

Aus der Klinik und Poliklinik
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. K.Friese)

**Bestimmung der Zytokine Interleukin-1 α , Interleukin-1 β , Interleukin-2, Interleukin-3
und Interleukin-4 im Vaginalsekret bei Frauen mit Bakterieller Dysbiose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Simona Lucia Moga
aus
Cluj-Napoca
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. E. R. Weissenbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Rüssmann
Priv. Doz. Dr. S. Krauss - Etschmann

Mitberteuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. H. Spitzbart

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2007

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen.....	7
1. Einleitung und Problemstellung.....	8
1.1. Einleitung.....	8
1.2. Problemstellung.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Material.....	13
2.2. Patientinnen.....	13
2.2.1. Patientengut.....	13
2.2.2. Vaginalabstriche.....	14
3. Diagnostik.....	15
3.1. pH-Wert.....	15
3.2. Reinheitsgrad.....	15
3.3. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).....	16
3.3.1. Interleukin-1 α und Interleukin-2.....	16
3.3.1.1. Reagenzien.....	16
3.3.1.2. Reagenzienvorbereitung.....	16
3.3.1.3. Durchführung.....	18
3.3.1.4. Auswertung der Meßergebnisse für IL-1 α und IL-2.....	19

3.3.2.	Interleukin-1 β und Interleukin-4.....	22
3.3.2.1.	Reagenzien.....	22
3.3.2.2.	Reagenzeinvorbereitung.....	22
3.3.2.3.	Durchföhrung.....	23
3.3.2.4.	Auswertung der Meßergebnisse für IL-1 β und IL-4.....	25
3.3.3.	Interleukin-3.....	27
3.3.3.1.	Reagenzien.....	27
3.3.3.2.	Reagenzeinvorbereitung.....	27
3.3.3.3.	Durchföhrung.....	28
3.3.3.4.	Auswertung der Meßergebnisse für IL-3.....	29
4.	Ergebnisse der Untersuchungen.....	30
4.1.	Alter.....	30
4.2.	Diagnostische Marker.....	31
4.2.1.	Reinheitsgrad.....	31
4.2.2.	pH-Wert.....	32
4.3.	Zytokinbestimmung mittels ELISA.....	34
4.3.1.	Interleukin-1 α und Interleukin-1 β	34
4.3.2.	Interleukin-2.....	40
4.3.3.	Interleukin-3.....	42
4.3.4.	Interleukin-4.....	43

5.	Diskussion.....	46
6.	Zusammenfassung.....	53
7.	Anhang.....	55
7.1.	Patientenrohdaten.....	55
7.2.	Geräte.....	58
8.	Literaturverzeichnis.....	59
	Danksagung.....	68
	Lebenslauf.....	69

Abkürzungen

BV	Bakterielle Vaginose
CFU	colony forming units
CIN	cervicale intraepitheliale Neoplasie
CSF	colony stimulating factor
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
h-IL	humanes Interleukin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LTR	long terminal repeat
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate-Borate-Saline-Puffer
PGE2	Prostaglandin E2
RHG	Reinheitsgrad
Rpm	rounds per minute
TNF	tumor-necrosis-factor

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Einleitung

Die vaginale Mikroflora der Frau ist Teil eines komplexen und dynamischen Ökosystems [1, 2, 3, 4, 5, 7], das unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Einflüssen steht [1] und von endogenen und exogenen Faktoren abhängig ist [5, 17]. Die Flora der gesunden, asymptomatischen Frau besteht aus einer Vielzahl von aeroben und anaeroben Mikroorganismen [1, 3, 5, 6, 25, 26, 27, 72, 76] in verschiedener Anzahl und Verhältnissen zueinander [4]. Vorherrschend in der Normalflora der Vagina sind die Laktobazillen [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 21, 25, 28, 29]. Laktobazillen sind eine heterogene Gruppe grampositiver Stäbchen, von denen ungefähr 50 verschiedene Typen bekannt sind [13]; die häufigsten Spezies sind *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. crispatus* [3, 6, 10, 13, 14]. Meistens ist die Vagina von zwei oder mehr dieser Spezies besiedelt [13]. In der Normalflora der geschlechtsreifen Frau befinden sich diese Keime in einer Anzahl von 10^5 bis 10^8 colony forming units (CFU) pro Mililiter Vaginalsekret [1, 6, 10, 23]. Die Konzentration der Keime ist auch abhängig vom Zyklus. So finden sich während der Menstruation und unmittelbar danach geringere Konzentrationen, die dann rasch unter der Östrogeneinwirkung heranreifender Follikel in der ersten Zyklushälfte wieder ansteigen [1, 25, 27].

Aufgrund der Lage und der Funktion der Vagina wird diese mit einer Vielzahl von anderen Keimen der Haut, des Perianalbereichs und des Partners besiedelt; es handelt sich dabei um Spezies wie *Gardnerella vaginalis*, Streptokokken der Gruppe B und D, *Ureaplasma urealyticum*, Staphylokokken, *Proteus*, Propionibakterien, *Bacteroides*, Corynebakterien, Eubakterien, Fusobakterien [1, 3, 5, 7, 13, 14, 25, 29] und andere, die zusammen die residente Flora der gesunden, asymptomatischen Frau bilden; diese Keime bleiben jedoch in einer sehr niedrigen Zahl (bis 10^4 - 10^5 /ml) [13] und verursachen somit keine Symptome.

Als normale Vaginalflora sollten nur hohe Keimzahlen von Laktobazillen akzeptiert werden; diese haben dann auch eine wichtige Rolle, die Normalflora vor einem Ungleichgewicht zu schützen und die anderen Keime auf ein Mindestmaß zu reduzieren [1, 3, 5, 14, 20]. Es gibt verschiedene Mechanismen, durch denen die Laktobazillen die Vaginalflora kontrollieren: einer der wichtigsten ist die Produktion eines sauren Milieus in der Vagina mit einem pH-Wert von 3,8-4,2 [1, 3, 5, 6, 14, 15, 17, 19, 72, 77], das andere aerobe und anaerobe Bakterien in ihrem Wachstum hemmt; dieses geschieht durch die Produktion von Milchsäure aus

Glykogen. Ein anderer wichtiger Mechanismus scheint die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu sein [1, 3, 5, 6, 14, 15, 16, 17, 19, 27, 29, 72, 76], das für anaerobe Bakterien, die keine Katalase besitzen, toxisch ist; besonders diese H_2O_2 -produzierende Laktobazillen haben eine wichtige Rolle in der Kontrolle eines gesunden vaginalen Ökosystems [20, 22, 23, 24, 28, 76, 77].

Laktobazillen kontrollieren noch die Vaginalflora durch die Produktion anderer toxischer Substanzen, wie Bakteriozine [1, 6, 12, 17, 29, 72, 77], und durch die Fähigkeit, die Adhärenz anderer Keime am Vaginalepithelium beeinflussen zu können [1, 3, 6, 10, 14, 20, 73, 77].

Mit diesen Mechanismen machen es die Laktobazillen möglich, daß sich auch andere Keime in der Scheide aufhalten können, ohne Symptome zu verursachen, denn sie sind in einer geringen Anzahl und es besteht ein ausgeglichenes Verhältnis. In diesem Falle herrscht eine Normalflora und im mikroskopischen Präparat sind dann hauptsächlich Laktobazillen, Epithelzellen und vereinzelt Leukozyten zu sehen [13]. Die Frauen haben dann keine Beschwerden, keinen Fluor, zeigen keine Scheidenveränderungen und haben einen Scheiden-pH von 3,8 – 4,2.

Wenn es nun zu einer Störung dieser in sich ausgeglichenen Normalflora der Scheide kommt, kann sich der Zustand einer Dysbiose entwickeln. Wenn sich so ein Ungleichgewicht einstellt, können die Frauen über verschiedene Symptome klagen; sie haben meistens einen verstärkten Fluor, der von Brennen, Schmerzen, Pruritus, Rötung und Kohabitationsstörungen begleitet werden kann [1, 4, 13, 29]. Der pH-Wert kann über 4,5 ansteigen, was diese Fehlbesiedlung der Vagina unterhalten kann. Im mikroskopischen Präparat sind dann weniger Laktobazillen, überwiegend Bakterien und auch unterschiedlich viele Leukozyten zu sehen [4, 13, 30].

Annähernd 100% aller Patientinnen haben zumindest einmal in ihrem Leben eine Dysbiose der Scheide [13].

Es ist wichtig, die Bakterielle Dysbiose als ein Ungleichgewicht der vaginalen Flora zu betrachten, und nicht als ein bestimmtes Krankheitsbild [5, 12], und sie von der Bakteriellen Vaginose (BV) zu unterscheiden. Die BV ist auch eine Störung der Scheidenflora, hat aber ein typisches klinisches Bild mit einem dünnflüssigem, homogenen Ausfluß, ein pH-Wert $>4,5$, einem positivem Amintest, „clue cells“ im vaginalem Abstrich, und einem unangenehmen Geruch des Fluors [16]. Es ist durch eine Abnahme von Laktobazillen und eine Vermehrung von anaeroben Bakterien, wie *Gardnerella vaginalis*, charakterisiert. Bisherige Studien haben sich oft mit einer abnormalen vaginalen Flora beschäftigt, doch meistens hat man sich dabei auf das Krankheitsbild der BV konzentriert, ohne andere Formen

einer gestörten Scheidenflora genug zu berücksichtigen. Diese wurden oft als „intermediäre Flora“ klassifiziert, oder entweder zu der Gruppe der BV oder der Normalflora eingeteilt [4, 30]. Es gibt aber Formen einer abnormalen vaginalen Flora, die weder normal sind, noch dem Krankheitsbild der BV entsprechen [4]. Diese würden dann unter dem Begriff der Bakteriellen Dysbiose fallen. Donders et al. haben dieses Ungleichgewicht als aerobe Vaginitis bezeichnet [4, 16, 30], um sie von der BV zu unterscheiden [4]. Die Vaginitis geht mit den typischen Zeichen einer Entzündung einher, wie Rötung, Schwellung und Schmerzen, und man findet einen gelblichen Fluor. Mikroskopisch findet man eine hohe Anzahl an aeroben Bakterien und Leukozyten im Abstrich, parabasale Epithelzellen und einen erhöhten pH [16]. Die Bakterielle Dysbiose ist von der BV getrennt zu sehen, denn sie sollte durch andere Kriterien diagnostiziert werden, hat ein anderes klinisches Bild, ruft eine andere Immunantwort hervor und benötigt eine andere Therapie [4, 16, 30, 32]. Ob die Bakterielle Dysbiose einen Übergang zur BV oder eine separate Entität darstellt, ist noch nicht klar [4, 30], doch die beiden Formen können koexistieren [4].

Die Ursachen einer Störung der vaginalen Mikroflora sind noch unbekannt [32, 74]. Es können aber verschiedene Faktoren eine Rolle spielen, z.B. Antibiotikabehandlung, hormonelle Veränderungen, verschiedene Hygienemaßnahmen, Vaginalduschen, lokale Kontrazeptiva, postoperative anatomische Veränderungen, schlecht eingestellter Diabetes mellitus oder immunsuppressive Zustände [1, 17, 28, 74]. Jedoch führen diese Veränderungen nicht bei allen Frauen zu einer Störung der vaginalen Flora; es bleibt noch zu klären, wieso einige Frauen nicht in der Lage sind, die Bakterien auszuschalten oder sie zu einer nicht-pathogenen Anzahl zu reduzieren [4]. In diesem Sinne könnte eine genetisch bedingte Anfälligkeit oder eine Veränderung der lokalen Immunantwort der Scheide vorliegen [4].

Die Vagina ist schon länger als ein immunkompetentes Organ anerkannt worden [33, 34, 35, 36, 66] und moduliert sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort [34]. Für die Abwehr von Bakterien ist vor allem die zellvermittelte Immunität verantwortlich [38]. Dafür sind CD4⁺ T-Helfer-Zellen wichtig [33], die in die Subtypen Th1 und Th2 unterteilt werden. Diese produzieren verschiedene Zytokine, die in der Vagina lokal eine wichtige Rolle als Immunmodulatoren spielen. Zytokine sind die wichtigsten Mediatoren der Entzündungsreaktion [38], kontrollieren die Interaktion zwischen den verschiedenen Zellen der Immunantwort und wirken auf autokrine und parakrine Art [37]. Sie überschneiden sich häufig in ihrer Wirkung, so daß ein einzelner Effekt durch verschiedene Zytokine ausgelöst

werden kann, aber auch ein einzelnes Zytokin verschiedene Wirkungen haben kann und somit Teil eines komplexen Immungeschehen ist [37].

Bakterien produzieren eine Reihe von Substanzen, die einen großen Einfluß auf die Fähigkeit der Leukozyten und anderer Gewebszellen, verschiedene Zytokine zu produzieren, haben [38, 39]. Die immunologische Antwort vom Th-1 Typ hat über Freisetzung von IFN eine protektive Wirkung, fördert die Phagozytose durch Makrophagen und führt zu einer Freisetzung von IL-1; dieses stimuliert wiederum die Th-1 Zellen zur Produktion von IL-2 [33]. Das initiiert die Vermehrung der Th-1 Zellen, die das Pathogen erkennen, und der antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und antigen-unspezifischen NK-Zellen. Die Abwehr gegen Infektionen ist somit durch die kombinierte Aktivität von phagozytischen und zytotoxischen Zellen gewährleistet. Durch die Immunantwort vom Th-1 Typ kommt es zu einer Hemmung von Th-2-Zellen.

Die Antwort vom Th-2 Typ hingegen führt über die Freisetzung von Th-2-spezifischen Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, Transforming-Growth-Factor (TGF-1 β), und über deren Wirkung zu einer Unterdrückung der zellvermittelten Immunität [33]. Des Weiteren bewirkt die Th-2-Immunantwort eine Aktivierung von eosinophilen Zellen, ist für den Klassenwechsel von Antikörpern zuständig, führt zu einer Antikörperproduktion durch B-Zellen sowie zu einer Reduktion der Funktion von Th-1-Zellen [33, 37]. Die Infektion wird somit durch Antikörper und nicht durch Zellen abgewehrt.

Sowohl bei einer Th-1 wie auch bei einer Th-2 Antwort kommt es zu einer erhöhten Produktion von hämatopoetisch-stimulierenden Zytokinen, die die Proliferation und Differenzierung unreifer Immunzellen im Knochenmark stimulieren. Dazu gehören colony-stimulating factors (CSF), IL-3, IL-7 und das c-kit-Ligand [37, 75].

Der konstitutive Niveau der Zytokinexpression zeigt, daß im gesunden Genitaltrakt eine Th-2-Typ-Umgebung herrscht [35]. Wenig weiß man aber von den Veränderungen der lokalen Zytokinkonzentrationen als Antwort auf bakterielle oder virale Infektionen. Das relative Verhältnis der induzierten Th-1 und Th-2 Zytokinen determiniert bei Weitem sowohl den Ausmaß als auch die Folgen der inflammatorischen Antwort [33].

1.2. Problemstellung

Das Ziel unserer experimentellen Studie war es, neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel der Bakteriellen Dysbiose und des lokalen Immunverhaltens der Vagina zu gewinnen.

Dafür haben wir Frauen einer Kontrollgruppe sowie Frauen mit Verdacht auf einer Bakteriellen Dysbiose untersucht.

Wir haben im Vaginalsekret den pH-Wert und den Reinheitsgrad mittels lichtmikroskopischer Untersuchung bestimmt.

Im Folgenden haben wir im Vaginalsekret die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β , die immunregulatorischen Zytokine IL-2 und IL-4 und das hämatopoese-fördernde Zytokin IL-3 mittels Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) bestimmt, um deren Bedeutung und Einfluß auf die zellvermittelte lokale Immunität der Scheide zu verdeutlichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die Materialien für den Nachweis von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3 und IL-4 stammen alle von der Firma BioSource Europe S.A., 1400 Nivelles, Belgien (Immunoassay Kit # KAC 1192, # KHC 0012, # KHC 0022, # KHC 0032, # KHC 0042).

Zur Verdünnung des gepufferten Waschlösungskonzentrates wurde Ampuwa für Spülzwecke, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland, verwendet.

Die einzelnen Materialien werden im jeweiligen Kapitel nochmals einzeln aufgegriffen und im Zusammenhang genau erklärt.

2.2. Patientinnen

2.2.1. Patientengut

Es wurden insgesamt 102 Patientinnen aus drei verschiedenen gynäkologischen Praxen untersucht, bei denen die Diagnose Bakterielle Dysbiose gestellt wurde. Zur Diagnostik gehört, neben den Symptomen wie Fluor, Brennen, Juckreiz, Schmerzen und Kohabitationsstörungen, und einem klinischen Bild mit Entzündungszeichen der Vagina, eine mikroskopische Untersuchung des Scheidensekrets, dessen Zellbild eine Mischflora zeigt (wenige Laktobazillen, überwiegend Bakterien und unterschiedlich viele Leukozyten). Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit Bakterieller Dysbiose lag bei 32,45 Jahren (Alter 17-54).

