

Besteht eine Korrelation zwischen dem immunologischen Laborstatus von Omega-3-Fettsäure-supplementierten Kinderwunschpatientinnen und dem IVF-Behandlungserfolg?

Arasch Bareksei¹, Christoph Schwermann¹, Gerd Hafner², Sebastian Pfeiffer³, Kathrin Schlatterer^{4,5}

¹ Dental Concept, Praxis für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Bahnhofstr. 65, 46562 Voerde

² Universitätsmedizin, Universität Duisburg-Essen, Hufelandstraße 55, D-45147 Essen

³ Labor Todorov, Hüttenstraße 31a, D-40215 Düsseldorf

³ Ärztehaus Mitte, In den Ministergärten 1, D-10117 Berlin

⁴ Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Ferdinand-Sauerbruch-Str., D-17475 Greifswald

⁵ Sankt Gertrauden-Krankenhaus, Institut für Laboratoriumsmedizin, Paretzer Str. 12, D-10713 Berlin

Schlüsselwörter

Omega-3-Fettsäure-Substitution, in-vitro-Fertilisation, immunologischer Laborstatus

Korrespondierender Autor

Dr. Arasch Bareksei

Bahnhofstr. 65

46562 Voerde

Tel.: +49-02855-7223

E-Mail: dr.bareksei@zahnarzt-voerde.de

Correlation between immunological laboratory status of omega-3-fatty-acid-supplemented patients and outcome of IVF-treatment

Summary

A well defined group of patients of a German fertility center, which received omega-3-fatty acid supplementation, was monitored for specific alterations in the immunological laboratory status correlated with the outcome of IVF-treatment. In 36 of 52 IVF-patients treatment was successful. Decreased numbers of CD4-positive T-cells could be correlated with increased failure rates of IVF, increased numbers of regulatory T-cells on the other hand with significantly improved success rates. Six of the parameters analysed (T-lymphocytes, T-helper cells, B-lymphocytes, CD4/CD8 ratio and both classes of regulatory T-cells) showed values lying significantly more often below the median of the respective distribution in unsuccessfully treated patients than in successfully treated. These results offer the outlook of developing a simple prognostic measure for the outcome of a IVF-therapy by putting the numbers of these parameters in relation to the median of the respective distribution. With increasing numbers of parameters lying below the median, the probability of successful IVF-treatment is decreasing.

Key Words

omega-3-fatty acid supplementation, in vitro fertilization, immunological laboratory status

Einleitung

Die Verschiebung der Familienplanung in spätere Lebensphasen mit physiologischerweise abnehmender Fertilität ist einer der Hauptgründe für die steigende Nachfrage an reproduktionsmedizinischen Behandlungen [1] mit einem durchschnittlichen Alter von Frauen wie Männern von 38.52 Jahren [2]. Mit der abnehmenden Fertilität sinken auch die Chancen für eine erfolgreiche IVF-Behandlung [1]. Ein tiefgehendes Verständnis dieses Phänomens auf molekularer Basis mit dem Ziel der Entwicklung von Optimierungsstrategien solcher aufwändigen Behandlungen dient dazu, physische, psychische und auch finanzielle Belastungen für Kinderwunschaare zu minimieren.

Bisher haben bereits verschiedene Forschungsansätze den Einfluss von Life-Style-Modifikationen, insbesondere die des Einsatzes von Nahrungsergänzungsmitteln, auf die Fertilität und Fehlgeburtsraten untersucht [3,4]. Im Rahmen der Ursachenevaluation von Fehlgeburten konnte gezeigt werden, dass chromosomale Aberrationen für bis zu 50% der Aborte verantwortlich sind [5]. Andere Faktoren anatomischer, hämatologischer und immunologischer Natur wurden immer wieder als mögliche Auslöser für Spontanaborte diskutiert [6,7]. So ist die Bedeutung der Erythrozyten für das Eintreten einer Schwangerschaft bislang unklar. Mütterliche Erythrozyten können ab dem 10. postkonzeptionellen Tag intervillös in der Plazenta detektiert werden, der mütterliche Blutfluss ist ab dem 29. Schwangerschaftstag nachweisbar [8]. Thrombozyten scheinen hingegen sowohl bereits in der Implantationsphase als auch im späteren Verlauf der Schwangerschaft eine wichtige Rolle zu spielen [9]. Für das angeborene und adaptive Immunsystem konnte eine Verbindung mit Schwangerschaftskomplikationen wie Spontanaborten, intrauteriner Wachstumsretardierung, Präeklampsie und Frühgeburten gezeigt werden [10]. Während der normalen Schwangerschaft liegt phänotypisch ein suppressives mütterliches Immunprofil vor. In Frühgeburtssituationen hingegen kann dies verändert sein. So beschrieb Blidaru bei Frauen mit Frühgeburten eine Erhöhung der B-Lymphozyten, eine erhöhte CD4/CD8-Ratio und verringerte CD8-T-Lymphozytenanzahlen [11]. Die Präeklampsie ist mit fetaler Wachstumsretardierung und erhöhter mütterlicher Mortalität assoziiert [12]. Präeklampsische Schwangere weisen verminderte Dioxygenase-Spiegel und eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten auf [13,14,15,16,17]. Neutrophile Granulozyten und die Bildung neutrophiler extrazellulärer Substanzen scheinen beim Eintritt in die Schwangerschaft wie auch in ihrem Verlauf von Bedeutung zu sein [18]. Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch neutrophile Granulozyten und ihre Argininase-I-Aktivität sind ihrerseits im Rahmen der Immunantwort in die Regulation von T-Zell-Aktivitäten involviert [19]. Auch Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige physiologische wie auch pathophysiologische Rolle während der Schwangerschaft. So zeigt die Upregulation

der Expression von Chemoattraktoren für Makrophagen die Bedeutung dieser Zellen für die Periimplantations- wie auch die erste Phase der Schwangerschaft [20]. Quantitative Veränderungen von Makrophagen und Monozyten bei der normalen, unkomplizierten Schwangerschaft verdeutlichen ihre Wichtigkeit für die Abwehr von Infektionen wie auch die Elimination apoptotischer plazentarer Zellen [21]. Eine gesteigerte monozytäre Infiltration der uterinen Schleimhaut wurde mit Schwangerschaftskomplikationen assoziiert [22,23]. Auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) konnten als wichtig für Eintritt und Verlauf einer Schwangerschaft identifiziert werden [24-28]. So gelten NK-Zell-Erhöhungen als Trigger für wiederholte Spontanaborte [29]. Ebenfalls essentiell scheinen T-Lymphozyten-Subpopulationen in den Eintritt und den Verlauf einer Schwangerschaft involviert zu sein, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten beeinflussen Implantation wie auch die plazentare Entwicklung des Embryos positiv und sorgen für das Gleichgewicht zwischen Trophoblasten und Deziduagewebe [30]. CD4+ und CD25+ positive T-Zellen sind neben der erfolgreichen Implantation auch in einen günstigen Schwangerschaftsverlauf involviert [31-33]. Offensichtlich spielen somit verschiedene Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems eine zentrale Rolle sowohl für den Eintritt in eine normale Schwangerschaft als auch für pathologische Verläufe von Schwangerschaften [34,35].

Vor diesem Hintergrund nutzten wir die Verfügbarkeit einer sehr gut charakterisierten Patientengruppe in einem deutschen Kinderwunschzentrum, um mit Hilfe einer vorläufigen Studie Einflüsse von immunologischen Parametern auf die Fertilität, i.e. die Wahrscheinlichkeit eines Schwangerschaftseintritts und die Verhinderung von Fehlgeburten, zu untersuchen. Die zentrale Fragestellung war, ob es Unterschiede im Immunstatus zwischen den Patientinnen, die nach IVF-Behandlung unter Omega-3-Fettsäure-Substitution schwanger wurden, und denjenigen gab, bei denen unter identischen Bedingungen keine Schwangerschaft ein- bzw. eine Fehlgeburt auftrat. Fokussiert wurde die hämatologische Untersuchung auf die quantitative Analyse von T-Lymphozyten, T-Helfer-Zellen, T-Suppressor-Zellen, der CD4/CD8-Ratio, NK-Zellen, B-Lymphozyten, T-NK-Zellen und regulatorischer T-Zellen. Daneben wurden der lösliche Interleukin-2-Rezeptor, Il-6, Il-8, IL-10, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die quantitativen Immunglobuline E, A, M, G und die IgG-Subklassen analysiert. Auf dieser Datenbasis wurde zudem evaluiert, ob einzelne dieser Parameter oder eine Kombination aus mehreren Parametern von prädiktivem Wert für einen IVF-Erfolg unter Omega-3-Fettsäure-Supplementation sein könnten.

Material und Methoden

Patientinnen

Patientinnen eines deutschen Kinderwunschzentrums (Interdisziplinäres IVF-Zentrum Düsseldorf) mit mindestens 2 Fehlgeburten oder erfolglosen IVF-Therapieversuchen wurden in die Studie inkludiert. Die so entstandene Studiengruppe war auf schlechte Voraussetzungen für eine erfolgreiche IVF-Therapie vorselektioniert. Patientinnen mit Prednisolon-Einnahme und solche, die die Weitergabe ihrer Daten ablehnten, wurden nicht eingeschlossen. Alle Studienteilnehmerinnen erhielten perikonzeptionell eine Omega-3-Fettsäure-Supplementierung [3]. Insgesamt konnte eine Studiengruppe von 52 Patientinnen im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen Immunstatus und IVF-Erfolg unter Omega-3-Fettsäure-Substitution untersucht werden. Von 52 Kinderwunschpatientinnen führte bei 36 die IVF-Behandlung unter Omega-3-Fettsäuresupplementierung zum Erfolg, eine Patientin dieser Gruppe erlitt im weiteren Verlauf der Schwangerschaft eine Fehlgeburt [3].

