiedene Therapieansätze entwickelt. Beer und Mitarbeiter führten die Immunisierung mit Partnerlymphozyten als „Drittortimmunisierung“ durch (Beer et al. 1981), Taylor und Faulk (Taylor und Faulk 1981) behandelten Patientinnen mit Drittpenderlymphozyten. Beide Therapieansätze waren zunächst erfolgreich.

Weite Verbreitung fand die Immuntherapie mit Partnerlymphozyten durch die 1985 publizierte Arbeit von Mowbray et al. In einer plazebokontrollierten Doppelblindstudie an Patientinnen mit habituellen Aborten, die entweder mit Partnerlymphozyten (Verum) oder Eigenblut (Plazebo) behandelt worden waren, konnte ein positiver Effekt der Partnerlymphozytentherapie gezeigt werden: Während in der Verumgruppe 77,3 % der Schwangerschaften ausgetragen wurden, waren es in der Plazebogruppe nur 37 % (Mowbray et al. 1985).

Eine 1994 publizierte Metaanalyse zur aktiven Immuntherapie bei Paaren mit habituellen Aborten zeigte für 7 von 8 Doppelblindstudien einen nicht signifikanten Vorteil der Immuntherapie gegenüber Plazebo. Die Gesamtauswertung der Metaanalyse ergab jedoch einen knapp signifikanten Vorteil der Immuntherapie (Daya und Gunby 1994), (Abb. 19).

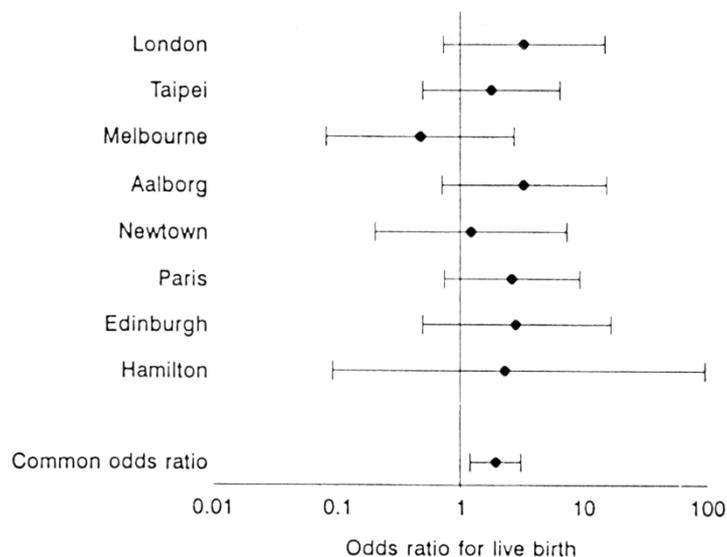


Abb. 19: Metaanalyse von acht plazebokontrollierten Studien zur Immuntherapie mit Partnerlymphozyten.

7 von 8 Studien zeigen eine höhere – aber nicht signifikant höhere – Rate ausgetragener Schwangerschaften nach aktiver Immuntherapie gegenüber einer Plazebothherapie. Die Metaanalyse ergibt im Vergleich zur Plazebobehandlung einen knapp signifikanten Vorteil der aktiven Immuntherapie. Daya und Gunby (1994, S. 298).

Eine spätere Cochrananalyse konnte die positiven Ergebnisse der aktiven Immuntherapie allerdings nicht bestätigen (Abb. 20, Scott 2003). In dieser Metaanalyse führte vor allem die Arbeit von Ober 1999 zu einer negativen Bewertung.

Fig. 00 Paternal white cell immunization vs placebo

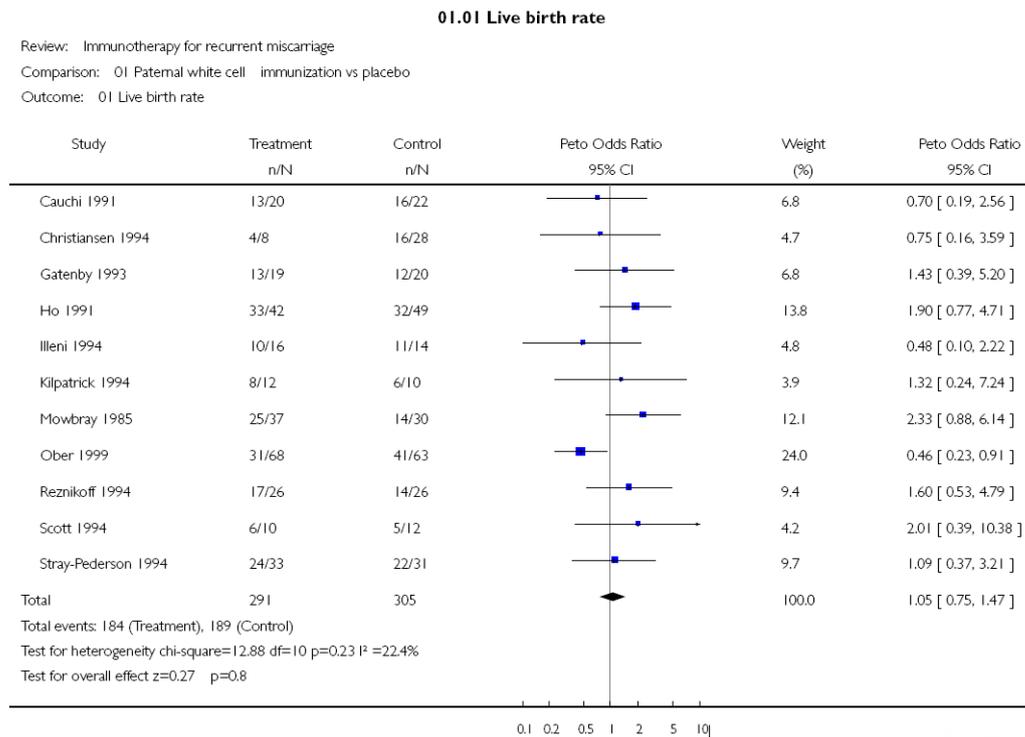


Abb. 20: Metaanalyse der Cochrane-Foundation zur Immuntherapie mit Partnerlymphozyten bei habituellen Aborten. Scott (2003, S. 17).