Als Kontrollgruppe wurden 50 asymptomatische Frauen ohne das Bild einer Bakterieller Dysbiose ausgewählt. Diese kamen meistens zur Routineuntersuchung in die Praxis, ohne ein Beschwerdebild. Bei der Kontrollgruppe war eine Normalflora der Scheide zu finden, das heißt, im mikroskopischen Präparat waren dann hauptsächlich Laktobazillen zu sehen, weiter Epithelzellen und vereinzelt Leukozyten [13]. Sie hatten keine Beschwerden, keinen Fluor, einen Scheiden-pH-Wert von 3,8 – 4,2 hat und zeigten keine Scheidenveränderungen. Somit befanden sie sich in einem eubiotischen Zustand. Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe lag bei 35,72 Jahren (Alter 18-52).

Patientinnen, die an einer anderen Infektionskrankheit, wie Trichomonaden, Chlamydien oder Gonorrhoe litten, eine Candidainfektion oder das Bild einer Bakteriellen Vaginose aufwiesen wurden bereits im Vorfeld von den Untersuchungen ausgeschlossen.

2.2.2. Vaginalabstriche

Bei jeder Patientin wurden Vaginalabstriche vom hinteren Scheidengewölbe mit geprüften Watteträgern entnommen.

Um Abstrichmaterial zur Bestimmung der Zytokine zu erhalten, wurde zusätzlich folgendermaßen vorgegangen: es wurden 2 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung mittels einer Dreimilliliter-Spritze in die Vagina eingebracht und mit Hilfe eines Watteträgers im hinteren Scheidengewölbe kurz vermengt. Anschließend wurde die Kochsalzlösung mit derselben Spritze wieder aufgesogen und noch am selben Tag wie folgt weiterverarbeitet: Der Inhalt der Spritze wurde auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt, um dann mit beiden Gefäßen gleichermaßen zu verfahren. Durch kurze Gabe des Eppendorfgefäßes auf das Vortex-Gerät erreichte man ein Vermengen des Inhalts. Im Anschluß war das Eppendorfreaktionsgefäß bei 5000 rpm für zwei Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und das Sediment in 0.5 ml PBS resuspendiert. Dann wurden beide Gefäße bei -80°C tief gefroren bis sie zur weiteren Untersuchung benötigt wurden. Für die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Bestimmungen von Interleukinen mittels ELISA benötigten wir jeweils den so gewonnenen Überstand.

3. Diagnostik

3.1. pH-Wert

Um den pH-Wert zu bestimmen, verwendete man als einfache und preiswerte Methode pH-Streifen (Spezialindikatorpapier 4,0-7,0 von der Firma Merck) . Das Meßverfahren verlief unterschiedlich in den drei Praxen, deshalb wird es im Rahmen der Auswertung des pH-Wertes aufgeführt.

3.2. Reinheitsgrad

Der Reinheitsgrad gibt Auskunft über den unterschiedlichen Erreger- und Zellgehalt des Scheidensekrets. Dazu erfolgt die mikroskopische Untersuchung des gramgefärbten Präparates. Für die Einteilung des Reinheitsgrades (RHG) haben wir folgendes Schema nach Richter und Weissenbacher verwendet:

RHG 0	„Leeres Bild“, ausschliesslich Epithelzellen, keine oder wenig Mikroorganismen, wie z.B. nach Zytostase oder vaginaler Chemotherapie
RHG I	„Reine“ Döderleinflora: zahlreiche Döderleinstäbchen, keine Bakterien (Leukozyten nur bei Döderleinzytolyse)
RHG II	Mischflora: wenig Döderleinstäbchen, überwiegend Bakterien, Leukozyten
RHG III	„reine Bakterienflora“: keine Döderleinstäbchen, massenhaft Bakterien und Leukozyten

Da oft eine exakte Zuteilung zu einem Grad nicht möglich ist, gibt es die entsprechenden Einteilungen: RHG I bis II, II bis III, die auch von uns zur Beschreibung des Reinheitsgrades verwendet wurden.

3.3. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

3.3.1. Interleukin -1 α und Interleukin -2

3.3.1.1. Reagenzien

- Humanes Interleukin-1 α (h-IL-1 α) bzw. h-IL-2 Standard
- Puffer zur Verdünnung des Standards
- Inkubationspuffer
- h-IL-1 α bzw. h-IL-2 Antikörper-beschichtete Mikroküvetten
- h-IL-1 α bzw. h-IL-2 Biotin Konjugat
- 100-fach konzentrierte Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25 x)
- Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen
- Halterahmen

3.3.1.2. Reagenzienvorbereitung

Die Herstellung des Humanen Standards für IL-1 α und IL-2 unterscheidet sich voneinander, deswegen wird es jeweils exakt beschrieben.

Humanes IL-1 α Standard

Zuerst wurde der Standard in einer Standardverdünnungslösung zu 10000 pg/ml aufgelöst. Um eine komplette Auflösung zu gewährleisten, ließen wir die Lösung für 10 Minuten ruhen. Indem wir 0,010 ml dieser Verdünnung zu 0,390 ml des Standardverdünnungspuffers gegeben haben, erhielten wir eine Standardkonzentration von 250 pg/ml. Danach erfolgte die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe nach folgendem Schema: durch Mischung von jeweils 200 μ l der vorangehenden Standardkonzentration mit 200 μ l des Standardverdünnungspuffers erhielten wir eine Verdünnungsreihe mit folgenden

Konzentrationen: 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml.

Humanes IL-2 Standard

Als erstes wurde der Standard zu einer Konzentration von 10000 pg/ml in der Standardverdünnungslösung verdünnt, man ließ dabei die Lösung für 10 Minuten ruhen. Als nächstes haben wir 100µl dieser Lösung zu 900 µl des Standardverdünnungspuffers gegeben und so haben wir eine Standardkonzentration von 1000 pg/ml erhalten. Für die Verdünnungsreihe wurden jeweils 300 µl der vorangehenden Standardkonzentration in 300 µl des Standardverdünnungspuffers pipettiert. Wir erhielten so eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml und 15,6 pg/ml.

Streptavidin-HRP Verdünnungslösung (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3 und IL-4)

Die Vorbereitung der Verdünnungslösung erfolgte für alle Interleukine gleich. Deshalb wird nur einmal der genaue Ablauf beschrieben.

Hierzu wurden pro Reihe zu je acht Vertiefungen 10 µl der 100-fach konzentrierten Streptavidin-Peroxidase in 1 ml der Streptavidinlösung verdünnt. Bei einer benötigten Anzahl von 8 Streifen, d.h. 64 Vertiefungen benötigten wir 80 µl der Streptavidin-Peroxidase vermengt in 8 ml der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung.

Gepufferte Waschlösung (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3 und IL-4)

Die Herstellung der Waschlösung verlief ebenfalls für alle Interleukine analog.

Durch Verdünnung von einem Teil des 250-fach konzentrierten Waschpuffers in 24 Teilen destilliertem Wasser (Ampuwa für Spülzwecke) erhielt man insgesamt eine Waschpufferlösung von 2500 ml.

Alle weiteren Reagenzien wurden gebrauchsfertig geliefert.

3.3.1.3. Durchführung

In der Durchführung unterscheiden sich IL-1 α und IL-2 in einzelnen Mengenangaben, deshalb erfolgt in diesem Fall eine gesonderte Angabe.

Zuerst wurden nach Bedarf die erforderliche Anzahl der Streifen zu je acht Mikroküvetten für Standard, Kontrollen und Patientenproben zurechtgelegt und in einem entsprechenden Halterahmen fixiert.

Beginnend mit der höchsten Konzentration von 250 pg/ml für IL-1 α bzw. von 1000 pg/ml für IL-2 wurden in die 8 Vertiefungen des ersten und zweiten Streifens für IL-1 α je 50 μ l und für IL-2 je 100 μ l der Standardverdünnungsreihe einpipettiert. In die Mikroküvette, die die Standardkonzentration von 0 pg/ml enthalten sollte, war ausschließlich die Standardpufferlösung zu geben. In die weiteren Mikroküvetten mussten für IL-1 α je 50 μ l und für IL-2 je 100 μ l der Kontrollen und der Patientenproben gegeben werden.

Nachdem in jede Vertiefung 50 μ l des Inkubationspuffers und 50 μ l des Biotin Konjugates (Ligand-markiertes-Anti-IL-1 α - bzw. -Anti-IL-2-Antikörper) hinzupipettiert worden waren, wurde die Mikrotiterplatte mit einem Klebestreifen abgedeckt, um zu verhindern, dass es zu Verunreinigungen kommt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit mußten wir die nicht gebundenen Antikörper auswaschen, indem die einpipettierten Lösungen ausgegossen, und dann jeweils viermal in jede Vertiefung 400 μ l des Waschpuffers ein- und wieder abpipettiert wurden. Nachdem letzten Waschvorgang wurde die gesamte Mikrotiterplatte auf weichem Fließpapier ausgeklopft, um eventuelle Rückstände der Waschlösung zu entfernen. Nun erfolgte die Zugabe von 100 μ l der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung in jede einzelne Küvette. Streptavidin-Peroxidase ist das für den späteren Farbumschlag verantwortliche Enzym. Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte wieder, wie bereits beschrieben, viermal gewaschen. Durch die Zugabe von je 100 μ l der Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB) begann der gewünschte Farbumschlag ins Blaue. Die Mikrotiterplatte mussten wir weitere 30 Minuten inkubieren, dieses Mal ins Dunkle, da TMB sehr lichtempfindlich ist.

Zur Beendigung der Farbreaktion wurden bereits nach 10 Minuten bei IL-1 α und nach 30 Minuten bei IL-2 100 μ l der Stopplösung hinzupipettiert, und damit verhindert, dass die Farbreaktion zu intensiv und somit die optische Dichte zu hoch wird. Denn wenn sie zu hoch liegt, kann sie vom Spektralphotometer, je nach Meßbereich des jeweiligen Geräts nicht mehr

gelesen werden und es kommt zu nicht verwertbaren Ergebnissen. Durch Zugabe der Stopplösung erfolgte der Farbumschlag von Blau nach Gelb.

Mit dem Spektralphotometer konnten wir abschließend innerhalb eines Zeitraumes von 2 Stunden bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte des Standards und der Patientenproben ermitteln.

Im Falle des IL-1 α gab es einige Proben, bei welchen die optische Dichte zu hoch war und vom Spektralphotometer nicht gelesen werden konnten. Um trotzdem die Konzentration dieser Proben bestimmen zu können, haben wir diese Proben verdünnt und dann den ganzen Versuch erneut durchgeführt. Die Patientenproben wurden zu 1:10 verdünnt, das heißt, in die Mikrotiterplatte wurden anstatt 50 μ l der Probe nur 5 μ l der Probe mit 45 μ l des Standardverdünnungspuffers verdünnt gegeben. So konnte das Gerät die optische Dichte messen. Die später ermittelten Konzentrationen wurden dann mit dem Faktor 10 multipliziert.

3.3.1.4. Auswertung der Meßergebnisse für IL-1 α und IL-2

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte für IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3 und IL-4 nach dem gleichem Schema. Deshalb wird nur einmal, am Beispiel von IL-1 α , die genaue Durchführung zur Berechnung der Konzentrationen beschrieben. Es werden dann nur die entsprechenden Standardkurven gezeigt.

Mit Hilfe des Computerprogramms Excel von Microsoft wurden die benötigten Standardkurven erstellt, um jeweils die gemessene optische Dichte in die entsprechende Konzentration umrechnen zu können.

Zuerst wurden die festgesetzten Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe, nämlich 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 0 pg/ml, und die ihnen entsprechende optischen Dichte, die mit dem Spektralphotometer gemessen wurde, in Excel eingegeben (Tabelle 1).

Interleukin-1 α

OD1	OD2	Mittelwert	Konz [pg/ml]
1,992	2,045	2,0185	250
1,425	1,516	1,4705	125
0,877	0,74	0,8085	62,5
0,472	0,513	0,4925	31,3
0,249	0,246	0,2475	15,6
0,157	0,144	0,1505	7,8
0,096	0,083	0,0895	3,9
0,081	0,077	0,079	0

Tabelle 1: Standardkonzentrationen und OD für IL-1 α in Excel

Indem wir die gemessene optische Dichte als abhängige Variable und die Konzentration als unabhängige Variable zugeordnet hatten und für die Kurvenanpassung ein polynomisches Modell ausgewählt haben, erhielten wir schließlich die Standardkurve. Zur Veranschaulichung wird die Standardkurve für IL-1 α gezeigt (Abb. 1):

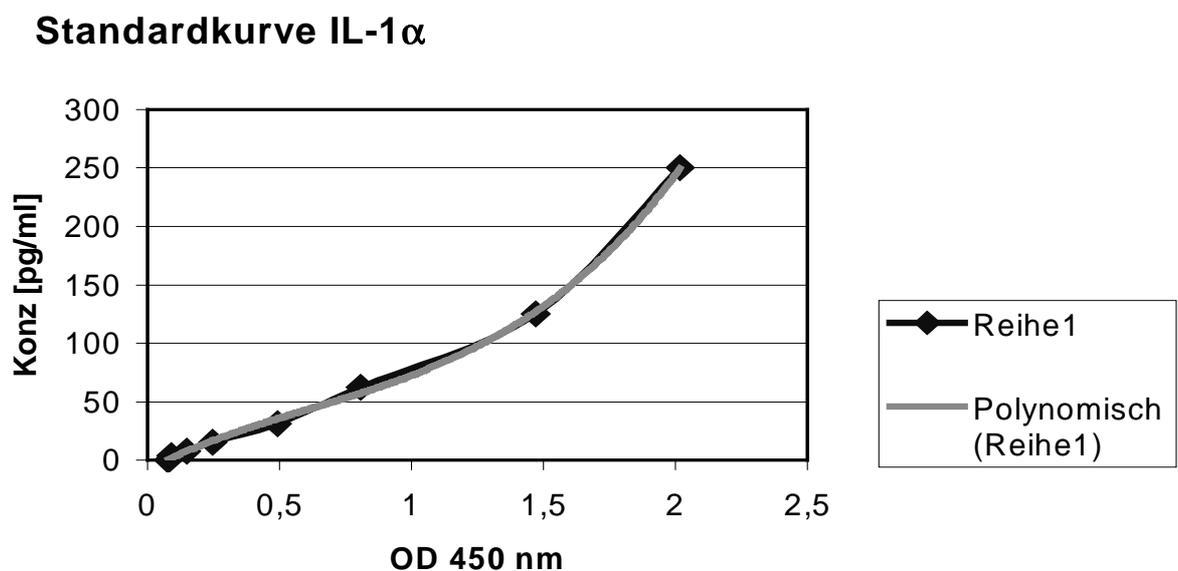


Abbildung 1: Im Excel erstellte Standardkurve für IL-1 α

Durch die Gleichung der Kurve war es dann mittels Excel möglich, zu jeder zuvor photometrisch gemessenen optischen Dichte die jeweils zugehörige Konzentration in pg/ml abzulesen.