Blutproben

Während der perikonzeptionell Omega-3-Fettsäure-supplementierten IVF-Behandlung und der Follow-Up-Periode wurden von jeder Patientin Blutproben zu durchschnittlich 4 unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen, das mittlere Zeitintervall zwischen den Blutentnahmen betrug 14 Tage. Die erste Blutentnahme erfolgte vor Beginn der Supplementation. Für durchflußzytometrische Analysen wurde EDTA-Blut verwendet, für die Analyse von TNF- α Lithiumheparinatblut, für die Bestimmung von Immunglobulinen, Immunglobulin-Subklassen, löslichem IL-2-Rezeptor, IL-6, IL-8 und IL-10 Serum.

Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Untersuchungen wurden mittels FACSCaliburTM (Becton Dickinson, Heidelberg, Auswertesoftware BD Multiset) mit den Laserwellenlängen 635 und 488 nm durchgeführt. Multiset. Untersucht wurden T-Lymphozyten (CD3+), T-Helfer-Zellen (CD4+), T-Suppressor-Zellen (CD8+), CD4/CD8-Ratio, NK-Zellen (CD16+, CD56+), T-NK-Zellen (CD56+, CD16+, CD3+), B-Lymphozyten (CD19+), regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+), regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-). Jeweils 50 μ l EDTA-Blut wurde für 15-30 Minuten mit jeweils 20 μ l Antikörper-Gemisch 1 (Anti-CD3, Anti-CD8, Anti CD45, Anti CD4) (BD Multiset IMK Kit) und Antikörper-Gemisch 2 (AntiCD3, Anti CD16, Anti-CD56, Anti-CD45, Anti-CD19) (BD Multiset IMK Kit) inkubiert. Unmittelbar vor der

durchflußzytometrischen Messung wurde danach zu jeder Probe für 15-30 Minuten 450 µl Lysis-Lösung (BD Multiset IMK Kit Lysis Solution) hinzugegeben.

Zur Messung regulatorischer T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-) wurde 50 µl EDTA-Blut mit 10 µl des jeweiligen Antikörpers bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15-30 Minuten inkubiert, bevor 450 µl Lysis-Lösung (BD Multiset IMK Kit Lysis Solution) über eine weitere Inkubationszeit von 15-30 Minuten vor der Messung hinzugegeben wurde.

Enzymimmunoassay-Analyse

Die quantitative Analyse von Immunglobulinen und Zytokinen, wurde mittel kommerzieller Chemilumineszenz-basierter Enzymimmunoassays entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Testkits wurden verwendet: IgE, A, M, G, IgG-Subklassen (Siemens Centaur XP), sIL2-Rezeptor (Siemens Immulite), IL-6, 8, 10 (Siemens Immulite), TNF- α (Siemens Immulite).

Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von IBM SPSS Statistics (Version 22) durchgeführt, die graphische Darstellung erfolgte anhand Bloxplots. Mittelwerte zweier Gruppen wurde mit Hilfe des Zweistichproben-t-Tests verglichen. Der Mann-Whitney-U-Test diente zur Prüfung, ob zwei Verteilungen zur selben Grundgesamtheit gehören. Mittels der Spearman-Rangkorrelationsanalyse wurde Richtung und Stärke des Zusammenhangs zweier Variablen eruiert. Die unifaktorielle ANOVA-Analyse diente der Überprüfung, ob sich die Mittelwerte der unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen zwischen den unterschiedlichen Blutentnahmezeitpunkten einer einzelnen Patientin unterschieden. Der Einsatz der Diskriminanzanalyse erfolgte, um zu überprüfen, ob eine Prognose des IVF-Behandlungserfolgs oder drohende Komplikationen wie beispielweise Fehlgeburten mit Hilfe der Messwerte unterschiedlicher Lymphozytensubpopulationen möglich ist.

Ergebnisse

Lymphozytensubpopulationskinetik während des Beobachtungszeitraums

Abbildungen 1 und 2 zeigen die zeitlichen Verläufe der unterschiedlichen Zellpopulationen während des Beobachtungszeitraumes. Die erste Blutentnahme erfolgte vor der Supplementationsbehandlung mit Omega-3 Fettsäuren.

Sowohl für CD3+ T-Lymphozyten (Abb. 1, $p = 0.419$), CD19+ B-Lymphozyten (Abb. 1, $p = 0.022$), CD4+ T-Helferzellen (Abb. 1, $p = 0.538$), CD8+ T-Suppressorzellen (Abb.1, $p=0.440$) und die CD4/CD8-Ratio (Abb.1, $p=0.998$) fanden sich bei Patientinnen ohne IVF-Erfolg Schwankungen ohne jedoch einen deutlichen Trend. Bei den erfolgreich IVF-behandelten Patientinnen zeigten T-Lymphozyten (Abb. 1, $p = 0.419$) ebenso wie B-Lymphozyten (Abb.1, $p = 0.417$), T-Helferzellen (Abb.1, $p=0.497$), T-Suppressorzellen (Abb.1, $p=0.682$) sowie die CD4/CD8-Ratio (Abb.1, $p=0.149$) keine Varianz im zeitlichen Verlauf.

Bei den Patientinnen ohne IVF-Erfolg fanden sich Schwankungen für NK-Zellen (Abb.2, $p = 0.131$), T-NK-Zellen (Abb.2, $p = 0,987$), CD4- und CD25-positive, CD127-negative regulatorische T-Zellen (Abb.2, $p= 0.124$) wie auch für CD4- und CD25-positive regulatorische T-Zellen (Abb.2, $p=0.475$) ohne jedoch einen deutlichen Trend. Bei erfolgreich behandelten IVF-Patientinnen zeigten die NK-Zellen (Abb.2, $p=0.663$, Abb.2) wie auch die T-NK-Zellen (Abb.2, $p = 0.988$) und die regulatorischen T-Zellen (Abb.2, CD4+, CD25+, CD127-, $p=0.590$; CD4+, CD25+, $p=0.909$) keine Varianz im zeitlichen Verlauf.

Für keine der analysierten Lymphozytenpopulationen konnte somit eine signifikante Änderung über den Beobachtungszeitraum detektiert werden. Damit ließ sich einer Omega-3-Fettsäuresubstitution im vorliegenden Patientenkollektiv kein moderierender Einfluss auf die Lymphozytensubpopulationen zuschreiben.

Korrelation von Lymphozytensubpopulationen mit den Erfolg einer IVF-Behandlung sowie Fehlgeburtsraten

Während des Behandlungs- und Beobachtungszeitraumes wurden die Lymphozytenpopulationen auf signifikante Unterschiede zwischen erfolgreich behandelten Patientinnen und solchen, bei denen die IVF-Behandlung nicht zum Erfolg führte, analysiert (Tab.1). In die letzte Gruppe wurde auch diejenige Patientin integriert, die im Verlauf der Schwangerschaft eine Fehlgeburt erlitt. Patientinnen ohne IVF-Erfolg ($n=17$) zeigten signifikant niedrigere Anzahlen an T-Helfer-Zellen (mittlere Differenz: -34.0% , $p=0.009$), T-Lymphozyten (mittlere Differenz: -26.0% , $p=0.015$) und B-Lymphozyten (mittlere Differenz: -22.1% , $p=0.063$). Regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+) wiesen niedrigere, jedoch statistisch nur grenzwertig signifikante Level auf als bei Patientinnen mit IVF-Erfolg.

Desweiteren wurden die Lymphozytenpopulationen von Kinderwunschpatientinnen, bei denen nach perikonzeptioneller Omega-3-Fettsäure-Supplementation die IVF-Behandlung erfolgreich war ($n=35$), mit der Patientin verglichen, die nach zunächst erfolgreicher IVF-Behandlung im weiteren Schwangerschaftsverlauf eine Fehlgeburt erlitt ($n=1$) (Tab.2). Diese Patientin zeigte signifikant erhöhte Werte an T-Suppressorzellen (mittlere Differenz: $+67,7\%$; $p = 0,001$), B-Lymphozyten (mittlere Differenz: $+77,4\%$; $p = 0,002$), T-Lymphozyten (mittlere

Differenz: +70,8 %; $p = 0,003$), T-Helferzellen (mittlere Differenz: +70,7 %; $p = 0,015$), regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-) (mittlere Differenz: +56,1 %; $p = 0,032$) und regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+) (mittlere Differenz: +63,6 %; $p = 0,044$). Auch der CD4/CD8-Quotient war signifikant erhöht (mittlere Differenz: +150 %; $p = 0,004$). Hingegen wies die Abortpatientin signifikant erniedrigte Zellzahlen an NK-Zellen (mittlere Differenz: -38,2 %; $p = 0,035$) auf. Für T-NK-Zellen fanden sich keine Unterschiede.