Auf Grund der zunächst beschriebenen Erfolge einer aktiven Immuntherapie bei Paaren mit habituellen Aborten entstand der Gedanke, dass Störungen der Implantation nach extrakorporaler Befruchtung ebenfalls auf immunologische Ursachen zurückzuführen und durch eine aktive Immuntherapie behandelt werden könnten. Eine immunologisch bedingte Implantationsstörung wird angenommen, wenn es nach drei oder mehr Transfers von offenbar gut entwickelten Embryonen nicht zum Eintritt einer Schwangerschaft gekommen ist (Rinehart 2007). Seit etwa 25 Jahren werden daher aktive Immuntherapien auch bei wiederholtem Implantationsversagen durchgeführt. Bisher fehlen jedoch kontrollierte Studien zur Wirksamkeit dieser Therapie.

Die vorliegende Studie diente dem Vergleich von zwei Patientenkollektiven. Im Zeitraum von 1987 bis 2002 wurde allen in der Sterilitätssprechstunde der Universitäts-Frauenklinik Göttingen behandelten Paaren nach mindestens drei vorausgegangenen erfolglosen Embryotransfers vor erneuter IVF- oder ICSI-Behandlung eine Immuntherapie mit Partnerlymphozyten angeboten. 39 Patientinnen ließen die Behandlung durchführen, 33 Patientinnen lehnten die Behandlung ab.

Ein Vergleich beider Gruppen ergab keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Alters der Patientinnen und hinsichtlich der Zahl zuvor übertragener Embryonen. Verglichen wurde die

Schwangerschaftsrate beider Gruppen im ersten IVF- oder ICSI-Behandlungszyklus nach der durchgeführten oder nicht durchgeführten Immuntherapie.

Der Embryotransfer nach Immuntherapie führte bei 10 von 39 Patientinnen (25,6%) zur Schwangerschaft, in der Kontrollgruppe mit 33 Patientinnen kam es zu 13 Schwangerschaften (39,4%). In dem hier untersuchten Kollektiv von 72 Paaren ergibt sich somit eine geringfügig höhere Schwangerschaftsrate in der Kontrollgruppe, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Die Aufgliederung der Schwangerschaftsraten nach der Zahl der zuvor durchgeführten Embryotransfers ließ ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven erkennen.

Überraschend war allerdings das Ergebnis der Auswertung nach Differenzierung der Kollektive hinsichtlich der Indikation zur extrakorporalen Befruchtung. Während sich bei der andrologischen und der idiopathischen Sterilität keine signifikanten Unterschiede der Schwangerschaftsraten nach erfolgter und nicht erfolgter Immuntherapie nachweisen ließen, war der Unterschied bei der tubaren Sterilität signifikant zuungunsten der Immuntherapie. Die Daten deuten darauf hin, dass die aktive Immuntherapie bei der tubaren Sterilität zur Senkung der Schwangerschaftsraten führt.

Angesichts dieses unerwarteten Ergebnisses wurden die mit Immuntherapie behandelten und die nicht behandelten Patientinnen mit tubarer Sterilität gesondert hinsichtlich des Alters und der Zahl zuvor übertragener Embryonen verglichen. Es fanden sich dabei keine Unterschiede. Es muss also vermutet werden, dass die aktive Immuntherapie bei Frauen mit tubarer Sterilität eine Senkung der Schwangerschaftsraten bewirkt.

Die Gründe für diesen ungünstigen Einfluss der Immuntherapie bei tubarer Sterilität sind unklar. Es können lediglich Hypothesen formuliert werden. Die Patientinnen mit tubarer Sterilität unterscheiden sich vor allem durch vorausgegangene genitale Infektionen von Patientinnen mit andrologischer oder idiopathischer Sterilität. Im Vordergrund stehen *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma genitalis* und Keime der bakteriellen Vaginose, in erster Linie Anaerobier (Soper 2010). Als Folge dieser Infektionen kann es zu beiderseitigen Tubenläsionen und zum Tubenverschluss kommen. Falls die Eizelle trotzdem befruchtet wird, kann eine Tubargravidität entstehen. Bei den genitalen Infektionen handelt es sich nahezu immer um aufsteigende Infektionen, d. h. die Keime gelangen von der Vagina über den Uterus – den Zervikalkanal und das Endometrium – in die Tuben. Im Uterus kommt es sehr selten zu bleibenden Folgen der Infektion. Möglicherweise werden jedoch die eventuell noch latent vorhandenen Infektionen des Endometriums durch die Immuntherapie reaktiviert. Dies könnte sich ungünstig auf die Nidation auswirken und eine Ursache für den negativen Effekt der Immuntherapie bei tubarer Sterilität sein.

Zur Therapie von immunologisch bedingten Implantationsstörungen liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Der klinische Erfolg ist kaum beurteilbar, weil in den bisher vorliegenden Publikationen nur die Schwangerschaftsraten nach aktiver Immuntherapie dargestellt wurden. Es fehlte jedoch ein unter gleichen Bedingungen behandeltes Kontrollkollektiv.