Interleukin-2

OD1	OD2	Mittelwert	Konz [pg/ml]
2,400	2,400	2,400	1000
1,774	1,733	1,754	500
0,720	0,774	0,747	250
0,318	0,362	0,340	125
0,148	0,155	0,152	62,5
0,098	0,109	0,104	31,2
0,056	0,072	0,064	15,6
0,051	0,060	0,056	0

Tabelle 2: Standardkonzentrationen und OD für IL-2 in Excel

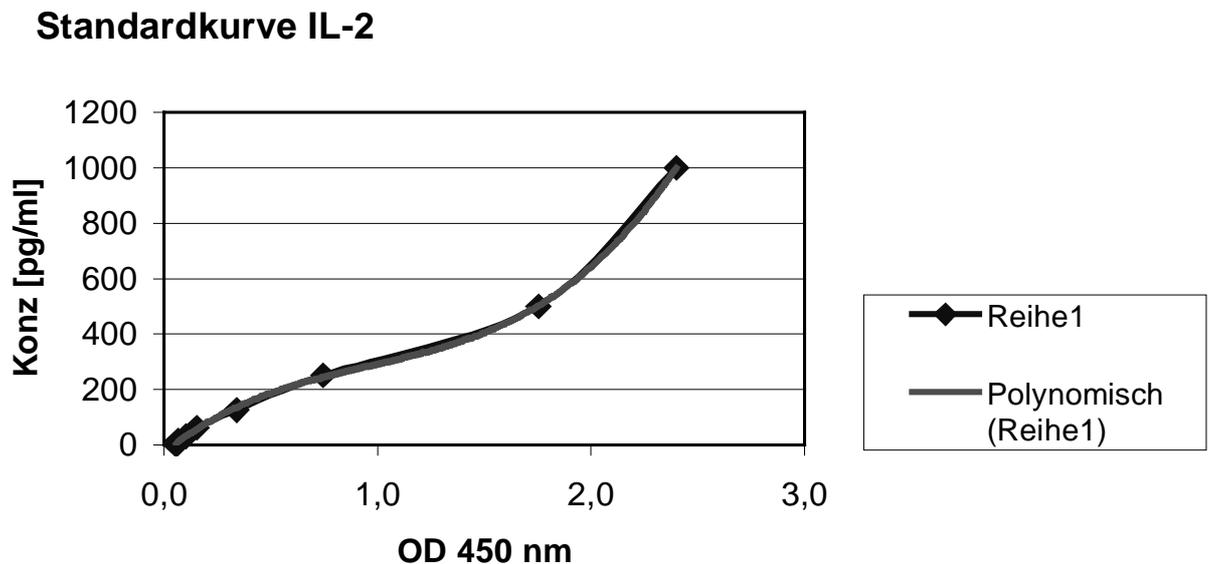


Abbildung 2: In Excel erstellte Standardkurve für IL-2

3.3.2. Interleukin -1 β und Interleukin -4

3.3.2.1. Reagenzien

- Humanes Interleukin-1 β (h-IL-1 β) bzw. h-IL-4 Standard
- Puffer zur Verdünnung des Standards
- h-IL-1 β bzw. h-IL-4 Antikörper-beschichtete Mikroküvetten
- h-IL-1 β bzw. h-IL-4 Biotin Konjugat
- 100-fach konzentrierte Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25 x)
- Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen
- Halterahmen

3.3.2.2. Reagenzienvorbereitung

Die Herstellung des Humanen Standards für IL-1 β und IL-4 unterscheidet sich voneinander, deswegen wird es jeweils exakt beschrieben.

Humanes IL-1 β Standard

Zuerst wurde der Standard zu einer Konzentration von 2500 pg/ml verdünnt und nach einer Wartezeit von 10 Minuten war eine gänzliche Auflösung zu erwarten. Anschließend wurden 100 μ l des so gewonnenen Standards in 900 μ l der gepufferten Standardverdünnungslösung gegeben, um eine Standardkonzentration von 250 pg/ml zu erhalten. Die Standardverdünnungsreihe erhielten wir, indem wir jeweils 250 μ l der vorher gewonnenen Standardkonzentration zu 250 μ l der Standardverdünnungslösung hinzugefügt haben. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Schrittes erhielten wir folgende Konzentrationen: 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml und 3.9 pg/ml.

Humanes IL-4 Standard

Als erstes wurde der Standard zu einer Konzentration von 10000 pg/ml in der Standardverdünnungslösung verdünnt, wir ließen dabei die Lösung für 10 Minuten ruhen. Als nächstes hat man 50 µl dieser Lösung zu 950 µl des Standardverdünnungspuffers gegeben und so hat man eine Standardkonzentration von 500 pg/ml erhalten. Für die Verdünnungsreihe wurden jeweils 300 µl der vorangehenden Standardkonzentration in 300 µl des Standardverdünnungspuffers pipettiert. Wir erhielten so eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml.

Die Herstellung der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung und der gepufferten Waschlösung wurde schon vorher beschrieben.

Alle weiteren Reagenzien wurden gebrauchsfertig geliefert.

3.3.2.3. Durchführung

In der Durchführung unterscheiden sich IL-1β und IL-4 in einzelnen Mengenangaben, deshalb erfolgt in diesem Fall eine gesonderte Angabe.

Nachdem die Mikroküvetten entsprechend der Anzahl von Standard, Kontrolle und Proben vorbereitet und in einem Halterahmen befestigt worden waren, mussten für IL-1β je 50 µl bzw. für IL-4 je 100 µl der Standardverdünnungsreihe, beginnend mit der höchsten Konzentration von 250 pg/ml bzw. von 500 pg/ml, der Kontrolle und der Patientenproben in die dazugehörige Mikroküvette pipettiert werden. Für die Standardkonzentration von 0 pg/ml wurden nur 50 bzw. 100 µl der Standardverdünnungslösung in die entsprechende Küvette gegeben. Danach wurden in die Mikroküvetten noch je 100 µl bzw. 50 µl des Biotin Konjugates (Ligand-markiertes-Anti-IL-1β- bzw. -Anti-IL-4-Antikörper) hinzupipettiert. Um während der zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur Verunreinigungen zu vermeiden, haben wir die Mikrotiterplatte mit einem Klebestreifen abgedeckt.

Nach der Inkubationszeit wurden die Mikroküvetten ausgewaschen, indem in die einzelnen Vertiefungen jeweils 400 µl der zuvor hergestellten gepufferten Waschlösung einpipettiert und dann wieder abpipettiert wurden. Diesen Vorgang haben wir viermal wiederholt. Danach

wurde die Platte auf weichem Fließpapier ausgeklopft, um so eventuell zurückgebliebene Reste der Waschlösung zu entfernen.

Im nächsten Schritt waren 100 µl der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung, die das für den späteren Farbumschlag verantwortliche Enzym enthielt, hinzuzugeben. Danach folgte wieder eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur und danach ein neuer Waschvorgang. Anschließend mussten wir in jede Vertiefung 100 µl der Tertramethylbenzidin-Substratlösung (TMB) hinzugeben, wodurch es zu einer Blaufärbung kam. Für die erneute dreißigminütige Inkubationszeit war zu beachten, dass es im Dunklen geschah, da TMB äußerst lichtempfindlich ist.

Um die Reaktion abubrechen und zu verhindern, dass die optische Dichte zu hoch wird, wurden bei IL-1 β nach 15 Minuten und bei IL-4 nach 30 Minuten 100 µl der Stopplösung hinzugefügt, wodurch es zu einem Farbumschlag nach Gelb kam.

Innerhalb von 2 Stunden konnten wir dann mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte des Standards und der Proben lesen.

Im Falle des IL-1 β gab es einige Proben, bei welchen die optische Dichte zu hoch war und vom Spektralphotometer nicht gelesen werden konnten. Um trotzdem die Konzentration dieser Proben bestimmen zu können, haben wir diese Proben verdünnt und dann den ganzen Versuch erneut durchgeführt. Die Patientenproben wurden zu 1:5 verdünnt, das heißt, in die Mikrotiterplatte wurden anstatt 50 µl der Probe nur 10 µl der Probe mit 40 µl des Standardverdünnungspuffers verdünnt gegeben. So konnte das Gerät die optische Dichte messen. Die später ermittelten Konzentrationen wurden dann mit dem Faktor 5 multipliziert.

3.3.2.4. Auswertung der Meßergebnisse für IL-1 β und IL-4

Interleukin-1 β

OD 1	OD 2	Mittelwert	Konz [pg/ml]
1,899	1,942	1,9205	250
1,145	1,236	1,1905	125
0,714	0,676	0,695	62,5
0,423	0,429	0,426	31,2
0,245	0,254	0,2495	15,6
0,192	0,197	0,1945	7,8
0,146	0,155	0,1505	3,9
0,123	0,134	0,1285	0

Tabelle 3: Standardkonzentrationen und OD für IL-1 β in Excel

Standardkurve IL-1 β

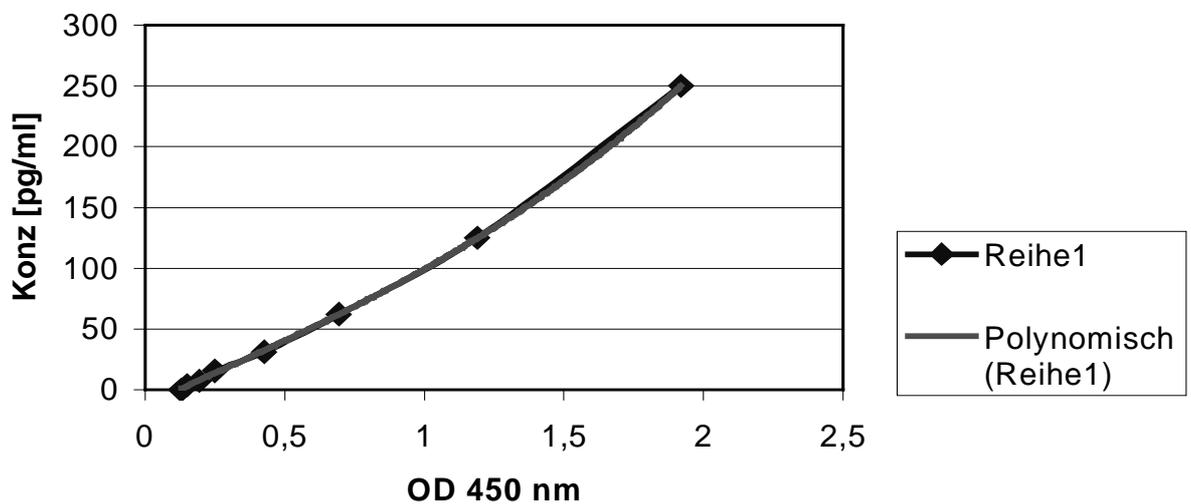


Abbildung 3: In Excel erstellte Standardkurve für IL-1 β

Interleukin-4

OD 1	OD 2	Mittelwert	Konz [pg/ml]
2,368	2,336	2,352	500
1,612	1,568	1,59	250
0,859	0,837	0,848	125
0,447	0,456	0,4515	62,5
0,516	0,225	0,3705	31,2
0,147	0,14	0,1435	15,6
0,103	0,088	0,0955	7,8
0,084	0,064	0,074	0

Tabelle 4: Standardkonzentrationen und OD für IL-4 in Excel

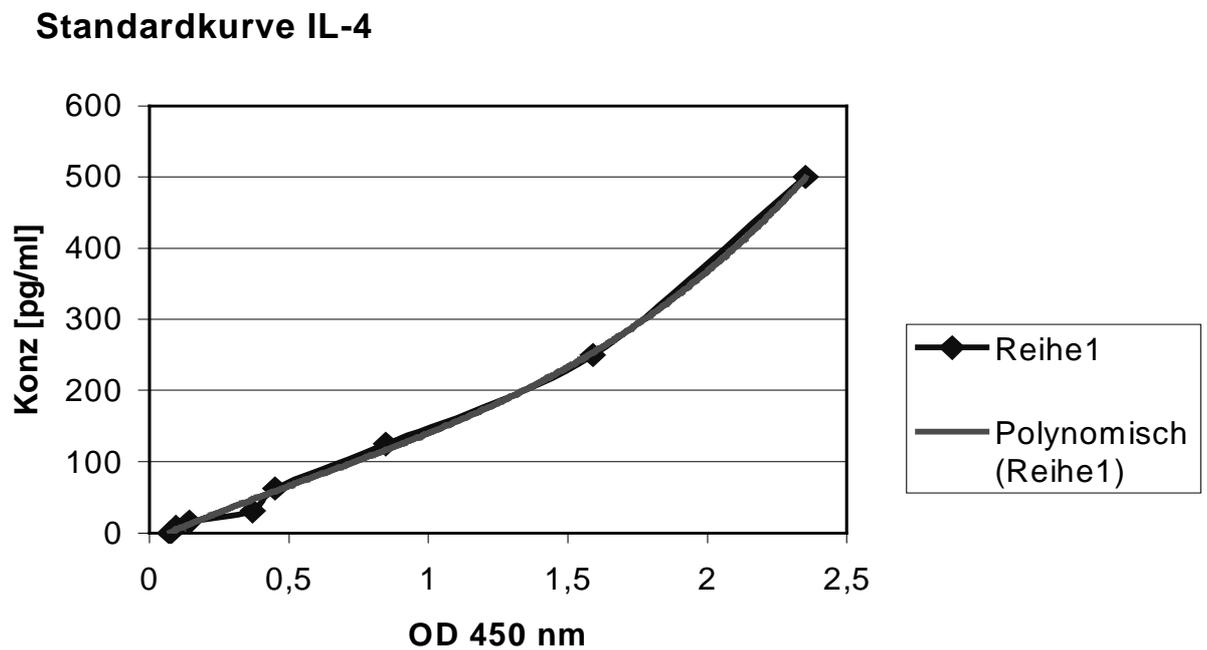


Abbildung 4: In Excel erstellte Standardkurve für IL-4

3.3.3. Interleukin-3

3.3.3.1. Reagenzien

- Humanes Interleukin-3 (h-IL-3) Standard
- Puffer zur Verdünnung des Standards
- h-IL-3 Antikörper-beschichtete Mikroküvetten
- h-IL-3 Biotin Konjugat
- 100-fach konzentrierte Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25 x)
- Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen
- Halterahmen

3.3.3.2. Reagenzienvorbereitung

Als erstes wurde der Standard zu einer Konzentration von 10000 pg/ml verdünnt, man ließ dabei die Lösung für 10 Minuten ruhen. Als nächstes haben wir 50 µl dieser Lösung zu 950 µl des Standardverdünnungspuffers gegeben und so haben wir eine Standardkonzentration von 500 pg/ml erhalten. Für die Verdünnungsreihe wurden jeweils 300 µl der vorangehenden Standardkonzentration in 300 µl des Standardverdünnungspuffers pipettiert. Man erhielt so eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml.

Die Herstellung der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung und der gepufferten Waschlösung wurde schon vorher beschrieben.

Alle weiteren Reagenzien wurden gebrauchsfertig geliefert.

3.3.3.3. Durchführung

Zuerst wurden nach Bedarf die erforderliche Anzahl der Streifen zu je acht Mikroküvetten für Standard, Kontrollen und Patientenproben zurechtgelegt und in einem entsprechenden Halterahmen fixiert. Beginnend mit der höchsten Konzentration von 500 pg/ml wurden in die 8 Vertiefungen des ersten und zweiten Streifens je 100 µl der Standardverdünnungsreihe einpipettiert. In die Mikroküvette, die die Standardkonzentration von 0 pg/ml enthalten sollte, war ausschließlich die Standardpufferlösung zu geben. In die weiteren Mikroküvetten mussten je 100 µl der Kontrollen und der Patientenproben gegeben werden. Nachdem die Mikrotiterplatte mit einem Klebestreifen abgedeckt wurde, um Verunreinigungen zu vermeiden, folgte eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubationszeit mußte man die nicht gebundenen Antikörper auswaschen, indem die einpipettierten Lösungen ausgegossen, und dann jeweils viermal in jede Vertiefung 400 µl des Waschpuffers ein- und wieder abpipettiert wurden. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die gesamte Mikrotiterplatte auf weichem Fließpapier ausgeklopft, um eventuelle Rückstände der Waschlösung zu entfernen.

Nachdem wir in jede Vertiefung 100 µl des Biotin Konjugates (Ligand-markiertes-Anti-IL-3-Antikörper) hinzupipettiert haben, wurde die Platte erneut abgedeckt und nochmals eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 100 µl der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung in jede einzelne Küvette. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte wieder, wie bereits beschrieben, viermal gewaschen. Durch die Zugabe von je 100 µl der Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB) begann der gewünschte Farbumschlag ins Blaue. Die Mikrotiterplatte musste man weitere 30 Minuten inkubieren, dieses Mal ins Dunkle, da TMB sehr lichtempfindlich ist. Zur Beendigung der Farbreaktion haben wir nach 30 Minuten 100 µl der Stopplösung hinzupipettiert, und damit verhindert, dass die Farbreaktion zu intensiv und somit die optische Dichte zu hoch wird. Durch Zugabe der Stopplösung erfolgte der Farbumschlag von Blau nach Gelb.

Mit dem Spektralphotometer konnten wir abschließend innerhalb eines Zeitraumes von 2 Stunden bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte des Standards und der Patientenproben ermitteln.