Einfluss von Interleukinen, TNF- α und Immunglobulinen auf IVF-Erfolgs- und Fehlgeburtsraten Omega-3-Fettsäure-supplementierter Patientinnen

Unter Omega-3-Fettsäure-Supplementierung schwanger gewordene Kinderwunschpatientinnen wiesen statistisch signifikant niedrigere lösliche IL-2-Rezeptor-Durchschnittswerte (416.8 ± 169.4 IU/ml) auf als erfolglos IVF-behandelte Patientinnen (536.1 ± 271.7 IU/ml, $p < 0.01$). Diejenige Patientin, die im Verlauf nach IVF-Erfolg im Verlauf der Schwangerschaft eine Fehlgeburt erlitt, zeigte die höchsten sIL-2R-Werte (816.9 ± 84.8 IU/ml) (Abb. 3).

Für IL-6-, IL-8-, IL-10- und TNF- α -Konzentrationen fanden sich über den Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen, erfolgreich IVF-behandelte Patientinnen wiesen zwar mehr als 10-fach erniedrigte Werte an IL-6 auf, aufgrund der erheblichen Streuung der Werte bei den nicht schwangeren Patientinnen war der Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant. Für IL-8 lagen die Messwerte bei erfolgreich behandelten Patientinnen fast doppelt so hoch wie bei erfolglos behandelten, beide Gruppen wiesen große Streuungen der Messwerte auf, so dass die Unterschiede nicht signifikant waren.

Von 30 zufällig ausgewählten Kinderwunschpatientinnen wurden die Konzentrationen an IgA, E, G und M sowie die IgG-Subklassen gemessen. Von diesen 30 Patientinnen wurden 20 schwanger (66.7 %), keine Patientin erlitt eine Fehlgeburt. Kinderwunschpatientinnen, bei denen die IVF-Behandlung nicht zu einer Schwangerschaft führte, zeigten im Vergleich erfolgreich behandelten statistisch nicht signifikant erhöhte IgE-Werte. Bei den IgA, M und G, und den IgG-Subklassen zeigten sich keine Unterschiede (Tab.4).

Diskriminanzanalyse

Zur Prüfung, ob die verwendeten Laborparameter geeignet sind, den Erfolg einer IVF-Behandlung bei Omega-3-Fettsäure-supplementierten Kinderwunschpatientinnen zu prognostizieren, wurde eine Diskriminanzanalyse durchgeführt. Zunächst erfolgte sie mit der Zielvariable „schwanger“ oder „nicht schwanger nach IVF-Behandlung“. Erklärende Variablen

waren Absolutwerte von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, T-NK-Zellen, regulatorischen T-Zellen, des CD4/CD8-Quotienten, löslicher Interleukin-2-Rezeptor und das Alter der Patientin. Es ergab sich folgende Diskriminanzfunktion:

$$D = -8.332 - 0.001 \cdot (\text{T-Lympho}_{\text{CD}3+}) - 0.001 \cdot (\text{B-Lympho}_{\text{CD}19+}) + 0.002 \cdot (\text{NK-Zellen}_{\text{CD}16+\text{CD}56+}) + 0.002 \cdot (\text{T-Helferzellen}_{\text{CD}4+}) + 0.001 \cdot (\text{T-Suppressorzellen}_{\text{CD}8+}) - 0.002 \cdot (\text{CD4/CD8-Ratio}) - 0.001 \cdot (\text{T-NK-Zellen}_{\text{CD}56+\text{CD}16+\text{CD}3+}) + 0.000 \cdot (\text{reg.T-Zellen}_{\text{CD}4+\text{CD}25+\text{CD}127-}) + 0.000 \cdot (\text{reg.T-Zellen}_{\text{CD}4+\text{CD}25+}) + 0.192 \cdot \text{Alter} + 0.003 \cdot (\text{sIL-2-Rezeptor})$$

Anhand dieser konnten 89% der Fälle korrekt eingruppiert werden (Tab.5). Eine falsche Zuordnung erfolgte bei 15 Blutprofilen nicht-schwangerer Patientinnen, die fälschlicherweise als schwanger klassifiziert wurden, während bei schwangeren Frauen 3 Blutprofile von schwangeren Frauen fälschlicherweise den Nicht-Schwangeren zugeordnet wurden.

Im Anschluss wurde eine Diskriminanzanalyse mit der Zielvariable „schwanger“ oder „Abort“ nach IVF-Behandlung unter Verwendung von Absolutwerte von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, T-NK-Zellen, regulatorischen T-Zellen, des CD4/CD8-Quotienten, des löslichen Interleukin-2-Rezeptors und des Alters der Patientin als erklärende Variablen. Es ergab sich folgende Diskriminanzfunktion:

$$D = 1.680 + 0.002 \cdot (\text{T-Lympho}_{\text{CD}3+}) + 0.003 \cdot (\text{B-Lympho}_{\text{CD}19+}) - 0.002 \cdot (\text{NK-Zellen}_{\text{CD}16+\text{CD}56+}) - 0.003 \cdot (\text{T-Helferzellen}_{\text{CD}4+}) - 0.002 \cdot (\text{T-Suppressorzellen}_{\text{CD}8+}) + 0.001 \cdot (\text{CD4/CD8-Ratio}) + 0.004 \cdot (\text{T-NK-Zellen}_{\text{CD}56+\text{CD}16+\text{CD}3+}) - 0.001 \cdot (\text{reg.T-Zellen}_{\text{CD}4+\text{CD}25+\text{CD}127-}) - 0.000 \cdot (\text{reg.T-Zellen}_{\text{CD}4+\text{CD}25+}) - 0.109 \cdot \text{Alter} + 0.004 \cdot (\text{sIL-2-Rezeptor})$$

Anhand dieser ließen sich 99.3 % der ursprünglich gruppierten Fälle korrekt klassifizieren (Tab.6). Lediglich das Profil einer Schwangeren wurde fälschlicherweise als Fehlgeburtprofil klassifiziert, während die tatsächliche Fehlgeburtspatientin anhand ihrer Blutwerte korrekt klassifiziert werden konnte. 7 Fälle konnten nicht klassifiziert werden. Damit scheint sich für die Fehlgeburt ein eindeutiges Muster aus den einzelnen Lymphozyten-Parametern zu ergeben.

Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Diskriminanzanalyse wurde postuliert, dass es für jede Patientin ein charakteristisches Blutprofil geben sollte, welches eine Prognose über den potentiellen Erfolg der IVF-Behandlung zulässt. Da jedoch ist die Anwendung einer Diskriminanzfunktion äußerst komplex ist und damit für die Anwendung in der täglichen Praxis nicht geeignet erscheint, war das Ziel, aus den bisher Ergebnissen der untersuchten Blutparametern einen einfachen Algorithmus zur Vorhersage über den weiteren Verlauf der Kinderwunschbehandlung zu entwickeln.

Hierfür wurden die Mediane der unterschiedlichen Blutwerte berechnet und die Daten im Verhältnis zum Median eingeteilt (Tab.7). Die so erhaltenen Werte wurden in Relation zum

Ausgang der Kinderwunschbehandlung gesetzt (schwanger, nicht schwanger, Fehlgeburt). Ob die Lage der Blutparameter unabhängig vom Erfolg der In-vitro-Fertilisation war, wurde mittels Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest überprüft.

Bei T-Lymphozyten (CD3+), T-Helferzellen (CD4+), B-Lymphozyten (CD19+), dem CD4/CD8-Quotienten, regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+) und regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-) lagen die Werte der nicht schwanger gewordenen Patientinnen doppelt so häufig unterhalb des Medians der Stichprobe wie darüber. Bei den schwanger gewordenen Patientinnen war das Verhältnis ausgewogen. Die Werte der Patientin mit der späteren Fehlgeburt lagen alle oberhalb des Median der Stichprobe. Für NK-Zellen (CD16+, CD56+) und den löslichen Interleukin-2-Rezeptor gab es keine Unterschiede.

Da bei T-Lymphozyten, T-Helferzellen, B-Lymphozyten, dem CD4/CD8-Quotienten und regulatorischen T-Zellen eine Position unterhalb des Medians der Stichprobe mit einem negativen Ausgang der IVF-Behandlung assoziiert werden konnte, wurde im nächsten Schritt eine Variable entwickelt, die angab, bei wie vielen Parametern eine Patientin unterhalb des Medians der jeweiligen Verteilung lag (Tab.8).

Patientinnen, bei denen die Kinderwunschbehandlung nicht zum gewünschten Erfolg führte, wiesen signifikant mehr Werte unterhalb des Medians der jeweiligen Verteilung auf erfolgreich Behandelte ($p = 0,007$; Abb. 4). Mit zunehmender Anzahl an Werten unterhalb des Medians sank der kumulative Anteil an schwangeren Patienten hochsignifikant ($r = -0,966$; $p < 0,001$).

Dieses einfache Maß lässt sich ohne großen Aufwand für jede Kinderwunschpatientin ermitteln.

Konkret werden hierfür die Werte der sechs Parameter T-Lymphozyten (CD3+), T-Helferzellen (CD4+), B-Lymphozyten (CD19+), CD4/CD8-Quotienten, regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+) und regulatorische T-Zellen (CD4+,CD25+,CD127-) mit dem jeweiligen Median der Verteilung verglichen. Mit zunehmender Anzahl an Werten unterhalb des Medians sinkt dann die Wahrscheinlichkeit des Eintritts einer Schwangerschaft nach IVF-Behandlung.

