

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

**Bestimmung der Zytokine Interleukin-1ra, Interleukin-6, Interleukin-10 und
Interleukin-12 im Vaginalsekret bei Frauen mit Bakterieller Vaginose**

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

vorgelegt von
Claudia Walter
aus
München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. St. Endres

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. habil. H. Spitzbart

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2004

Meiner Mutter und Schwester Alexandra
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	7
1. Einleitung	8
1.2. Problemstellung.....	15
2. Eigene Untersuchungen	16
2.1. Material.....	16
2.2. Patientinnen.....	16
2.2.1. Patientengut.....	16
2.2.2. Vaginalabstriche.....	17
3. Diagnostik	17
3.1. Amintest.....	17
3.2. Reinheitsgrad.....	18
3.3. pH-Wert.....	19
3.4. Clue cells.....	19
3.5. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).....	19
3.5.1. Interleukin-1ra.....	19
3.5.1.1. Reagenzien.....	19
3.5.1.2. Reagenzienvorbereitung.....	20
3.5.1.3. Durchführung.....	21
3.5.1.4. Auswertung der Messergebnisse.....	22

3.5.2.	Interleukin-6 und Interleukin-12.....	23
3.5.2.1.	Reagenzien.....	23
3.5.2.2.	Reagenzienvorbereitung.....	23
3.5.2.3.	Durchführung.....	25
3.5.2.4.	Auswertung der Messergebnisse für IL-6 und IL-12.....	26
3.5.3.	Interleukin-10.....	30
3.5.3.1.	Reagenzien.....	30
3.5.3.2.	Reagenzienvorbereitung.....	31
3.5.3.3.	Durchführung.....	31
3.5.3.4.	Auswertung der Messergebnisse.....	33
3.6.	Statistische Auswertung.....	34
4.	Ergebnisse der Untersuchungen.....	35
4.1.	Zytokinbestimmung mittels Elisa.....	35
4.1.1.	Interleukin- 10.....	35
4.1.2.	Interleukin- 6.....	37
4.1.3.	Interleukin- 12.....	40
4.1.4.	Vergleich der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12.....	41
4.2.	Diagnostische Marker.....	42
4.2.1	Reinheitsgrad.....	42
4.2.2.	Amintest.....	46
4.2.3.	pH-Wert.....	47
4.2.4.	Alter.....	48

5.	Diskussion	49
6.	Zusammenfassung	59
7.	Anhang	61
7.1.	Geräte	61
8.	Literaturverzeichnis	62
	Danksagung	72
	Lebenslauf	73

Abkürzungen

BV	Bakterielle Vaginose
bp	Basenpaare
CMI	Zellvermittelte Immunität
Elisa	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
h-IL	humanes Interleukin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
INF-gamma	Interferon-gamma
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LAK	Lymphokin-aktivierte-Killerzellen
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NK	Natural-Killer-Zellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
pg	Pikogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RHG	Reinheitsgrad
rpm	rounds per minute
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha

1. Einleitung

Vaginaler Ausfluss ist einer der häufigsten Gründe, der Frauen dazu veranlasst, die gynäkologische Praxis aufzusuchen. Als Hauptursache von vermehrtem Fluor vaginalis ist bei Frauen im gebärfähigen Alter neben einer Pilzinfektion [5] und anderen infektiologischen Ursachen das Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose (BV) zu sehen [17,42,45,47,71]. So ist dieses Symptom signifikant mit BV assoziiert [17]. In den USA sind es immerhin mehr als drei Millionen Frauen im Jahr, die an Bakterieller Vaginose erkranken. Man kann also sagen, dass sie neben einer Infektion mit Candida oder Trichomonaden [1], zu den häufigsten Erkrankungen der Vagina [7,57] gehört, und es nicht selten zu rezidivierenden Episoden kommt [38,57]. Bei Frauen, die bereits früher aufgrund einer Bakteriellen Vaginose behandelt wurden, kommt es mit einer fast dreimal höheren Wahrscheinlichkeit zu einem erneuten Auftreten des Krankheitsbildes der BV [47].

Einerseits ist dieses Krankheitsbild charakterisiert durch klinische Symptome, wie gräulich-homogenen Fluor [40,45,57,68,71] und auffallenden fischartigen Geruch [40,45,68,71]. Dieses Symptom kann bei über achtzig Prozent der Patientinnen [19], die an Bakterieller Vaginose leiden, nachgewiesen werden. Auffallend ist außerdem das Fehlen von Leukozyten bei der mikroskopischen Untersuchung [35,45] entzündliche Veränderungen oder Rötungen der Vaginalschleimhaut hingegen sind selten [45]. In der Regel lassen sich keine Zeichen für eine Vaginitis finden [19]. Andererseits gelten auftretende Beschwerden, wie vaginales Brennen, Juckreiz oder auch Dyspareunie als eher untypisch und treten selten auf [19,40].

Bei dem Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose kommt es zu einer Abnahme der Anzahl von aeroben Laktobazillen [23,38,39,45,46,47,57,62,67,68,71], die normalerweise in der gesunden Scheidenflora vorherrschen. Hier ist vor allem der Verlust der Wasserstoffperoxid-(H₂O₂)-produzierenden Laktobazillen [45,68], z.B. *Lactobacillus crispatus*, als eine der hauptsächlich in der vaginalen Normalflora vorkommenden H₂O₂-produzierenden Spezies [3] zu nennen. Solch eine Konstellation ist im Gegensatz dazu bei Patientinnen, die an einer Candida- oder Trichomonaden-Infektion erkrankt sind, nicht erkennbar [45].

Zum anderen kommt es, erst durch die Depopulation der Laktobazillen und die damit fehlende Produktion von Wasserstoffperoxid gefördert [68], zu einem Überwuchern

anderer anaerober und fakultativ anaerober Bakterien [38,65,71]. Hier sind im Besonderen *Gardnerella vaginalis* [23,45,46,57,71], aber auch anaerobe gram-negative Stäbchen, wie *Bacteroides* spp. [23,45,46,57], verwandte Bakterien, wie *Prevotella*, *Porphyromonas* [23,46], und auch *Mycoplasma hominis* [23,45,46] zu erwähnen. Auch *Ureaplasma urealyticum* [23,46] wird gefunden. Ebenso lassen sich *Peptostreptococcus* species [23,57] und *Mobiluncus* spp. [23,29,57] nachweisen.

Von den anaeroben Bakterien werden die Enzyme Aminopeptidase und Decarboxylase, deren Fähigkeit darin liegt, Aminosäuren und andere Verbindungen zu Aminen umzuwandeln [57,67,68], produziert [57,68]. Durch die steigende Anzahl dieser Bakterien, lässt sich eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme feststellen [25,75]. Diese Konstellation ist in Kombination mit der, aufgrund der abnehmenden Zahl von Laktobazillen, gleichzeitig noch hinzukommenden fehlenden Herstellung von Milchsäure ursächlich für den erhöhten vaginalen pH-Wert [67,68] und den extremen Ausfluss, unter dem die Frauen leiden [57,68].

Wurde der pH-Wert beim Geschlechtsverkehr durch männliches Ejakulat alkalisiert, sind Wasserstoffperoxid-produzierende Laktobazillen in der Lage, das Scheidenmilieu wieder anzusäuern und den pH-Wert damit zu senken [45].

Außerdem verursacht die erhöhte Freisetzung der Amine den für die Bakterielle Vaginose typischen fischartigen Geruch [67]. Häufig wird dieser erst durch Zugabe von ein bis zwei Tropfen zehnpromzentiger Kalilauge zu dem gewonnenen Scheidensekret verstärkt [19,45] und somit leichter diagnostiziert.

Es existieren verschiedene Klassifikationen nach denen das Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose eingeteilt bzw. diagnostiziert werden kann.

So kann die Diagnose entweder klinisch (Amsel et al. criteria) [2,19,20], nach mikroskopischen Gesichtspunkten [20], indem der Nachweis so genannter Schlüsselzellen („clue cells“) gelingt [19,71], oder nach kulturellen Kriterien [20] gestellt werden, d.h. es lassen sich BV-assoziierte Bakterien, vor allem *Gardnerella vaginalis* anzüchten. Die Problematik liegt allerdings darin, dass zum einen der Nachweis von clue cells bei Bakterieller Vaginose nicht zwingend ist und zum anderen der alleinige Nachweis von *Gardnerella vaginalis* nicht aussagekräftig ist, da *Gardnerella vaginalis* durchaus in der physiologischen vaginalen Normalflora vorkommen kann [71].

Am häufigsten orientiert man sich an Amsel's Kriterien, welche auch in der Literatur mehrfach beschrieben werden [2,36,38,45,71]. In diesem Fall gilt die Diagnose als bestätigt, wenn drei der folgenden vier Kriterien zutreffen:

- 1, Bei den Patientinnen ist ein dünnflüssiger, homogener Ausfluss feststellbar.
- 2, Nachweis eines pH-Wertes, der größer oder gleich 4.5 beträgt.
- 3, Es liegt ein positiver Amintest vor.
- 4, Der Nachweis von „clue cells“ im Abstrich ist gegeben.

Schlüsselzellen gelten als typischer Befund bei Bakterieller Vaginose. Sie entstehen durch Desquamation vaginaler Epithelzellen verursacht durch bakterielle Zytotoxine. An diese abgeschilferten Epithelzellen heften sich die Bakterien, im besonderen *Gardnerella vaginalis* an und es entstehen die pathognomonischen blau getüpfelten „clue cells“ [57,67].

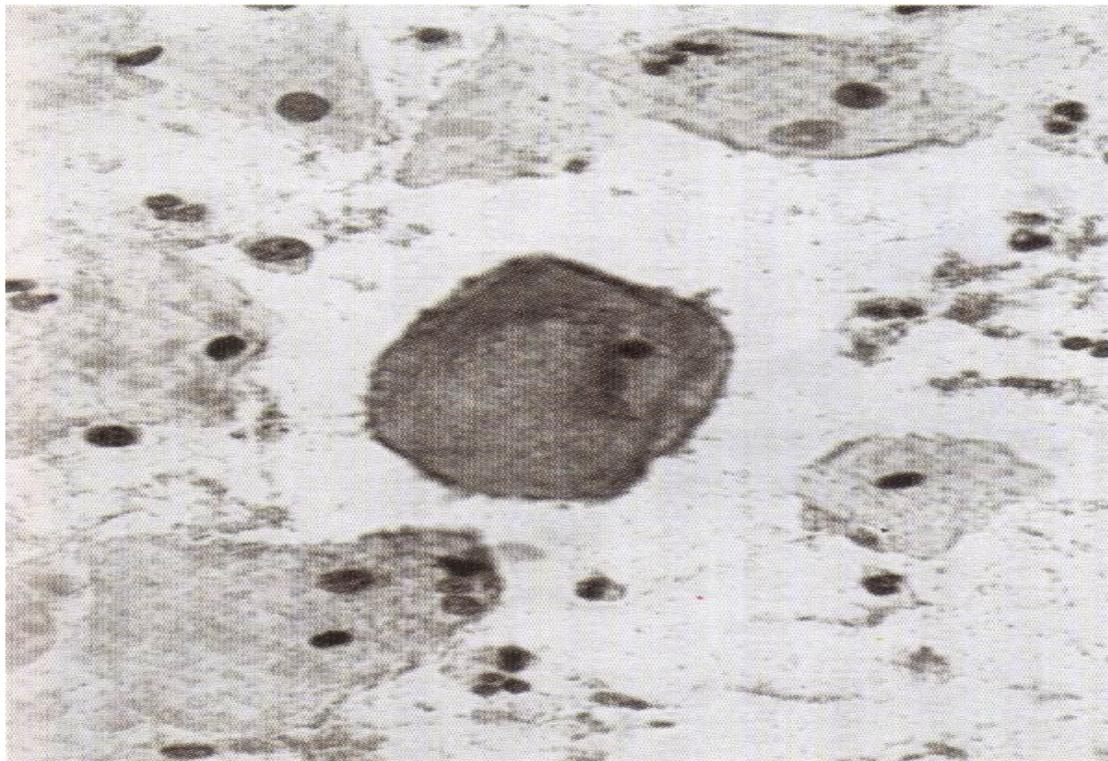


Abbildung 1: eine clue cell, dicht von Bakterien überlagert [72].

Es ließen sich in Studien einige verschiedene Faktoren feststellen, die mit Bakterieller Vaginose assoziiert sein können. So besteht ein signifikanter Zusammenhang mit BV im Besonderen bei Frauen, die ein Intrauterinpeessar verwenden [2,4,46,56]. Häufiger wird dieses Krankheitsbild bei sexuell aktiven Frauen mit einer hohen Anzahl wechselnder Sexualpartner nachgewiesen [2,39,42], es korreliert auch mit einer vorausgegangenen Infektion mit *Trichomonas vaginalis* [2].

Die der Bakteriellen Vaginose zugrunde liegenden Ursachen sind allerdings nicht geklärt [19,23,39,57,66] und werden vielseitig diskutiert. Ein Ansatzpunkt ist die Überlegung, dass die mikrobiologischen Veränderungen den hormonellen Schwankungen während des Menstruationszyklus unterliegen [30,31,38,66,67]. Meist kommt es bei den Frauen kurz nach der Menstruation, wenn der Östradiol-Spiegel erhöht ist, zum Auftreten einer Episode [30,31]. Für diese Theorie spricht auch die Tatsache, dass äußerst selten präpubertäre Mädchen und postmenopausale Frauen an Bakterieller Vaginose erkranken [38]. Oft unterstützen erst andere exogene Faktoren, wie die Einnahme von Antibiotika oder Nikotinabusus die Manifestation der Störung in der vaginalen Mikroflora [39,66,67].

Eine andere Möglichkeit, die in Betracht gezogen werden muss, ist die Überlegung, dass es sich bei der Bakteriellen Vaginose um eine sexuell übertragbare Erkrankung handelt [2,8,12,37,42,48]. Weiterhin wird diskutiert, ob die Bakterielle Vaginose möglicherweise lediglich eine mikrobiologische Fehlbesiedelung der Vagina darstellt [45]. In Erwägung wird auch gezogen, dass eine atypische Mikroflora bei manchen Frauen den genetisch bedingten normalen Status der Scheidenflora darstellt [39].