In einer Studie aus dem Jahr 1993 wurden an zwei verschiedenen IVF Zentren (Göttingen und Leuven) 20 bislang erfolglos therapierte Sterilitäts-Patientinnen mit Partner Lymphozyten immunisiert, um eine Verbesserung der Schwangerschaftsrate im weiteren Verlauf der Sterilitätstherapie zu erzielen (Kuhn et. al. 1993). Einschlusskriterien war der fehlende Schwangerschaftserfolg nach mindestens acht Inseminationszyklen bzw. mindestens drei IVF Zyklen mit Transfer von drei morphologisch guten Embryonen und fehlendem Nachweis von antipaternalen zytotoxischen Antikörpern (negativer Mikrolymphozytotoxizitätstest). Jeweils zehn Patientinnen wurden an den beiden teilnehmenden IVF Zentren behandelt. Das mittlere Alter der Patientinnen bei Eintritt in die Studie betrug $32,7 \pm 3,8$ Jahre. Bei zehn Patientinnen lag eine tubare Sterilität vor, die anderen zehn hatten nachgewiesen durchgängige Tuben. In einem der beiden IVF-Zentren (Göttingen) wurden die Lymphozyten durch Dichtegradientenzentrifugation aus einem Buffy Coat, im anderen IVF Zentrum (Leuven) mittels Dichtegradientenzentrifugation aus 50ml heparinisiertem Vollblut gewonnen. Die Testung auf antipaternale Antikörper erfolgte zwei Wochen nach der Immunisierung. Die Immunisierung verlief bei 19 Patientinnen erfolgreich, eine Patientin reagierte nicht. Innerhalb von $3,1 \pm 2,3$ Monaten nach Immunisierung mit Partnerlymphozyten wurden 10 Patientinnen schwanger. In 3 Fällen trat die Schwangerschaft spontan ein, 2 Patientinnen konzipierten nach zwei bzw. vier Inseminationszyklen. Die anderen 5 Schwangerschaften kamen nach jeweils einem IVF Zyklus zustande. Von den 10 erzielten Schwangerschaften führten 9 zur Geburt gesunder Kinder; eine Patientin erlitt einen Abort. Aus den Ergebnissen dieser Studie wurde auf einen positiven Einfluss der Immuntherapie mit Partnerlymphozyten auf die Schwangerschaftsrate bei Implantationsversagen geschlossen.

Im Jahr 1994 untersuchten Carp et al. drei Gruppen von Patientinnen. Ziel der Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss die aktive Immuntherapie auf die Frühschwangerschaft hat, und ob sie in der Lage ist, die Implantationsrate zu erhöhen. Hierzu wurden drei verschiedene Patientenkollektive im Alter von 20-40 Jahren gebildet: die erste Gruppe mit insgesamt 12 Patientinnen schloss nur Frauen mit wiederholten – mindestens drei – biochemischen Schwangerschaften ein. Die zweite Gruppe mit insgesamt 10 Patientinnen hatte in der Vorgeschichte mindestens drei erfolglose IVF-Behandlungen mit Transfer von jeweils drei morphologisch guten Embryonen; die dritte Gruppe beinhaltete 23 Patientinnen mit mindestens drei Aborten in der

Vorgeschichte. Ausschlusskriterium für die Durchführung der aktiven Immuntherapie war der positive Nachweis zytotoxischer antipaternaler Antikörper. In der ersten Gruppe mit 12 Patientinnen, welche aufgrund von rezidivierenden biochemischen Schwangerschaften mit einer aktiven Immuntherapie behandelt wurden, resultierten 10 Schwangerschaften (83,3%). In Gruppe zwei und drei mit insgesamt 33 Patientinnen wurden 79 IVF Zyklen durchgeführt. Hieraus resultierten insgesamt 20 Schwangerschaften, das entspricht einer Schwangerschaftsrate von 25,3% pro IVF Zyklus. Von den 20 Schwangerschaften traten 8 im ersten IVF Zyklus auf, 4 im zweiten Zyklus. Die restlichen Schwangerschaften verteilten sich auf den vierten, fünften, sechsten und achten Zyklus. In der zweiten Gruppe, mit mindestens drei erfolglosen IVF-Behandlungen in der Vorgeschichte, resultierte eine Schwangerschaftsrate von 20,0%: Von 10 Patientinnen wurden 6 in insgesamt 30 IVF Zyklen schwanger. In der dritten Gruppe mit 23 Patientinnen, mit mindestens drei habituellen Aborten, ergab sich eine Schwangerschaftsrate von 28,6%, 14 Schwangerschaften in insgesamt 49 IVF Zyklen.

Umfangreiche Patientenzahlen wurden in retrospektiven Analysen der Jahre 1996-1998 (Kling et al. 2002) und 1999-2002 (Kling et al. 2007) aus dem Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, publiziert. Im Zeitraum 1996-1998 erhielten insgesamt 769 Paare nach mindestens zwei – im Mittel 3-4 – erfolglosen Embryotransfers (ET nach Follikelpunktion oder ET nach Übertragung zuvor eingefrorener PN-Stadien) eine aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten. Die IVF-Behandlung setzten 686 Paare fort. Die Auswertung erfolgte zwei bis drei Jahre später nach im Mittel 2,6 weiteren Embryotransfers. In diesem Zeitraum hatten 289 Paare (42,3%) ihren Kinderwunsch erfüllt. Davon 251 durch IVF- bzw. ICSI-Behandlung, 33 nach spontaner Konzeption und 5 nach heterologer Insemination. Im Laufe von zwei bis drei Jahren wurden 459 Frauen (68%) einmal, 211 Frauen (30%) zweimal und 16 Frauen (2%) dreimal immunisiert. Einschlusskriterien zur Durchführung der Immuntherapie waren mindestens zwei erfolglose Embryotransfers nach IVF-Behandlung oder nach dem Auftauen zuvor eingefrorener PN-Stadien mit morphologisch gut beurteilten Embryonen. Ausschlusskriterien waren der positive Nachweis zytotoxischer antilymphozytärer HLA-Antikörper sowie Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten. Die Lymphozyten des Partners wurden aus 50ml heparinisiertem Vollblut über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Nach vier Wochen erfolgte die Testung auf Antikörper. Bei negativem Ergebnis wurde eine Wiederholung der Immunisierung vor erneuter IVF Behandlung empfohlen. Im Hinblick auf das Alter der Patientinnen zeigte sich die Fertilität bis zum Alter von 36 Jahren annähernd konstant, danach sanken die Schwangerschafts- und Geburtenraten deutlich ab. Ab einem Alter von 42 Jahren verlief keine Schwangerschaft mehr erfolgreich. An den 686 Paaren konnte nach 966 Embryotransfers eine Schwangerschaftsrate von 29,8% ermittelt

werden. Die Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer war in den ersten sechs Monaten nach aktiver Immunisierung mit 33,3% am höchsten. Im zweiten Jahr nach Immunisierung sank die Schwangerschaftsrate auf 27% pro Transfer.