Je stärker die Stichprobe an IVF-Patientinnen mit dem tatsächlichen Outcome der IVF-Behandlung korreliert, umso präziser ließe sich der tatsächliche Median der Lymphozyten-Werte ermitteln und damit auch die Erfolgswahrscheinlichkeit der In-vitro-Fertilisation prognostizieren.

Diskussion

Einfluss der Lymphozyten auf den IVF-Erfolg

Omega-3-Fettsäure-supplementierte Patientinnen ohne IVF-Erfolg, zeigten erniedrigte Werte für T-Helferzellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, dem CD4/CD8-Quotienten und regulatorischen T-Zellen. Bisher wurde beschrieben, dass sich eine Verschiebung des Verhältnisses von TH1-Helferzellen (zellvermittelte Immunantwort) und TH2-Helferzellen (humorale Immunantwort) mit einem Versagen der Implantation nach dem Transfer von in-vitro-fertilisierten Embryonen in Verbindung bringen lässt [36]. Veränderte TH1/TH2-Quotienten führen zu wiederholten Misserfolgen von IVF-Versuchen, durch die hormonelle Behandlung während einer Kinderwunschbehandlung wird der negative Einfluss von hohen TH1/TH2-Quotienten noch verstärkt [37,38,39]. Auch wiederkehrende Spontanaborte lassen sich auf signifikant erhöhte TH1/TH2-Quotienten zurückführen [38]. Verminderte Zahlen an CD4-positiven T-Zellen können eindeutig mit erfolglosen IVF-Versuchen assoziiert werden [40], erhöhte Werte von NK-Zellen gehen mit einer erhöhten Misserfolgsquote von IVF-Versuchen einher [41-43], was sich in der vorliegenden Studie tendentiell ebenfalls widerspiegelt. So zeigen Patientinnen mit nicht-erfolgreicher IVF-Behandlung hier zwar erhöhte, jedoch im Vergleich statistisch nicht signifikant veränderte NK-Zell-Werte. Kürzlich publizierte Daten zeigen hingegen auf einen Zusammenhang von hohen NK- und T-NK-Zellen und einer signifikanten Verbesserung der IVF-Erfolgsquote [44,45]. Die Datenlage zur Bedeutung der NK-Zellen ist damit widersprüchlich und auch durch die hier vorgelegte Studie nicht weiter klären. In den hier vorgestellten Daten wiesen erfolgreich IVF-behandelte Patientinnen erhöhte Werte an regulatorischen T-Zellen auf, was mit der Literatur konkordant ist: Erhöhte Hämoxxygenase-1-Werte führen zu einer Anhebung regulatorischen T-Zellen und damit zu einer Begünstigung von Befruchtung, Implantation und fetalem Wachstum [46]. Eine Stimulierung mit humanem Choriongonadotropin führt zu erhöhten Werten von regulatorischen T-Zellen und zu einer erhöhten Erfolgsrate von künstlichen Befruchtungen [47]. Eine eindeutige Assoziation von erhöhten Werten an regulatorischen T-Zellen mit erhöhten Erfolgsaussichten von IVF-Behandlungen wurde erst kürzlich gezeigt [48]. Im hier vorliegenden Omega-3-Fettsäure-supplementierten Patientenkollektiv wurden bei erfolglos IVF-behandelten Patientinnen leicht erniedrigte, verglichen mit den erfolgreich behandelten jedoch nicht signifikant differente B-Lymphozyten-Werte detektiert. Die bisher dazu veröffentlichte Datenlage ist ebenfalls widersprüchlich [49, 50].

Einfluss der Lymphozyten auf die Fehlgeburtsrate

In der vorliegenden Studie gab es lediglich eine Patientin, die eine Fehlgeburt erlitt. Diese zeigte im Vergleich zu schwangeren Kinderwunschpatientinnen signifikant erhöhte Werte für T-Suppressorzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen. Auch der CD4/CD8-Quotient war signifikant erhöht, die NK-Zellen waren jedoch signifikant erniedrigt. Eine Übereinstimmung mit publizierten Daten fand sich nicht [38,51-53]. Die geringe Anzahl an Fehlgeburten in der hier vorgestellten Studie erlaubt keine jedoch weitere Interpretation. Sie spricht hingegen am ehesten für den günstigen Einfluss der Omega-3-Fettsäure-Substitution auf die Prävention von Fehlgeburten bei IVF-Patientinnen [3].

Zeitlicher Verlauf der Lymphozyten-Werte

Für keine der gemessenen Lymphozytenpopulationen konnte im Rahmen dieser Studie eine signifikante Änderung über den Behandlungszeitraum gezeigt werden. Eine Beeinflussung der Lymphozytenwerte durch die Omega-3-Fettsäure-Substitution ließ sich somit in diesem speziellen Patientenkollektiv nicht belegen. Literaturdaten zeigen hingegen einen möglichen Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf Blutzellen. So wurde bei Kaninchen eine Abnahme der Thrombozytenzahl unter Fischölsubstitution beobachtet [54], bei Angina-pectoris-Patienten reduzierte eine vierwöchige Substitution mit Omega-3-Fettsäuren sowohl die Zahl der Thrombozyten als die Thromboxankonzentrationen [55]. Eine weitere Studie zeigt, dass Öle marinen Ursprungs sowohl eine Abnahme der Thrombozytenzahl als auch antithrombotisch wirkende Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung der Thrombozytenmembran hervorrufen [56]. Die Plättchenaggregation bei Diabetespatienten hingegen wird durch Omega-3-Fettsäuren nicht beeinflusst [57]. Auf Grundlage dieser Datenbasis dürften somit für IVF-behandelte Patientinnen nachteilige Auswirkungen einer Omega-3-Fettsäuren-Supplementierung auf die Implantation nicht zu erwarten sein, da ein verringertes Thromboserisiko grundsätzlich mit positiven Effekten auf den Verlauf einer Schwangerschaft vergesellschaftet ist.

In Bezug auf Leukozyten fand sich eine Abnahme deren Zellzahl, insbesondere die der Lymphozyten, nach Zufuhr von mit Omega-3-Fettsäuren angereicherter Nahrung bei Übergewichtigen [58]. Im peripheren Blut von Mäusen konnte nach vierwöchiger Omega-3-Fettsäuresubstitution keine Veränderung der relativen Anteile an CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten festgestellt werden [59]. Auch bei übergewichtigen jungen Männern wurde kein Effekt einer Omega-3-Fettsäure-Substitution auf die T-Zellzahlen und auf die CD4- und CD8-positiven Lymphozyten-Populationen nachgewiesen [58].

Prognostischer Wert der Größe unterschiedlicher Lymphozyten-Populationen

Bei T- und B-Lymphozyten, T-Helferzellen, dem CD4/CD8-Quotienten, regulatorischen T-Zellen lagen die Werte in der vorlegten Studie der erfolglos IVF-behandelten Patientinnen signifikant häufiger unterhalb des Medians der jeweiligen Verteilung als bei den erfolgreich behandelten. Mit zunehmender Anzahl an Werten unterhalb des Medians sank der kumulative Anteil an schwangeren Patientinnen hochsignifikant.

Über den Ansatz, anhand eines Blutprofils eine Prognose über den weiteren Verlauf einer Kinderwunschbehandlung treffen zu können, wurde vor Kurzem beschrieben [60]. Eine erhöhte Expression von CD56 und CD158a in T-Lymphozyten, erniedrigte Werte an CD4-positiven T-Zellen, eine erhöhte Expression von HLA-DR in T-Suppressorzellen und NK-Zellen, eine erhöhte Anzahl an NK-Zellen, eine erhöhte Expression von CD158a und eine verringerte Expression von CD8 in NK-Zellen wurden hier als prognostisch negativ für den weiteren Verlauf der Kinderwunschbehandlung beschrieben. Auch hier wurde für jede Patientin ermittelt, für wie viele der Parameter ihre Blutwerte in einem kritischen Bereich lagen. Mit zunehmender Anzahl an kritischen Blutwerten sank die Erfolgsrate der IVF-Behandlung [60]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an kritischen Blutwerten eine verbesserte Aussagekraft als die Einzelwerte an immunologischen Parametern aufwies. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Definition von Grenzwerten, jenseits derer ein negativer Einfluss auf den Verlauf einer IVF-Behandlung feststellbar ist, für den die Erstellung eines Risikoprofils einer jeden Patientin sinnvoll zu sein scheint. In der hier vorgelegten Studie wurde der Median der jeweiligen Verteilung der immunologischen Blutcharakteristika als Grenzwert definiert. Dieser könnte mit zunehmender Studiengröße präzisiert und damit auch die Prognosestellung verbessert werden.

Einfluss der Immunglobuline und Interleukine auf den IVF-Erfolg

Unter Omega-3-Fettsäure-Supplementierung durch IVF-Therapie schwanger gewordene Kinderwunschpatientinnen zeigten signifikant niedrigere Werte des löslichen Interleukin-2-Rezeptors als erfolglos behandelte. Bisher publizierte Daten wiesen keinen eindeutigen Einfluss einer Omega-3-Fettsäure-Substitution auf die Serumspiegel des löslichen Interleukin-2-Rezeptors aus. So gibt es Daten, die keine Beeinflussung zeigen [61,62], andere Studien beschreiben eine Abnahme der Serumwerte [63,64]. Die Höhe des löslichen Interleukin-2-Rezeptors ließ sich nicht mit dem Eintreten von ektopen Schwangerschaften korrelieren [65,66], erhöhte sIL-2-Rezeptor-Werte wurden negatives prognostisches Kriterium für den Erfolg von IVF-Behandlungen In-vitro-Fertilisationen ausgemacht [67].