Die Frage, warum einige Frauen nicht in der Lage sind, diese Bakterien vollständig zu beseitigen beziehungsweise sie auszuschalten oder sie zumindest auf eine Zahl, die zu keiner Pathologie führt, minimieren zu können, bleibt noch zu klären [19]. Es wäre also zu untersuchen, ob eine erhöhte Anfälligkeit aufgrund genetischer Disposition oder eine Veränderung der lokalen Immunantwort in der Scheide vorliegt [19].

Für die Abwehr bakterieller Infektionen ist hauptsächlich die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich. Verschiedene bakterielle Oberflächenantigene können von Makrophagen gebunden werden, wodurch es zur Aktivierung von Phagozyten kommt. Diese beginnen daraufhin, bestimmte pro-inflammatorische Mediatoren und

Zytokine freizusetzen, die dann die Entzündungsreaktion auslösen und die weitere Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen beeinflussen [28,33].

Entscheidend für die T-zelluläre Abwehr sind CD4+ - T-Helferzellen der MHC-Klasse II, die verschieden Zytokine sezernieren [54] und entsprechend in die Subpopulationen vom T_H1- oder T_H2-Typ unterteilt werden können [33]. T_H1- und T_H2-Zellen sezernieren unterschiedliche Typen von Zytokinen, die sich aber zum Teil überschneiden und die ihre unterschiedlichen Aufgaben definieren [28,33]. Auch beeinflussen die Zytokine selbst die Differenzierung der T-Helferstammzellen in Richtung einer T_H1- oder T_H2-Antwort [52,64].

Pro-inflammatorische Zytokine vom T_H1-Typ, wie zum Beispiel Interleukin-2 (IL-2), IL-6 und IL-12, Interferon-gamma (INF-gamma) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) [33,50], fördern die zelluläre Immunität, stimulieren die Stickstoffmonoxid-Produktion [16] und inhibieren zugleich die Zytokine vom T_H2-Typ.

Der Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) gehört neben Interleukin-6 zu den Entzündungsparametern, die im Rahmen einer beginnenden inflammatorischen Reaktion am frühesten gemessen werden können [34].

In dieser Studie wird unter anderem IL-1ra im Vaginalsekret der Patientinnen und der Kontrollgruppe bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein 17 kilo Dalton (kDa) großes Protein [26], das als Monomer [28] vorliegt.

Sezerniert wird dieses Zytokin hauptsächlich von Makrophagen und mononukleären Phagozyten [26,28,33]. IL-1ra liegt in glykosilierter und in nicht glykosilierter Form vor. Beide Formen binden mit der fast gleichen Affinität wie Interleukin (IL)-1 an den IL-1-Rezeptor, ohne ihn allerdings zu aktivieren. Das bedeutet, dass der Vorgang der intrazellulären Signaltransduktion, die sonst durch Bindung von IL-1 an den Rezeptor stattfindet, nicht ausgelöst wird [26,28]. In dieser Funktion spricht man von einem kompetitiven Inhibitor des IL-1 [26,33].

Es wird des weiteren IL-6 im Vaginalsekret nachgewiesen. Bei diesem Zytokin handelt es sich um ein aus 182 Aminosäuren bestehendes monomeres [28] Protein, das 26 kDa groß ist und an den Positionen 73 und 172 glykosiliert ist. Das Gen, das h-IL-6 kodiert, liegt auf Chromosom 7 p 21 – p 14, und enthält fünf Exons.

IL-6 wird nach entsprechender Stimulation durch IL-1, TNF-alpha oder bakterieller Endotoxine von verschiedenen Zelltypen produziert. Neben T- und B-Lymphozyten

sind hauptsächlich Monozyten bzw. Makrophagen, Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen von Bedeutung. IL-6 kann seine eigene Synthese jedoch auch selbst stimulieren. Glucocorticoide hingegen haben eine hemmende Wirkung auf die Produktion von IL-6.

Bei IL-6 handelt es sich um ein pleiotrop wirkendes Zytokin. Es steht einerseits im Zusammenhang mit der antigenspezifischen Immunantwort, andererseits nimmt es auch Einfluss auf die Entzündungsreaktion, indem es als physiologischer Stimulus die Produktion der Akuten-Phase-Proteine in der Leber bewirkt [53].

Es induziert die Differenzierung der B-Zellen und die Aktivierung von T-Zellen und fördert im Zusammenspiel mit IL-2 die Differenzierung von reifen und unreifen T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen.

Der IL-6-Rezeptor wird neben peripheren Monozyten auf T-Zellen und Mitogen-aktivierten B-Zellen exprimiert. Interessant ist, dass er zwar auf ruhenden T-Zellen, nicht aber auf ruhenden B-Zellen exprimiert wird.

Als weiteres pro-inflammatorisches Zytokin wird IL-12 untersucht, welches ebenfalls aus dem Vaginalsekret bestimmt wird. Bei IL-12 handelt es sich um ein 75 kDa heterodimeres Glykoprotein [32] mit einer Länge von 197 und 306 Aminosäuren [28], bestehend aus einer 40 kDa großen Untereinheit und einer kleinen Untereinheit von 35 kDa [69]. Diese beiden glykosilierten Ketten sind über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden, dadurch ist die biologische Aktivität gegeben.

Das Gen, das die p40-Untereinheit des h-IL-12 kodiert, liegt auf Chromosom 5 q 31 – 5 q 33 [69], das Gen für die p35-Kette auf Chromosom 3 p 12 – 3q 13,2 [69].

Produziert wird IL-12 von Monozyten [63] bzw. Makrophagen [28] und peripheren Lymphozyten, allerdings betrifft das fast ausschließlich B-Zellen, denn von T-Zellen wird es nicht sezerniert [26,63]. Durch entsprechenden Zelloberflächenkontakt als Antwort auf eine bakterielle Infektion wird die IL-12-Produktion induziert, zusätzlich dazu findet eine Regulation durch andere Mediatoren, wie IL-10 und Prostaglandin E₂ (PGE₂) statt [63].

IL-12 ist ein zentraler Bestandteil bei der Aktivierung der zellulären Immunantwort und Entzündungsreaktion [63]. Es induziert die Proliferation humaner Lymphoblasten [26] als auch die Proliferation und zytotoxische Aktivität von Natural Killer (NK)-Zellen [26,28,32,69]. Zusammen mit Interleukin-2 hat IL-12 einen synergistischen Effekt und fördert die Produktion so genannter Lymphokin-aktivierter Killer-Zellen (LAK-Zellen) [26]. IL-12 selbst bewirkt die Synthese von IFN-gamma in peripheren

Lymphozyten [26]. Im Zusammenwirken mit IFN-gamma wird erreicht, dass die Entwicklung von stimulierten CD4-T-Zellen vor allem in Richtung T_H1-Zellen läuft [28], und es im Weiteren zur Differenzierung von T_H1-Zellen kommt.

Außerdem fördert es die Expression der β 2-Untereinheit des IL-12-Rezeptors (IL-12R), welche selektiv auf T_H1-Zellen exprimiert wird [52]. Dagegen wird IL-12R β 1 auf T_H1- und T_H2-Zellen in gleicher Weise exprimiert. [52,64] Interessant ist auch, dass IFN-gamma ebenso die Expression von IL-12R β 2 induziert, während IL-4 die Expression von IL-12R β 2 hemmt [64].

Im Ausgleich zu den pro-inflammatorischen Zytokinen vom T_H1-Typ liegen auch so genannte anti-inflammatorische Zytokine, die von den T_H2-Zellen sezerniert werden, vor. Sie funktionieren als Inhibitoren der pro-inflammatorischen Zytokine. Zu dieser Gruppe werden beispielsweise die Zytokine IL-4, IL-5, und IL-10 [50], welche B-Zellen aktivieren [28], gezählt.

IL-10, das auch in unserer Studie untersucht wird, liegt als ein 160 Aminosäuren langes, nicht kovalent-gebundenes Homodimer vor und hat eine Größe von 35 kDa [13,26,28,61]. Das Gen, das humanes IL-10 codiert, enthält vier Exons [26].

Es wirkt als ein Hauptmediator in der Suppression der Immunantwort und ist somit bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen von Bedeutung [18]. IL-10 inhibiert als anti-inflammatorisches Zytokin die Synthese der Zytokine der T_H1-Antwort, unter anderem IFN-gamma [26,53]. IFN-gamma ist hauptsächlich für die Aktivierung der Makrophagen verantwortlich, bei einem Fehlen kommt es zur Hemmung der zellvermittelten Immunität [28,58]. Außerdem induziert IL-10 bei B-Zellen die Antikörperproduktion und einen Anstieg der MHC-Klasse II [28]. Ein co-stimulierender Effekt wird ihm bei der Proliferation von Mastzellen zugeschrieben [26].

1.2. Problemstellung

Das Ziel unserer experimentellen Studie ist es, neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel des Krankheitsbildes der Bakteriellen Vaginose und der lokalen vaginalen Immunität zu gewinnen.

Da die Scheide als immunkompetentes Organ angesehen werden kann, soll die Rolle der lokalen Immunität der Vagina durch Messung von T_H1- und T_H2-spezifischer Zytokine mittels Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (Elisa) genauer geklärt werden. Um zu verdeutlichen, ob bei Bakterieller Vaginose Veränderungen der lokalen zellvermittelten Immunität vorliegen, bestimmen wir in unserer Studie im Hinblick auf mögliche neue diagnostische und therapeutische Ansätze daher die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-12 sowie das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin-10 im Vaginalsekret.

In diesem Zusammenhang untersuchten wir 45 symptomatische Patientinnen der „Mikrobiologischen Spezialsprechstunde“ im Klinikum Großhadern der Universität München und 36 asymptomatische Frauen, die als Kontrollgruppe dienen.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Material

Von Biosource Europe S.A., 1400 Nivelles, Belgien wurden die für den Elisa des Zytokins IL-1ra notwendigen Materialien bezogen.

Während die Materialien zur Bestimmung der Zytokine IL-6, IL-10 und IL-12 von Biosource International, Inc., Camarillo, Californien 93012 USA, stammten.

Als das für die Verdünnungen nötige destillierte Wasser wurde Ampuwa für Spülzwecke von 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

Im Rahmen der mikrobiologischen Sprechstunde des Klinikum Großhadern wurden 58 Patientinnen mit dem vorrangigen Beschwerdebild des wässrigen Fluors verbunden mit fischartigem Geruch untersucht. Manche Patientinnen klagten auch über Brennen oder vaginalen Juckreiz. Bei 45 dieser Patientinnen wurde die Diagnose Bakterielle Vaginose gestellt. Um in unsere Testreihe aufgenommen zu werden, mussten drei der folgenden Einschlusskriterien zutreffen, das Symptom des vaginalen Fluors, fischartiger Geruch - häufig erst verifiziert durch den Amintest, Bestimmung eines Reinheitsgrades II, II – III oder III, ein pH-Wert größer oder gleich 4.5 oder der Nachweis von clue cells. Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit Bakterieller Vaginose lag bei 30,0 Jahren (Alter 19 – 47 Jahre).

Als Kontrollgruppe wurden 36 asymptomatische Frauen ohne das Bild einer Bakteriellen Vaginose ausgewählt. Diese kamen meist zur Routinekontrolle in die

Sprechstunde, ohne ein Beschwerdebild. Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe lag bei 33.7 Jahren (Alter 16 – 58 Jahre).

Patientinnen, bei denen eine andere Infektionskrankheit, wie Trichomonaden, Chlamydien oder Gonorrhö nachgewiesen wurde oder die an einer Candidainfektion litten, wurden von den Untersuchungen unsere Studie betreffend 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 mit derselben Spritze wieder aufgesogen und noch am selben Tag wie folgt weiter verarbeitet: 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 rounds per minute (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° Celsius 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. Amintest

Hierbei wurden dem Scheidensekret ein bis zwei Tropfen einer gebrauchsfertigen zehnprozentigen Kalilauge zugegeben. Dadurch konnte man bei Verdacht auf

Bakterielle Vaginose, den hierfür typischen fischartigen Geruch verstärken bzw. verifizieren. Als Synonym wird auch die Bezeichnung KOH-Probe verwendet.

3.2. Reinheitsgrad

Der Reinheitsgrad gibt Auskunft über den unterschiedlichen Erreger- und Zellgehalt des Scheidensekrets. Dazu erfolgt die mikroskopische Untersuchung des Nativpräparates.

Für die Einteilung des Reinheitsgrades (RHG) im Nativpräparat existiert folgendes Schema:

RHG 0	„Leeres Bild“: ausschließlich Epithelzellen, keine oder wenig Mikroorganismen, wie z.B. nach Zytostase oder vaginaler Chemotherapie
RHG I	„Reine“ Döderlein-Flora: zahlreiche Döderleinstäbchen, keine Bakterien
RHG II	Mischflora: wenig Döderleinstäbchen, überwiegend Bakterien, Leukozyten
RHG III	„Reine“ Bakterien-Flora: keine Döderleinstäbchen, massenhaft Bakterien und Leukozyten

Da oft Zwischenbefunde vorliegen und eine exakte Zuteilung zu einem Grad nicht möglich ist, gibt es die entsprechenden Einteilungen: RHG I bis II, II bis III [72], die auch von uns zur Beschreibung des Reinheitsgrades verwendet wurden.

3.3. pH-Wert

Um den pH-Wert zu bestimmen, verwendeten wir als einfache und preiswerte Methode pH-Streifen. Diese wurden in den Fluor vaginalis kurz eingetaucht und so konnte der pH-Wert sofort abgelesen werden.

3.4. Clue cells

Typisch für die Bakterielle Vaginose sind so genannte, auch als Schlüsselzellen bezeichnete, clue cells. Hierbei handelt es sich um Scheidenepithelien, denen dicht Bakterien aufgelagert sind.

Für den Nachweis dieser Schlüsselzellen wurde einem Tropfen des Scheidensekrets, der auf einem Objektträger alkoholfixiert wurde, ein Tropfen einer 1-prozentigen Methylenblau-Lösung zugegeben. Anschließend konnte bei der mikroskopischen Untersuchung bereits mit einem 40-fachen Objektiv die bakterielle Besiedelung beurteilt werden.

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

3.5.1. Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist

3.5.1.1. Reagenzien

Die benötigten Materialien wurden von BioSource Europe S.A., 1400 Nivelles, Belgien, geliefert (Cytoscreen Kit # KAC 1182).