Die nach aktiver Immuntherapie erzielten Ergebnisse wurden mit den Daten des Deutschen IVF-Registers (DIR 1998) verglichen. Gegenüber den DIR-Daten lagen die Schwangerschaftsraten nach aktiver Immuntherapie um 10% höher. Dies galt allerdings nur für Patientinnen bis zu einem Alter von 39 Jahren.

Die DIR-Ergebnisse sind jedoch aus verschiedenen Gründen nicht als Kontrollgruppe geeignet. Bei dem DIR-Kollektiv handelt es sich um die Gesamtdarstellung der Behandlungsergebnisse aller Deutschen IVF-Zentren. Die Streubreite der Ergebnisse ist daher sehr groß. Die von Kling behandelten Paare entstammen nur einigen dieser Zentren. Ein Vergleich mit dem Gesamtkollektiv ist auf Grund dessen unzulässig. Weiterhin wird im DIR-Register jede Behandlung als Erstbehandlung dargestellt, die wünschenswerten kumulativen Ergebnisse der einzelnen Patientinnen können bisher – u. a. auf Grund des Datenschutzes – nicht erfasst werden.

In der zweiten retrospektiven Analyse wurden 1.435 Paare, welche sich im Zeitraum von 1999-2002 einer aktiven Immunisierung unterzogen hatten, ausgewertet. Wiederum handelte es sich um Paare, bei denen durchschnittlich 3,7 Punktionszyklen und 4,3 Embryotransfers, inklusive Transfers von zuvor kryokonservierten PN-Stadien, vorausgegangen waren. Eine Kontrollgruppe ohne aktive Immunisierung lag auch hier nicht vor. In dem behandelten Kollektiv resultierte eine Geburtenrate von 25 %.

Die beiden Auswertungen von Kling et al. sind mit der hier durchgeführten Untersuchung aus verschiedenen Gründen nicht vergleichbar. Die Fallzahlen der Kieler Auswertung sind sehr hoch, allerdings fehlt ein vergleichbares Kontrollkollektiv. Der Vergleich mit dem DIR-Gesamtkollektiv ist angesichts der Heterogenität der Ergebnisse einzelner Gruppen nicht aussagekräftig (DIR 2006). In unserer Untersuchung wurden beide Kollektive im gleichen Zeitraum unter weitgehend gleichen Bedingungen behandelt. Einschlusskriterien in beiden Gruppen waren mindestens drei vorausgegangene erfolglose Embryotransfers. Die Altersverteilung in beiden Gruppen ist nahezu gleich, die Zahl der vor dem Index ET übertragenen Embryonen ist in beiden Kollektiven vergleichbar, ebenso die Indikation zur IVF/ICSI Behandlung. Die Bildung einer Kontrollgruppe bzw. eines Vergleichskollektives war möglich, da diese Patientinnen nach ausführlicher Aufklärung eine aktive Immuntherapie abgelehnt hatten. Angemerkt werden muss jedoch, dass die Paare nicht zufällig ausgewählt wurden. Weiterhin wurde die Kontrollgruppe nicht auf zytotoxische

antilymphozytäre HLA-Antikörper getestet, da die aktive Immuntherapie bereits im Vorfeld abgelehnt wurde.

In den beiden Studien von Kling galten mindestens zwei erfolglose ET nach IVF- oder ICSI-Behandlung und/oder nach Transfer von zuvor kryokonservierten PN-Stadien als Einschlusskriterium. In der vorliegenden Arbeit wurden ET von zuvor kryokonservierten PN-Stadien ausgeschlossen, da sich die Schwangerschaftsraten nach dem Embryotransfer im Punktionszyklus von den Raten nach dem Transfer von zuvor kryokonservierten PN-Stadien unterscheiden. Nach sofortigem Embryotransfer beträgt die Rate klinischer Schwangerschaften 28,87%, nach Übertragung zuvor kryokonservierter PN-Stadien 18,34% (DIR 2007). Die Gleichsetzung der Übertragung von direkt nach Entstehung übertragener Embryonen mit dem Transfer von zuvor kryokonservierten PN-Stadien ist daher unzulässig.

Die menschliche Reproduktion ist höchst komplex. Die für die Transplantatabstoßung bedeutsamen Erkenntnisse sind offenbar nicht auf die Immunologie der Schwangerschaft übertragbar. Insbesondere ist die Rolle der unterschiedlichen HLA-Antigene der Eltern nicht mit der Transplantatimmunologie vergleichbar. In den letzten Jahren ist es gelungen zahlreiche Mechanismen aufzudecken, die zum Schutz der Schwangerschaft vor einer immunologischen Abstoßung beitragen. Die Wirksamkeit der von verschiedenen Autoren (Beer et al. 1985, Taylor und Faulk 1981, Mowbray et al. 1985) entwickelten Strategien zur Abortprophylaxe nach habituellen Aborten (aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten) konnte in größeren Studien nicht bestätigt werden.

Die analog zur aktiven Immuntherapie bei Paaren mit habituellen Aborten angewandte Immuntherapie mit Partnerlymphozyten bei Paaren mit mehrfachem Implantationsversagen nach extrakorporaler Befruchtung schien allerdings einen positiven Effekt zu haben. Bisher liegt jedoch keine plazebokontrollierte Studie zu dieser Behandlung vor. Für die von Kling et al. publizierten positiven Ergebnisse eines großen Patientinnenkollektivs fehlt ein unter gleichen Bedingungen behandeltes Kontrollkollektiv.

In der hier vorgestellten Untersuchung konnte kein positiver Effekt der Immuntherapie auf die Schwangerschaftsraten bei wiederholtem Implantationsversagen nachgewiesen werden.

Bei der tubaren Sterilität scheint die Immuntherapie sogar eher nachteilig zu sein. Die Ursachen für diesen Effekt sind unklar. Bei der idiopathischen Sterilität hat die Immuntherapie möglicherweise einen positiven Effekt auf die Einnistung, allerdings sind die Fallzahlen zu klein, um eine diesbezügliche Empfehlung auszusprechen.