Für die übrigen untersuchten Parameter IgA, E, G und M, IgG-Subklassen, IL-6, -8 und -10 und TNF- α ergaben sich in der hier vorgelegten Untersuchung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen.

Bisher publizierte Daten zu den Immunglobulin-Spiegeln basieren zumeist auf geringen Fallzahlen. So zeigten Frauen mit Fertilitätsproblemen [68] wie Kinderwunschpatientinnen mit Antiphospholipid-Syndrom [69] höhere Werte für IgG und IgM als normal fruchtbare Frauen. Auch wiesen infertile Frauen mit Antiphospholipid-Syndrom erhöhte IgA-Werte auf [70].

Die Datenlage zu Interleukinen ist widersprüchlich. Bei Frauen mit ektopter Schwangerschaft waren die Serumwerte von IL-6, IL-8 und TNF- α erhöht [69]. Andererseits wurden signifikant erniedrigte IL-8 Werte bei ektopten Schwangerschaften detektiert [71]. Nicht mit den hier erhobenen Daten im Einklang steht der Befund des erhöhten Verhältnisses von TNF- α zu IL-10 bei infertilen verglichen mit fertilen Frauen [72].

Bedeutung für die Praxis

Sowohl in der vorliegenden Studie als auch anhand bisher publizierter Daten konnte gezeigt werden, dass eine Erniedrigung von CD4-positiven T-Zellen mit erhöhten Misserfolgsraten von In-vitro-Fertilisationen assoziiert ist. Erhöhte Werte an regulatorischen T-Zellen führen wie durch uns als auch in weiteren Publikationen gezeigt zu signifikant verbesserten Erfolgsquoten von Kinderwunschbehandlungen.

Bei sechs der analysierten Laborparameter (T-Lymphozyten, T-Helferzellen, B-Lymphozyten, CD4/CD8-Quotienten und beiden Klassen regulatorischer T-Zellen) lagen die Werte der erfolglos IVF-behandelten Patientinnen signifikant häufiger unterhalb des Medians der jeweiligen Verteilung als bei erfolgreich behandelten. Eine Erniedrigung von CD4-positiven T-Zellen war mit erhöhten Misserfolgsraten von in-vitro-Fertilisationen assoziiert. Erhöhte Werte regulatorischer T-Zellen führten zu signifikant verbesserten Erfolgsaussichten von Kinderwunschbehandlungen. Bei T-Lymphozyten, T-Helferzellen, B-Lymphozyten, dem CD4/CD8-Quotienten und regulatorischen T-Zellen lagen die Werte der erfolglos behandelten Patientinnen signifikant häufiger unterhalb des Medians der jeweiligen Verteilung als bei erfolgreich behandelten. Diese Befunde geben die Möglichkeit, ein einfaches prognostisches Maß für den Verlauf der IVF-Behandlung zu ermitteln, indem die Werte der sechs genannten Parameter mit dem jeweiligen Median der Verteilung verglichen werden. Mit zunehmender Anzahl an Werten unterhalb des Medians sinkt die Wahrscheinlichkeit des Eintritts einer Schwangerschaft nach IVF-Behandlung.

Literatur

1. Revermann C., Hüsing B. Fortpflanzungsmedizin - Rahmenbedingungen, wissenschaftlich-technische Entwicklungen und Folgen. TAB-Arbeitsbericht 2010; 139.
2. DIR-Jahrbuch Mittleres Alter der Frauen und Männer 1997 - 2012. 2013. <http://www.kup.at/kup/pdf/11987.pdf>.
3. Bareksei A., Hafner G., Pfeiffer S., Schlatterer K. Einfluss von präkonzeptioneller Omega-3-Fettsäuresubstitution auf den IVF-Erfolg sowie Abort-Raten bei Patientinnen eines deutschen Kinderwunschzentrums. J Reproduktionsmed Endokrinol, submitted.
4. Kermack AJ., Calder PC., Houghton FD., Godfrey KM., Macklon NS. A randomised controlled trial of a preconceptional dietary intervention in women undergoing IVF treatment (PREPARE trial). BMC Womens Health 2014; 14:130.
5. Doria S., Carvalho F., Ramalho C., Lima V., Francisco T., Machado AP., Brandao O., Sousa M., Matias A., Barros A. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 147:144-150.
6. Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. Am J Reprod Immunol 2008; 59: 388-400.
7. Beaman KD., Ntrivalas E., Mallers TM., Jaiswal MK., Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Immune etiology of recurrent pregnancy loss and its diagnosis. Am J Reprod Immunol 2012; 67:319-25.
8. Foidart JM., Hustin J., Dubois M., Schaaps JP. The human placenta becomes haemochorial at the 13th week of pregnancy. Int J Dev Biol 1992; 36:451-53.
9. Fujiwara H. Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? Mol Hum Reprod 2009; 15:335-43.
10. Challis JR., Lockwood CJ., Myatt L., Norman JE., Strauss JF. 3rd, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. Reprod Sci 2009; 16, 206-15.
11. Blidaru I., Zugun F., Cianga C., Carasevici E. Maternal immunophenotypic profile in normal pregnancy and preterm birth. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 2002; 107:343-47.
12. Lin S., Leonard D., Co MA., Mukhopadhyay D., Giri B., Perger L., Beeram MR., Kuehl TJ., Uddin MN. Pre-eclampsia has an adverse impact on maternal and fetal health. Transl Res 2015; 165:449-63
13. Luppi P., Tse H., Lain KY., Markovic N., Piganelli JD., DeLoia JA. Preeclampsia activates circulating immune cells with engagement of the NF-kappaB pathway. Am J Reprod Immunol 2006; 56:135-44.

14. Darmochwal-Kolarz D., Saito S., Rolinski J., Tabarkiewicz J., Kolarz B., Leszczynska-Gorzela B., Oleszczuk J. Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:39-45.
15. Sasaki Y., Darmochwal-Kolarz D., Suzuki D., Sakai M., Ito M., Shima T., Shiozaki A., Rolinski J., Saito S. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 2007; 149:139-45.
16. Nishizawa H., Hasegawa K., Suzuki M., Kamoshida S., Kato T., Saito K., Tsutsumi Y., Kurahashi H., Udagawa Y. The etiological role of allogeneic fetal rejection in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:11-20.
17. Canzoneri BJ., Lewis DF., Groome L., Wang Y. Increased neutrophil numbers account for leukocytosis in women with preeclampsia. *Am J Perinatol* 2009; 26:729-32.
18. Daimon E., Wada Y. Role of neutrophils in matrix metalloproteinase activity in the preimplantation mouse uterus. *Biol Reprod* 2005; 73:163-71.
19. Müller I., Munder M., Kropf P., Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* 2009; 30:522-30.
20. Jones RL., Hannan NJ., Kaitu'u TJ., Zhang J., Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:6155-67.
21. Wan H., Coppens JM., van Helden-Meeuwssen CG., Leenen PJ., van RN., Khan NA., Kiekens RC., Benner R., Versnel MA. Chorionic gonadotropin alleviates thioglycollate-induced peritonitis by affecting macrophage function. *J Leukoc Biol* 2009; 86:361-70.
22. Abrahams VM., Visintin I., Aldo PB., Guller S., Romero R., Mor G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol* 2005; 175:8096-104.
23. Huang SJ., Schatz F., Masch R., Rahman M., Buchwalder L., Niven-Fairchild T., Tang C., Abrahams VM., Krikun G., Lockwood CJ. Regulation of chemokine production in response to pro-inflammatory cytokines in first trimester decidual cells. *J Reprod Immunol* 2006; 72:60-73.
24. Beer AE., Kwak JY., Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:376-82.
25. Fukui A., Fujii S., Yamaguchi E., Kimura H., Sato S., Saito Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 413-22.

26. Thum MY., Bhaskaran S., Bansal AS., Shehata H., Ford B., Sumar N., Abdalla HI. Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+ NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Hum Reprod* 2005; 20:1272-76.
27. Baczkowski T., Kurzawa R. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes on the day of embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45 Suppl 1:S73-7.
28. Miko E., Manfai Z., Meggyes M., Barakonyi A., Wilhelm F., Varnagy A., Bodis J., Illes Z., Szekeres-Bartho J., Szereday L. Possible role of natural killer and natural killer T-like cells in implantation failure after IVF. *Reprod Biomed Online* 2010; 21:750-56.
29. Laird SM., Tuckerman EM., Cork BA., Linjawi S., Blakemore AI., Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2003; 9:163-74.
30. Tian X., Zhang L., Wu Y. The role of decidua tissue lymphocytes in early pregnancy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1998; 33: 7-9.
31. Zenclussen AC., Gerlof K., Zenclussen ML., Ritschel S., Zambon BA., Fest S., Hontsu S., Ueha S., Matsushima K., Leber J., Volk HD. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol* 2006; 36:82-94.
32. Zenclussen AC., Gerlof K., Zenclussen ML., Sollwedel A., Bertoja AZ., Ritter T., Kotsch K., Leber J., Volk HD. 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* 2005; 166:811-22.
33. Robertson SA., Guerin LR., Bromfield JJ., Branson KM., Ahlstrom AC., Care AS. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod* 2009; 80:1036-45.
34. Kemp MW. Preterm birth, intrauterine infection, and fetal inflammation. *Front Immunol* 2014; 5:574.
35. Svensson-Arelund J., Ernerudh J. The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface. *Am J Reprod Immunol* 2015; 74:100-9
36. Liang PY., Yin B., Cai J., Hu XD., Song C., Wu TH., Zhao J., Li GG., Zeng Y. Increased circulating Th1/Th2 ratios but not other lymphocyte subsets during controlled ovarian stimulation are linked to subsequent implantation failure after transfer of in vitro fertilized embryos. *Am J Reprod Immunol* 2015; 73:12-21.