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

- Humanes Interleukin (h-IL) – 1ra Standard
- Puffer zur Verdünnung des Standards
- Anti-h-IL-1ra-Antikörper-beschichtete Reaktionsgefäße

- Anti-h-IL-1ra-Biotin Konjugat
- Inkubationspuffer
- 100-fach konzentrierte Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25 x)
- Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen
- Halterahmen

3.5.1.2. Reagenzienvorbereitung

Humanes IL-1ra Standard

Hierbei wurde der Standard in einer Standardverdünnungslösung zu 10000 pg/ml aufgelöst. Um eine komplette Auflösung zu gewährleisten, ließ man die Lösung für zehn Minute ruhen. Indem 0.200 ml dieser Verdünnung zu 0.800 ml des Standardverdünnungspuffers gegeben wurden, erhielt man eine Standardkonzentration von 2000 pg/ml. Nun erfolgte die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe nach folgendem Schema: Durch Mischung von jeweils 400 µl der vorangehenden Standardkonzentration mit 400 µl des Standardverdünnungspuffers erhielt man eine Verdünnungsreihe mit folgende Konzentrationen: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml und 31.3 pg/ml.

Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung

Abhängig von der Anzahl der Streifen, die man benötigte, wurde die Streptavidinlösung vorbereitet. So wurden pro Streifen mit je acht Vertiefungen 10 µl der 100-fach konzentrierten Streptavidin-Peroxidase mit 1 ml der Streptavidin-HRP-Verdünnung gemischt. Bei einer benötigten Anzahl von fünf Streifen, d.h. vierzig Vertiefungen benötigte man 50 µl der Streptavidin-Peroxidase vermengt in 5 ml der Streptavidin-HRP-Verdünnung.

Gepufferte Waschlösung

Die Herstellung erfolgte durch Verdünnen von 100 ml des Waschpufferkonzentrates in 2400 ml destillierten Wassers.

Alle weiteren Reagenzien wurden gebrauchsfertig geliefert.

3.5.1.3. Durchführung

Als erstes wurden die benötigte Anzahl von Reihen mit je acht Mikroküvetten zum Ansatz von Standard, Kontrollen und Patientenproben vorbereitet und in den passenden Halterahmen gegeben.

Nachdem in jede Vertiefung für Standard, Kontrolle und Patientenproben 100 µl des Inkubationspuffers pipettiert worden waren, wurden je 100 µl des Standards, der Kontrollen bzw. der Patientenproben hinzugefügt. Man begann mit der Standardverdünnungsreihe, ausgehend von der Standardkonzentration mit 2000 pg/ml. Um eine Standardkonzentration von 0 pg/ml zu erreichen, wurden in die Mikroküvette zu den 100 µl des Inkubationspuffers lediglich 100 µl des Standardverdünnungspuffers einpipettiert.

Im nächsten Schritt waren 50 µl der Ligand-markierten Anti-IL-1ra-Antikörperlösung hinzu zu geben. Nach diesem Vorgang musste die Mikrotiterplatte zur Verhinderung von Unreinheiten mit einer Abdeckfolie abgeklebt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden.

Daraufhin wurden die nicht gebundenen Antikörper durch viermaliges Wiederholen des Waschvorgangs entfernt. Dazu erfolgte ein Einpipettieren von 400 µl des Waschpuffers in jede Vertiefung, um anschließend wieder abpipettiert zu werden. Nach dem vierten Waschvorgang wurde die Mikrotiterplatte sanft auf weichem, saugfähigem Fließpapier ausgeklopft, um eventuelle Rückstände der Waschlösung zu entfernen.

Anschließend wurden je 100 µl der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung zu gegeben. Diese Lösung enthielt das für die Farbreaktion ursächliche Enzym Streptavidin-Peroxidase. Nun war eine erneute Inkubationszeit von sechzig Minuten bei Raumtemperatur einzuhalten. Danach erfolgte wieder ein viermaliges Waschen der Mikrotiterplatte, bevor in jede Vertiefung 100 µl der Tetramethylbenzidin-

Substratlösung pipettiert wurden, wodurch es zu der gewollten Blaufärbung kam. Bei der dreißigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur war darauf zu achten, die Mikrotiterplatte ins Dunkle zu stellen, da der Farbstoff lichtempfindlich ist und es sonst zu einer Verfälschung der Reaktion gekommen wäre.

Um die Farbreaktion zu beenden, waren 100 µl der Stopplösung hinzu zu geben. Das musste allerdings bereits nach 15 Minuten erfolgen, um eine zu intensive Farbreaktion zu verhindern, welche dann vom Spektralphotometer nicht mehr gelesen werden konnte. Durch die Zugabe der Stopplösung erreichte man einen Farbumschlag nach Gelb.

Innerhalb einer Stunde, nachdem die Stopplösung zugegeben worden war, wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte (OD) sowohl des Standards als auch der Kontrollen und Proben gegen TMB und die Stopplösung (je 100 µl/Mikroküvette) gemessen.

3.5.1.4. Auswertung der Messergebnisse

Sowohl bei Proben von Patientinnen als auch bei Proben der Kontrollgruppe konnte vom Spektralphotometer keine optische Dichte ermittelt werden.

Das von uns verwendete Gerät misst in einem Bereich bis zu einer Wellenlänge von 602 nm. Den Angaben des Herstellers zufolge waren die OD des Standards und der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm zu messen. Insofern kann man davon ausgehen, dass es sich nicht um einen Messfehler handelt.

Daraufhin wurde die Untersuchung mit einem neu bestellten Kit durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich um produktionsbedingte fehlerhafte Reagenzien handelt. Doch es stellte sich dieselbe Problematik dar. Es wurde versucht, durch Verdünnen der Proben, ein verwertbares Ergebnis zu erlangen. Doch auch die Verdünnungsschritte von 1:10, 1:500, 1:1000, 1:2000 und schließlich bis zu 1:5000 zeigten keine messbaren Ergebnisse. Insofern waren die Ergebnisse der IL-1ra-Messungen nicht zu verwerten und können auch im Weiteren nicht in unserer Studie verwendet werden.

3.5.2. Interleukin-6 und Interleukin-12

3.5.2.1. Reagenzien

Die für den Nachweis von IL-6, IL-10 und IL-12 verwendeten Materialien wurden alle bei BioSource International, Inc., Camarillo, Californien 93012 USA, bestellt (Immunoassay Kit # KHC 0062, # KHC 0102 und # KHC 0122).

Bei allen drei Interleukinbestimmungen wurde der 25-fach konzentrierte Waschpuffer in Ampuwa für Spülzwecke, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland verdünnt.

- Humanes Interleukin-6 (h-IL-6) bzw. h-IL-12 Standard
- Puffer zur Verdünnung des Standards
- h-IL-6 bzw. h-IL-12 Antikörper-beschichtete Mikroküvetten
- h-IL-6 bzw. h-IL-12 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

3.5.2.2. Reagenzienvorbereitung

Da sich die Herstellung des Humanen Standards für IL-6, IL-12 und IL-10 in einzelnen Schritten unterscheidet, erfolgt jeweils zugehörig eine exakte Beschreibung.

Humanes IL-6 Standard

Zuerst wurde der Standard zu 2500 pg/ml in der gepufferten Standardlösung verdünnt. Hierzu war eine Ruhezeit von zehn Minuten einzuhalten, damit sich der Standard vollkommen in der Standardlösung zersetzen konnte. Um eine

Standardkonzentration von 500 pg/ml zu erreichen, wurden 0.200 ml des nun aufgelösten Standards in 0.800 ml der Pufferlösung gegeben. Zur Herstellung einer Standardverdünnungsreihe wurden jeweils 0.300 ml der vorhergehenden Standardkonzentration in 0.300 ml der Pufferlösung pipettiert. So erhielt man nach mehrmaligem Wiederholen dieses Schrittes Standardlösungen 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.

Humanes IL-12 Standard

Um eine Standardvergleichsreihe herzustellen, wurde als erstes der Standard zu einer Konzentration von 5000 pg/ml in der Standardverdünnungslösung verdünnt, dazu ließ man die Lösung zehn Minuten ruhen. Als nächsten Schritt waren 0.100 ml dieses Standards in 0.900 ml der Standardverdünnung zu geben. Die so erhaltene Standardkonzentration enthielt dann 500 pg/ml humanes Interleukin-12. Um eine Verdünnungsreihe zu erhalten, wurden, ausgehend von dem Standard mit der Konzentration von 500 pg/ml, je 0.200 ml der vorangehenden Standardverdünnung in 0.200 ml der Standardverdünnungslösung gegeben. Die so hergestellten Standardkonzentrationen betragen 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.

Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung (IL-6, IL-12 und IL-10)

Die Vorbereitung der Verdünnungslösung erfolgte für IL-6, IL-12 und IL-10 analog. Aus diesem Grund wird nur einmal die genaue Vorgehensweise beschrieben.

Hierzu wurden pro Reihe zu je acht Vertiefungen 10 µl der 100-fach konzentrierten Streptavidin-Peroxidase in 1 ml der Streptavidin-Lösung verdünnt. Bei einer benötigten Anzahl von fünf Streifen, d.h. vierzig Vertiefungen benötigte man 50 µl der Streptavidin-Peroxidase vermengt in 5 ml der Streptavidin-HRP-Verdünnung.

Gepufferte Waschlösung (IL-6, IL-12 und IL-10)

Die Herstellung der Waschlösung von IL-6 entsprach der für IL-12 und IL-10. Daher wird dort auf eine Beschreibung verzichtet.

Durch Verdünnung von einem Teil des 25-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.

3.5.2.3. Durchführung

In der Durchführung unterscheiden sich IL-6 und IL-12 in einzelnen Mengenangaben, daher erfolgt in diesem Fall eine gesonderte detaillierte Angabe.

Zuerst wurden je 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 Standardkonzentration von 500 pg/ml wurden in die acht Vertiefungen des ersten Streifens für IL-6 je 100 µl und für IL-12 je 50 µl der Standardverdünnungsreihe einpipettiert. In die Mikroküvette, die eine Standardkonzentration von 0 pg/ml enthalten sollte, war ausschließlich die Standardpufferlösung zu geben. In die weiteren Mikroküvetten mussten für IL-6 je 100 µl und für IL-12 je 50 µl der Kontrollen und der Patientenproben gegeben werden.

Nachdem in jede Vertiefung 50 µl Ligand-markierte–Anti-IL-6-Antikörper bzw. 100 µl des Biotin-bindenden humanen Interleukin-12 hinzu pipettiert worden waren, wurde die Mikrotiterplatte mit einem Klebestreifen abgedeckt, um zu verhindern, dass es zu Verunreinigungen kommt. Es folgte eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubationszeit waren die nicht gebundenen Antikörper in jeder Mikroküvette auszuwaschen, 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 ausklopft.

Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung in jede einzelne Küvette. Streptavidin-Peroxidase ist das für den späteren Farbumschlag verantwortliche Enzym. Nach jetzt dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte nochmals, wie bereits vorhin beschrieben, viermal gewaschen. Durch die Zugabe von je 100 µl der Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB) begann der gewünschte Farbumschlag ins Blaue. Die Mikrotiterplatte wurde für weitere dreißig Minuten inkubiert, dieses Mal war allerdings darauf zu achten, die Platte ins Dunkle zu stellen, da das TMB lichtempfindlich ist und somit die Messung nicht korrekt gewesen wäre.

Zur Beendigung der Farbreaktion wurden bereits nach zwanzig Minuten 100 µl der Stopplösung hinzu pipettiert, und damit zugleich 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 Gerätes nicht mehr gelesen werden und es käme zu nicht-verwertbaren Ergebnissen. Durch die Zugabe der Stopplösung erfolgte ein Farbumschlag von Blau nach Gelb.

Mit dem Spektralphotometer konnte abschließend innerhalb eines Zeitrahmens von zwei Stunden bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte des Standards und der Patientenproben gegen TMB und die Stopplösung (je 100 µl/Mikroküvette) ermittelt werden.

3.5.2.4. Auswertung der Messergebnisse für IL-6 und IL-12

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte für Interleukin-6, Interleukin-10 als auch für Interleukin-12 nach demselben Schema. Aus diesem Grund wird nur einmal die genaue Durchführung zur Berechnung der Konzentrationen beschrieben. Für IL-10 und IL-12 werden dann nur die entsprechenden Standardkurven gezeigt. Ebenso gilt die Bezeichnung der Spalten für das Beispiel eines Eingabefensters von Standardkonzentration und OD in das Computerprogramm SPSS für IL-10 und IL-12 analog.

Mittels der Computerprogramme SPSS und 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 Konzentration der Standardverdünnungsreihe, nämlich 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml und 0 pg/ml, und die ihnen entsprechende optisch Dichte, die mittels Spektralphotometer ermittelt worden war, in SPSS eingegeben. Dadurch wurde ein Mittelwert der Optischen Dichte (OD) im Vergleich zur gemessenen OD errechnet (Tab.1).

Interleukin-6

1	2	3	4	5	6
konz	dichte	fit_1	err_1	lcl_1	ucl_1
0,00	0,053	0,03369	0,01931	-0,01600	0,08339
7,80	0,064	0,07159	-0,00759	0,02414	0,11903
15,60	0,098	0,10812	-0,01012	0,06197	0,15426
31,20	0,163	0,17724	-0,01424	0,13151	0,22297
62,50	0,314	0,30094	0,01306	0,25213	0,34975
125,00	0,496	0,49539	0,00061	0,44316	0,54762
250,00	0,731	0,73215	-0,00115	0,67347	0,79083
500,00	1,061	1,06089	0,00011	1,00174	1,12003

Tabelle 1: Eingabe von Standardkonzentrationen und OD für IL-6 in das Computerprogramm SPSS.

- Spalte 1: Konzentrationen der Standardkurve in pg/ml
- Spalte 2: Photometrisch gemessene optische Dichte in nm
- Spalte 3: Mittels SPSS errechneter Wert
- Spalte 4: Abweichung vom tatsächlich gemessenen Wert
- Spalte 5: Untergrenze des Konfidenzintervalls
- Spalte 6: Obergrenze des Konfidenzintervalls

Nachdem man die gemessene optische Dichte als abhängige Variable und die Konzentration als unabhängige Variable zugeordnet hatte und für die Kurvenanpassung ein kubisches Modell ausgewählt worden war, erhielt man schließlich die Standardkurve. Zur Veranschaulichung wird eine Standardkurve für IL-6 gezeigt (Abb.2).