3.3.3.4. Auswertung der Messergebnisse

OD 1	OD 2	Mittelwert	Konz [pg/ml]
2,4	2,4	2,4	500
2,313	2,337	2,325	250
1,555	1,564	1,5595	125
0,917	0,903	0,91	62,5
0,457	0,463	0,46	31,2
0,256	0,272	0,264	15,6
0,166	0,169	0,1675	7,8
0,076	0,08	0,078	0

Tabelle 5: Standardkonzentrationen und OD für IL-3 in Excel

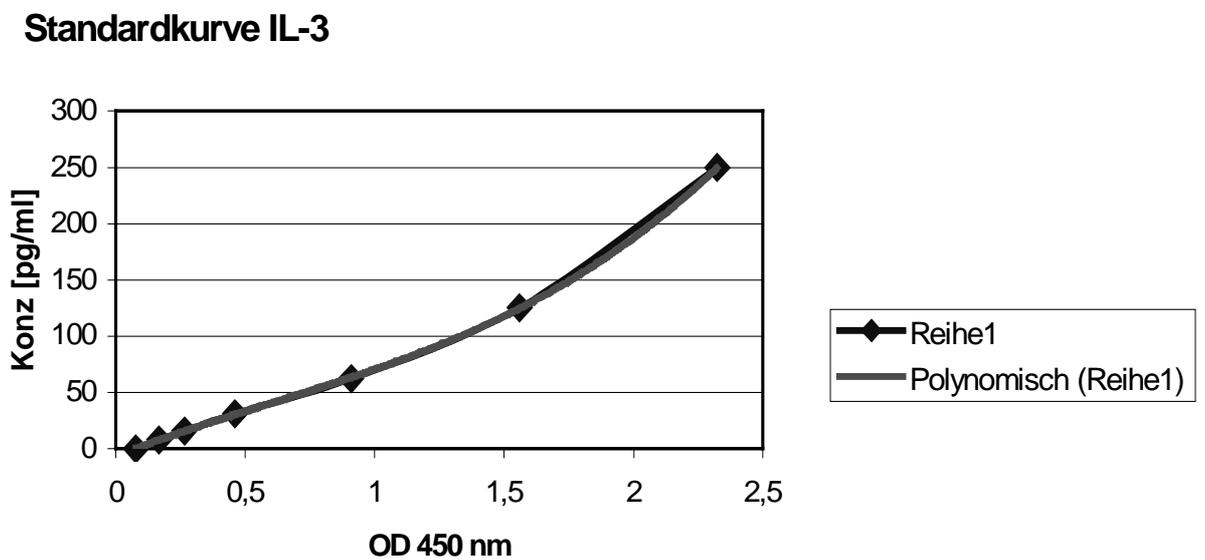


Abbildung 5 : In Excel erstellte Standardkurve für IL-3

4. Ergebnisse der Untersuchungen

4.1. Alter

Bei der Bakteriellen Dysbiose handelt es sich um eine Störung, die vor allem im gebärfähigen Alter der Frau auftritt. Das konnte in unserer Studie insoweit bestätigt werden, daß sich in der Patientengruppe eine Altersspanne von 17 – 54 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 32,45 Jahren ergab. In der Kontrollgruppe war der Altersdurchschnitt bei 35,72 Jahren und die Spannbreite verlief von 18 bis 52 Jahren.

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)
Durchschnittsalter (Jahre)	32,45	35,72
Spannbreite (Jahre)	17-54	18-52

Tabelle 6: Durchschnittsalter und Spannbreite bei Patienten- und Kontrollgruppe

Das Alter in der Patientengruppe war signifikant kleiner ($p=0,021$) als das in der Kontrollgruppe. Das läßt uns schlußfolgern, daß jüngere Patientinnen häufiger wegen Beschwerden den Gynäkologen aufsuchen, während ältere Patientinnen hauptsächlich zur Kontrolluntersuchung hingehen.

4.2. Diagnostische Marker

4.2.1. Reiheitsgrad

Da es bei der Bakteriellen Dysbiose zu einem Abfall der Anzahl der in der Normalflora vorherrschenden Laktobazillen und zu einer gleichzeitigen Vermehrung anderer Bakterien kommt, ist auch eine Verschiebung des Reinheitsgrades zu höheren Graden zu erwarten. So fand sich in der Patientengruppe nicht selten ein mikroskopisches Zellbild mit nur sehr vereinzelt oder komplett fehlenden Laktobazillen, so daß hier der Reinheitsgrad überwiegend zwischen Grad II und III eingestuft wurde.

Reinheitsgrad-Median

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)	p-Wert
Reinheitsgrad			
Median	II	I	0,0001

Tabelle 7: Signifikanz und Medianwert des Reinheitsgrades bei Patienten- und Kontrollgruppe

In der Abbildung 6 wird die Häufigkeitsverteilung der Reinheitsgrade in den beiden Studiengruppen dargestellt und da kann man sehen, daß es bei der Patientengruppe eine deutliche Verschiebung in Richtung eines höheren Reinheitsgrades gibt.

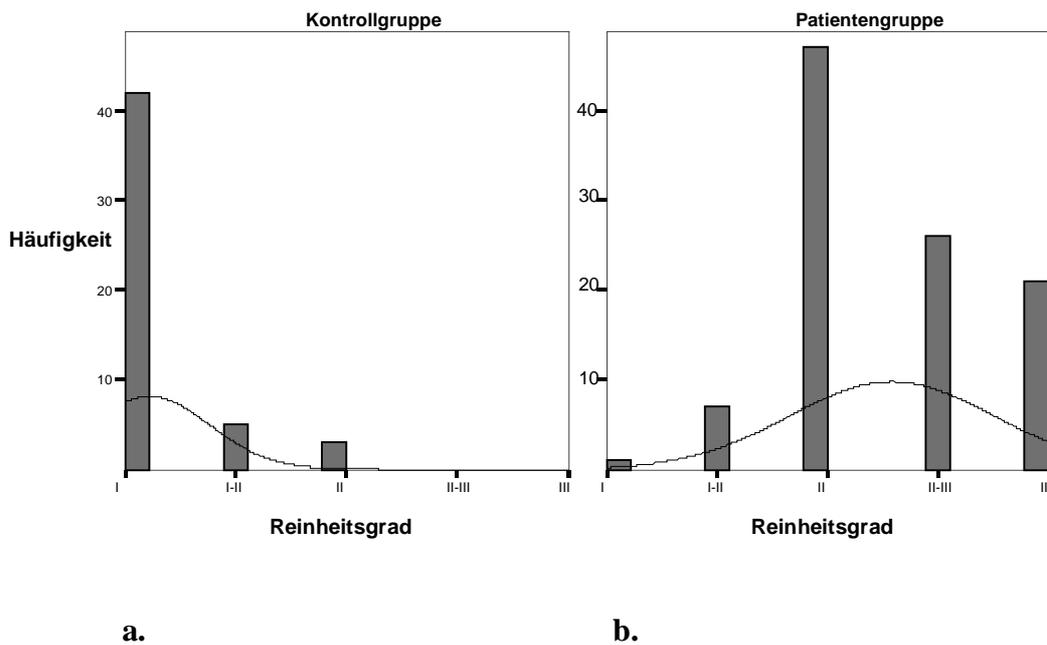


Abbildung 6 : a. Häufigkeitsverteilung der Reinheitsgrade bei der Kontrollgruppe
b. Häufigkeitsverteilung der Reinheitsgrade bei der Patientengruppe

In der asymptomatischen Kontrollgruppe war von einer normalen Vaginalflora auszugehen und der Ausschluß anderer Erkrankungen fand bereits im Vorfeld statt. So waren für den Reinheitsgrad Normwerte zu finden, was sich darin bestätigte, daß der Medianwert des Reinheitsgrades bei I lag. Für die Patientengruppe hingegen ließ sich eine eindeutige Verschiebung des Reinheitsgrades nach oben erkennen, so daß sich diesbezüglich mit $p < 0,0001$ eine statistisch eindeutige Signifikanz ergab. Bei der Bakteriellen Dysbiose stellt die Bestimmung des Reinheitsgrades ein neben anderen Verfahren aussagekräftiges diagnostisches Mittel dar.

4.2.2. pH-Wert

Durch die Abnahme der Anzahl der Laktobazillen in der Scheidenflora würde eine erniedrigte Produktion der Milchsäure vorliegen, die für das Ansäuern des Scheidenmilieus verantwortlich ist. Das heißt, daß die Patientinnen, die Symptome zeigten, die für die Bakterielle Dysbiose typisch sind, einen erhöhten pH-Wert haben könnten. Jedoch wurde bei

der Auswertung unserer Daten keine signifikante Erhöhung des pH-Wertes der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet ($p=0,068$).

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median
Kontrollgruppe	4,234	4,0	4,7	4,200
Patientengruppe	4,432	3,8	5,8	4,300

Tabelle 8 : Vergleich von Mittelwert, Minimal-, Maximal- und Medianwert des pH-Wertes zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

Man konnte aber signifikante Unterschiede zwischen den drei Praxen feststellen:

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median
Kontrollgruppe	4,234	4,0	4,7	4,200
Praxis1	4,315	3,8	5,5	4,200
Praxis2	4,176	4,0	4,4	4,200
Praxis3	5,035	4,7	5,8	5,000

Tabelle 9 : Vergleich von Mittelwert, Minimal-, Maximal- und Medianwert des pH-Wertes zwischen Kontrollgruppe und den drei verschiedenen Praxen

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe der Praxis 3 und der Kontrollgruppe, bzw. den zwei anderen Praxen festgestellt werden. In dieser Praxis war der pH-Wert der Patientinnen, wie erwartet höher als in der Kontrollgruppe, mit einer Signifikanz von $p<0,0001$. In der Praxis 1 und 2 waren die pH-Werte nicht signifikant von der Kontrollgruppe verschieden. Die Differenzen unter den drei Praxen kann man sich durch den unterschiedlichen Meßvorgang erklären: in der Praxis 1 wurde der pH-Wert im mittleren Scheidendrittel gemessen, in der Praxis 3 jedoch im oberen Scheidendrittel. In der Praxis 2 wurde vermengtes Scheidensekret mit einer ausgeglühten Platinöse herausgenommen und erst dann auf das Indikatorpapier aufgetragen und gemessen. Es ist zu erwähnen, daß die Kontrollgruppe aus derselben Praxis stammt, wie die Patientengruppe aus der Praxis 2.

Zwischen dieser beiden Gruppen konnte aber, wie oben erwähnt, keinen signifikanten Unterschied im pH-Wert beobachtet werden, obwohl die Messungen gleich verliefen. In diesem Sinne kann man sagen, daß es bei den Bakteriellen Dysbiosen keinen signifikanten Unterschied im pH-Wert zwischen den gesunden und kranken Patientinnen geben muß.

4.3. Zytokinbestimmung mittels ELISA

Es wurde der verteilungsunabhängige Mann-Whitney-U-Test zur statistischen Auswertung der Zytokinkonzentrationen zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe verwendet. Für die Testergebnisse wird der p-Wert angegeben und mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

4.3.1. Interleukin -1 α und Interleukin-1 β

Um die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 α und Interleukin-1 β zu ermitteln, haben wir das Vaginalsekret von 50 asymptomatischen und 102 symptomatischen Frauen untersucht (siehe Abschnitt 3.3.1. und 3.3.2.).

IL-1 wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Epithelzellen gebildet, und ist ein Hauptmediator der Entzündungsreaktion, indem es B- und T-Zellen stimuliert. Es gehört zu den Akut-Phasen-Proteinen und verursacht Fieber. Es gibt zwei Isoformen für IL-1, IL-1 α und IL-1 β , die verschiedene isoelektrische Punkte (5 für IL-1 α und 7 für IL-1 β) haben und auf zwei verschiedene Genen auf Chromosom 2 kodiert werden. Obwohl diese Zytokine weniger als 30% strukturelle Homologien haben, binden sie an denselben Rezeptoren und haben dieselben biologischen Eigenschaften.

In Tabelle 10, 11, 12 werden die Ergebnisse zusammengefaßt.

Interleukin-1 α

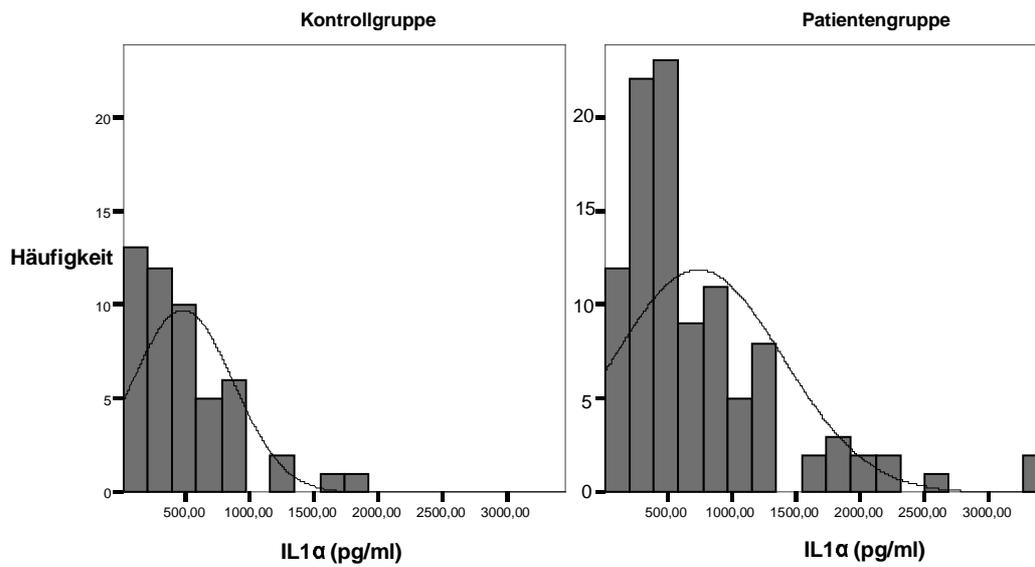
	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)
IL-1α Mittelwert (pg/ml)	734,72	470,09
IL-1α Minimum (pg/ml)	44,04	34,90
IL-1α Maximum (pg/ml)	3468,14	1859,39

Tabelle 10: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-1 α

In Tabelle 10 läßt sich erkennen, daß es einen signifikanten Unterschied in den IL-1 α -Konzentrationen zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe gibt. Für jede einzelne Gruppe kommt es zu einer starken Streuung der Werte. So reichen die Werte bei der Kontrollgruppe von 34,90 bis 1859,39 pg/ml und bei der Patientengruppe von 44,04 bis 3468,14 pg/ml.

Die 25. und die 75. Perzentile waren in der Patientengruppe bei 281,74 pg/ml und bei 902,91 pg/ml. Für die Kontrollgruppe betragen die Werte für die 25. und die 75. Perzentile 176,55 pg/ml und 688,71 pg/ml.

In Abbildung 7 und 8 wird deutlich, daß die Konzentration und das Median von IL-1 α bei der Patientengruppe in Richtung höheren Werten tendiert als bei der Kontrollgruppe.



a.

b.

Abbildung 7: a. Häufigkeitsverteilung der IL-1 α -Konzentration bei der Kontrollgruppe
 b. Häufigkeitsverteilung der IL-1 α -Konzentration bei der Patientengruppe

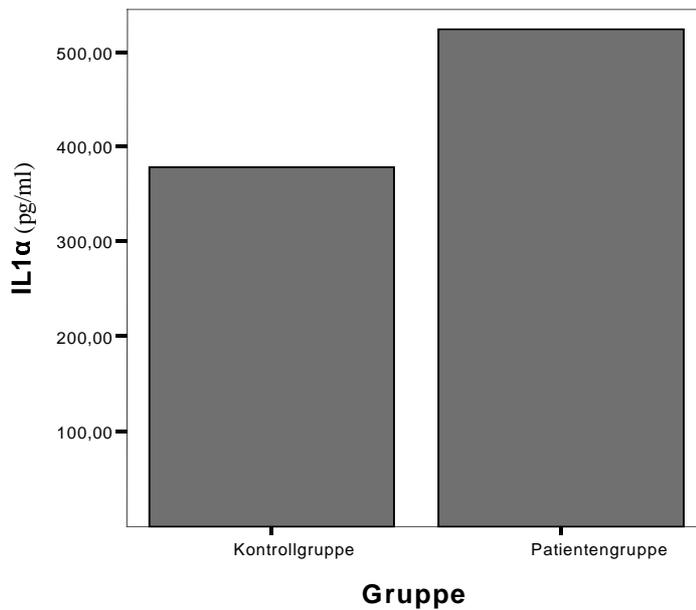


Abbildung 8: Median bei IL-1 α bei Patienten- und Kontrollgruppe

Interleukin-1 β

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)
IL-1β Mittelwert (pg/ml)	177,64	46,71
IL-1β Minimum (pg/ml)	0,00	0,65
IL-1β Maximum (pg/ml)	1560,17	210,22

Tabelle 11: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-1 β

In Tabelle 11 läßt sich erkennen, daß es einen eindeutigen Unterschied auch in den IL-1 β -Konzentrationen zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe gibt. Für die Patientengruppe betragen die 25. und die 75. Perzentile 15,86 pg/ml und 203,34 pg/ml und bei der Kontrollgruppe 4,66 pg/ml bzw. 72,81 pg/ml. Hier gab es auch eine große Streuung der Werte, so reichen die Werte bei der Patientengruppe von 0,00 bis 1560,17 pg/ml und bei der Kontrollgruppe von 0,65 bis 210,22 pg/ml.