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse zur Immunologie der Frühschwangerschaft haben zu neuen Therapieansätzen geführt. Besonderes Interesse hat dabei die Therapie mit schützenden Zytokinen gefunden. Die vor etwa 10 Jahren als erfolgversprechend geltende Therapie mit LIF (leukemia inhibitory factor) hat sich in einer plazebokontrollierten Multicenterstudie als nicht wirksam erwiesen. Kleine, nicht kontrollierte Studien wurden zur Therapie mit TNF- α -Blocker und G-CSF publiziert. Auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse kann jedoch diesbezüglich keine Therapieempfehlung ausgesprochen werden.

5 Zusammenfassung

Die extrakorporale Befruchtung hat sich bei der Behandlung von Paaren mit ungewollter Kinderlosigkeit zu einer Routinemethode entwickelt. In Deutschland werden heute etwa 1,2 % aller Kinder nach IVF- oder ICSI-Behandlung geboren. Die Schwangerschaftsraten pro Embryotransfer liegen im Mittel bei etwa 26,6 %. Da normalerweise zwei bis drei Embryonen übertragen werden, liegt die Schwangerschaftsrate pro übertragenen Embryo bei lediglich 17 %, d. h. 83 % der transferierten Embryonen gehen zugrunde. Ein wesentliches Ziel der reproduktionsmedizinischen Forschung ist daher die Reduzierung der Embryonenverluste nach Embryotransfer.

Die Gründe für Embryonenverluste nach Embryotransfer sind vielschichtig. Unter anderem werden in Analogie zur Transplantatabstoßung immunologische Abstoßungsreaktionen bei der Auseinandersetzung des mütterlichen Immunsystems mit dem Hemiallotransplantat Embryo vermutet. Um 1980 wurde die aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten zur Behandlung von Frauen nach mehreren Fehlgeburten (habituellen Aborten) eingeführt. Die zunächst positiven Ergebnisse dieser Therapie führten zu der Annahme, dass auch die frühen Embryonenverluste nach Embryotransfer auf immunologische Abstoßung zurückzuführen sein könnten, und dass die aktive Immuntherapie auch diese frühen Aborte verhindern könne. Seit 1987 wurden in der Arbeitsgruppe für Reproduktionsmedizin der Universitäts-Frauenklinik Göttingen in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Transfusionsmedizin Frauen nach mehrfachem erfolglosem Embryotransfer aktive Immuntherapien mit Partnerlymphozyten angeboten.

In einer retrospektiven Analyse wurden 72 Patientinnen identifiziert, bei denen von 1987 bis 2002 in der Arbeitsgruppe Reproduktionsmedizin der Universitätsfrauenklinik Göttingen mindestens dreimal erfolglos ein Embryotransfer nach IVF oder ICSI durchgeführt worden war. Allen Patientinnen war in diesen Fällen eine aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten angeboten worden. 39 Patientinnen hatten die Therapie durchführen lassen, 33 Patientinnen hatten die Therapie abgelehnt. Beide Gruppen waren hinsichtlich der wichtigsten Voraussetzungen für den Eintritt einer Schwangerschaft vergleichbar.

Verglichen wurden beide Gruppen hinsichtlich der Schwangerschaftsraten nach Immuntherapie (Behandlungsgruppe) bzw. nach dem vergleichbaren Behandlungszyklus ohne vorausgegangene Immuntherapie (Kontrollgruppe).

In der Therapiegruppe wurden 10 von 39 Frauen schwanger. Dies entspricht einer Schwangerschaftsrate von 25,6 %. In der Kontrollgruppe wurden von 33 Frauen 13 schwanger (39,4 %) (s. Tab. 6, S. 52). Der Unterschied ist im Chi²-Test statistisch nicht signifikant ($p = 0,21$). Die Subanalysen für unterschiedliche Zahlen vorausgegangener Embryotransfers und für unterschiedliche Altersgruppen ließen ebenfalls keine Unterschiede erkennen. Bei einem Vergleich der Indikationen zur IVF- bzw. ICSI-Behandlung fand sich überraschenderweise ein signifikant ungünstiger Effekt der Immuntherapie auf die Schwangerschaftsraten bei Patientinnen mit tubarer Sterilität ($p = 0,01$). Die Gründe dafür sind unklar.

Das Ergebnis dieser Studie lässt den Schluss zu, dass die aktive Immuntherapie mit Partnerlymphozyten zu keiner Erhöhung der Schwangerschaftsraten nach Embryotransfer führt. Insbesondere auf Grund des in unserer Studie nachteiligen Effekts der Immuntherapie bei tubarer Sterilität sollte die Indikation zur aktiven Immuntherapie kritisch überdacht werden.

6 Literatur

ACIP (1996) Update: vaccine side effects, adverse reactions, contraindications, and precautions. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 45 (9), 1-35

Aghajanova L (2010): Update on the role of leukemia inhibitory factor in assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 22 (3), 213-219

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004): Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5 (3), 266-271

Balaban B, Urman B (2006): Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 12 (5), 608-615

Basir GS, Lam TP, Chau MT, Ng EH, WS O, Ho PC (2001): Colour Doppler analysis of peri-implantation utero-ovarian haemodynamics in women with excessively high oestradiol concentrations after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 16 (10), 2114-2117

Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, Haines RF (1981): Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 141 (8), 987-999

Beer AE, Quebbeman JF, Semprini AE, McGaw TG, Jijon A (1985): Survival and rejection of the fetal allograft. *Contrib Gynecol Obstet* 14, 114-130

Behar E, Carp H, Livneh A, Gazit E (1993): Differential suppression activity induced by paternal leukocyte immunization in habitual abortion. *Gynecol Obstet Invest* 36 (4), 202-207

Boomsma CM, Keay SD, Macklon NS (2007): Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 24 (1), CD005996

Boue J, Bou A, Lazar P (1975): Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12 (1), 11-26

Bourgain C, Ubaldi F, Tavaniotou A, Smitz J, van Steirteghem AC, Devroey P (2002): Endometrial hormone receptors and proliferation index in the periovulatory phase of stimulated embryo transfer cycles in comparison with natural cycles and relation to clinical pregnancy outcome. *Fertil Steril* 78 (2), 237-244