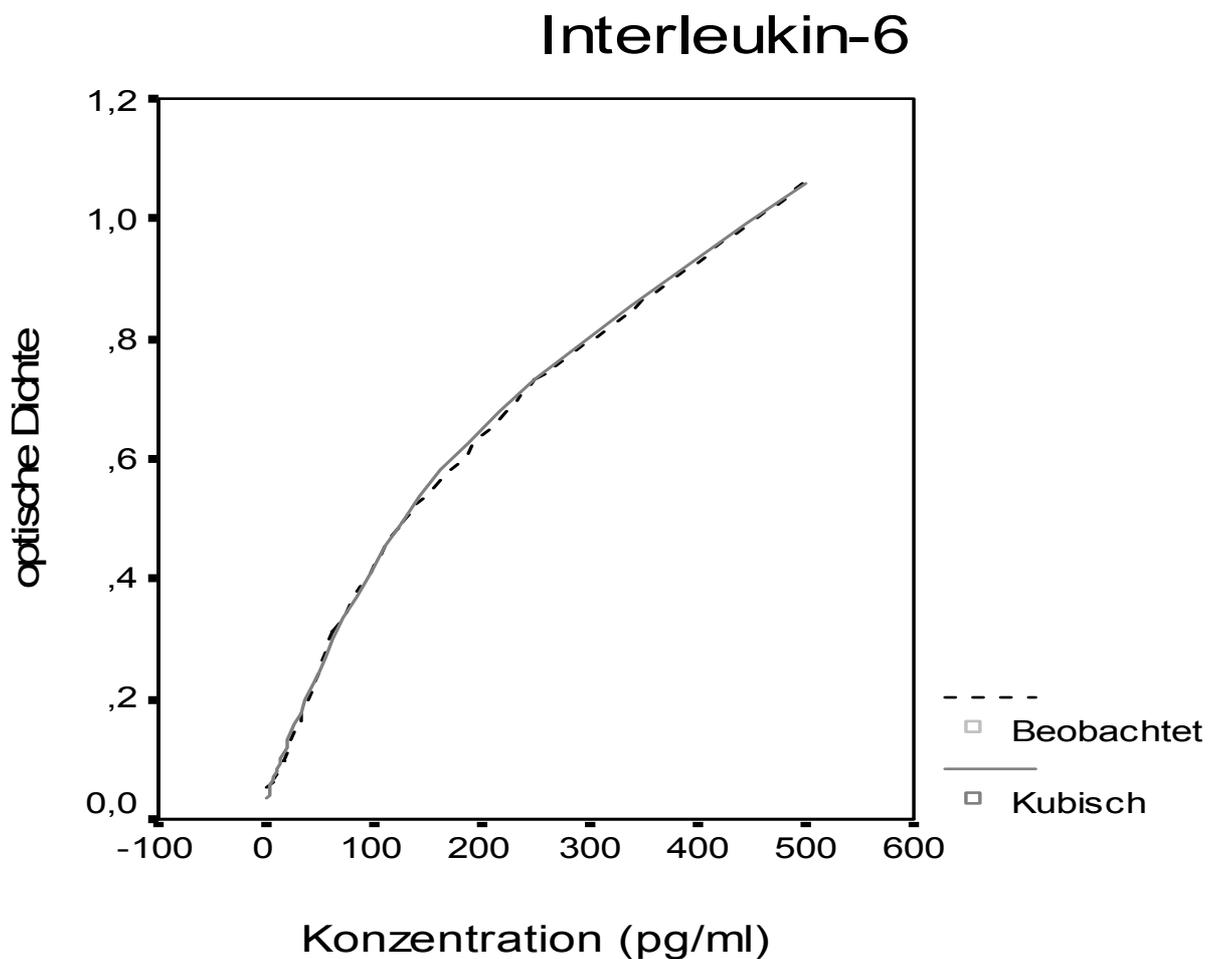


Abbildung 2: Im Computerprogramm SPSS erstellte Standardkurve für IL-6.

Die errechneten drei Variablen und die Konstante waren dann in das Computerprogramm Excel zu übertragen, dadurch war es dann möglich, zu jeder zuvor photometrisch gemessenen optischen Dichte die jeweils zugehörige Konzentration in pg/ml abzulesen.

Interleukin-12

1	2	3	4	5	6
konz	dichte	fit_1	err_1	lcl_1	ucl_1
0,00	0,044	0,04034	0,00366	0,01053	0,07014
7,80	0,065	0,07095	-0,00595	0,04249	0,09940
15,60	0,108	0,10148	0,00652	0,07381	0,12916
31,20	0,163	0,16229	0,00071	0,13487	0,18972
62,50	0,271	0,28308	-0,01208	0,25381	0,31236
125,00	0,527	0,51784	0,00916	0,48652	0,54916
250,00	0,947	0,94917	-0,00217	0,91398	0,98436
500,00	1,560	1,55985	0,00015	1,52438	1,59532

Tabelle 2: Eingabe von Standardkonzentrationen und OD für IL-12 in das Computerprogramm SPSS.

Interleukin-12

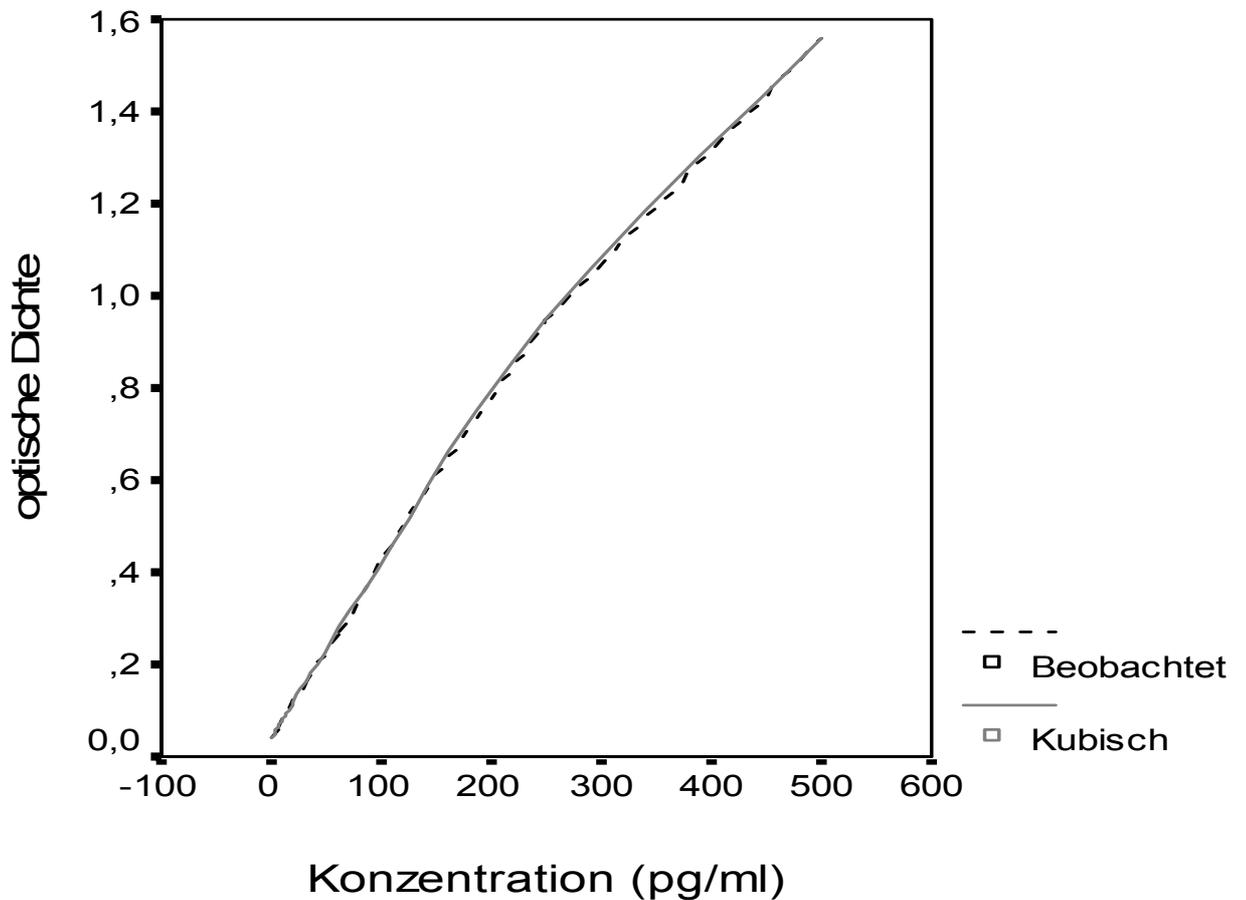


Abbildung 3: Im Computerprogramm SPSS erstellte Standardkurve für IL-12.

3.5.3. Interleukin-10

3.5.3.1. Reagenzien

- Humanes Interleukin-10 (h-IL-10) Standard
- Puffer zur Verdünnung des Standards
- Inkubationspuffer
- h-IL-10 Antikörper-beschichtete Mikroküvetten
- h-IL-10 Biotin Konjugat
- 100-fach konzentrierte Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase (HRP)

- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25 x)
- Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB), stabilisiertes Chromogen
- Stopplösung
- Abdeckstreifen
- Halterahmen

3.5.3.2. Reagenzienvorbereitung

Humanes IL-10 Standard

Zunächst wurde der Standard in dem Standardpuffer zu 5000 pg/ml verdünnt, nach einer Wartezeit von zehn Minuten war eine gänzliche Auflösung zu erwarten. Anschließend wurden 0.050 ml des so gewonnenen Standards in 0.450 ml der gepufferten Standardverdünnungslösung gegeben, um eine Standardkonzentration von 500 pg/ml zu erhalten. Zur Herstellung der Standardverdünnungsreihe wurden jeweils 0.200 ml der vorher gewonnenen Standardkonzentration zu 0.200 ml der Standardverdünnungslösung hinzugefügt. Nach mehrmaligem Wiederholen dieses Schrittes erhielt man 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.

Alle weiteren Reagenzien wurden gebrauchsfertig geliefert.

3.5.3.3. Durchführung

Nachdem die Mikroküvetten entsprechend der Anzahl von Standard, Kontrolle und Proben vorbereitet und in einem Halterahmen befestigt worden waren, mussten je 50 µl der Standardverdünnungsreihe, beginnend mit der höchsten Standardkonzentration von 500 pg/ml, der Kontrolle und der Patientenproben in die dazugehörige Mikroküvette pipettiert werden. Für die Konzentration von 0 pg/ml wurden 50 µl ausschließlich der Standardverdünnungslösung in die entsprechende Küvette gegeben und im Anschluss 50 µl des Inkubationspuffers hinzugefügt. Um während der zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur Verunreinigungen

des Standards und der Patientenproben zu vermeiden, war die Mikrotiterplatte mit einem Klebestreifen abzudecken.

Nach der Inkubationszeit wurden die Mikroküvetten ausgewaschen, indem in die einzelnen Vertiefungen jeweils 400 µl der zuvor hergestellten gepufferten Waschlösung einpipettiert und im Folgenden wieder vollständig abpipettiert wurden. Dieser Vorgang war viermal zu wiederholen, um danach die Platte auf einem weichen und saugfähigen Fließpapier auszuklopfen, und somit eventuell zurückgebliebene Reste der Waschlösung zu entfernen.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden in jede Mikroküvette 100 µl des Biotin Konjugates zugefügt. Im Anschluss war die Platte wieder abzudecken und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur zu inkubieren.

Es folgte wiederum viermalig der bereits oben beschriebene Waschvorgang, um die nicht gebunden, freien Antikörper zu entfernen.

Anschließend waren 100 µl der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung, die das für den späteren Farbumschlag ausschlaggebende Enzym enthielt, hinzu zu geben. Nach diesem Vorgang war eine Inkubationszeit von dreißig Minuten bei Raumtemperatur einzuhalten. Erneut wurde die Mikrotiterplatte viermal gewaschen, bevor in jede Vertiefung 100 µl der Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB) eingefüllt wurden, wodurch es zu einer Blaufärbung kam. Für die erneute Inkubationszeit von dreißig Minuten bei Raumtemperatur war zu beachten, dass dies im Dunkeln geschah, denn TMB ist äußerst lichtempfindlich.

Um die Reaktion abubrechen und zu verhindern, dass die optische Dichte zu hoch wird, wurden nach 25 Minuten 100 µl der Stopplösung hinzugefügt, wodurch es zu einem Farbumschlag nach Gelb kam.

Innerhalb von zwei Stunden nach Zugabe der Stopplösung wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte sowohl des Standards als auch der Proben gegen TMB und die Stopplösung (je 100 µl/Mikroküvette) gemessen.

3.5.3.4. Auswertung der Messergebnisse

Interleukin-10

1	2	3	4	5	6
konz	dichte	fit_1	err_1	lcl_1	ucl_1
0,00	0,023	0,00798	0,01502	-0,04426	0,06022
7,80	0,051	0,04628	0,00472	-0,00359	0,09615
15,60	0,076	0,08422	-0,00822	0,03571	0,13272
31,20	0,143	0,15900	-0,01600	0,11093	0,20707
62,50	0,296	0,30471	-0,00871	0,25341	0,35601
125,00	0,597	0,57891	0,01809	0,52401	0,63380
250,00	1,059	1,06431	-0,00531	1,00263	1,12599
500,00	1,816	1,81560	0,00040	1,75342	1,87777

Tabelle 3: Eingabe von Standardkonzentrationen und OD für IL-10 in das Computerprogramm SPSS.