37. Ng SC., Gilman-Sachs A., Thaker P., Beaman KD., Beer AE., Kwak-Kim J. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:77-86.
38. Kwak-Kim JY., Chung-Bang HS., Ng SC., Ntrivalas EI., Mangubat CP., Beaman KD., Beer AE., Gilman-Sachs A. Increases T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18:767-73.
39. Kalu E., Bhaskaran S., Thum MY., Vishwanatha R., Croucher C., Sherriff E., Ford B., Bansal AS. Serial estimation of Th1:th2 cytokines profile in women undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59:206-11.
40. Chernyshov VP., Dons'koi BV., Sudoma IO., Goncharova YO. Favorable immune phenotype predicts successful implantation and pregnancy. *Immunol Lett* 2014; 162:217-21.
41. Coulam CB., Roussev RG. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:58-62.
42. Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59:388-400.
43. van den Heuvel MJ., Peralta CG., Hatta K., Han VK., Clark DA. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:447-59.
44. Ramos-Medina R., Garcia-Segovia A., Gil J., Carbone J., Aguaron de la Cruz A., Seyfferth A., Alonso B., Alonso J., Leon JA., Alecsandru D., Melia E., Carrillo de Albornoz E., Ordonez D., Santillan I., Verdu V., Garcia Ruiz de Morales JM., Lopez-Hoyos M., Lopez Larios A., Sampalo A., Caballero P., Ortiz Quintana L., Fernandez-Cruz E., Sanchez-Ramon S. Experience in IVIg therapy for selected women with recurrent reproductive failure and NK cell expansion. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71:458-66.
45. Zhou J., Zhao X., Wang Z., Wang J., Sun H., Hu Y. High circulating CD3+CD56+CD16+ natural killer-like T cell levels predict a better IVF treatment outcome. *J Reprod Immunol* 2013; 97:197-203.
46. Schumacher A., Zenclussen AC. Effects of heme oxygenase-1 on innate and adaptive immune responses promoting pregnancy success and allograft tolerance. *Front Pharmacol* 2015; 5:288.

47. Elmaagacli AH., Ditschkowski M., Steckel NK., Gromke T., Ottinger H., Hillen U., Baba HA., Trenchel R., Beelen DW., Koldehoff M. Human chorionic gonadotropin and indolamine 2,3-dioxygenase in patients with GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49:800-5.
48. Zhou J., Wang Z., Zhao X., Wang J., Sun H., Hu Y. An increase of Treg cells in the peripheral blood is associated with a better in vitro fertilization treatment outcome. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68:100-6.
49. Thum MY., Bhaskaran S., Bansal AS., Shehata H., Ford B., Sumar N., Abdalla HI. Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+ NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Hum Reprod* 2005; 20:1272-76.
50. Vujisic S., Lepej SZ., Aksamija A., Jerkovic L., Sokolic B., Kupesic S., Vince A. B- and T-cells in the follicular fluid and peripheral blood of patients undergoing IVF/ET procedures. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:379-85.
51. Fukui A., Kwak-Kim J., Ntrivalas E., Gilman-Sachs A., Lee SK., Beaman K. Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. *Fertil Steril* 2008; 89:157-65.
52. Almasry SM., Elmansy RA., Elfayomy AK., Algaidi SA. Ultrastructure alteration of decidual natural killer cells in women with unexplained recurrent miscarriage: a possible association with impaired decidual vascular remodelling. *J Mol Histol* 2015; 46:67-78.
53. Wu L., Luo LH., Zhang YX., Li Q., Xu B., Zhou GX., Luan HB., Liu YS. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12:74.
54. Lichtenstein AH., Chobanian AV. Effect of fish oil on atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Arteriosclerosis* 1990; 10:597-606.
55. Kalinkina OM., Perova NV., Zytkova VP., Gratsianskii NA., Mel'kina OE., Sokolova MA., Oganov RG. The effect of a diet enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids on thrombocyte functional activity and on the blood lipid-apolipoprotein spectrum in newly occurring stenocardia. *Ter Arkh* 1990; 62:77-83.
56. Vognild E., Elvevoll EO., Brox J., Olsen RL., Barstad H., Aursand M., Osterud B. Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. *Lipids* 1998; 33:427-36.

57. Woodman RJ., Mori TA., Burke V., Puddey IB., Barden A., Watts GF., Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2003; 166:85-93.
58. Mukaro VR., Costabile M., Murphy KJ., Hii CS., Howe PR., Ferrante A. Leukocyte numbers and function in subjects eating n-3 enriched foods: selective depression of natural killer cell levels. *Arthritis Res Ther* 2008; 10:R57.
59. Sasaki T., Kanke Y., Nagahashi M., Toyokawa M., Matsuda M., Shimizu J., Misawa Y., Takita T. Dietary docosahexaenoic acid can alter the surface expression of CD4 and CD8 on T cells in peripheral blood. *J Agric Food Chem* 2000; 48:1047-49.
60. Chernyshov VP., Dons'koi BV., Sudoma IO., Goncharova YO. Favorable immune phenotype predicts successful implantation and pregnancy. *Immunol Lett* 2014; 162:217-21.
61. Thienprasert A., Samuhaseneetoo S., Popplestone K., West AL., Miles EA., Calder PC. Fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids selectively affect plasma cytokines and decrease illness in Thai schoolchildren: a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. *J Pediatr* 2009; 154:391-95.
62. Kelley DS., Taylor PC., Nelson GJ., Mackey BE. Dietary docosahexaenoic acid and immunocompetence in young healthy men. *Lipids* 1998; 33:559-66.
63. Schauder P., Rohn U., Schafer G., Korff G., Schenk HD. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on DNA synthesis, cytokine release and receptor expression by lymphocytes in the postoperative period. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 1:S103-S110.
64. Almallah YZ., El-Tahir A., Heys SD., Richardson S., Eremin O. Distal procto-colitis and n-3 polyunsaturated fatty acids: the mechanism(s) of natural cytotoxicity inhibition. *Eur J Clin Invest* 2000; 30:58-65.
65. Soriano D., Hugol D., Quang NT., Darai E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 79:975-80.
66. Morelli SS., Keegan DA., Krey LC., Katz J., Liu M., Noyes N. Early serum interleukin-8 evaluation may prove useful in localizing abnormally implanted human gestations after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008; 90:2068-72.
67. Fasouliotis SJ., Spandorfer SD., Witkin SS., Schattman G., Liu HC., Roberts JE., Rosenwaks Z. Maternal serum levels of interferon-gamma and interleukin-2 soluble receptor-alpha predict the outcome of early IVF pregnancies. *Hum Reprod* 2004; 19:1357-63.

68. Hammar O., Roth B., Bengtsson M., Mandl T., Ohlsson B. Autoantibodies and gastrointestinal symptoms in infertile women in relation to in vitro fertilization. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013; 13:201.
69. Ulcova-Gallova Z. Repeated miscarriages in patients with antiphospholipid syndrome and subjected to in vitro fertilization: the importance of preimplantation genetic diagnosis. *Lupus* 2012; 21:744-46.
70. Paulmyer-Lacroix O., Despierres L., Courbiere B., Bardin N. Antiphospholipid antibodies in women undergoing in vitro fertilization treatment: clinical value of IgA anti-beta2glycoprotein I antibodies determination. *Biomed Res Int* 2014; 314704.
71. Soriano D., Hugol D., Quang NT., Darai E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 79:975-80.
72. Ozkan ZS., Deveci D., Kumbak B., Simsek M., Ilhan F., Sekercioglu S., Sapmaz E. What is the impact of Th1/Th2 ratio, SOCS3, IL17, and IL35 levels in unexplained infertility? *J Reprod Immunol* 2014; 103:53-8.