Brinsden PR, Alam V, de Moustier B, Engrand P (2009): Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure. *Fertil Steril* 91 (4), 1445-1447

Brown JA, Buckingham K, Abou-Setta A, Buckett W (2007): Ultrasound versus 'clinical touch' for catheter guidance during embryo transfer in women. *Cochrane Database Syst Rev* 24 (1), CD006107

Carp HJA, Toder V, Mashiach S, Rabinovici J (1994): Effect of Paternal Leukocyte Immunization on Implantation after Biochemical Pregnancies and Repeated Failure of Embryo Transfer. *Am J Reprod Immunol* 31, 112-115

Carrington B, Sacks G, Regan L (2005): Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17 (6), 591-597

Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG (1990): Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* 89 (2), 447-458

Chaouat G, Assal-Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG (1995): IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol* 154 (9), 4261-4268

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J (2002): A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 53 (1-2), 241-256

Chaouat G, Ledee-Bataille N, Zourbas S, Ostojic S, Dubanchet S, Martal J, Frydman R (2003): Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *Am J Reprod Immunol* 50 (3), 177-186

Check JH, Arwitz M, Gross J, Peymer M, Szekeres-Bartho J (1997): Lymphocyte immunotherapy (LI) increases serum levels of progesterone induced blocking factor (PIBF). *Am J Reprod Immunol* 37 (1), 17-20

Choudhury SR, Knapp LA (2001): Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum Reprod Update* 7 (2), 113-134

Chung IB, Yelian FD, Zaher FM, Gonik B, Evans MI, Diamond MP, Svinarich DM (2000): Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta* 21 (4), 320-324

Clark DA, Fernandes J, Banwatt D (2008): Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4+8+ FOXP3+ cells. *Am J Reprod Immunol* 59 (6), 525-534

Coady MA, Mandapati D, Arunachalam B, Jensen K, Maher SE, Bothwell AL, Hammond GL (1999): Dominant negative suppression of major histocompatibility complex genes occurs in trophoblasts. *Transplantation* 67 (11), 1461-1467

Dausset J (1958): [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol* 20 (1-4), 156-166

Daya S, Gunby J (1994): The effectiveness of allogeneic leukocyte immunization in unexplained primary recurrent spontaneous abortion. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. *Am J Reprod Immunol* 32 (4), 294-302

Delves PJ, Roitt IM (2000): The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343 (2), 108-117

Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM (2000): Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 15 (10), 2190-2196

DIR Deutsches IVF-Register (2006): DIR Bundesgeschäftsstelle Ärztekammer Schleswig-Holstein, Bad Segeberg 2006.

DIR Deutsches IVF-Register (2007): DIR Bundesgeschäftsstelle Ärztekammer Schleswig-Holstein, Bad Segeberg 2007.

Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R (1990): Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 47 (4), 656-663

Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ (1986): Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 59 (4), 595-601

Engel W, Schmidt M, Pauer HU (1998): Genetik und mikroassistierte Reproduktion durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion. *Dtsch Arztebl* 95, 1902-1908

ESchG - Embryonenschutzgesetz - Gesetz zum Schutz von Embryonen. *Bundesgesetzblatt I.* (1990), 2746-2748

Ewoldsen MA, Ostlie NS, Warner CM (1987): Killing of mouse blastocyst stage embryos by cytotoxic T lymphocytes directed to major histocompatibility complex antigens. *J Immunol* 138 (9), 2764-2770

Fahy UM, Cahill DJ, Wardle PG, Hull MG (1995): In-vitro fertilization in completely natural cycles. *Hum Reprod* 10 (3), 572-575

Fanchin R, De Ziegler D, Castracane VD, Taieb J, Olivennes F, Frydman R (1995): Physiopathology of premature progesterone elevation. *Fertil Steril* 64 (4), 796-801

Festenstein H, Sachs JA, Pegrum GD, Moorhead JF, Paris AM (1976): Influence of HLA matching and blood-transfusion on outcome of 502 London Transplant Group renal-graft recipients. *Lancet* 1976,1 (7592), 157-161

Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi OR (2002): HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 32 (2), 311-315

Gerencer M, Drazancic A, Kuvacic I, Tomaskovic Z, Kastelan A (1979): HLA antigen studies in women with recurrent gestational disorders. *Fertil Steril* 31 (14), 401-404

Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, Bontis JN, Devroey P (2001): Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update* 7(2), 161-174

- Guerin LR**, Prins JR, Robertson SA (2009): Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update* 15 (5), 517-535
- Hammer A**, Blaschitz A, Daxbock C, Walcher W, Dohr G (1999): Fas and Fas-ligand are expressed in the uteroplacental unit of first-trimester pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 41 (1), 41-51
- Hayakawa S**, Karasaki-Suzuki M, Itoh T, Ishii M, Kanaeda T, Nagai N, Takahashi-Yamamoto N, Tochigi M, Chishima F, Fujii TK, Oyama J, Kitanaka S, Satoh K (2000): Effects of paternal lymphocyte immunization on peripheral Th1/Th2 balance and TCR V beta and V gamma repertoire usage of patients with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 43 (2), 107-115
- Heikkinen J**, Mottonen M, Alanen A, Lassila O (2004): Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 136 (2), 373-378
- Henderson TA**, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP, Critchley HO (2003): Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (1), 440-449
- Hinckley MD**, Milki AA (2004): 1000 office-based hysteroscopies prior to in vitro fertilization: feasibility and findings. *JSLs* 8 (2), 103-107
- Hinney B** (2001): Habituelle Abortneigung. *Gynäkologe* 34, 339-356
- Hunt JS**, Petroff MG, McIntire RH, Ober C (2005): HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 19 (7), 681-693
- Jamieson ME**, Coutts JR, Connor JM (1994): The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 9 (4), 709-715
- Jasper MJ**, Tremellen KP, Robertson SA (2006): Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod* 12 (5), 301-308
- Katz I**, Fisch B, Amit S, Ovadia J, Tadir Y (1992): cutaneous graft-versus-host-like reactions after paternal lymphocyte immunization for prevention of recurrent abortion. *Fertil Steril* 57(4), 927-929
- Kilpatrick DC** (1992): Soluble interleukin-2 receptors in recurrent miscarriage and the effect of leukocyte immunotherapy. *Immunol Lett* 34 (3), 201-206