Die Häufigkeitsverteilung und der Vergleich beider Medianwerte zeigt auch in den Abbildungen 9 und 10, daß die Konzentrationen von IL-1 β deutlich größer bei der Patientengruppe sind als bei den gesunden Frauen.

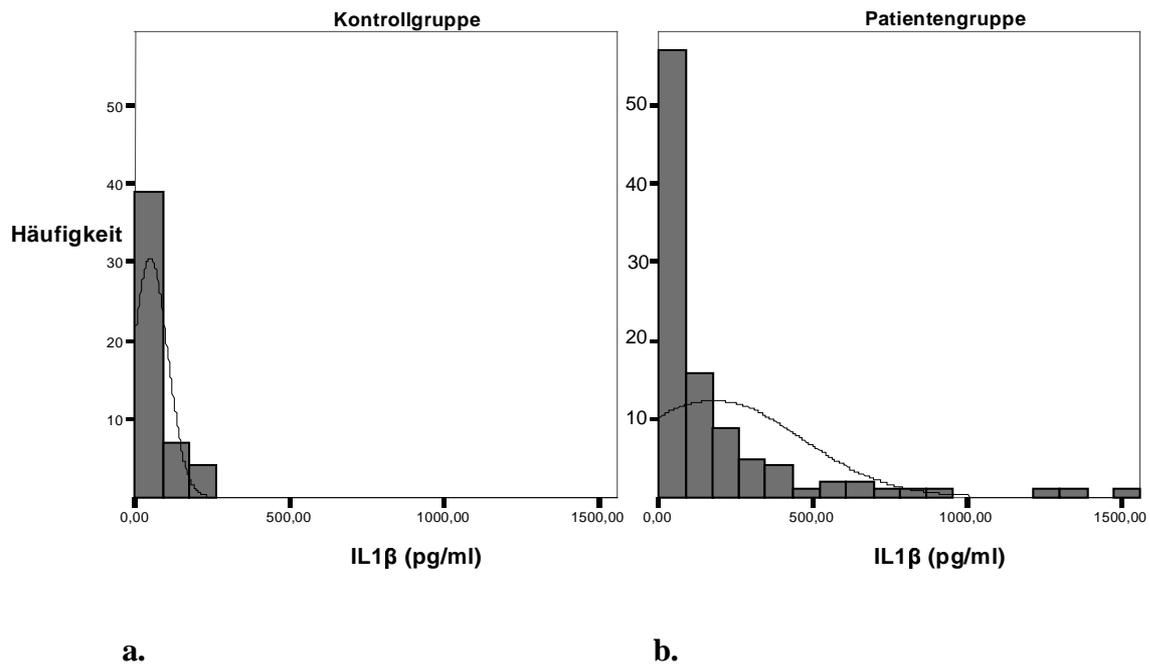


Abbildung 9: a. Häufigkeitsverteilung der IL-1 β -Konzentration bei der Kontrollgruppe
 b. Häufigkeitsverteilung der IL-1 β -Konzentration bei der Patientengruppe

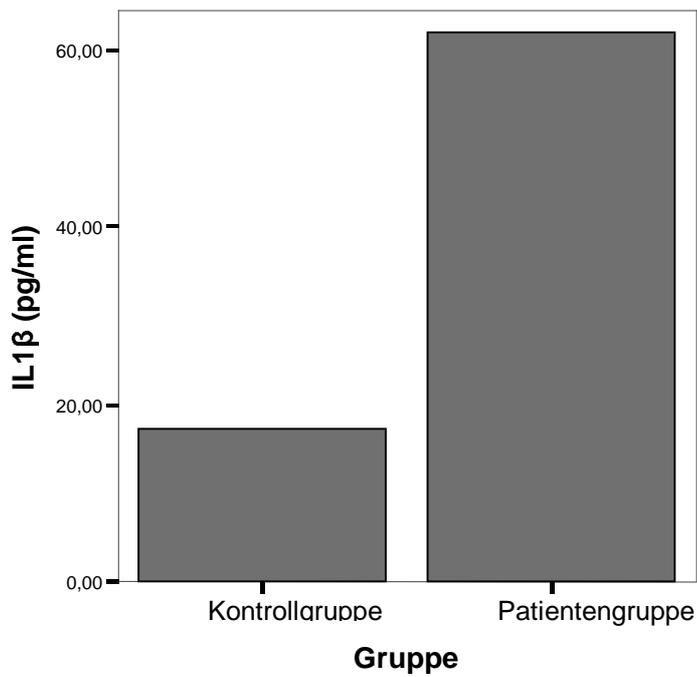


Abbildung 10: Median bei IL-1 β bei Patienten- und Kontrollgruppe

Vergleich der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β

Bei beiden proinflammatorischen Zytokinen gab einen signifikanten Unterschied zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe, mit einer Signifikanz von $p=0,009$ bei IL-1 α und $p=0,0001$ bei IL-1 β .

Interleukin-1 α und Interleukin-1 β

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)	p-Wert
IL-1α Median (pg/ml)	524,89	377,89	0,009
IL-1β Median (pg/ml)	61,90	17,28	0,0001

Tabelle 12: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) bei IL-1 α und IL-1 β in Patienten- und Kontrollgruppe

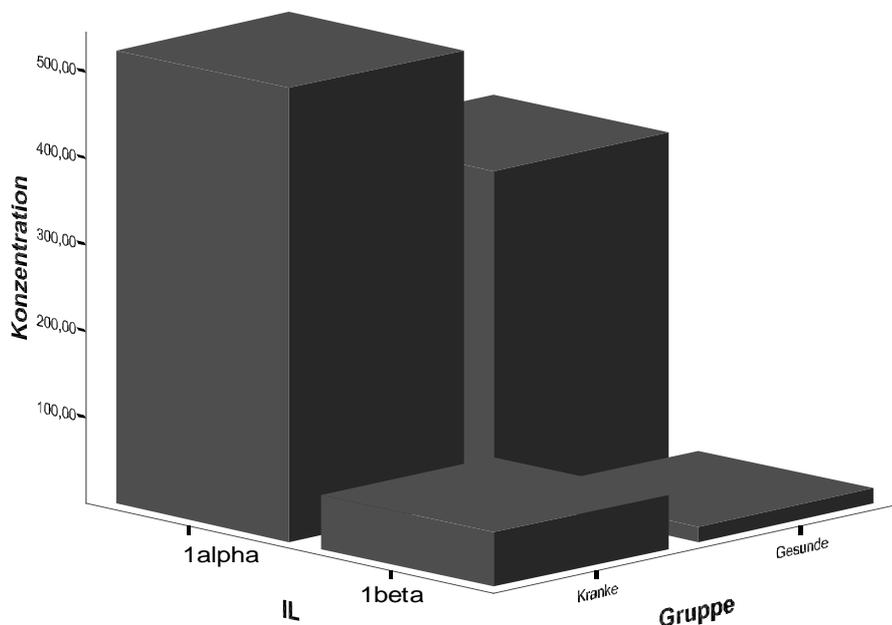


Abbildung 11: Vergleich der Medianwerte bei IL-1 α und IL-1 β bei jeweils Kontroll- und Patientengruppe

Ein signifikanter Anstieg dieser beiden Interleukine in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe spricht für eine starke lokale proinflammatorische Immunantwort der Makrophagen auf die Veränderung der Normalflora der Vagina. Somit kann von einer Initiierung einer zell-vermittelten Entzündungsreaktion ausgegangen werden.

4.3.2. Interleukin-2

Die Konzentration von IL-2 wurde aus dem Scheidensekret von 102 symptomatischen und 50 asymptomatischen Frauen bestimmt, so wie es im Abschnitt 3.3.1. beschrieben wurde. IL-2 wird von aktivierten T-Helferzellen, hauptsächlich Th-1 Zellen, produziert. Es stimuliert sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen, und auch B-Zellen. IL-2 ist ein Hauptmediator der Th-1 Antwort und wirkt immunregulatorisch.

In Tabelle 13 und 14 werden die Ergebnisse zusammengefaßt.

Interleukin-2

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)
IL-2 Mittelwert (pg/ml)	9,39	14,57
IL-2 Minimum (pg/ml)	0,00	0,00
IL-2 Maximum (pg/ml)	60,55	54,73

Tabelle 13: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-2

Interleukin-2

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)	p-Wert
IL-2 Median (pg/ml)	5,92	13,57	0,0001

Tabelle 14: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) bei IL-2 in Patienten- und Kontrollgruppe

In Tabelle 13 und 14 läßt sich erkennen, daß es einen signifikanten Unterschied in der Konzentration von IL-2 zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe gibt ($p=0,0001$). In Abbildung 12 wird noch mal der Unterschied der Medianwerte verdeutlicht.

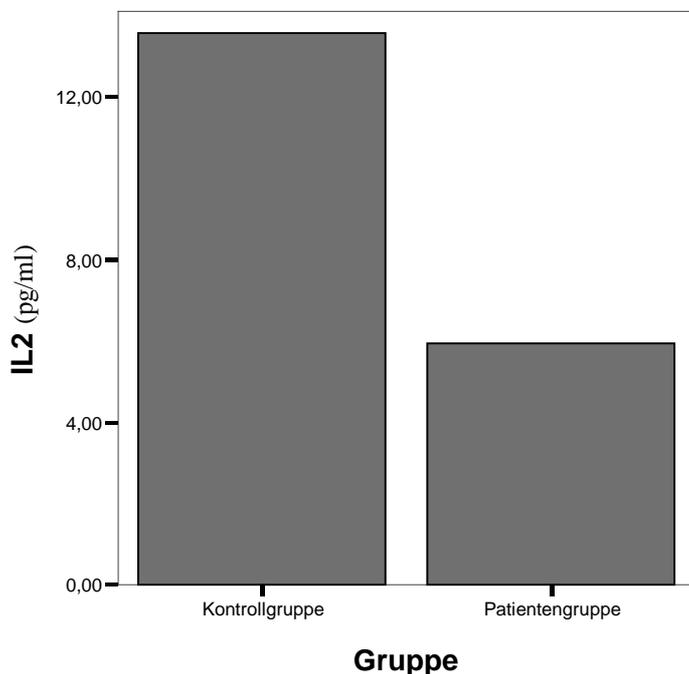


Abbildung 12: Median bei IL-2 bei Patienten- und Kontrollgruppe

In der Patientengruppe waren die 25. Perzentile und die 75. Perzentile bei 0 pg/ml und 14, 83 pg/ml zu finden und in der Kontrollgruppe bei 8,28 pg/ml bzw. bei 17,55 pg/ml.

Interleukin-2 ist ein Hauptmediator der Th-1 Antwort. Eine signifikant niedrigere Konzentration in der Patientengruppe spricht für eine fehlende oder unterdrückte immunregulatorische Th-1 Antwort bei den Patientinnen mit Bakterieller Dysbiose.

4.3.3. Interleukin 3

Um die Konzentration des Zytokins Interleukin-3 zu ermitteln, haben wir das Vaginalsekret von 50 asymptomatischen und 102 symptomatischen Patientinnen, wie im Abschnitt 3.3.3. beschrieben, untersucht.

Interleukin-3 wird von aktivierten T-Zellen produziert und stimuliert die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark.

Interleukin-3

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)
IL-3 Mittelwert (pg/ml)	1,84	0,55
IL-3 Minimum (pg/ml)	0,00	0,00
IL-3 Maximum (pg/ml)	18,41	5,14

Tabelle 15: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-3

Interleukin-3

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)	p-Wert
IL-3 Median (pg/ml)	0,00	0,00	0,514

Tabelle 16: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) bei IL-3 in Patienten- und Kontrollgruppe

Sowohl in der Gruppe der Frauen, bei denen das klinische Bild einer Bakteriellen Dysbiose vorlag, als auch bei den Frauen, die asymptomatisch waren, waren keine signifikanten Veränderungen der Konzentrationen zu sehen. Es läßt sich die Aussage treffen, daß mit einer Signifikanz von $p=0,514$ Frauen mit Bakterieller Dysbiose im Vergleich keine erhöhte IL-3-Konzentration erkennen ließen.

In der Patientengruppe waren die 25. und die 75. Perzentile bei 0 pg/ml und 0,80 pg/ml zu finden. Die Werte für die Kontrollgruppe betragen für 25. Perzentile 0 pg/ml und für die 75. Perzentile 1,54 pg/ml. Im allgemeinen war IL-3 in den beiden Gruppen sehr häufig nicht nachweisbar.

Eine nicht nachweisbare Konzentrationsänderung für IL-3 in unserer Studie weist darauf hin, daß bei der Bakteriellen Dysbiose der Hämatopoeseförderung keine Rolle zukommt.

4.3.4. Interleukin-4

Um die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 zu bestimmen, haben wir das Vaginalsekret von 50 asymptomatischen und 102 symptomatischen Frauen untersucht (siehe Abschnitt 3.3.2.).

IL-4 wird hauptsächlich von dem Th-2 Subtyp der T-Helferzellen aber auch von Mastzellen produziert. Es wirkt immunregulatorisch und stimuliert B-Zellen und somit die antikörpervermittelte Immunantwort, zugleich hemmt es Freisetzung der Zytokine der Th-1 Zellen und die Produktion von IL-1. IL-4 hat außerdem antiinflammatorische Eigenschaften und scheint bei der Entstehung von Allergien eine Rolle zu spielen.

In Tabelle 17 und 18 werden die Ergebnisse zusammengefaßt.

Interleukin-4

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)
IL-4 Mittelwert (pg/ml)	2,83	4,53
IL-4 Minimum (pg/ml)	0,00	0,00
IL-4 Maximum (pg/ml)	34,51	11,37

Tabelle 17: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-4

Interleukin-4

	Patientengruppe (n= 102)	Kontrollgruppe (n=50)	p-Wert
IL-4 Median (pg/ml)	1,00	4,42	0,0001

Tabelle 18: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) bei IL-4 in Patienten- und Kontrollgruppe

Aus den Tabellen 17 und 18 läßt sich erkennen, daß es einen signifikanten Unterschied in der Konzentration von IL-4 zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe gibt. Das Verteilungsmuster war in den beiden Gruppen verschieden; in der Kontrollgruppe lagen Mittelwert und Median eng beieinander, und in der Patientengruppe gab es eine weite Streuung der Werte (von 0 pg/ml bis 34,51 pg/ml). Die 25. Perzentile und die 75. Perzentile

lagen in der Kontrollgruppe bei 2,76 pg/ml bzw. bei 5,91 pg/ml. In der Patientengruppe lag die 25. Perzentile bei 0 pg/ml und die 75. Perzentile bei 3,32 pg/ml.

In Abbildung 13 wird noch einmal der Unterschied der Medianwerte bildlich dargestellt.

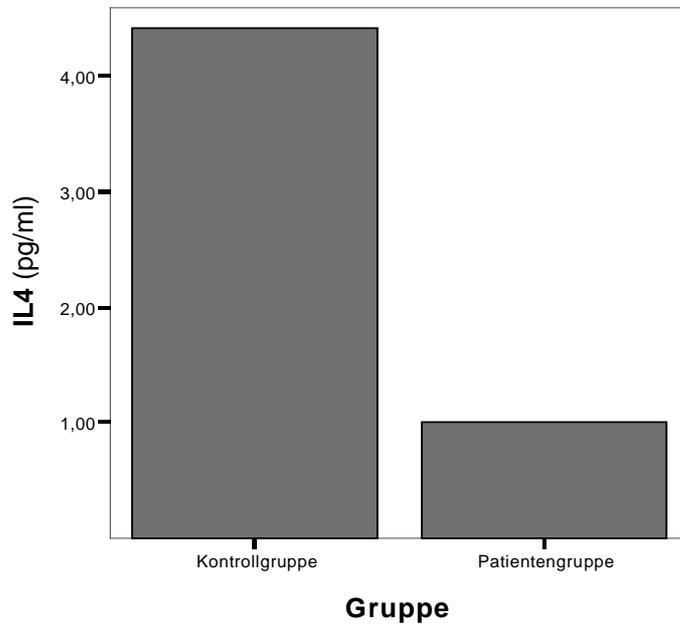


Abbildung 13: Median bei IL-4 bei Patienten- und Kontrollgruppe

IL-4 ist ein Mediator der Th-2 Immunantwort, wirkt immunregulatorisch und hat antiinflammatorische Eigenschaften. Da in der Patientengruppe die Konzentration von IL-4 signifikant niedriger war, ist die Überlegung nahe liegend, daß es bei der Bakteriellen Dysbiose zu einer Unterdrückung der Th-2-Antwort kommt.

5. Diskussion

Annähernd 100% aller Frauen haben einmal in ihrem Leben eine Bakterielle Dysbiose der Vagina [13]. Dabei handelt es sich um eine Störung der in sich ausgeglichenen normalen Scheidenflora, in der H₂O₂-produzierende Laktobazillen vorherrschend sind und andere Keime sich nur in einer niedrigen Anzahl befinden; es kommt zu einer Abnahme dieser Laktobazillen und zu einer Vermehrung der potentiell pathogenen Begleitflora der Scheide.