Abbildungen

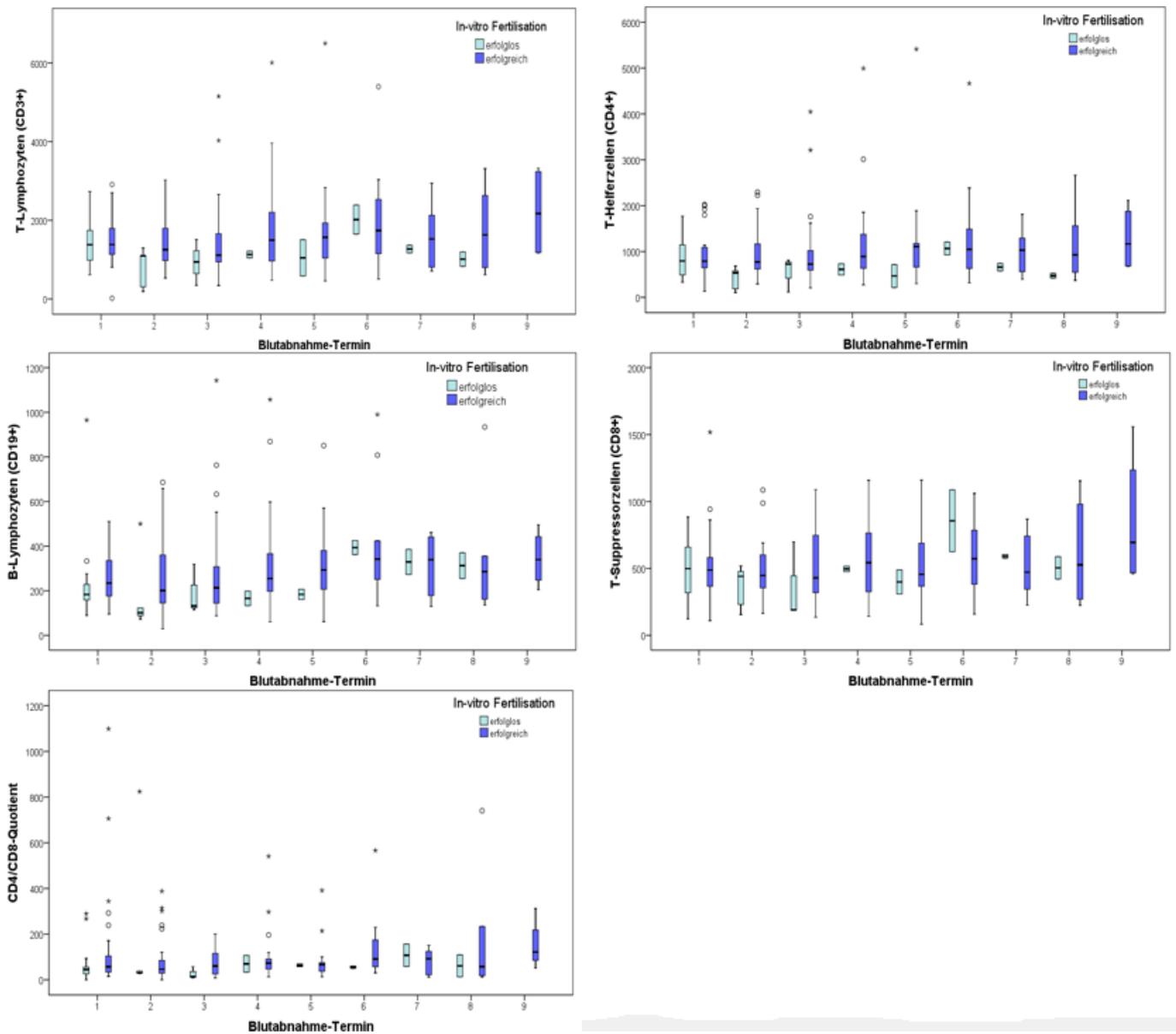


Abb. 1: zeitlicher Verlauf von T-Lymphozyten (CD3+), B-Lymphozyten (CD19+), T-Helfer-Zellen (CD4+), T-Suppressorzellen (CD8+) und der CD4/CD8-Ratio bei perikonzeptionell Omega-3-Fettsäure-substituierten Patientinnen mit (n=35) und ohne IVF-Erfolg (n=17)

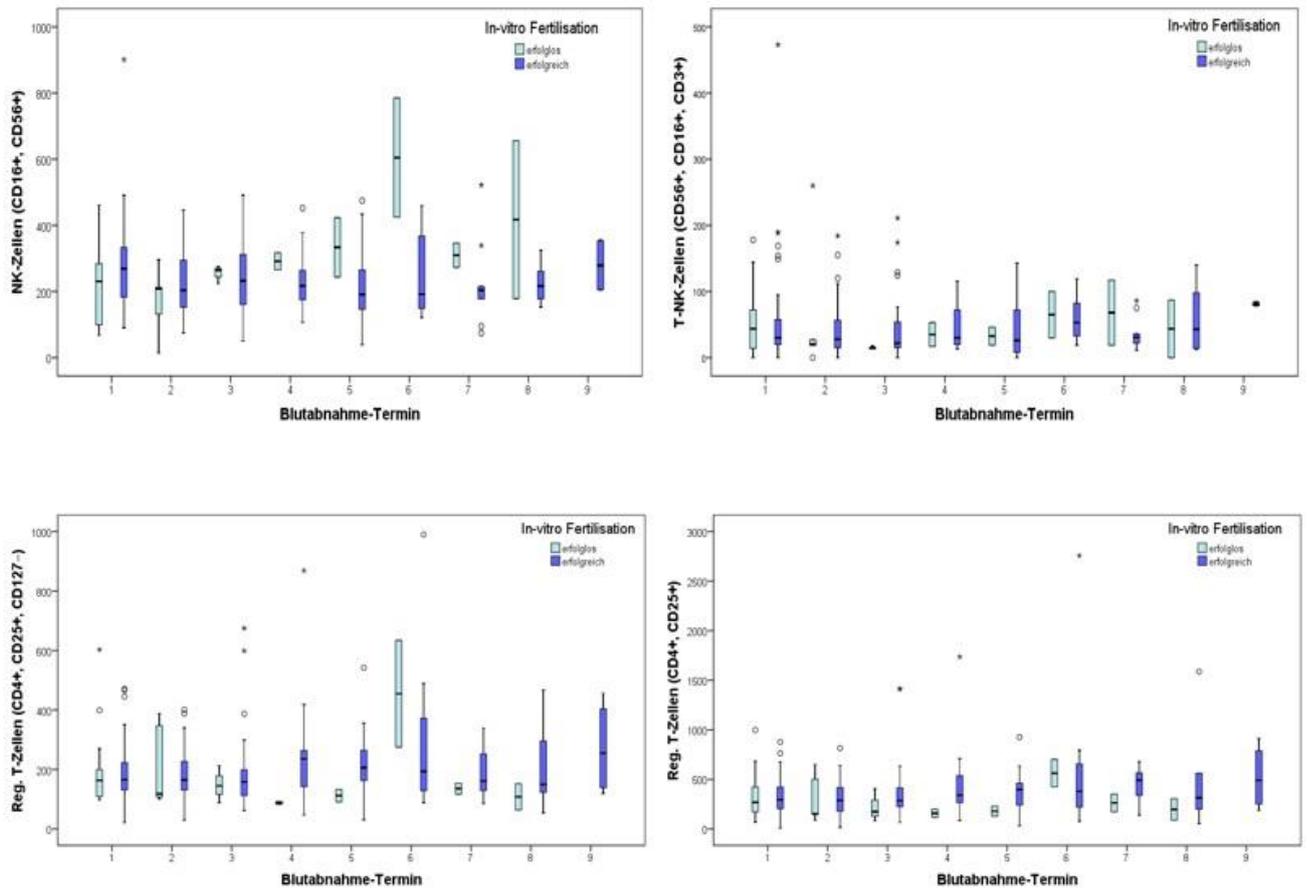


Abb. 2: zeitlicher Verlauf von NK-Zellen (CD16+, CD56+), T-NK-Zellen (CD56+, CD16+, CD3+), regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-) und regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+) bei perikonzeptionell Omega-3-Fettsäure-substituierten Patientinnen mit (n=35) und ohne IVF-Erfolg (n=17)

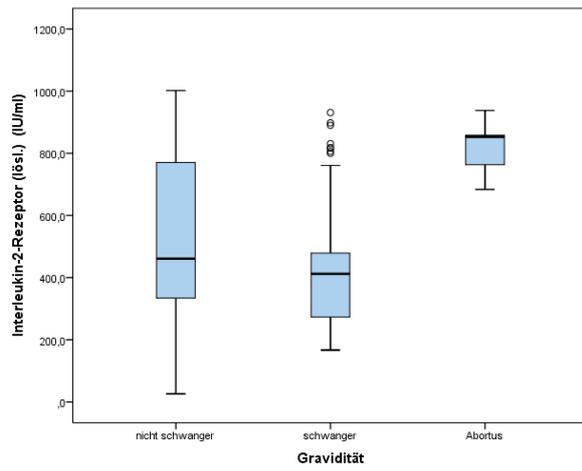


Abb. 3: Abhängigkeit der Höhe des löslichen Interleukin-2-Rezeptors vom Ausgang der Kinderwunschbehandlung