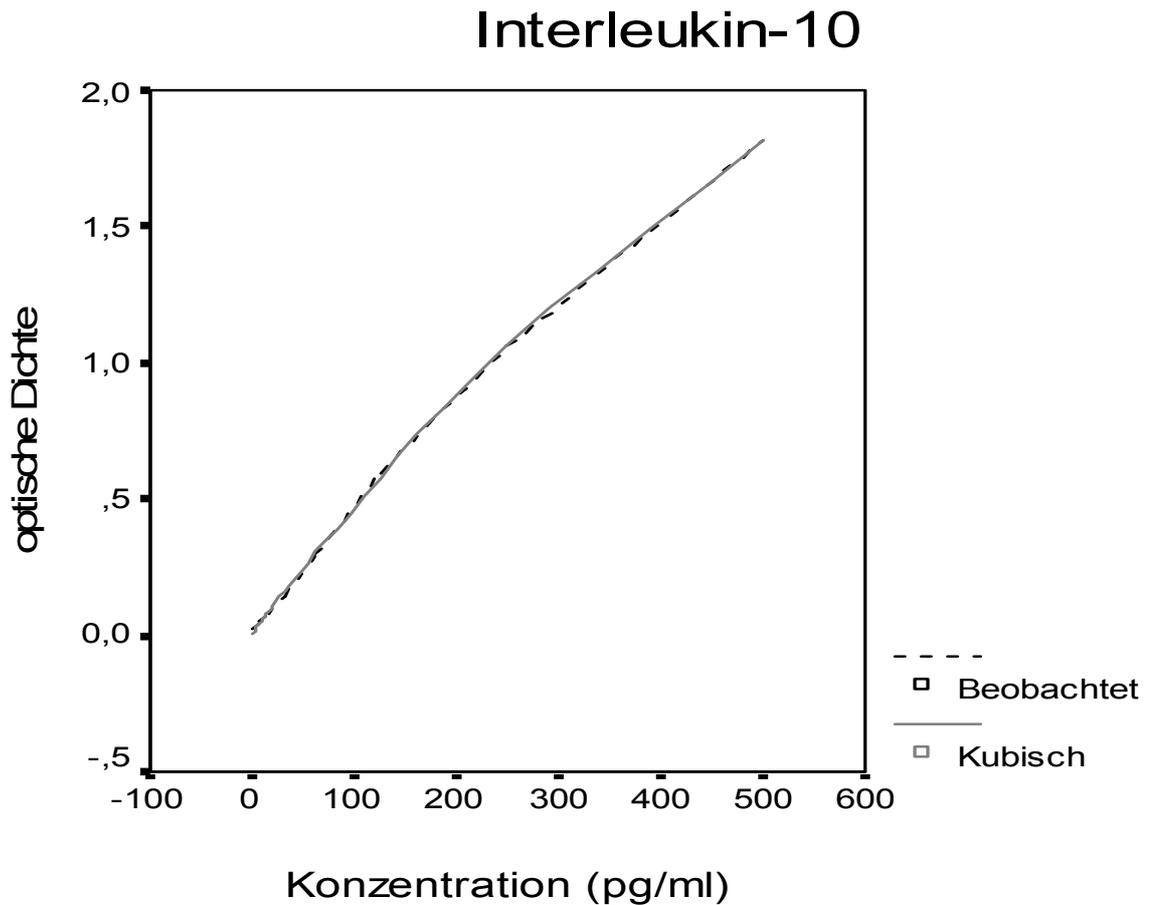


Abbildung 4: Im Computerprogramm SPSS erstellte Standardkurve für IL-10.

3.6. Statistische Auswertung

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

4. Ergebnisse der Untersuchungen

4.1. Zytokinbestimmung mittels Elisa

4.1.1. Interleukin-10

Um die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 zu ermitteln, wurde das Vaginalsekret von 45 symptomatischen und 36 asymptomatischen Frauen untersucht (siehe Abschnitt 3.5.3.).

IL-10 wirkt als ein Hauptmediator in der Suppression einer Entzündungsreaktion und inhibiert zugleich die Freisetzung der Zytokine der T_H1-Antwort.

In Tabelle 4 und 5 werden die Ergebnisse zusammengefasst.

Interleukin-10

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)
IL-10 Mittelwert (pg/ml)	2,14	4,00
IL-10 Minimum (pg/ml)	0	0
IL-10 Maximum (pg/ml)	36,00	49,00

Tabelle 4: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-10.

Interleukin-10

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)	p-Wert
Interleukin-10			
Median (pg/ml)	0,00	1,00	0,389744

Tabelle 5: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) bei IL-10 in Patienten- und Kontrollgruppe.

Sowohl in der Gruppe der Frauen, bei denen das klinische Bild einer BV vorlag, als auch bei den Frauen, die asymptomatisch waren, waren keine signifikanten Veränderungen der Konzentrationen zu sehen. Bei beiden Gruppen lagen Mittelwert und 50. Perzentile eng beieinander, insgesamt ergab sich ein sehr ähnliches Verteilungsbild. Es lässt sich die Aussage treffen, dass mit einer Signifikanz von $p=0,389744$ Frauen mit BV im Vergleich keine erhöhten IL-10-Konzentrationen erkennen ließen.

In der Patientengruppe waren die 25. und die 75. Perzentile bei 0 pg/ml und 2,50 pg/ml zu finden. Unter der 25. Perzentile lagen 51,1% (23/45), 24,4% (11/45) im Bereich von 25. bis 75. und über der 75. Perzentile 24,4% (11/45). Die Werte für die Kontrollgruppe betragen für 25. Perzentile 0 pg/ml und für die 75. Perzentile 2,75 pg/ml. Hier sah die Verteilung folgendermaßen aus: Bei 36,1% (13/36) waren Werte unter der 25. Perzentile, bei 38,9% (14/36) Werte zwischen 25. und 75. und bei 25,0% (9/36) Werte über der 75. Perzentile zu finden.

Da IL-10 für eine T_H2 -Zell-vermittelte Immunantwort verantwortlich ist, spricht eine in unserer Studie nicht nachweisbare Konzentrationsänderung für eine fehlende T_H2 -Antwort des lokalen Immunsystems in der Scheide.

4.1.2. Interleukin-6

Die Konzentration des IL-6 wurde, wie bereits in Abschnitt 3.5.2. beschrieben, aus dem Vaginalsekret bestimmt.

Interleukin-6 wird in die Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine eingeordnet, welche hauptsächlich von Zellen vom T_H1-Typ sezerniert werden.

IL-6 fördert die Aktivierung von Lymphozyten und führt zu einer gesteigerten Antikörperproduktion [28].

Interleukin-6

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)
IL-6 Mittelwert (pg/ml)	159,89	151,03
IL-6 Minimum (pg/ml)	0	0
IL-6 Maximum (pg/ml)	2100	1740

Tabelle 6: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-6.

In Tabelle 6 werden die in unserer Studie ausgewerteten Ergebnisse dargestellt. Dabei lässt sich erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied in den IL-6-Konzentrationen zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe gibt. Für jede einzelne Gruppe kommt es zu einer starken Streuung der Werte. So reicht die Wertespanne bei den Frauen, bei denen BV diagnostiziert wurde, von 0 bis 2100 pg/m, bei den für BV negativen Frauen von 0 – 1740 pg/ml.

Die 25. und die 75. Perzentile waren in der Patientengruppe 12,50 pg/ml und 181,00 pg/ml. Im Bereich der 25. Perzentile lagen 24,4 % (11/45), zwischen der 25. und 75. Perzentile 51,1% (23/45) und über der 75. Perzentile 24,4% (11/45). Für die

Kontrollgruppe betragen die Werte für die 25. und 75. Perzentile 16,25 pg/ml und 123,25 pg/ml. Hier sah die Verteilung folgendermaßen aus: Werte unter der 25. Perzentile waren bei 25% (9/36), dazwischen liegend bei 50% (18/36) und über der 75. Perzentile bei 25% (9/36) zu finden.

Im direkten Vergleich der Verteilung der IL-6-Konzentrationen in beiden Gruppen, wird deutlich, dass die beiden Verteilungsmuster fast identisch sind. Die auftretenden Unterschiede können mit $p=0,782807$ nicht als signifikant angesehen werden und es ist eher an eine andere Ursache für die Veränderung zu denken.

Interleukin-6

Patientengruppe (n=45)

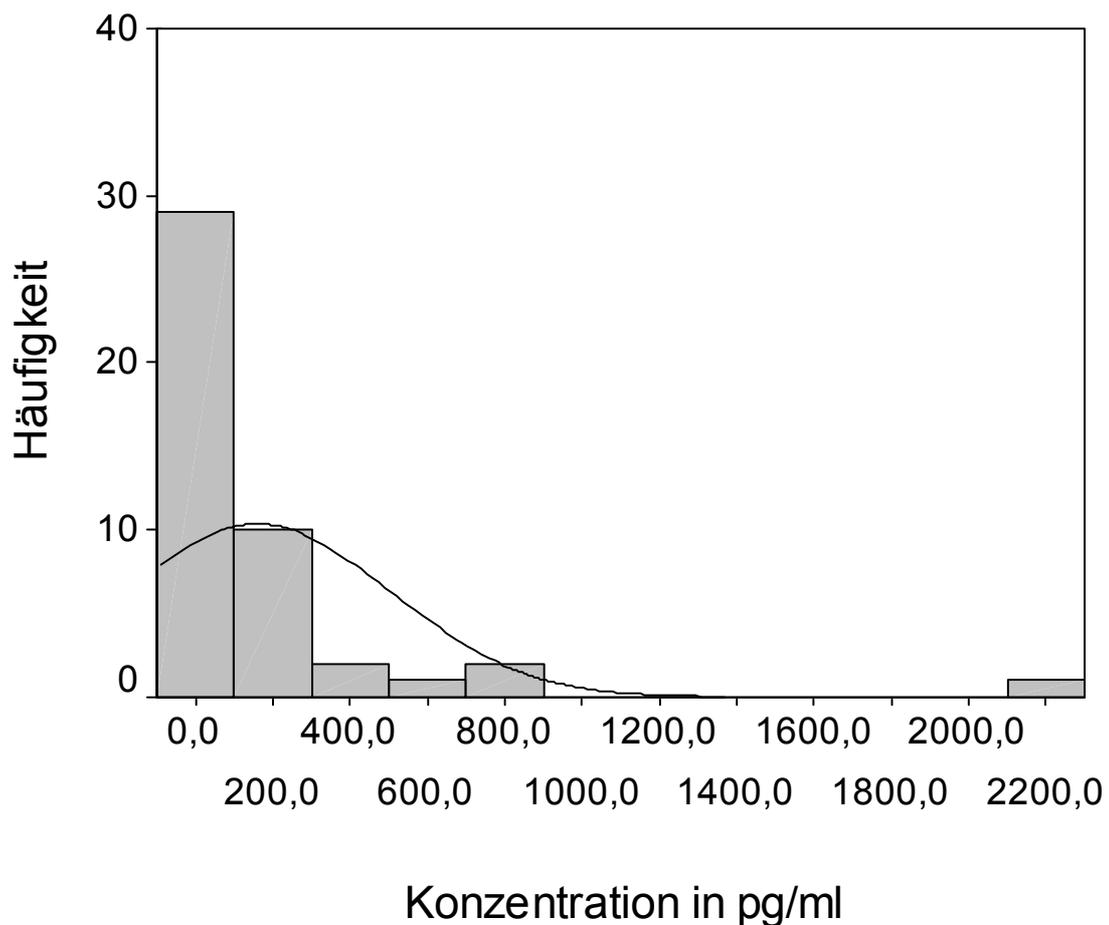


Diagramm 1: Häufigkeitsverteilung der IL-6-Konzentrationen bei der Patientengruppe.

Interleukin-6

Kontrollgruppe (n=36)

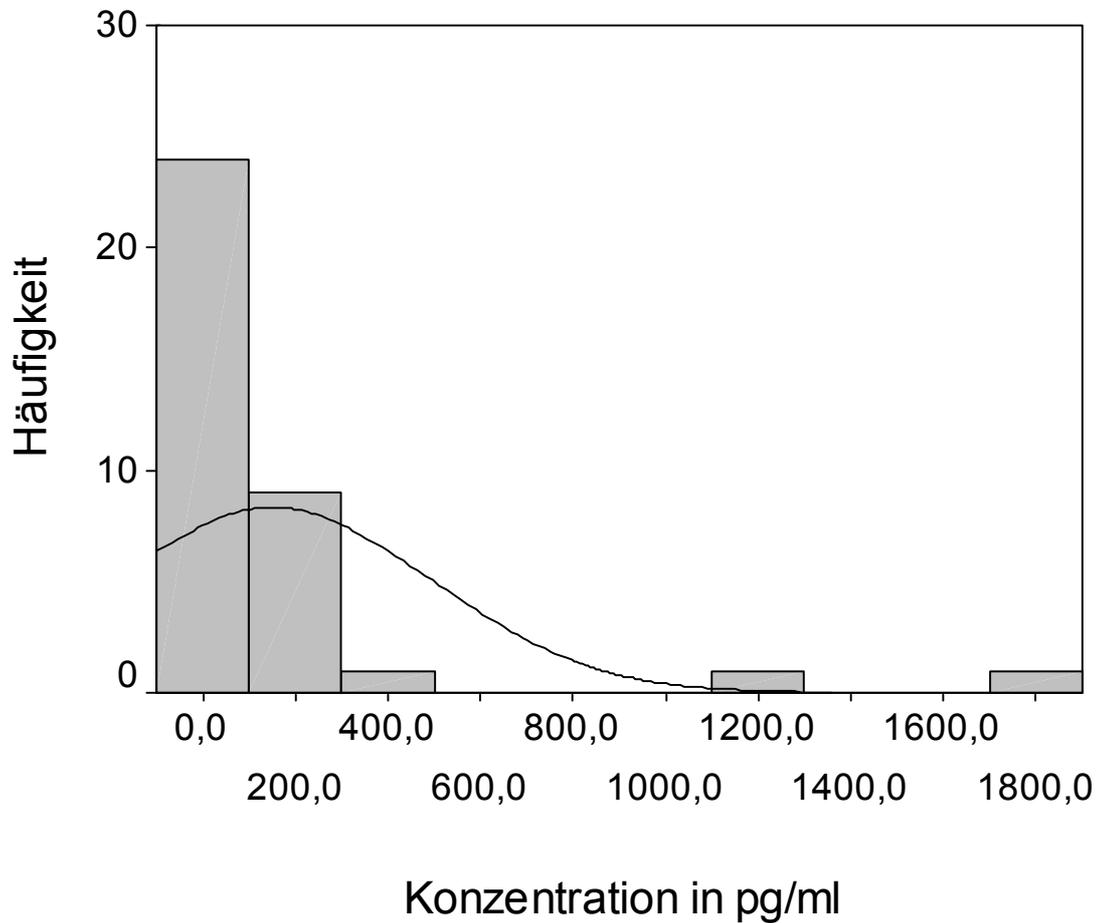


Diagramm 2: Häufigkeitsverteilung der IL-6-Konzentrationen bei der Kontrollgruppe.

4.1.3. Interleukin-12

Auch IL-12, ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, wurde mittels Elisa aus dem Vaginalabstrich beider Gruppen gemessen (siehe Abschnitt 3.5.2.).

IL-12 aktiviert NK-Zellen und induziert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T_H1-Zellen.