- King A**, Boocock C, Sharkey AM, Gardner L, Beretta A, Siccardi AG, Loke YW (1996): Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol* 156 (6), 2068-2076
- King A**, Gardner L, Loke YW (1999): Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum Reprod* 14 (3), 656-663
- King A**, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma S, Hiby SE, McMichael AJ, Loke YW, Braud VM (2000a): HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 30 (6), 1623-1631
- King A**, Burrows TD, Hiby SE, Bowen JM, Joseph S, Verma S, Lim PB, Gardner L, Le Bouteiller P, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Loke YW (2000b): Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 21 (4), 376-387
- Kling C**, Magez-Zunker J, Jenisch S, Kabelitz D (2002): Einfluss der aktiven Lymphozyten-Immunisierung bei Paaren mit wiederholtem Implantationsversagen. *Geburtsh Frauenheilkd* 62, 661-667
- Kling C**, Wilke H, Schmutzler A (2007): Verlauf 2 Jahre nach wiederholtem Implantationsversagen im IVF-Programm. *Geburtsh Frauenheilkd* 67, 1002-1008
- Kuhn U**, Campo R, Hinney B, Neumeyer H, Criel A, Gordts S, Kuhn W (1993): Immunisierung mit Partner-Lymphozyten: Verbesserung der Schwangerschaftsrate bei Sterilitätspatienten. *Z Geburtsh Perinat* 197, 209-214
- Lambers MJ**, Hoozemans DA, Schats R, Homburg R, Lambalk CB, Hompes PG (2009): Low-dose aspirin in non-tubal IVF patients with previous failed conception: a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 92 (3), 923-929
- LeMaoult J**, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED (2004): HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (18), 7064-7069
- Lessey BA** (2000): The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod* 15 (6), 39-50
- Lin H**, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG (1993): Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 151 (9), 4562-4573

- Lio D**, Candore G, Colombo A, Colonna RG, Gervasi F, Marino V, Scola L, Caruso C (2001): A genetically determined high setting of TNF-alpha influences immunologic parameters of HLA-B8,DR3 positive subjects: implications for autoimmunity. *Hum Immunol* 62 (7), 705-713
- Loke YW**, King A, Gardner L, Carter NP (1992): Evidence for the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors by human first trimester extravillous trophoblast and its response to this cytokine. *J Reprod Immunol* 22 (1), 33-45
- Loke YW**, King A, Burrows TD (1995): Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 10 (2), 14-21
- Macklon NS**, Fauser BC (2000): Impact of ovarian hyperstimulation on the luteal phase. *J Reprod Fertil Suppl* 55, 101-108
- Malter HE**, Cohen J (1989): Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 51 (1), 139-148
- Margalioth EJ**, Ben Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T (2006): Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 21 (12), 3036-3043
- Matsubayashi H**, Maruyama T, Ozawa N, Izumi SI, Sugi T, Yoshikata K, Yoshimura Y, Makino T (2000): Anti-paternal antibodies by flow cytometry in the management of alloimmunization on recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 44 (5), 284-288
- Medawar PB** (1953): Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Experim Biol* 7, 320-338
- Moon HS**, Park SH, Lee JO, Kim KS, Joo BS (2004): Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 82, (4), 816-820
- Morrish DW**, Bhardwaj D, Paras MT (1991): Transforming growth factor beta 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion. *Endocrinology* 129 (1), 22-26
- Mowbray JF**, Gibbings C, Liddell H, Reginald PW, Underwood JL, Beard RW (1985): Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet* 1985,1 (8435), 941-943

- Mueller-Eckhardt G**, Heine O, Neppert J, Künzel W, Mueller-Eckhardt C (1989): Prevention of recurrent spontaneous abortion by intravenous immunoglobulin. *Vox Sang* 56 (3), 151-154
- Munn DH**, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998): Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281 (5380), 1191-1193
- Neumeyer H**, Kuhn W, Gotze O, Hinney B (1985): Zur Prävention habitueller Aborte durch Buffycoat-Transfusionen. *Z Geburtsh Perinat* 189, 197-201
- Nikas G** (1999a): Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum Reprod* 14 (2), 37-44
- Nikas G** (1999b): Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod* 14 (2), 99-106
- Norwitz ER**, Schust DJ, Fisher SJ (2001): Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345 (19), 1400-1408
- O'Sullivan CM**, Rancourt SL, Liu SY, Rancourt DE (2001): A novel murine tryptase involved in blastocyst hatching and outgrowth. *Reproduction* 122 (1), 61-71
- Ober C**, Karrison T, Odem RR, Barnes RB, Branch DW, Stephenson MD, Baron B, Walker MA, Scott JR, Schreiber JR (1999): Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. *Lancet* 1999,354 (9176), 365-369
- Orgad S**, Loewenthal R, Gazit E, Sadetzki S, Novikov I, Carp H (1999): The prognostic value of anti-paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births in couples with consecutive recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 14 (12), 2974-2979
- Palermo G**, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992,340 (8810), 17-18
- Pandey MK**, Saxena V, Agrawal S (2003): Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) in human pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth* 3 (1), 2
- Parham P** (2004): NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med* 200 (8), 951-955