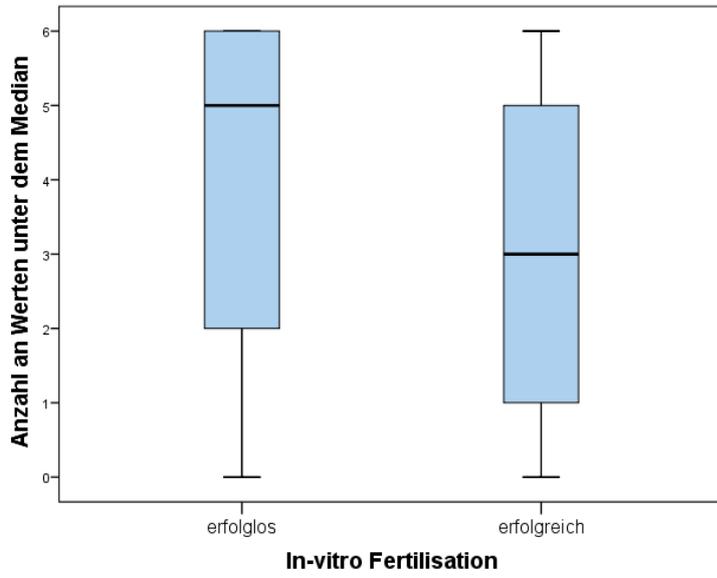


Abb. 4: Abhängigkeit des Erfolges der In-vitro-Fertilisation von der Anzahl an Lymphozyten-Werten unter dem Median der Stichprobenverteilung

Tabellen

Tabelle 1: Unterschiede zwischen den Lymphozyten-Subpopulationen bei Omega-3-Fettsäure-supplementierten Patientinnen mit (n=35) und ohne IVF-Erfolg (n=17)

Parameter	Patientinnen ohne IVF-Erfolg (n=17)	Patientinnen mit IVF-Erfolg (n=35)	Differenz des Mittelwerts	p-Wert
B-Lymphozyten (CD19+)	236.5±165.7	303.3±194.5	-66.8	0.063
CD4/CD8-Ratio	84±145.2	107.2±138.7	-23.2	0.378
NK-Zellen (CD16+, CD56+)	264.9±155.4	244.4±116.8	20.5	0.379
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+)	306.2±218.8	413.9±331.1	-107.6	0.071
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+) [%]	16.5±9.3	17.3±6.8	-0.8	0.553
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-)	188.8±137.9	217.2±144.8	-28.4	0.294
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-) [%]	10.4±4.8	9.4±3.4	0.9	0.178
T-Helfer-Zellen (CD4+)	714.8±379.9	1082.6±795.2	-367.8	0.009
T-Lymphozyten (CD3+)	1237.9±556.3	1673.5±1002.7	-435.6	0.015
T-NK-Zellen (CD56+, CD16+, CD3+)	52.0±57.9	52.9±56.7	-0.8	0.938
T-Suppressor-Zellen (CD8+)	485.6±216.1	548.9±282.6	-63.3	0.218

Tabelle 2: Unterschiede zwischen den Lymphozyten-Subpopulationen bei Omega-3-Fettsäure-supplementierten Patientinnen mit IVF-Therapieerfolg und der Patientin, die nach IVF-Erfolg eine Fehlgeburt erlitt

Parameter	Patientin ohne IVF-Erfolg (n=1)	Patientinnen mit IVF-Erfolg (n=35)	Differenz des Mittelwerts	p-Wert
B-Lymphozyten (CD19+)	294.0±192.6	521.73±80.3	-227.7	0.002
CD4/CD8-Ratio	101.1±135.0	252.7±157.0	-151.6	0.004
NK-Zellen (CD16+, CD56+)	248.2±117.4	153.4±43.4	94.8	0.035
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+)	403.5±332.6	660.1±165.3	-256.6	0.044
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+) [%]	17.3±6.9	18.6±4.0	-1.3	0.628
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-)	212.4±144.7	331.6±93.9	-119.2	0.032
regulatorische T-Zellen (CD4+, CD25+, CD127-) [%]	9.4±3.5	9.3±2.2	0.1	0.914
T-Helfer-Zellen (CD4+)	1052.5±797.7	1796.3±104.8	-734.8	0.015
T-Lymphozyten (CD3+)	1626.9±996.5	2778.4±172.8	-1151.5	0.003
T-NK-Zellen (CD56+, CD16+, CD3+)	51.8±56.6	78.6±56.8	-26.8	0.222
T-Suppressor-Zellen (CD8+)	534.3±278.3	896.0±110.4	-361.7	0.001

Tabelle 3: Vergleich von IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α bei Omega-3-Fettsäure-supplementierten Patientinnen mit (n=35) und ohne IVF-Erfolg (n=17)

Parameter	Patientinnen ohne IVF-Erfolg (n=17)	Patientinnen mit IVF-Erfolg (n=35)	Differenz des Mittelwerts	p-Wert
IL-6 [pg/ml]	33.8 \pm 89.8	2.1 \pm 0.4	31.7	0.107
IL-8 [pg/ml]	14.8 \pm 22.9	27.6 \pm 59.4	-12.8	0.539
IL-10 [pg/ml]	5.0 \pm 0.1	6.7 \pm 7.4	-1.6	0.518
TNF- α [pg/ml]	5.6 \pm 0.9	6.7 \pm 1.7	-1.2	0.137

Tabelle 4: Vergleich von Immunglobulinkonzentrationen Omega-3-Fettsäure-substituierter Patientinnen mit (n=35) und ohne IVF-Erfolg (n=17)

Parameter	Patientinnen ohne IVF-Erfolg (n=17)	Patientinnen mit IVF-Erfolg (n=35)	Differenz des Mittelwertes	p-Wert
IgA [mg/ml]	1.7±0.9	2.1±0.7	-0.38	0.277
IgE [ng/ml]	68.1±105.4	55.7±59.9	12.5	0.672
IgG [mg/ml]	9.3±3.6	11.5±2.2	-1.6	0.115
IgG1 [mg/ml]	5.2±2.1	6.4±1.4	-1.1	0.123
IgG2 [mg/ml]	3.6±1.6	4.7±1.4	-1.2	0.107
IgG3 [mg/ml]	0.4±0.2	0.6±0.3	-0.2	0.109
IgG4 [mg/ml]	0.3±0.5	0.7±0.9	-0.3	0.369
IgM [mg/ml]	1.2±0.8	1.2±0.5	0.1	0.809

Tabelle 5: Ergebnisse der Diskriminanzanalyse unter Verwendung von T-Lymphozyten-, B-Lymphozyten-, NK-Zell-, T-Helferzell-, T-Suppressorzell-, T-NK-Zell-, regulatorische T-Zell-Zahlen, CD4/CD8-Quotienten, löslichem IL-2-Rezeptor und des Patientinnenalters für die Zielvariablen „schwanger“ und „nicht-schwanger“

	nicht-schwanger (vorhergesagt)	schwanger (vorhergesagt)
nicht-schwanger (tatsächlich)	9	15
schwanger (tatsächlich)	3	137

Tabelle 6: Ergebnisse der Diskriminanzanalyse unter Verwendung von T-Lymphozyten-, B-Lymphozyten-, NK-Zell-, T-Helferzell-, T-Suppressorzell-, T-NK-Zell-, regulatorische T-Zell-Zahlen, CD4/CD8-Quotienten, löslichem IL-2-Rezeptorfür und des Patientinnenalters für die Zielvariablen „schwanger“ und „Abort“

	schwanger (vorhergesagt)	Abort (vorhergesagt)
schwanger (tatsächlich)	139	1
Abort (tatsächlich)	0	7

Tabelle 7: Vergleich der Lage der analysierten Parameter zum Median der Stichprobe in Abhängigkeit der Gravidität.

Parameter	Gravidität	unter Median	gleich Median	über Median	p-Wert
T-Lymphozyten (CD3+)	nicht schwanger	21	1	12	0,024
	schwanger	81	1	84	
	Abort	0	0	7	
NK-Zellen (CD16+, CD56+)	nicht schwanger	14	0	20	0,224
	schwanger	82	3	81	
	Abort	6	0	1	
T-Helferzellen (CD4+)	nicht schwanger	23	0	11	0,017
	schwanger	79	2	85	
	Abort	0	0	7	
B-Lymphozyten (CD19+)	nicht schwanger	23	0	11	0,003
	schwanger	80	0	85	
	Abort	0	0	7	
T-NK-Zellen (CD56+,CD16+,CD3+)	nicht schwanger	18	0	16	0,001
	schwanger	85	1	80	
	Abort	0	1	6	
T-Suppressorzellen (CD8+)	nicht schwanger	17	1	16	0,015
	schwanger	86	0	80	
	Abort	0	0	7	
CD4/CD8-Quotient	nicht schwanger	25	0	9	0,004
	schwanger	78	1	87	
	Abort	0	0	7	
Reg. T-Zellen (CD4+, CD25+)	nicht schwanger	22	0	12	0,032
	schwanger	81	2	83	
	Abort	0	0	7	
Reg. T-Zellen (CD4+,CD25+,CD127-)	nicht schwanger	23	0	11	0,014
	schwanger	78	3	85	
	Abort	0	0	7	
löslicher Interleukin-2-Rezeptor	nicht schwanger	11	0	13	0,082
	schwanger	74	2	65	
	Abort	0	0	7	

Tabelle 8: Abhängigkeit des IVF-Erfolges von der Anzahl an Lymphozyten-Werten unter dem Median der jeweiligen Stichprobenverteilung

Anzahl an Werte unterhalb Median	Patientinnen ohne IVF-Erfolg (n=17)	Patientinnen mit IVF-Erfolg (n=35)	Anteil der Schwangeren	Kumulativer Anteil der Schwangeren
0	1	43	97.7	97.7
1	3	26	89.7	94.5
2	5	16	76.2	90.4
3	5	16	76.2	87.8
4	1	19	95.0	88.9
5	9	19	67.9	85.3
6	10	34	77.3	83.6