Interleukin-12

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)
IL-12 Mittelwert (pg/ml)	13,53	8,81
IL-12 Minimum (pg/ml)	0	0
IL-12 Maximum (pg/ml)	146	58

Tabelle 7: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert (pg/ml) zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei IL-12.

Auch aus der statistischen Auswertung der Ergebnisse, in der die Interleukin-12-Werte der BV-Gruppe denen der Kontrollgruppe gegenübergestellt wurden, ließen sich keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Interleukin-12-Konzentration ermitteln.

Die Werte für die 25. und die 75. Perzentile betragen in der Gruppe der symptomatischen Frauen 3,0 pg/ml und 15,50 pg/ml. Unter der 25. Perzentile lagen 22,2% (10/45), im Zwischenbereich 53,3% (24/45) und über der 75. Perzentile 24,4% (11/45). Für die Gruppe der asymptomatischen Frauen war die 25. Perzentile 3,0 pg/ml und die 75. Perzentile 11,0 pg/ml.

Konzentrationen kleiner 3,0 pg/ml waren bei 19,4% (7/36) nachzuweisen, zwischen 25. und 75. Perzentile lagen 52,8% (19/36) und Werte größer oder gleich 11,0 pg/ml waren bei 27,8% (10/36) zu finden.

4.1.4. Vergleich der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12

Bei beiden pro-inflammatorischen Zytokinen konnte kaum ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen erkannt werden.

Mit einer Signifikanz von $p=0,782807$ für IL-6 und $p=0,671506$ für IL-12 konnten wir in unserer Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe nachweisen.

IL-6 und IL-12

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)	p-Wert
Interleukin-6			
Median (pg/ml)	28,00	54,00	0,782807
Interleukin-12			
Median (pg/ml)	7,00	6,50	0,671506

Tabelle 8: Signifikanz und Medianwerte (pg/ml) bei IL-6 und IL-12 in Patienten- und Kontrollgruppe.

Sowohl IL-6 als auch IL-12 sind Mediatoren der T_H1 -Immunantwort. Da in beiden Fällen keine wesentlichen Änderungen der Konzentrationen in der Gruppe von BV-Patientinnen zu der Gruppe asymptomatischer Frauen vorlagen, ist die Überlegung nahe liegend, dass bei Bakterieller Vaginose keine T_H1 -Zellen vermittelte Immunreaktion bezüglich der von uns untersuchten Zytokine vorliegt, somit scheint

einer Initiierung einer Entzündungsreaktion über lokale immunologische Reaktionen bei der Erkrankung der BV keine Rolle zuzukommen.

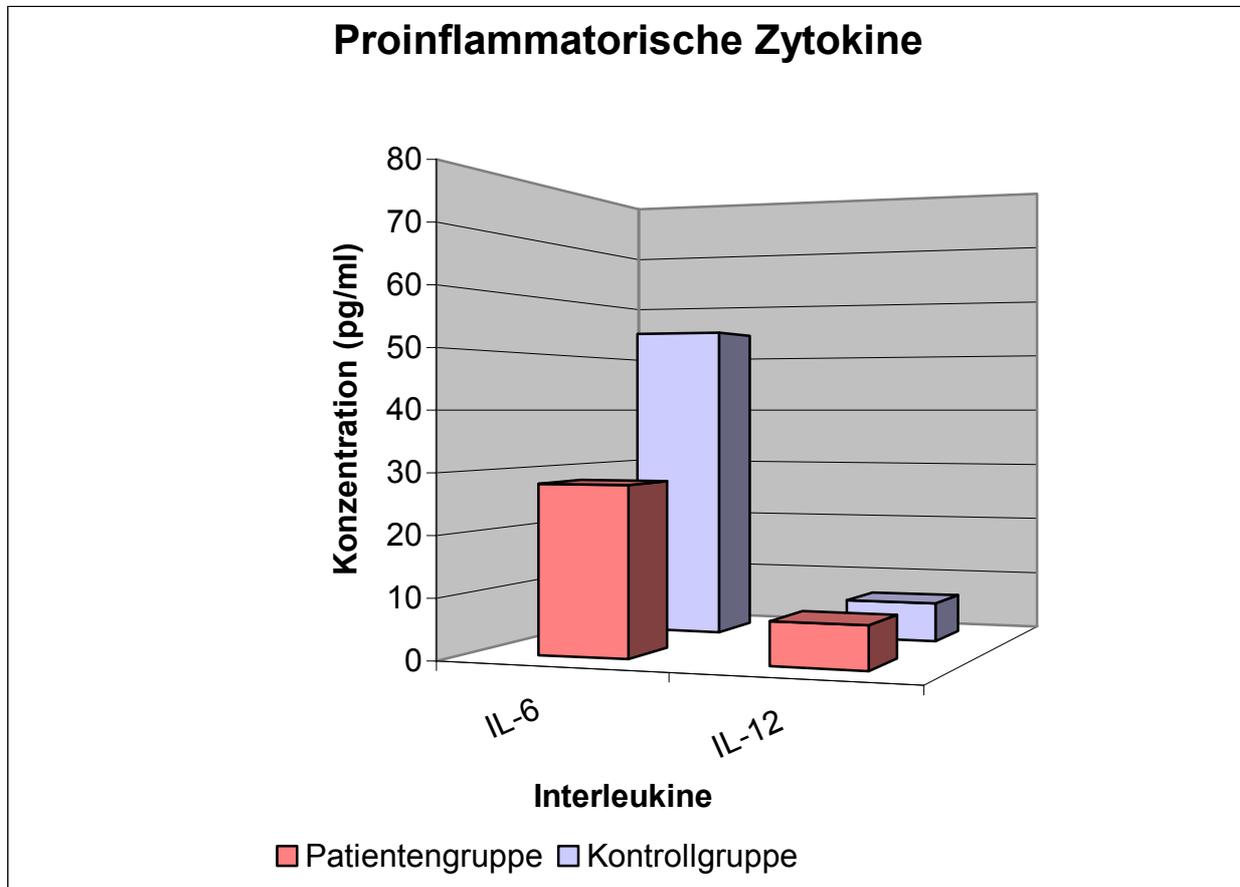


Diagramm 3: Median (pg/ml) bei IL-6 und IL-12 von jeweils Kontroll- mit Patientengruppe.

4.2. Diagnostische Marker

4.2.1. Reinheitsgrad

Da es bei dem Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose zu einem starken Abfall der Anzahl der in der vaginalen Normalflora vorherrschenden Laktobazillen und zu einem gleichzeitigen Überwuchern 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

vorkommenden oder komplett fehlenden Laktobazillen, so dass hier der Reinheitsgrad überwiegend zwischen Grad II und III eingestuft wurde.

Reinheitsgrad

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)	p-Wert
Reinheitsgrad (Median)	II - III	I - II	<0,0001

Tabelle 9: Signifikanz und Medianwert des Reinheitsgrades bei Patienten- und Kontrollgruppe.

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 bis II 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 Bakterieller Vaginose stellt die Bestimmung des Reinheitsgrades ein neben anderen Verfahren aussagekräftiges diagnostisches Mittel dar.

Reinheitsgrad

Patientengruppe (n=45)

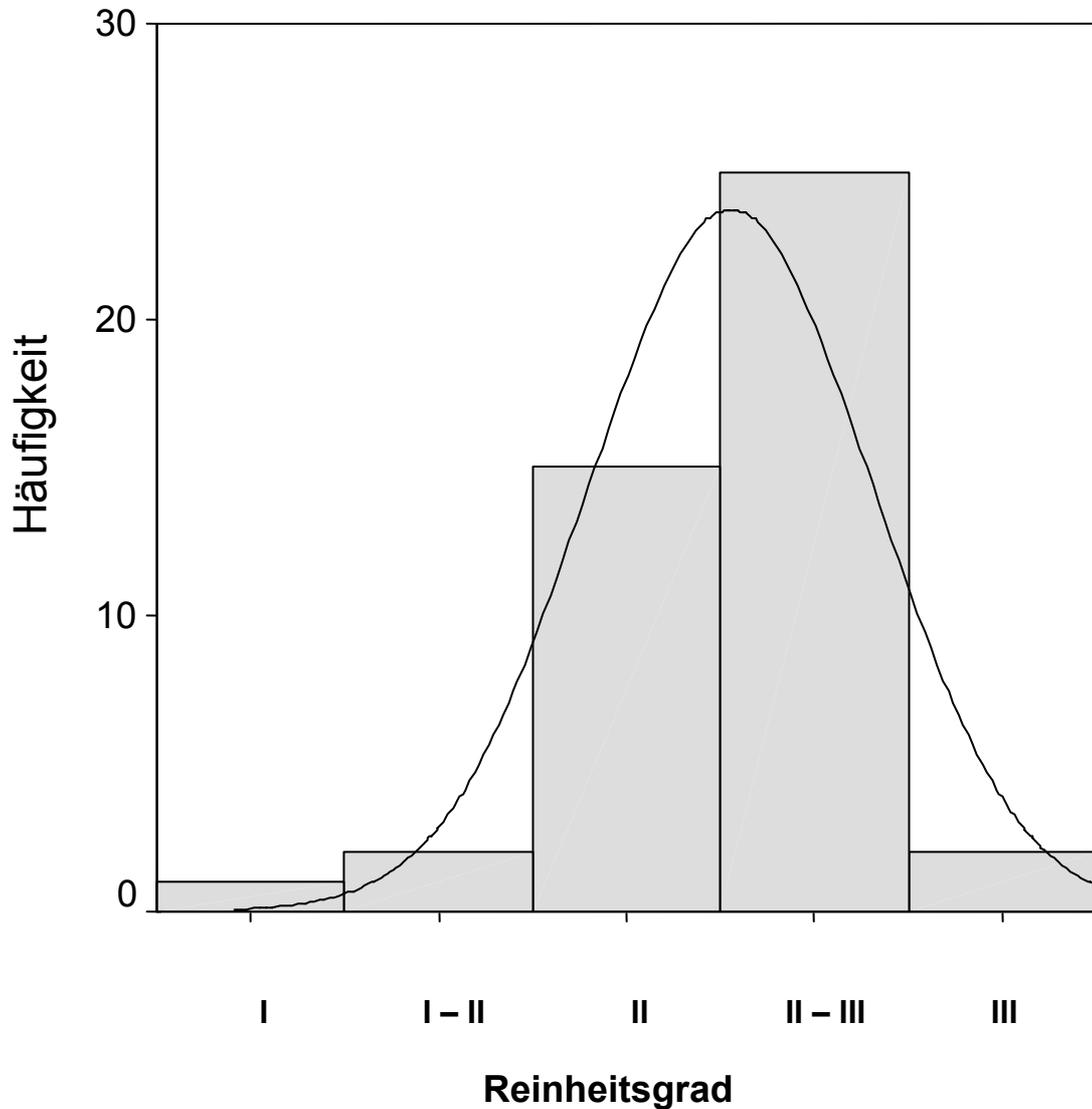


Diagramm 4: Häufigkeitsverteilung des RHG auf die einzelnen Wertebereiche in der Patientengruppe.

In den Diagrammen 4 und 5 soll dargestellt werden, mit welcher Häufigkeit der Reinheitsgrad auf die einzelnen Wertebereiche in der Patientengruppe und in der Kontrollgruppe verteilt war.

Bei direktem Vergleich der beiden Kurven für die Häufigkeitsverteilung wurde deutlich, dass der Reinheitsgrad bei der Patientengruppe gehäuft in den Bereichen Grad II und Grad II – III lag, während sich bei der Kontrollgruppe die Werte bei Grad I und Grad I – II konzentrierten.

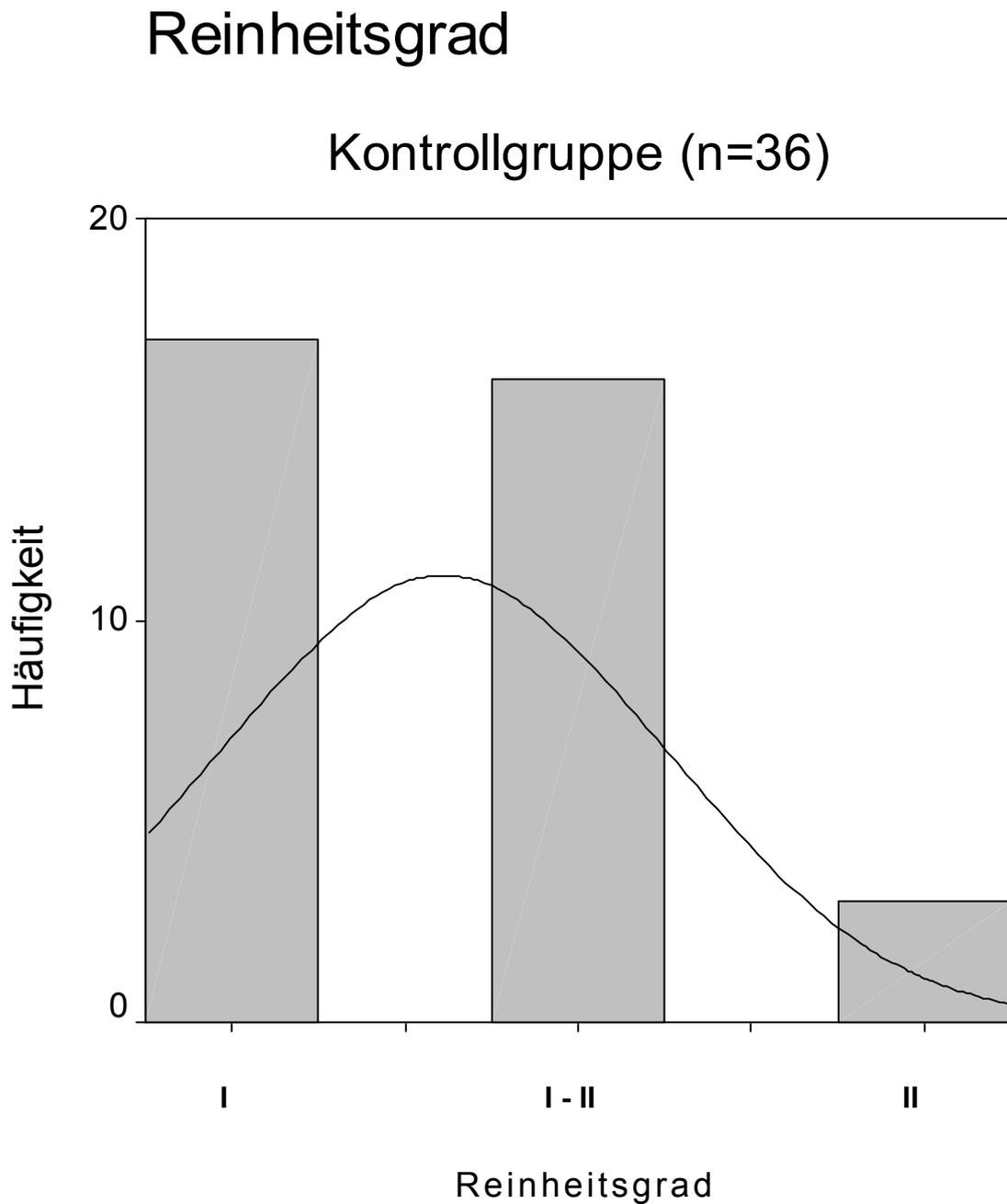


Diagramm 5: Häufigkeitsverteilung des RHG auf die einzelnen Wertebereiche in der Kontrollgruppe.