Die Patientinnen klagen dann über Beschwerden wie vermehrtem Fluor, Brennen, Jucken, Schmerzen und Kohabitationsstörungen; es findet sich ein klinisches Bild mit erhöhtem pH-Wert und Entzündungszeichen der Vagina, wie Rötung und Schwellung [4].

Die Ursachen für das Auftreten eines solchen Ungleichgewichts in der Vaginalflora ist noch unbekannt. Verschiedene Faktoren können zu einer gestörten bakteriellen Flora der Scheide führen, wie das Verwenden von Antibiotika, hormonelle Störungen, Hygienemaßnahmen oder ungeschützter Geschlechtsverkehr. Es ist jedoch noch nicht klar, wieso manche Frauen imstande sind, trotz dieser Faktoren eine ausgeglichene Flora zu behalten, wobei es bei anderen zu dem Bild einer Bakteriellen Dysbiose kommt. Dabei könnte eine immunologische Störung der Scheide vorliegen [4].

Bei vielen gynäkologischen, infektiologischen Erkrankungen stellt die lokale Immunantwort in der Scheide einen wichtigen Faktor in der Abwehr von Krankheitserregern dar [35, 66], da sie ein breites Spektrum an Immunzellen enthält, die mittels Zytokine die lokale Immunität beeinflussen können [66, 70]. So konnten zum Beispiel Steel et al. [43] in einer Studie nachweisen, daß es nach einer Infektion mit *Candida albicans* zu einer erhöhten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen kommt, im Besonderen von IL-1 α und TNF, und somit die lokale Immunität eine wichtige Rolle in der Abwehr spielt. Fichorova et al. [34] konnten bei *Neisseria-gonorrhoeae*-Infektionen zeigen, daß dabei erhöht IL-1, IL-6 und IL-8 produziert werden. Doh et al. [71] haben bei der Infektion schwangerer Frauen mit *Mycoplasma hominis* auch eine pro-inflammatorische Antwort mit erhöhtem IL-1 β nachweisen können. Interleukine werden nicht nur von Zellen des Immunsystems produziert, sondern auch von den Epithelzellen [67, 69]. Das bestätigten unter anderem Svanborg et al. [68] in einer Studie, in der sie zeigten, daß Epithelzellen vermehrt IL-1 α und IL-1 β nach Stimulation mit *Escherichia coli* freisetzen.

In diesem Zusammenhang untersuchten wir den lokalen Immunstatus der Scheide bei 102 Patientinnen mit dem klinischen Bild einer Bakteriellen Dysbiose, diagnostisch bestätigt durch die mikroskopische Beurteilung der Scheidenflora und damit der Bestimmung des Reinheitsgrades und der Laktoflora und die Messung des pH-Werts. Sowohl in der Kontrollgruppe von 50 asymptomatischen Frauen als auch in der Gruppe der symptomatischen Patientinnen bestimmten wir die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β , die immunregulatorischen Zytokine IL-2 und IL-4 und das hämatopoese-stimulierende IL-3 mittels ELISA.

In unseren Untersuchungen dieser Immunparameter konnten wir bei der Bakteriellen Dysbiose eine erhöhte Produktion der pro-inflammatorischer Zytokine IL-1 α ($p < 0,009$) und IL-1 β ($p < 0,0001$) und eine Unterdrückung der immunregulatorischen Zytokine IL-2 ($p < 0,0001$) und IL-4 ($p < 0,0001$) feststellen. Deshalb können wir davon ausgehen, daß im Falle der Bakteriellen Dysbiose der zellvermittelten Immunität der Scheide eine wesentliche Rolle zukommt. Es liegt dabei eine Aktivierung der Zytokine in Richtung einer inflammatorischen Entzündungsreaktion vor, und eine Unterdrückung der Zytokine, die für die Immunregulation verantwortlich sind. Für das hämatopoetisch-stimulierende IL-3 konnten wir jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe feststellen ($p > 0,514$), in diesem Sinne spielt die Hämatopoeseförderung durch IL-3 bei der Bakteriellen Dysbiose keine Rolle.

Bis jetzt haben viele Arbeiten von dem Zusammenspiel der lokalen Immunität der Vagina und einer abnormalen Scheidenflora gehandelt; jedoch haben sich die meisten Autoren dabei speziell auf das Bild der Bakteriellen Vaginose bezogen. Es ist doch wichtig dieses typische Krankheitsbild von dem der Bakteriellen Dysbiose, das eher ein Ungleichgewicht als ein Krankheitsbild darstellt, zu unterscheiden. Es gibt jedoch Formen abnormaler Vaginalflora, die nicht mit dem Bild einer BV zu vereinbaren sind [4, 44]. Diese wurden bis jetzt als „intermediäre Flora“ bezeichnet, mit der Gruppe der BV oder der Normalflora gleichgestellt [4, 16, 30], oder von Donders et al. als „aerobe Vaginitis“ bezeichnet [4]. Donders et al. weisen darauf hin, daß es wichtig ist, diese beiden Formen der abnormalen Vaginalflora, BV und „aerobe Vaginitis“, zu unterscheiden, denn durch diese Verwechslung kann man eine wichtige Risiko- und Therapiegruppe übersehen [4, 30]. Sie unterstreichen auch die Tatsache, daß ein mikroskopisches Präparat, das eine gestörte Scheidenflora zeigt, nicht unbedingt mit der Diagnose einer BV gleichzusetzen ist [45, 46]. In diesem Sinne, wäre es wichtig, zu einer

Übereinstimmung in der Diagnostik und Klassifikation der Scheidenflora zu kommen, um diese Form der abnormalen vaginalen Flora, die sich von der BV unterscheidet, besser definieren zu können.

Die BV ruft auch eine andere immunologische Antwort hervor und hat ein unterschiedliches Zytokinprofil als die Bakterielle Dysbiose. So haben Donders et al. [4, 49] in ihren Arbeiten beschrieben, daß vor allem die von ihnen bezeichnete „aerobe Vaginitis“ mit einem Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 verbunden ist und nicht die BV, und daß der Anstieg von IL-1 β mit dem Abfall der Laktobazillen indirekt proportional ist [30, 49]. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Untersuchungen überein, denn auch wir haben bei den Patientinnen mit einer Bakteriellen Dysbiose einen signifikanten Unterschied in der IL-1 β -Konzentration gefunden. Auch Spandorfer et al. [47] und Cauci et al. [48] haben in Studien erhöhte Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 bei Patienten mit einer abnormalen vaginalen Flora gefunden.

Doh et al. [71] haben in ihren Untersuchungen auch eine signifikante Erhöhung der IL-1 β -Konzentration bei Frauen, die in höherem Maße mit *Mycoplasma hominis* besiedelt waren, gefunden. Die Kolonisierung mit *M. hominis* ist mit Störungen der Scheidenflora assoziiert, die eine stärkere Entzündung der Vagina hervorrufen. Die pathogenen Mikroorganismen können zu einer Verschlechterung der lokalen Immunmechanismen der Vagina führen und dadurch die Besiedlung und das Wachstum von *M. hominis* erleichtern. Im Gegensatz dazu, konnten Doh et al. [71] bei *Ureaplasma urealyticum* keinen signifikanten Anstieg des proinflammatorischen IL-1 β finden. Das kann dadurch erklärt werden, daß *U. urealyticum* die lokale Immunantwort hemmt; deswegen hat *U. urealyticum* auch eine höhere Prävalenz als *M. hominis*.

Wieso es bei einer Störung der vaginalen Flora zu einem Anstieg in der Konzentration proinflammatorischer Zytokine kommt, kann dadurch erklärt werden, daß Bakterien eine Reihe von Substanzen produzieren, die eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen veranlassen [38]. Es geht dabei um Endotoxine und Lipopolysaccharide, deren Ausschüttung, wie Mattsby-Baltzer et al. [50, 51] in ihren Untersuchungen feststellten, mit einer erhöhten Produktion von IL-1 α und IL-1 β einhergeht.

Die Steuerung der Produktion von Zytokinen in der Vagina hängt von verschiedensten Mechanismen ab, es besteht nicht zwingend ein Zusammenhang mit einer Infektion. Laut Cauci et al. [48] können mehrere Stimuli die Produktion von Zytokinen und die Akkumulation von Leukozyten triggern; dazu gehören auch mechanische oder endogene Ursachen.

Bei den von uns untersuchten immunregulatorischen Zytokinen IL-2 und IL-4 haben wir bei den Patientinnen mit Bakterieller Dysbiose eine signifikante Unterdrückung ($p < 0,0001$) der Konzentration im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt. Eine Erklärung dafür kann sein, daß Bakterien genauso Substanzen produzieren, die die Freisetzung bestimmter Zytokine inhibieren können [38]. So können Bakterien wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* oder *E. coli* Proteine freisetzen, die unter anderem IL-2, IL-4 und IL-5 herunterregulieren können [38]. Es gibt auch bakterielle Proteasen, die IL-2 spalten können, zum Beispiel bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Legionella pneumophila* [38]. Eine weitere Möglichkeit für eine Unterdrückung von IL-2 wäre die Produktion von PGE2 [33]. Monozyten, durch die Freisetzung von IL-1, und auch Mikroorganismen stimulieren die Biosynthese von Prostaglandin E2 [40], das wiederum die Synthese von IL-2 hemmt [41, 42]. Dieses Mechanismus wurde auch von Witkin et al. [81] als Erklärung für die rezidivierende Vaginitis erwähnt. Ein weiterer Mechanismus, das die vaginale Produktion von IL-2 inhibiert wäre Zigarettenrauchen, wie Crowley-Nowick et al. [35] in einer Studie belegen konnten, was aber von uns nicht untersucht worden ist.

Es stellt sich aber auch die Frage ob eventuell genetisch bedingte Veränderungen oder Störungen der lokalen Immunantwort vorliegen [4, 71], so daß eine adäquate Abwehrreaktion auf das Eindringen und Vermehren der Mikroorganismen nicht erfolgen kann und dadurch eine fehlende Elimination der Bakterien vorliegt. Fest steht, daß es bei der Bakteriellen Dysbiose zu einer Unterdrückung der immunregulatorischen Zytokine, sowohl von TH1-Typ als auch von TH2-Typ, kommt. Dadurch bleibt die Effektorphase der Immunantwort aus und die Zellen, die in der zellvermittelten Immunantwort eine wichtige Rolle haben, wie Lymphozyten vom TH1-Typ oder NK-Zellen, können nicht proliferieren. Die potentiell pathogenen Bakterien der Vaginalflora können daher ungehemmt wachsen und somit Beschwerden verursachen.

Falls die Ursache darin zu finden ist, daß es aufgrund eines genetischen Defekts oder einer lokalen Störung nicht zu einer ausreichenden Reaktion des lokalen Immunsystems kommt, wäre zu überlegen, ob mit Immunstimulantien therapeutisch eingegriffen werden könnte.

Richtige Therapieansätze stellen einen wichtigen Punkt bei der Bakteriellen Dysbiose dar, denn es handelt sich hierbei keineswegs um eine als harmlos anzusehende Veränderung der Mikroflora, die zwar unangenehme, aber ungefährliche Symptome mit sich bringt. Frauen mit dieser Störung sind wesentlich stärker gefährdet, denn eine gestörte Vaginalflora stellt auch ein wichtiger Risikofaktor für andere Komplikationen dar.

Besonders bei Frauen in der Schwangerschaft wird einer abnormalen Flora eine hohe Komplikationsrate zugeschrieben; vorzeitige Wehen, Spontanabort, Frühgeburt, vorzeitiger und frühzeitiger Blasensprung können Folgen sein [11, 52, 53, 54].

Doch nicht nur für Frauen in der Schwangerschaft erhöht sich durch eine gestörte Vaginalflora die Komplikationsrate, auch nicht schwangere Frauen haben ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Komplikationen. Durch das Aszendieren verschiedener Keime, die durch die abnormale Scheidenflora nicht mehr eliminiert werden können, treten vermehrt ernsthafte Infektionen im Bereich des oberen Genitaltraktes auf, wie zum Beispiel Endometritis [47, 55].

Sewankambo et al. [56] konnten eine Beziehung zwischen einer abnormalen vaginalen Flora und dem Erwerb einer HIV-1-Infektion sehen. Ein potentieller Mechanismus liegt darin, daß das Hydrogenperoxid die Vermehrung des HIV-1 inhibiert [8] und mit dem Abfall der hydrogen-peroxid-bildenden Laktobazillen dem Virus das Überleben im weiblichen Genitaltrakt erleichtert wird. Ein erniedrigter pH-Wert kann auch die CD4-Lymphozyten-Proliferation hemmen und dadurch die Anzahl der HIV-1-Zielzellen in der Vagina reduzieren [8, 56, 64]. Somit kann eine Störung des vaginalen Ökosystems, die mit einer Erhöhung des pH-Wertes einhergeht, das Risiko für die HIV- Infektion erhöhen [78].

Einen Zusammenhang zwischen Störungen in der Vaginalflora und einer Infektion mit HIV-1 stellten Sturm-Ramirez et al. [57], die sich auch mit dieser Problematik beschäftigten, heraus. Demnach spielen pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF- α , eine wichtige Rolle in der HIV- Replikation. Diese Interleukine, die im Rahmen einer Bakteriellen Dysbiose in großen Mengen ausgeschüttet werden, können durch die Aktivierung des NF- κ B- Enhancers in der long terminal repeat (LTR) - Promoterregion des Virus dessen Replikation hochregulieren [36, 57, 58, 59, 80]. Zara et al. [36], Al-Harhi et al. [59] und Martin et al. [8] fanden noch, daß die Viruszahl im Vaginalsekret bei HIV-positiven Frauen mit der IL-1 β -Menge im Vagiansekret korreliert. Auch die Freisetzung viraler Proteine, wie zum Beispiel p24, wird durch IL-1 stimuliert [80]. Alfano et al. [60] haben in ihrer Arbeit die protektive Wirkung von IL-2 gegenüber der HIV-Replikation erwähnt, was vielleicht die Bakterielle Dysbiose zusätzlich zu einem Risikofaktor für eine HIV-Infektion macht.

Des Weiteren konnten Behbakht et al. [61] bei Frauen, bei denen Veränderungen der Vaginalflora vorlagen, häufiger eine zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) nachweisen als bei Frauen mit normaler Vaginalflora. Dabei würde auch das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β eine wichtige Rolle als Promotionsfaktor spielen, denn sie haben eine signifikante Assoziation zwischen IL-1 β und CIN gefunden. Eine mögliche Überlegung für

eine Beziehung zwischen der Bakteriellen Dysbiose und der CIN wäre, daß IL-1 β , genauso wie im Falle des HIV, die Replikation des für die CIN verantwortlichen HPV stimulieren könnte [61, 63]. Guijon et al. [62] haben in einer Studie, wo sie auch den Zusammenhang zwischen einer abnormalen vaginalen Flora und einer CIN bestätigten, den Nitrosaminen, die von der pathogenen bakteriellen Flora produziert werden, eine potentielle Rolle in der zervikalen Onkogenese zugeschrieben.

Trotz des Gesundheitsrisikos, das mit einer Bakteriellen Dysbiose assoziiert ist, und der hohen Prävalenz bei Frauen im gebärfähigen Alter, wird diese Störung im klinischen Alltag oft übersehen [16] oder mit dem Krankheitsbild der BV gleichgestellt [4], im Besonderen in den Fällen in denen die Frauen über keine Symptome klagen.

Daher ist es wichtig, Tests bzw. Diagnoseverfahren zu entwickeln und anzuwenden, die eine schnelle Untersuchung und sichere Diagnose ermöglichen. Aufgrund der ernsthaften Folgen wäre die Untersuchung der Scheidenflora während der Schwangerschaft als Routineuntersuchung einzuführen. Eine richtige Diagnose ist auch für eine richtige Therapie wichtig. So meinen Donders et al., daß mit der Verwechslung der Bakteriellen Dysbiose mit der BV eine wichtige Therapiegruppe übersehen wird und daß dadurch ein fehlendes Ansprechen auf Therapie bei den Frauen mit einer sogenannten BV erklärt werden kann [4]. Da bisher allerdings die genauen Ursachen noch nicht geklärt werden konnten, ist es schwierig, ein optimales Therapieschema zu erstellen.

Aufgrund der Tatsache, daß die Laktobazillen eine protektive Wirkung für das vaginale Ökosystem zeigen, werden mehrere Studien durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit Laktobazillen als probiotische Therapie Erfolg bringen würde. Dabei gab es Studien, die mit exogenen Laktobazillen eine Normalisierung der Flora erreicht haben, doch das konnte nicht ein Rezidiv der Symptomatik und der Störung bei allen Fällen vorbeugen [65]. Deswegen bedarf es noch weiteren Untersuchungen, inwiefern eine solche probiotische Therapie auf lange Dauer sinnvoll ist.