- Päkkilä M**, Räsänen J, Heinonen S, Tinkanen H, Tuomivaara L, Mäkikallio K, Hippeläinen M, Tapanainen JS, Martikainen H (2005): Low-dose aspirin does not improve ovarian responsiveness or pregnancy rate in IVF and ICSI patients: a randomized, placebo-controlled double-blind study. *Hum Reprod* 20 (8), 2211-2214
- Pfeiffer KA**, Rebmann V, Passler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D, Grosse-Wilde H (2000): Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol* 61 (6), 559-564
- Piccinni MP**, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S (1998): Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 4 (9), 1020-1024
- Pijnenborg R**, Robertson WB, Brosens I, Dixon G (1981): Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 2 (1), 71-91
- Plachot M**, Junca AM, Mandelbaum J, de Grouchy J, Salat-Baroux J, Cohen J (1987): Chromosome investigations in early life. II. Human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2 (1), 29-35
- Poustie VJ**, Dodd S, Drakeley AJ (2007): Low-dose aspirin for in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev* 17 (4), CD004832
- Quenby S**, Farquharson R (2006): Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 13, 24-28
- Quenby S**, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J, Bulmer J (2009): Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Hum Reprod* 24 (1), 45-54
- Raghupathy R** (1997): Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18 (10), 478-482
- Rinehart J** (2007): Recurrent implantation failure: definition. *J Assist Reprod Genet* 24 (7), 284-287
- Runic R**, Lockwood CJ, Ma Y, Dipasquale B, Guller S (1996): Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (8), 3119-3122
- Rutella S**, Lemoli RM (2004): Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett* 94 (1-2), 11-26

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155 (3), 1151-1164

Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S (2004): Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 10 (5), 347-353

Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T (2003): Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 101 (9), 3581-3589

Scarpellini F, Sbracia M (2009): Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Hum Reprod* 24 (11), 2703-2708

Schmidt L, Münster K (1995): Infertility, involuntary infecundity, and the seeking of medical advice in industrialized countries 1970-1992: a review of concepts, measurements and results. *Hum Reprod* 10 (6), 1407-1418

Scott JR (2003): Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 1, CD 000112

Seif MM, Edi-Osagie EC, Farquhar C, Hooper L, Blake D, McGinlay P (2006): Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* 25 (1), CD001894

Shakhar K, Rosenne E, Loewenthal R, Shakhar G, Carp H, Ben Eliyahu S (2006): High NK cell activity in recurrent miscarriage: what are we really measuring? *Hum Reprod* 21 (9), 2421-2425

Soper DE (2010): Pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol* 116 (2), 419-428

Statistisches Bundesamt: Geburten in Deutschland 2007 (www.destatis.de)

Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM (2001): Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 76 (4), 782-791

Stephoe PC, Edwards RG (1978): Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978,2 (8085), 366

- Stewart CL**, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ (1992): Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359(6390), 76-79
- Stray-Pedersen B**, Stray-Pedersen S (1984): Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 148 (2), 140-146
- Sutton L**, Mason DY, Redman CW (1983): HLA-DR positive cells in the human placenta. *Immunology* 49 (1), 103-112
- Taylor C**, Faulk WP (1981): Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusions. *Lancet* 1981,2 (8237), 68-70
- Terasaki PI**, McClelland JD (1964): Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204, 998-1000
- The German RSA/IVIG Group** (1994): Intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 101, 1072-1077
- van den Elsen PJ**, Gobin SJ, van der SN, Datema G, Vietor HE (2001): Transcriptional control of MHC genes in fetal trophoblast cells. *J Reprod Immunol* 52 (1-2), 129-145
- Vanneste E**, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, Fryns JP, Verbeke G, D'Hooghe T, Moreau Y, Vermeesch JR (2009): Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 15 (5), 577-583
- Voullaire L**, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L (2007): High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 87 (5), 1053-1058
- Waldenström U**, Hellberg D, Nilsson S (2004): Low-dose aspirin in a short regimen as standard treatment in in vitro fertilization: a randomized, prospective study. *Fertil Steril* 81 (6), 1560-1564
- Wegmann TG**, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993): Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14 (7), 353-356

Winger EE, Reed JL, Ashoush S, Ahuja S, El Toukhy T, Taranissi M (2009): Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol* 61 (2), 113-120

Würfel W, Fiedler K, Krusmann G, Smolka B, von Hertwig I (2001): Verbesserung der Behandlungsergebnisse durch LeukoNorm Cytochemia bei Patientinnen mit mehrfachen, frustranen IVF- oder ICSI Behandlungszyklen. *Zentralbl Gynäkol* 123, 361-365

Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lu C, Lin Q (2008): Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril* 89 (3), 656-661

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD (2005): Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol* 166 (3), 811-822

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. sc. agr. B. Hinney danke ich für die Überlassung des Themas dieser interessanten und vielfältigen Arbeit, seine freundliche Unterstützung und stete Bereitschaft, sich Zeit für Fragen und fruchtbare Gespräche zu nehmen.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. R. Hilgers für die zahlreichen Anregungen bezüglich der statistischen Auswertungen.

Auch Herrn Prof. Dr. med. H. W. Michelmann möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank für sein Engagement und die dadurch entstandenen gewinnbringenden Diskussionen aussprechen.

Lebenslauf

Am 10.06.1978 wurde ich als erstes Kind in der Ehe von Petra Freifrau von Hammerstein-Equord, geb. Rümenapp und Wolf Freiherr von Hammerstein-Equord in Göttingen geboren.

Nach Besuch der Grundschule, der Orientierungsstufe und des Theodor-Heuss-Gymnasiums sowie eines Auslandsschuljahres in den USA schloss ich in Göttingen meine Schulausbildung im Juni 1997 mit Erlangung der Hochschulreife ab.

Im Wintersemester 1997/98 nahm ich mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Nach dem ersten Staatsexamen absolvierte ich eine zwei monatige Famulatur im St. Vincent`s University Hospital von Dublin in Irland.

Im Frühjahr 2003 bestand ich den II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Georg-August-Universität Göttingen. Mein Praktisches Jahr habe ich am Universitätsklinikum in Göttingen mit dem Wahlfach Anästhesiologie absolviert.

Den III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich im Dezember 2004 am Universitätsklinikum Göttingen ab.

Anfang 2005 begann ich mit der Auswertung von Daten für die vorliegende Arbeit in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Universitätsklinikum Göttingen.

Von Juli 2005 bis Juli 2006 arbeitete ich als Assistenzärztin in der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Neu-Bethlehem in Göttingen.

Seit August 2006 bin ich als Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen tätig.

Nach Absolvierung des Common Trunk beendete ich die schriftliche Niederlegung meiner Dissertation.