4.2.2. Amintest

Das zweithäufigste und auch sehr charakteristische Symptom bei Frauen mit Bakterieller Vaginose ist der fischartige Geruch des vaginalen Ausflusses. Er entsteht durch die vermehrte Freisetzung von Aminen und lässt sich oft erst durch die Durchführung des Amintests verifizieren.

Amintest

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)
Amintest positiv	42 / 45 (93,3%)	0 / 36 (0%)
Amintest negativ	3 / 45 (6,7%)	36 / 36 (100%)

Tabelle 10: Vergleich der Ergebnisse des Amintests bei Patienten- und Kontrollgruppe.

In der Patientengruppe fiel das Ergebnis in 42 / 45 (93,3%) positiv aus, in der Kontrollgruppe hingegen ließ sich kein einziges positives Ergebnis finden. Bei den Frauen, die an Bakterieller Vaginose leiden, war bei 3 von 45 Frauen (6,7%) der Test negativ. In der Gruppe der asymptomatischen Frauen war auch die Probe negativ 36 / 36 (100%).

4.2.3. pH-Wert

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)
Mittelwert	5,193	4,042
Minimum	4,0	3,8
Maximum	6,0	4,3

Tabelle 11: Vergleich von Mittelwert, Minimal- und Maximalwert des pH-Wertes zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

Durch das Fehlen der Laktobazillen in der Scheidenflora, liegt eine deutlich erniedrigte Produktion der Milchsäure vor, die hauptsächlich für das Ansäuern des Scheidenmilieus ist. Wie zu erwarten, waren bei den Frauen, die Symptome zeigten, die für die BV-typischen diagnostischen Marker statistisch signifikant verändert. Dies trifft auch für den pH-Wert zu. Mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$ konnten in der Patientengruppe wesentlich höhere Werte gemessen werden als in der Kontrollgruppe. Der Median betrug bei den symptomatischen Frauen 5,2 im Vergleich zu der gesunden Gruppe, bei der der Median bei 4,0 lag.

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)	p-Wert
pH-Wert			
Median	5,2	4,0	<0,0001

Tabelle 12: Signifikanz und Medianwert des pH-Wertes in Patienten- und Kontrollgruppe.

4.2.4. Alter

Bei der BV handelt es sich um eine Erkrankung, die vor allem vor der Menopause auftritt. Das konnte in unserer Studie insoweit bestätigt werden, dass sich in der Patientengruppe eine Altersspanne von 19 – 47 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 30,0 Jahren ergab. In der Kontrollgruppe war der Altersdurchschnitt bei 33,7 Jahren und die Spannbreite verlief von 16 bis 58 Jahren.

	Patientengruppe (n = 45)	Kontrollgruppe (n = 36)
Durchschnittsalter (Jahre)	30,0	33,7
Spannbreite (Jahre)	19 – 47	16 – 58

Tabelle 13: Durchschnittsalters und Spannbreite bei Patienten- und Kontrollgruppe.

5. Diskussion

Eine der häufigsten Ursachen für das Auftreten von Fluor vaginalis ist das Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose [47,59,71]. Hierbei liegt ein sehr komplexer Veränderungsprozess im Ökosystem der Scheide vor, bei dem es zu einem Verlust von Laktobazillen, welche in der vaginalen Normalflora dominierend sind, kommt.

Thomason et al. [68] hingegen sprechen nicht von einer Abnahme der Anzahl von Laktobazillen an sich, sondern von einer Verschiebung von H₂O₂-produzierenden Laktobazillen zu solchen, die kein Wasserstoffperoxid produzieren. Das Überwuchern mit Anaerobiern ist somit ebenfalls in der fehlenden Bildung von Wasserstoffperoxid, und damit einer mangelnden protektiven Wirkung zu suchen. Die Ursache hierfür liegt – laut Thomason et al. – jedoch nicht im Verlust der Laktobazillen an sich, sondern vielmehr in einem Austausch mit Nicht-Peroxid-Produzierenden Laktobazillen. In unseren Untersuchungen lag bei der Bestimmung des Reinheitsgrades, und damit der Laktoflora, der Median in der Gruppe der Patientinnen bei Grad II – III, und somit konnten keine oder nur vereinzelt Laktobazillen gefunden werden.

Die geringe oder gar fehlende Zahl dieser Wasserstoffperoxid produzierenden und dadurch physiologisch protektiv wirkenden Bakterien erleichtert die starke Vermehrung verschiedener anaerober und fakultativ anaerober Bakterien, wie zum Beispiel Gardnerella vaginalis, Mobiluncus oder Bacteroides in der Scheide [47,59,71]. In diesem Zusammenhang untersuchten wir den lokalen Immunstatus der Scheide bei 45 Patientinnen mit dem klinischen Bild einer Bakteriellen Vaginose, diagnostisch bestätigt durch die mikroskopische Beurteilung der Scheidenflora, der Bestimmung des Reinheitsgrades und der Laktoflora, Durchführung der Aminprobe, Messung des pH-Wertes und dem Nachweis von clue cells. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe der symptomatischen Patientinnen bestimmten wir die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-12, sowie das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin-10 aus dem Vaginalsekret mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (Elisa). Als Kontrollgruppe dienten 36 asymptomatische Frauen.

Bei vielen gynäkologischen, infektiologischen Erkrankungen stellt die lokale Immunantwort in der Scheide einen wichtigen Faktor an der Abwehr von Krankheitserregern dar.

So konnten zum Beispiel Filler et al. [22] in ihrer Studie nachweisen, dass es im Zuge einer Infektion mit *Candida albicans* zu einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt, im Besonderen von Interleukin-6 und Interleukin-8 und somit die lokale Immunität eine Rolle in der Abwehr spielt. Shaio et al. [55] konnten bei *Trichomonas-vaginalis*-Infektionen zeigen, dass Interleukin-8 als proinflammatorisches Zytokin eine erhebliche Rolle bei akuten Entzündungsreaktionen, die bei solchen Infektionen auftreten, zufällt. So kommt es zu einer über Monozyten induzierten Produktion großer Mengen von Interleukin-8.

In unseren Untersuchungen der Immunparameter hingegen konnten wir weder bei den für eine T_H1 -Antwort typischen Zytokinen IL-6 ($p > 0,782$) und IL-12 ($p > 0,671$), die für eine vorliegende Entzündungsreaktion sprechen würden, noch bei dem antiinflammatorischen IL-10 ($p > 0,389$), das von T_H2 -Zellen produziert wird, einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe feststellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse gehen wir nicht davon aus, dass im Falle der Bakteriellen Vaginose der zellvermittelten lokalen Immunität der Scheide eine wesentliche Rolle zukommt, zumindest nicht durch die von uns bestimmten Immunparameter maßgeblich beeinflusst wird. Weder liegt eine Aktivierung der Zytokine IL-6 und IL-12 in Richtung einer inflammatorischen Entzündungsreaktion vor noch kommt es zu einer vermehrten Produktion des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10.

Auch wenn die Überwucherung mit anaeroben Mikroorganismen zu einer Veränderung des normalen vaginalen Ökosystems führt, fehlen für gewöhnlich Symptome, die für ein entzündliches Geschehen sprechen. So machten Donders et al. [19] den Versuch, die Art der Veränderung der abnormalen Vaginalflora genau zu definieren. Es gilt, das Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose von dem der Aeroben Vaginitis abzugrenzen. Bei BV fehlen gewöhnlich Anzeichen für eine vorliegende Entzündung im Sinne einer Vaginitis. Laut Donders et al. [19] zeigt sich eine Vaginalschleimhaut, die weder gerötet noch entzündet erscheint, auch treten selten Symptome, wie ein Brennen, Schmerzen oder Dyspareunie auf. Ebenso lässt

sich in der mikroskopischen Untersuchung ein Fehlen von Leukozyten feststellen. Bei der Aeroben Vaginitis handelt es sich im Gegensatz dazu um ein entzündliches Geschehen, mit einem Nachweis einer stark erhöhten Anzahl von Leukozyten im Mikroskop. Außerdem kommt es daraus resultierend in ausgeprägter Form zu der bei der Bakteriellen Vaginose fehlenden Induktion der lokalen Immunantwort, in deren Folge eine deutlich erhöhte Produktion von Interleukin-6 und anderen Zytokinen der T_H1-Antwort im Vaginalsekret zu messen ist.

So sprechen sich auch Cauci et al. [10] für die korrekte Bezeichnung Bakterielle Vaginose und nicht Bakterielle Vaginitis aus. In diesem Fall wären die Ergebnisse unserer Studie, nämlich, dass wir keine lokale pro-inflammatorische über IL-6 und IL-12 vermittelte Reaktion in der Scheide nachweisen konnten, mit diesen Aussagen, in denen BV als ein nicht entzündliches Geschehen definiert wird, als übereinstimmend zu betrachten.

Auf dem Gebiet der immunologischen Regulation bei dem Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose bei nicht-schwangeren Frauen ist bis jetzt noch wenig erforscht worden, es gibt jedoch zahlreiche Studien, die sich mit der Untersuchung der Immunmodulatoren bei schwangeren BV-Patientinnen beschäftigen.

In den meisten Studien, die sich mit dem immunologischen Einfluss der T_H1-Antwort bei Bakterieller Vaginose beschäftigten, ergaben sich vergleichbare Ergebnissen zu unseren. Es fanden sich im Besonderen bei Interleukin-6 meist keine auffälligen Veränderungen bzw. statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe.

So waren unsere Ergebnisse in Bezug auf die T_H1-Antwort ähnlich zu den Erkenntnissen in der von Wennerholm et al. [74] durchgeführten Studie bei Frauen, die mit Zwillingen schwanger waren, zu werten. Auch in dieser Studie konnte keine signifikante Assoziation von Interleukin-6-Konzentrationen und Bakterieller Vaginose aufgezeigt werden. Für die Zytokine Interleukin-1-alpha und Interleukin-8 hingegen waren die Spiegel in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eindeutig erhöht.

Diese Erkenntnisse bestätigen unsere Ergebnisse insofern, dass auch bei schwangeren Frauen keine über Interleukin-6 vermittelte pro-inflammatorische Immunreaktion vorliegt, es aber zu einer lokalen Immunantwort kommen kann, die über die Zytokine IL-1-alpha und IL-8 vermittelt zu sein scheint.

In der Untersuchung von Mattsby-Baltzer et al. [41] zeigten sich weder für Interleukin-6, noch Tumornekrosefaktor alpha, noch Fetales Fibronectin statistisch signifikant erhöhte Werte bei schwangeren Frauen, die an BV erkrankt waren, verglichen mit schwangeren, gesunden Frauen. Es gab jedoch eine Assoziation von erhöhten Konzentrationen von Interleukin-1-beta im unteren Genitaltrakt bei Frauen mit Bakterieller Vaginose. Möglicherweise könnte es durch die Fähigkeit der für die BV typischen Endotoxine zu einer Induktion der Zytokine in den Monozyten kommen. Das würde den erhöhten Wert von Interleukin-1-beta zumindest teilweise erklären, IL-6 hingegen zeigt bei schwangeren Patientinnen keine Beteiligung.

Auch Imseis et al. [27], die ebenfalls Interleukin-6 bei Patientinnen mit BV untersuchten, konnten keine Korrelation dieser von ihnen bestimmten Parameter mit BV zeigen.

Mit anderem Ergebnis führten Yudin et al. [77] eine Untersuchung durch, um die unterschiedlichen Therapieerfolge bei der Behandlung der BV bei Schwangeren mit Metronidazol oral und vaginal anhand des Verlaufes der Konzentrationen bestimmter pro-inflammatorischer Zytokine zu vergleichen. Dabei konnten sie interessanterweise einen signifikanten Abfall der zervikalen Konzentrationen von Interleukin-6, IL-1-beta und IL-8 nach Abschluss der erfolgreichen Therapie und somit Heilung der BV feststellen. IL-1 induziert die Produktion von IL-6. Falls also die erfolgreiche Behandlung zu einer Abnahme der IL-1-beta-Konzentrationen führt, könnte darin ein möglicher Zusammenhang zu dem korrelierenden Abfall von IL-6 gesehen werden. Bei den Patientinnen allerdings, die nicht auf die Therapie ansprachen, war für IL-1-beta und IL-6 kein Unterschied vor Beginn und nach Ende der Therapie zu erkennen. Laut Yudin et al. [77] kommt es aufgrund des Versagens der Therapie wahrscheinlich zu einer Persistenz des bakteriellen Endotoxins, die in Verbindung steht mit der fehlenden Abnahme der IL-1-beta-Konzentration und der daraus resultierenden Induktion von IL-6. Diese Erkenntnisse könnten wiederum dafür sprechen, dass es zu einer über IL-1-beta und IL-6 vermittelten inflammatorischen Immunreaktion in der Zervix kommt.

Die Steuerung der Produktion von Zytokinen in der Vagina hängt von verschiedensten Mechanismen ab, es besteht nicht zwingend ein Zusammenhang mit einer stattfindenden Infektion. Laut Cauci et al. [10] können mehrere Stimuli die Produktion von Zytokinen und die Akkumulation von Leukozyten triggern, ohne dass

eine Infektion vorliegen muss. Zu diesen auslösenden Faktoren können auch mechanische und endogene Ursachen gezählt werden.