Da wir in unserer Studie einen signifikanten Unterschied in der Patientengruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe sowohl für die pro-inflammatorischen als auch für die immunregulatorischen Zytokine feststellen konnten, könnte eine immunmodulatorische Therapieform als Möglichkeit in Frage kommen. Falls die Ursache für diese Störung eine überschießende pro- inflammatorische Antwort ist, so wie es in unserer Studie mit IL-1 α und IL-1 β der Fall ist, könnte man überlegen ob eine lokale immunsuppressive Therapie, zum Beispiel mit IL-1ra oder Antikörper für IL-1 [79], eine Möglichkeit wäre. Andererseits haben

wir in unserer Studie einen signifikanten Abfall der immunregulatorischen Zytokine IL-2 und IL-4 in der Patientengruppe feststellen können; dieser fehlende Schritt in der Effektorphase der Immunantwort konnte auch der Grund für die Symptome und Bestehen der Störung sein. In diesem Sinne könnte eine immunstimulatorische Therapie in Frage kommen, zum Beispiel durch Administration von IL-2, da dieses die Anzahl der Lymphozyten ansteigen läßt und dadurch eine effektivere Bekämpfung der pathogenen Mikroorganismen ermöglicht wird. In dieser Hinsicht sind weitere Untersuchungen nötig.

6. Zusammenfassung

Die Bakterielle Dysbiose stellt in der gynäkologischen Infektiologie nach wie vor eine der häufigsten Störungen des vaginalen Ökosystems dar. Die auftretenden Symptome wie Fluor, Schmerzen, Brennen, Pruritus, Rötung der Vagina und Kohabitationsstörungen sind für die Patientinnen sehr belastend und können nicht selten aufgrund fehlender Diagnosestellung nicht gezielt behandelt werden. Besonders der häufig asymptomatische Verlauf verhindert das frühzeitige Erkennen des Krankheitsbildes der Bakteriellen Dysbiose und führt zu mangelhaften Therapieansätzen, was auch die Komplikationsrate erhöht.

Die der Bakteriellen Dysbiose zugrunde liegenden Ursachen konnten bis jetzt noch nicht hinreichend geklärt werden. Um die immunmodulatorischen zu untersuchen, die mit den Veränderungen der vaginalen Mikroflora im Sinne der Bakteriellen Dysbiose assoziiert sind, und im Hinblick auf mögliche neue therapeutische und diagnostische Ansätze, bestimmten wir die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β , die immunmodulatorischen Zytokine IL-2 und IL-4 und das hämatopoesefördernde IL-3 im Vaginalsekret bei Frauen mit Bakterieller Dysbiose. Insgesamt untersuchten wir 152 nicht schwangere Frauen. Bei 102 Patientinnen mit dem Durchschnittsalter von 32,45 Jahren mit der klinischen Diagnose Bakterielle Dysbiose und bei 50 asymptomatischen Frauen im Durchschnittsalter von 35,72 Jahren wurden mittels ELISA diese immunologischen Mediatoren untersucht. Ziel war die Beurteilung der zellvermittelten Immunität bei der Bakteriellen Dysbiose.

Die Auswertung unserer Meßergebnisse zeigte für die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β einen signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$) bei der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die immunregulatorischen Zytokine IL-2 und IL-4 waren bei der Patientengruppe signifikant ($p < 0,0001$) verschieden, im Sinne eines Konzentrationsabfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für das hämatopoesefördernde IL-3 konnten wir keinen signifikanten Unterschied feststellen ($p = 0,514$). Die für die Bakterielle Dysbiose diagnostischen Marker, wie der Reinheitsgrad, waren signifikant verändert ($p < 0,0001$), jedoch konnten wir beim pH-Wert keinen signifikanten Anstieg ($p = 0,068$) bei den Patientinnen feststellen.

Anhand unserer Ergebnisse scheint die lokale Immunität bei der Bakteriellen Dysbiose eine wichtige Rolle zu spielen. Man kann darin eventuelle Anhaltspunkte für neue therapeutische Ansätze im Sinne einer Immuntherapie erkennen, entweder als Immunsuppression gegen die

überschießende pro-inflammatorische Antwort oder als Immunstimulation um die herabgesetzte Immunmodulation zu fördern.

Bei den Frauen, bei denen das Bild einer Bakteriellen Dysbiose besteht, kommt es vermehrt zu Komplikationen sowohl während der Schwangerschaft, wie ein Spontanabort, Frühgeburt oder vorzeitiger Blasensprung, als auch bei nicht schwangeren Frauen, wie eine Endometritis. Auch das Infektionsrisiko für HIV-1 und das Entwickeln einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) scheint erhöht zu sein. Aufgrund dessen, daß eine Bakterielle Dysbiose möglicherweise in direktem Zusammenhang mit solchen Komplikationen steht, ist die Forschung in diesem Gebiet notwendig und sinnvoll. Es wäre wichtig, Richtlinien für eine schnelle und sichere Diagnose zu erarbeiten, um eine höhere therapeutische Effektivität zu erreichen.

7. Anhang

7.1. Patientenrohdaten

Probennr.	Gruppe	Alter	IL 1alpha (pg/ml)	IL 1beta (pg/ml)	IL 2 (pg/ml)	IL 3 (pg/ml)	IL 4 (pg/ml)	pH	RHG
1a	Gesunde	41	1544,49	57,74	20,15	0,00	1,26	4,3	I
2a	Gesunde	41	117,6	8,58	6,31	0,00	2,03	4,1	I
3a	Gesunde	52	274	27,76	17,42	0,76	6,19	4,3	I
4a	Gesunde	45	444,83	11,51	20,69	0,76	5,73	4,1	I
5a	Gesunde	19	415,14	120,00	0,00	0,00	0,48	4,3	II
6a	Gesunde	44	354	3,05	10,80	0,00	6,03	4,2	I
7a	Gesunde	22	84,6	5,03	7,44	0,58	3,11	4,2	I
8a	Gesunde	18	688,79	184,71	43,26	1,52	7,57	4,4	I
10a	Gesunde	42	561,79	2,00	5,18	0,00	2,65	4,1	I
11a	Gesunde	45	416,09	210,22	6,31	0,00	2,18	4,4	I
12a	Gesunde	34	398,07	87,28	10,24	0,00	3,11	4,2	I
13a	Gesunde	40	484,71	87,28	17,97	1,10	3,42	4,0	II
14a	Gesunde	35	515,38	49,49	13,57	0,00	3,57	4,3	I
15a	Gesunde	49	289,50	106,3	12,46	0,00	3,42	4,2	I
16a	Gesunde	18	828,51	101,21	16,88	0,00	0,95	4,6	I
18a	Gesunde	32	357,72	27,33	9,12	0,15	6,49	4,1	I
22a	Gesunde	43	240,7	19,81	6,31	1,18	2,65	4,4	I
23a	Gesunde	30	349,35	7,22	3,48	0,00	5,42	4,3	I
25a	Gesunde	49	220,56	2,00	15,78	1,27	5,27	4,3	I
28a	Gesunde	32	256,74	190,46	14,12	0,00	2,80	4,7	I
33a	Gesunde	43	106,9	14,76	28,20	1,78	4,50	4,3	I
35a	Gesunde	23	69,1	0,65	12,46	0,33	4,34	4,3	I
39a	Gesunde	34	788,36	21,61	28,20	0,50	3,57	4,3	I-II
40a	Gesunde	43	477,85	12,77	25,54	0,00	5,88	4,4	I
41a	Gesunde	39	808,31	9,84	2,34	0,00	2,80	4,1	I-II
46a	Gesunde	26	1244,44	62,48	4,05	0,00	5,42	4,2	I
51a	Gesunde	29	354,00	7,64	15,23	0,00	1,57	4,2	I
52a	Gesunde	41	183	3,05	19,61	1,95	5,27	4,2	I-II
53a	Gesunde	42	62,8	3,15	19,61	0,58	6,65	4,1	I
54a	Gesunde	39	610,44	128,71	14,12	0,58	9,40	4,3	I
56a	Gesunde	31	296,81	7,33	9,68	1,18	3,11	4,2	I
58a	Gesunde	27	1218,68	122,50	11,91	0,00	5,88	4,1	I-II
59a	Gesunde	40	157,2	64,71	4,61	0,00	0,00	5,2	I
60a	Gesunde	37	34,9	2,84	11,35	0,00	5,27	4,2	I
92a	Gesunde	27	82,8	2,42	11,35	1,01	7,41	4,3	I
97a	Gesunde	28	42,6	2,53	54,73	5,14	11,37	4,1	I
98a	Gesunde	25	278,55	9,42	2,91	0,00	2,18	4,1	I
99a	Gesunde	43	44,9	4,20	15,78	0,58	9,25	4,2	II
103a	Gesunde	43	425,63	65,78	13,57	0,00	2,18	4,3	I
104a	Gesunde	44	73,4	1,90	9,12	0,00	5,57	4,1	I
114a	Gesunde	20	626,25	71,45	14,68	0,00	6,80	4,3	I
116a	Gesunde	46	287,67	14,03	11,91	1,78	5,42	4,1	I
117a	Gesunde	37	57,2	5,45	16,33	0,67	4,34	4,1	I
119a	Gesunde	22	1859,39	40,8	15,78	0,00	4,50	4,3	I
125a	Gesunde	37	915,66	173,92	35,56	0,00	4,34	4,1	I-II
126a	Gesunde	47	688,79	3,47	17,42	0,41	7,26	4,2	I
128a	Gesunde	48	813,04	76,92	8,56	0,00	1,10	4,2	I

134a	Gesunde	43	427,55	4,82	21,23	2,88	8,94	4,1	I
140a	Gesunde	32	900,60	58,02	15,23	0,93	5,11	4,2	I
145a	Gesunde	19	725,43	29,68	0,05	0,00	2,80	4,3	I
J14	Patientengruppe	48	173,3	15,4	26,1	0,00	4,81	3,8	II
J23	Patientengruppe	33	2256,47	105,2	14,7	0,24	2,49	4	II-III
J26	Patientengruppe	37	2553,2	248,47	7,4	1,52	0,00	5,5	II-III
J44	Patientengruppe	39	1178,51	117,2	18,81	0,00	5,88	4,4	II
J45	Patientengruppe	23	451,59	416,63	0,00	0,00	0,00	4,3	II
J48	Patientengruppe	17	974,34	9,31	0,00	0,00	2,65	4,3	II
J85	Patientengruppe	46	293,16	1,59	1,77	0,93	2,49	4,5	III
J92	Patientengruppe	35	852,59	16,02	1,77	0,33	3,27	4	II
J93	Patientengruppe	35	1209,68	51,94	21,77	0,93	1,57	5,2	II-III
J108	Patientengruppe	28	424,68	1,69	21,77	1,44	6,80	4,2	II
J112	Patientengruppe	41	220,9	0,96	2,34	0,00	8,48	4	II
J120	Patientengruppe	54	371,73	1,90	5,18	0,00	4,34	4,4	II-III
J122	Patientengruppe	25	111,3	13,19	14,12	1,44	2,80	4,3	II
J125	Patientengruppe	18	1845,13	373,59	14,12	1,27	0,48	4,8	II
J126	Patientengruppe	34	1029,14	15	5,18	0,58	0,00	4,6	II-III
J129	Patientengruppe	21	634,74	42,5	15,78	1,10	1,34	4	II
J132	Patientengruppe	32	2174,55	97,03	17,42	0,76	0,50	4,8	II-III
J135	Patientengruppe	25	473,94	312,78	22,85	0,00	3,83	4,7	III
J139	Patientengruppe	38	862,32	304,06	19,06	0,00	1,00	4,4	II
J147	Patientengruppe	27	584,40	93,80	18,52	0,00	2,84	5	II
J155	Patientengruppe	33	344,71	58,25	19,61	1,18	4,99	4,2	II
J156	Patientengruppe	27	1018,38	33,22	60,55	6,06	0,00	4,4	III
J159	Patientengruppe	28	441,94	5,45	13,02	2,71	0,00	4,1	II
J163	Patientengruppe	24	1585,79	57,34	6,87	1,52	0,00	4,2	II
J164	Patientengruppe	28	454,49	50,38	10,80	1,61	0,00	4,3	II
J165	Patientengruppe	37	238,6	8,27	13,57	1,61	1,67	4,2	II
J166	Patientengruppe	30	480,79	141,83	2,34	0,00	8,44	4,2	II
J174	Patientengruppe	32	267,63	133,16	15,23	0,00	23,59	4,2	II
J175	Patientengruppe	37	120,2	1,17	9,68	0,24	5,98	4,1	II
J176	Patientengruppe	26	219,2	3,26	55,22	1,61	0,33	4,2	II
J177	Patientengruppe	22	783,70	181,75	0,00	0,00	0,00	4,1	II
J182	Patientengruppe	21	577,18	95,75	0,40	0,84	0,50	4,2	II
J185	Patientengruppe	40	178,24	30,81	1,44	1,35	0,00	4	II
J188	Patientengruppe	28	253,11	4,33	0,40	0,00	6,31	4,2	I
J190	Patientengruppe	17	309,65	0,00	0,00	0,41	0,00	4,2	II
J191	Patientengruppe	38	222,36	25,13	0,00	0,00	0,00	4,1	II
J192	Patientengruppe	36	49,48	27,02	0,00	0,00	1,00	4,3	II
J194	Patientengruppe	50	1600,35	15,03	25,73	5,38	4,99	4,3	II
J197	Patientengruppe	26	1845,13	9,99	16,69	0,00	0,00	4,2	II
J198	Patientengruppe	39	3395,55	118,87	0,00	0,00	0,00	4,2	II
J199	Patientengruppe	20	515,38	14,40	26,80	6,02	0,00	4,1	II
J200	Patientengruppe	43	418,95	124,03	1,96	0,00	0,00	4,1	I-II
J206	Patientengruppe	23	1948,91	103,44	11,41	0,00	0,00	4,3	II-III
J209	Patientengruppe	25	3468,14	11,88	7,72	0,00	0,00	4,3	II-III
J212	Patientengruppe	39	178,24	23,86	0,00	0,00	0,00	4,3	II
J214	Patientengruppe	42	573,06	20,07	5,10	0,00	3,50	4,3	II
1C	Patientengruppe	19	820,16	62,53	11,93	0,00	1,34	4,1	II
2C	Patientengruppe	43	331,75	160,27	9,83	0,00	0,00	4,2	II-III
3C	Patientengruppe	39	818,97	1244,80	12,46	3,04	0,00	4,2	III
4C	Patientengruppe	25	424,68	1560,17	14,57	5,38	0,00	4,2	III
5C	Patientengruppe	29	84,73	0,00	0,00	0,00	1,34	4,1	I-II

6C	Patientengruppe	33	479,81	471,19	7,20	6,66	0,00	4,1	II
7C	Patientengruppe	24	213,34	10,62	1,96	0,27	0,83	4,1	II
8C	Patientengruppe	38	212,44	9,36	7,20	0,00	3,17	4,2	I-II
9C	Patientengruppe	38	880,73	819,83	11,93	7,08	1,50	4,3	III
10C	Patientengruppe	27	1241,39	716,72	14,04	2,18	0,00	4,1	III
11C	Patientengruppe	26	1761,26	664,22	21,47	11,99	2,17	4,3	III
12C	Patientengruppe	28	602,07	658,42	0,00	0,00	0,33	4,3	III
13C	Patientengruppe	34	264,00	0,00	0,00	0,00	2,34	4	I-II
14C	Patientengruppe	37	262,18	49,82	0,00	0,00	2,17	4,3	II
15C	Patientengruppe	32	1242,91	200,06	0,00	0,00	4,49	4,1	II
16C	Patientengruppe	43	318,84	9,99	0,40	0,00	12,01	4,2	II
17C	Patientengruppe	27	716,47	584,45	0,00	0,00	0,00	4,4	II-III
18c	Patientengruppe	35	486,68	603,01	23,06	7,51	0,00	4,1	II-III
19C	Patientengruppe	29	875,80	413,89	19,34	6,02	0,00	4,1	II
20C	Patientengruppe	19	815,41	141,47	3,01	0,00	10,55	4,2	II
21C	Patientengruppe	29	614,65	68,90	3,01	0,00	0,00	4,2	I-II
22C	Patientengruppe	40	869,66	871,90	3,01	0,00	0,00	4,3	II-III
23C	Patientengruppe	34	794,20	230,95	4,58	0,00	0,00	4,2	II-III
24C	Patientengruppe	37	408,49	115,65	8,77	0,00	5,65	4,1	II
25C	Patientengruppe	19	100,05	14,40	10,88	0,00	9,74	4,2	II-III
26C	Patientengruppe	18	307,81	28,28	0,00	0,00	0,00	4,1	II-III
27C	Patientengruppe	50	196,23	66,36	0,92	0,00	4,99	4,3	II
28C	Patientengruppe	45	1317,58	213,18	16,69	10,29	1,34	4,2	II-III
29C	Patientengruppe	44	863,54	154,43	22,00	18,41	0,00	4,1	III
30C	Patientengruppe	34	575,12	191,55	12,46	8,79	0,00	4,2	II-III
31C	Patientengruppe	19	274,00	216,47	0,00	0,00	1,84	4,1	II
32C	Patientengruppe	34	605,20	26,39	5,10	0,00	4,33	4,1	I-II
33C	Patientengruppe	39	493,57	8,10	0,00	0,00	0,00	4,1	I-II
RM300	Patientengruppe	34	1109,27	115,65	0,00	0,00	0,00	5,8	III
RM301	Patientengruppe	49	535,42	26,39	0,00	0,00	2,67	4,7	III
RM302	Patientengruppe	30	969,48	121,45	0,00	0,00	3,17	5	III
RM303	Patientengruppe	29	1258,22	66,36	0,00	0,00	2,34	4,7	III
RM304	Patientengruppe	32	282,20	61,90	0,00	0,00	2,17	4,7	III
RM305	Patientengruppe	34	423,72	58,08	0,00	0,00	1,00	5	II-III
RM306	Patientengruppe	31	1226,22	1342,87	24,13	5,38	8,92	5,5	II
RM307	Patientengruppe	24	534,41	23,86	0,00	0,00	0,00	5	II
RM308	Patientengruppe	24	351,21	61,90	0,40	0,00	0,50	5	III
RM309	Patientengruppe	34	161,17	40,31	0,00	0,00	0,50	5	II-III
RM310	Patientengruppe	43	470,04	255,42	20,93	11,78	1,84	5,8	II-III
RM311	Patientengruppe	28	1194,77	333,63	7,72	9,00	0,00	5,8	III
RM312	Patientengruppe	28	604,16	24,49	0,00	0,00	0,50	4,7	III
RM313	Patientengruppe	42	93,74	58,72	9,83	5,81	0,33	5	II-III
RM314	Patientengruppe	41	416,09	413,20	22,00	10,29	2,50	5	II-III
RM315	Patientengruppe	34	44,04	70,82	46,75	11,99	34,51	5	II-III
RM316	Patientengruppe	27	560,77	308,08	0,00	0,00	8,76	4,7	II-III
RM317	Patientengruppe	43	111,75	33,98	5,10	0,00	1,34	5	II-III
RM318	Patientengruppe	31	585,44	296,03	3,53	0,00	0,83	4,7	II-III
RM319	Patientengruppe	36	756,02	49,19	0,00	0,00	0,00	5	III
RM320	Patientengruppe	40	2097,20	183,06	12,46	5,17	0,83	4,9	III
RM321	Patientengruppe	38	438,09	25,76	0,00	0,00	15,22	4,9	II
RM322	Patientengruppe	24	280,38	23,86	6,67	0,00	13,78	4,9	III

7.2. Geräte

3ml-Eimalspritzen	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Pipetten
Pipetten, Filter-Tips PE/PP	Nerbe plus GmbH, Winsen/ Luhe, Deutschland
Pipettenspitzen	SLG
Vortexgerät VF 2	Janke & Kunkel, IKA- Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland
Tischzentrifuge	UniEquip München, deutschland
Vibromix 301 EVT	Tehtnica, A-B Laborsysteme, Greiling, Deutschland
Spektralphotometer, Typ Anthos	Anthos Labtec Instruments, Österreich
Drucker Epson LX400	Epson, Deutschland GmbH Düsseldorf, Deutschland

8. Literaturverzeichnis

1. Kunz J. Causes and consequences of an unbalanced vaginal ecosystem. Schweiz Rundsch Med Prax. 1995; 84:1405-15.
2. Delaney ML, Onderdonk AB. Nugent score related to vaginal culture in pregnant women. Obstet Gynecol. 2001; 98:79-84.
3. Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. Clin Infect Dis. 2001 Feb 15;32:69-77.
4. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. BJOG. 2002;109:34-43.
5. Faro S. Vaginitis: diagnosis and management. Int J Fertil Menopausal Stud. 1996; 41:115-23.
6. Boris S, Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. Microbes Infect. 2000 ; 2:543-6.
7. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiology. 2004 ; 150:2565-73.
8. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Bwayo J, Kreiss J. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. J Infect Dis. 1999 ; 180:1863-8.
9. Friedrich EG Jr. Vaginitis. Am J Obstet Gynecol. 1985; 152:247-51.

10. Boris S, Suarez JE, Vazquez F, Barbes C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun*. 1998; 66:1985-9.
11. Onderdonk AB, Lee ML, Lieberman E, Delaney ML, Tuomala RE. Quantitative microbiologic models for preterm delivery. *J Clin Microbiol*. 2003 ; 41:1073-9.
12. Hay P. Life in the littoral zone: lactobacilli losing the plot. *Sex Transm Infect*. 2005; 81:100-2.
13. Petersen EE. *Infektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe*. Georg Thieme Verlag Stuttgart: New York; 2003.
14. Bayo M, Berlanga M, Agut M. Vaginal microbiota in healthy pregnant women and prenatal screening of group B streptococci (GBS). *Int Microbiol*. 2002; 5:87-90.
15. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, Winter C, Meier A, Stamm WE. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis*. 2000; 30:901-7.
16. Donders GG. Bacterial vaginosis during pregnancy: screen and treat? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999; 83:1-4.
17. Mardh PA. The vaginal ecosystem. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165:1163-8.
18. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol*. 1996; 45:120-6.
19. Rosenstein IJ, Fontaine EA, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Relationship between hydrogen peroxide-producing strains of lactobacilli and vaginosis-associated bacterial species in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997; 16:517-22.

20. Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wolner-Hanssen P, Holmes KK. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis.* 1996; 174:1058-63.
21. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, Holmes KK. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:251-6.
22. Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorff AM. Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis.* 1991; 164:94-100.
23. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis.* 1993; 16 :273-81.
24. Hillier SL, Krohn MA, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet Gynecol.* 1992; 79:369-73.
25. Larsen B, Galask RP. Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. *Ann Intern Med.* 1982; 96:926-30.
26. Hammill HA. Normal vaginal flora in relation to vaginitis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1989; 16:329-36.
27. Larsen B. Vaginal flora in health and disease. *Clin Obstet Gynecol.* 1993; 36:107-21.
28. Newton ER, Piper JM, Shain RN, Perdue ST, Peairs W. Predictors of the vaginal microflora. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184:845-53.
29. Friese K, Schäfer A, Hof H. *Infektionskrankheiten in Gynäkologie und Geburtshilfe.* Springer Verlag Berlin: Heidelberg: New York; 2003.

30. Donders GG, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Vereecken A, Van Bulck B, Spitz B. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182:872-8.
31. Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP, Gibbs RS. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by gram stain among pregnant women. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Am J Obstet Gynecol.* 1992; 166:938-44.
32. Donders GGG, Odds A, Vereecken A, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Salembier G, Spitz B. Abnormal vaginal flora in the first trimester, but not full-blown bacterial vaginosis, is associated with preterm birth. *Prenat Neonat Med.* 1998; 3:588-593.
33. Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ. Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183:252-6.
34. Fichorova RN, Desai PJ, Gibson FC 3rd, Genco CA. Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect Immun.* 2001; 69:5840-8.
35. Crowley-Nowick PA, Ellenberg JH, Vermund SH, Douglas SD, Holland CA, Moscicki AB. Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens. *J Infect Dis.* 2000; 181:939-45.
36. Zara F, Nappi RE, Brerra R, Migliavacca R, Maserati R, Spinillo A. Markers of local immunity in cervico-vaginal secretions of HIV infected women: implications for HIV shedding. *Sex Transm Infect.* 2004; 80:108-12.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Immunologie.* Verlag Hans Huber: Bern Göttingen Toronto Seattle; 1996.
38. Wilson M, Seymour R, Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun.* 1998; 66:2401-9.

39. Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, Svanborg C. Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1993; 61:602-9.
40. Romero R, Durum S, Dinarello CA, Oyarzun E, Hobbins JC, Mitchell MD. Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins*. 1989; 37:13-22.
41. Chouaib S, Chatenoud L, Klatzmann D, Fradelizi D. The mechanism of inhibition of human IL 2 production. PGE2 Induction of Suppressor T Lymphocytes. *J Immunol*. 1984; 132:1851-1857.
42. Chouaib S, Fradelizi D. The mechanism of inhibition of human IL 2 production. *J Immunol*. 1982; 129:2463-8.
43. Steele C, Fidel PL Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2002; 70:577-83.
44. Hay PE, Taylor-Robinson D. Defining bacterial vaginosis: to BV or not to BV, that is the question. *Int J STD AIDS*. 1996; 7:233-5.
45. Donders GG. Microscopy of the bacterial flora on fresh vaginal smears. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1999;7:177-9.
46. Donders GG, Vereecken A, Salembier G, Van Bulck B, Spitz B. Assessment of vaginal lactobacillary flora in wet mount and fresh or delayed gram's stain. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1996; 4: 2-6.
47. Spandorfer SD, Neuer A, Giraldo PC, Rosenwaks Z, Witkin SS. Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. *J Reprod Med*. 2001; 46:806-10.
48. Cauci S, Guaschino S, De Aloysio D, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Quadrifoglio F. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod*. 2003; 9:53-8.

49. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189:1433-8.
50. Platz-Christensen JJ, Mattsby-Baltzer I, Thomsen P, Wiqvist N. Endotoxin and interleukin-1 alpha in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169:1161-6.
51. Mattsby-Baltzer I, Platz-Christensen JJ, Hosseini N, Rosen P. IL-1beta, IL-6, TNFalpha, fetal fibronectin, and endotoxin in the lower genital tract of pregnant women with bacterial vaginosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1998; 77:701-6.
52. McDonald HM, O'Loughlin JA, Jolley PT, Vigneswaran R, McDonald PJ. Changes in vaginal flora during pregnancy and association with preterm birth. *J Infect Dis.* 1994; 170:724-8.
53. Hay P, Lamont RF, Taylor-Robinson D, Morgan DJ, Ison C, Pearson J. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ.* 1994; 308: 295-8.
54. Minkoff H, Grunebaum AN, Schwarz RH, Feldman J, Cummings M, Crombleholme W, Clark L, Pringle G, McCormack WM. Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1984; 150:965-72.
55. Peipert JF, Ness RB, Soper DE, Bass D. Association of lower genital tract inflammation with objective evidence of endometritis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2000;8:83-7.
56. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Li C, Kiwanuka N, Hillier SL, Rabe L, Gaydos CA, Quinn TC, Konde-Lule J. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997. 23;350:546-50.

57. Sturm-Ramirez K, Gaye-Diallo A, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 2000;182:467-73.
58. Poli G, Kinter AL, Fauci AS. Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:108-12.
59. Al-Harthi L, Kovacs A, Coombs RW, Reichelderfer PS, Wright DJ, Cohen MH, Cohn J, Cu-Uvin S, Watts H, Lewis S, Beckner S, Landay A; WHS 001 Study Team. A menstrual cycle pattern for cytokine levels exists in HIV-positive women: implication for HIV vaginal and plasma shedding. *AIDS.* 2001;15:1535-43.
60. Alfano M, Poli G. The cytokine network in HIV infection. *Curr Mol Med.* 2002;2:677-89.
61. Behbakht K, Friedman J, Heimler I, Aroutcheva A, Simoes J, Faro S. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2002;10:181-6.
62. Guijon F, Paraskevas M, Rand F, Heywood E, Brunham R, McNicol P. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obstet.* 1992;37:185-91.
63. Tjiong MY, van der Vange N, ten Schegget JS, Burger MPM, ten Kate FWJ, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine.* 2001;14:357-60.
64. Fichorova RN, Bajpai M, Chandra N, Hsiu JG, Spangler M, Ratnam V, Doncel GF. Interleukin (IL)-1, IL-6, and IL-8 predict mucosal toxicity of vaginal microbicide contraceptives. *Biol Reprod.* 2004;71:761-9.

65. Ozkinay E, Terek MC, Yayci M, Kaiser R, Grob P, Tuncay G. The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections. *BJOG*. 2005;112:234-40.
66. White HD, Yeaman GR, Givan AL, Wira CR. Mucosal immunity in the human female reproductive tract: cytotoxic T lymphocyte function in the cervix and vagina of premenopausal and postmenopausal women. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37:30-8.
67. Fichorova RN, Anderson DJ. Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol Reprod*. 1999; 60:508-14.
68. Svanborg C, Agace W, Hedges S, Linder H, Svensson M. Bacterial adherence and epithelial cell cytokine production. *Zentralbl Bakteri*. 1993;278:359-64.
69. Hedges SR, Agace WW, Svanborg C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol*. 1995; 3:266-70.
70. Anderson DJ. The importance of mucosal immunology to problems in human reproduction. *J Reprod Immunol*. 1996;31:3-19.
71. Doh K, Barton PT, Korneeva I, Perni SC, Bongiovanni AM, Tuttle SL, Skupski DW, Witkin SS. Differential vaginal expression of interleukin-1 system cytokines in the presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2004;12:79-85.
72. Pybus V, Onderdonk AB. Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes Infect*. 1999;1:285-92.
73. Domingue PA, Sadhu K, Costerton JW, Bartlett K, Chow AW. The human vagina: normal flora considered as an in situ tissue-associated, adherent biofilm. *Genitourin Med*. 1991;67:226-31.
74. Priestley CJF, Jones BM, Dhar J, Goodwin L. What is normal vaginal flora? *Genitourin Med*. 1997;73:23-28.

75. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
76. Carson HJ, Lapoint PG, Monif GRG. Interrelationships within the bacterial flora of the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1997;5:303-9.
77. Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis.* 1990;12:856-72.
78. Hillier SL. The vaginal microbial ecosystem and resistance to HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998;14:17-21.
79. Dinarello CA. The role of interleukin-1 in host responses to infectious diseases. *Infect Agents Dis.* 1992;1:227-36.
80. Granowitz EV, Saget BM, Wang MZ, Dinarello CA, Skolnik PR. Interleukin 1 induces HIV-1 expression in chronically infected U1 cells: blockade by interleukin 1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein type 1. *Mol Med.* 1995;1:667-77.
81. Witkin SS. Immunology of recurrent vaginitis. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1987;15:34-7.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. E. R. Weissenbacher für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung und durchgehende Beratung im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Spitzbart danke ich für die fachliche Beratung auf dem Gebiet der Infektiologie und organisatorische Unterstützung.

Frau Dr. G. Anton danke ich für die fachliche Unterstützung und hilfreiche Zusammenarbeit als auch für die Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

LEBENS LAUF

Simona Lucia Moga

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 22 Juni 1980
Geburtsort: Cluj-Napoca (Rumänien)
Adresse: Elektrastr. 5, c/o Buzila
81925 München
Telefon: +49/(0)179/5415087
E-Mail: simonamoga@yahoo.com
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: rumänisch

Schule:

1987-1999 Schülerin des „George Cosbuc“ Gymnasiums in Cluj-Napoca, Mathematik - Physik Abteilung, Unterrichtssprache Deutsch; Abschluß: Abitur
05 / 1999 Erwerb des Deutschen Sprachdiploms der Kulturministerkonferenz der BRD, Stufe 2

Hochschulstudium:

10/1999 – 7/2000 Studium von 2 Semestern der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der „Iuliu Hatieganu“ Universität für Medizin und Pharmazie / Cluj-Napoca
10/2000 – 4/2007 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
8/2002 Ärztliche Vorprüfung
8/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2006 – 3/2007 Praktisches Jahr
Innere Medizin am Hôpital Civil der Universität „Louis Pasteur“, Strasbourg, Frankreich (Prof. Dr. J.-Ch. Weber)
Chirurgie im Krankenhaus München – Schwabing (Prof. Dr. H. Waldner / Dr. Eduard F.J. Höcherl)
Gynäkologie und Geburtshilfe im Kantonsspital Winterthur, Schweiz (Dr. med. Th. Hess)
4/2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

3/2003 Kardiologie, Herzzentrum Cluj-Napoca (Prof. Dr. R. Capalleanu)
9/2003-10/2003 Chirurgie, Chirurgische Klinik I, Cluj-Napoca, (Dr. med. S. Ionescu)
3/2004 Allgemeinmedizin, Praxis, Cluj-Napoca (Dr. med. T. Tudoran)
3/2005-4/2005 Gynäkologie und Geburtshilfe, Frauenklinik vom Roten Kreuz, München (Prof. Dr. W. Eiermann)