Für das andere pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-12, welches auch von uns bestimmt wurde, konnten wir ebenso keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe verzeichnen. Dieses Ergebnis stützt weiterhin unsere Annahme, dass bei nicht schwangeren Patientinnen mit BV die Induktion der lokalen Immunreaktion anscheinend eine geringe Rolle spielt.

Im Wesentlichen keine andere Aussage stellten Hollier et al. [24]. In ihrer Studie, in der ein Vergleich von Interleukin-12 bei schwangeren Frauen mit BV mit einer gesunden Kontrollgruppe vorgenommen wurde, ergaben sich auch keinen deutlichen Assoziationen.

Als weiteren wichtigen Immunmodulator untersuchten wir Interleukin-10. Auch hierfür ergab sich, genauso wie für die beiden pro-inflammatorischen Zytokin IL-6 und IL-12, keine statistische Signifikanz in der Unterscheidung zwischen Patientenkollektiv und den asymptomatischen Frauen.

Bei IL-10 handelt es sich um ein Zytokin vom T_H2 -Typ mit anti-inflammatorischer Wirkung. Es wirkt immunsuppressiv und hemmt die Aktivierung der T_H1 -Zellen. Möglicherweise erhöht IL-10 die Empfänglichkeit von Makrophagen für eine Infektion mit HIV-1 [15]. Eine weitere wichtige Aufgabe der von T_H2 -Zellen produzierten Zytokine ist die Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen [76]. Es wäre zu überlegen und in weiteren Studien genauer zu untersuchen, inwieweit eventuell eine allergische Komponente bei dem Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose eine Rolle spielen könnte.

Interessanterweise konnten Cohen et al. [15] genau gegensätzliche Erkenntnisse erzielen. In ihrer Studie wurde Interleukin-10 im endozervikalen Sekret von Patientinnen mit BV deutlich häufiger nachgewiesen als in der Gruppe der Frauen, die nicht erkrankt waren. Es wurde dabei herausgestellt, dass die Assoziation von nicht-ulzerativen sexuell übertragbaren Erkrankungen und Bakterieller Vaginose mit einem deutlich häufigeren Nachweis von Interleukin-10 einen möglichen Mechanismus darstellen kann, durch den bei Frauen, die an einer der eben genannten Infektionen leiden, die Empfänglichkeit für eine Infektion mit HIV-1 verändert werden kann.

Aufgrund der Ergebnisse unserer Untersuchungen stellt sich für uns weiterhin die Frage, ob eventuell genetisch bedingte Veränderungen oder Störungen in der lokalen Immunantwort vorliegen [19], so dass eine adäquate Abwehrreaktion auf das Eindringen und Vermehren der Mikroorganismen, im speziellen Gardnerella vaginalis, nicht erfolgen kann und dadurch eine fehlende Elimination der Bakterien vorliegt und das Auftreten der BV begünstigt wird.

Andererseits wäre eventuell zu überlegen, ob das Vorhandensein dieser bestimmten Bakterien erst dazu führen könnte, dass es zu keiner Stimulierung des lokalen Immunsystems kommt und folglich die nötige Produktion der inflammatorisch wirkenden Mediatoren ausbleibt. Wilson et al. [76] sprechen beispielsweise davon, dass Mäuse, die mit Leishmania major infiziert worden waren, die Fähigkeit verloren haben, eine korrekte T_H1 -Zytokin-Antwort zu induzieren. Daraus resultierte eine fehlende Aktivierung von Monozyten, die die auftretende Infektion bekämpfen sollen. 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 Vaginose dar, denn es handelt sich hierbei laut Soper [59] keineswegs um eine als harmlos anzusehende Veränderung der Mikroflora, die zwar unangenehme, aber ungefährliche Symptome mit sich bringt. Denn Frauen mit dieser Erkrankung sind wesentlich stärker dahingehend gefährdet, dass es gehäuft zum Auftreten von Komplikationen im Besonderen während der Schwangerschaft kommt. Mardh [38] zufolge liegt eine statistische Korrelation zwischen BV und geburtshilflichen Komplikationen vor.

Durch das Überwuchern der bei BV auftretenden Bakterien, entwickelt sich eine so genannte Mischflora, in der die Produktion der mukolytischen Enzyme Sialidase [47] und Muzinase überwiegt. McGregor et al. [43] konnten in ihrer Studie zeigen, dass bei Frauen, die BV-positiv waren, höhere Konzentrationsspiegel dieser beiden Enzyme nachgewiesen werden konnten. Während Muzinase eindeutig nur mit BV-typischen Mikroorganismen in Verbindung zu bringen war, zeigte Sialidase auch bei Infektionen mit Chlamydia trachomatis oder einer Pilzinfektion eine erhöhte Aktivität. In dem Fortbestehen von Mikroorganismen in der Vagina, die Sialidase produzieren und

zwar in der Menge, dass es zu einem messbaren Anstieg der Sialidase-Aktivität im Vaginalsekret kommt, sehen McGregor et al. eine mögliche Gefahr für eine subklinische intrauterine Infektion und eine drohende Frühgeburt. Diese Aussage stützt ebenso die von Cauci et al. [11] durchgeführte Studie. Sie legen dar, dass Frauen mit BV, die eine angestiegene Aktivität des Enzyms Sialidase zeigten und eine extreme Abnahme von IgA, vermehrt zu gefährlichen Infektionen und Komplikationen während der Schwangerschaft neigten.

Gerade bei Frauen in der Schwangerschaft wird der Erkrankung an Bakterieller Vaginose eine sehr hohe Komplikationsrate zugeschrieben. Es gilt als eindeutiger Risikofaktor für vorzeitig einsetzende Wehen [49,68], Spontanabort [20], Frühgeburt [49,57,59], vorzeitiger und frühzeitiger Blasensprung [43,68].

Weitere Studien beschäftigen sich mit der Problematik, in welchem Zusammenhang BV mit idiopathischer Infertilität steht. Spandorf et al. [60] stellten in ihrer Studie heraus, dass bei Patientinnen mit idiopathischer Infertilität deutlich öfters eine BV nachgewiesen werden konnte als bei Frauen, deren Ursache für die Infertilität abgeklärt war. Übereinstimmend bemerkten McCaffrey et al. [42], dass bei der Untersuchung infertiler Paare eine verstärkte Prävalenz von BV nachweisbar war. Es gilt allerdings noch, den genauen Mechanismus, über den BV Infertilität verursachen kann, zu klären.

Aufgrund der hohen Konzentrationen von anaeroben gram-negativen Bakterien, Peptostreptokokken und anderen opportunistisch pathogenen Keimen im unteren Genitaltrakt kommt es, wie Hill [23] in seiner Studie verdeutlicht, dazu, dass Frauen, die an BV erkrankt sind, ein deutlich erhöhtes Risiko für Infektionen des oberen Genitaltraktes [57] und Komplikationen in der Schwangerschaft haben.

Doch nicht nur für Frauen in der Schwangerschaft erhöht sich durch die Erkrankung die Komplikationsrate, auch nicht schwangere Frauen haben ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Komplikationen. Durch das Aszendieren verschiedener Keime, zum einen der für BV typischen zum anderen auch derer, die durch die gestörte Vaginalflora nicht mehr eliminiert werden können, treten vermehrt ernsthafte Infektionen im Bereich des oberen Genitaltraktes, wie zum Beispiel eine Adnexitis [51,62,67,68,] oder Endometritis auf [68]. Die Ähnlichkeit der Mikroorganismen, die charakteristisch für diese beiden Krankheitsbilder, nämlich Bakterielle Vaginose und Adnexitis sind, legt diesen vermuteten Zusammenhang nahe [45].

Doch nicht nur durch das vermehrte Vorhandensein und Aufsteigen pathogener Keime wird das Auftreten von Infektionen gefördert, sondern auch durch die Veränderungen im Zusammenspiel der Zytokine stellt sich eine weitere Ursache dar, die das Auftreten viraler Infekte erleichtert kann.

Cohen et al. [15] konnten eine Beziehung zwischen BV und dem Erwerb einer HIV-1-Infektion sehen [51,62]. Ein potentieller Mechanismus liegt in der - laut Cohen et al. - bei der BV verändert vorliegenden Konzentration von Interleukin-10 im endozervikalen Sekret, die unter Umständen eine veränderte Lage in der Bereitschaft für eine Infektion mit HIV-1 mit sich bringt.

Einen Zusammenhang zwischen Störungen im vaginalen Ökosystem und einer Infektion mit dem human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) stellten Moodley et al. [44], die sich auch mit dieser Problematik beschäftigten, heraus. Demnach war eine steigende Prävalenz einer Infektion mit HIV-1 linear ansteigend mit dem zunehmenden Schweregrad der Bakteriellen Vaginose, orientiert am Nugent´s Score, zu bemerken.

Cherpes et al. [14] konnten nachweisen, dass eine Assoziation zwischen der Bakteriellen Vaginose und dem höheren Risiko des Erwerbes einer Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV-2) besteht. Allerdings bleibt noch zu klären, ob ein frühzeitiges Screening und eine adäquate Therapie die Empfänglichkeit für eine HSV-2-Infektion herabsetzen könnten.

Des Weiteren konnte – laut Mardh [38] - bei Frauen, bei denen Veränderungen der Vaginalflora im Sinne der BV vorlagen, häufiger eine zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) nachgewiesen werden, als bei Frauen mit normaler Vaginalflora [62,67]. Eine Überlegung für eine Beziehung zwischen diesen beiden Krankheitsbildern ist, dass es durch das Überwuchern pathogener Mikroorganismen in der Scheide zu einer gesteigerten Produktion von Nitrosaminen kommt, die potentiell onkogene Wirkung haben könnten. Behbakht et al. [6] untersuchten in ihrer Studie das Zusammenwirken des vaginalen mikrobiologischen Ökosystems und der Zytokinproduktion bei Patientinnen mit zervikaler Dysplasie. Bei den bestimmten Zytokinen Interleukin-1 beta, IL-6, IL-10 und IL-12 konnte nur für IL-1-beta eine Konzentrationsänderung beobachtet werden. Was als komplexe inflammatorische Reaktion auf verschiedene Pathogene im Rahmen der zervikalen intraepithelialen Neoplasie gewertet werden kann. Für einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von mikrobiologischen Veränderungen im Sinne einer Bakteriellen

Vaginose und dem Auftreten einer zervikalen Dysplasie ergaben sich allerdings keine Anhaltspunkte.

Möglicherweise kann BV als Risikofaktor für Morbus Parkinson gelten. Diese These wird von Carvey et al. [9] diskutiert. Demnach kommt es bei BV, als eine häufige Komplikation während der Schwangerschaft, zu erhöhten Konzentrationen von Lipopolysacchariden und pro-inflammatorischer Zytokine in der fetalen chorioamniotischen Umgebung. Aufgrund dieser Umstände entstand die Überlegung, ob darin ein möglicher Zusammenhang zwischen der Erkrankung der Bakteriellen Vaginose in der Schwangerschaft und dem späteren Auftreten des Morbus Parkinson zu erkennen ist.

Trotz des Gesundheitsrisikos, das mit Bakterieller Vaginose assoziiert ist, und der hohen Prävalenz bei Frauen im gebärfähigen Alter, wird dieses Krankheitsbild laut Sweet [62] im klinischen Alltag noch häufig übersehen, 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, sichere und preisgünstige Untersuchung ermöglichen. Ebenso schlagen Platz-Christensen et al. [49] aufgrund der ernsthaften Folgen vor, die Untersuchung auf BV während der Schwangerschaft als Routineuntersuchung in antenatalen Zentren einzuführen.

Aufgrund der Risiken und Komplikationen, die als Folge der nicht rechtzeitigen Diagnose und Therapie der Bakteriellen Vaginose auftreten können, ist nicht nur die Diagnosestellung, sondern auch eine richtige frühzeitige Therapie außerordentlich wichtig. Da bisher allerdings die genauen Ursachen noch nicht geklärt werden konnten, ist es schwierig ein optimales Therapieschema zu erstellen. Die Problematik ist laut Reid et al. [51] außerdem, dass Frauen oft eine Selbstdiagnose stellen und den Ausfluss als eine Pilzinfektion deuten, welche sie dann eigenständig mit so genannten „over-the-counter“ Antimykotika therapieren. Das kann das Krankheitsbild verschlimmern und die Vaginalflora noch mehr zerstören.

Es gibt Ansätze mit verschiedenen Antibiotika, die in der Behandlung der BV eingesetzt werden, im Besonderen Metronidazol und Clindamycin [57,68]. Laut „The Centers for Disease Control and Prevention“ werden zurzeit außerhalb der Schwangerschaft folgende Behandlungsschemata empfohlen: Metronidazol oral 2 x 500 mg pro Tag für 5–7 Tage, 2%ige Clindamycin-Creme 1 Applikation pro Tag intravaginal für 7 Tage oder Metronidazol-Gel 1-2 Applikationen pro Tag für 5 Tage

[71]. Vergleichbare Ergebnisse werden mit einer einmaligen Gabe von 2 g Metronidazol oral oder mit 2 x 2g Metronidazol oral im Abstand von 48 Stunden erzielt [73].

Ein weiterer Aspekt ist, dass erst der Verlust der Laktobazillen zur Manifestation führt. Aufgrund dieser Überlegung wurden mehrere Studien durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit vaginalen Laktobazillen als probiotische Therapie Erfolg bringen würde. So waren Therapieversuche, die zu einer Rekolonisation der Laktobazillen führten, entweder per Joghurt oder in Form von Kapseln verabreicht, als positiv zu werten [70].

Auch Famularo et al. [21] erachten die unterstützende Gabe von Laktobazillen als sinnvoll. Allerdings sind solche mit einer erhöhten Aktivität von „Arginindeiminase“ gegenüber denen, die nur Wasserstoffperoxid produzieren, vorzuziehen.

Als einen Erfolg bezeichnet Taylor-Robinson [66] den Versuch der Behandlung der Bakteriellen Vaginose durch die Gabe exogener Laktobazillen, wodurch eine Rekolonisation erreicht werden soll. Dies ist allerdings im Weiteren noch genauer zu untersuchen.

Es gibt zahlreiche Wege und Kriterien das Krankheitsbild der BV zu diagnostizieren. Aufgrund dessen wäre die Erarbeitung von Richtlinien sinnvoll, um sowohl Diagnosestellung als auch Therapieschemata zu standardisieren. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse gilt aus therapeutischer Sicht Metronidazol nach wie vor als das Mittel der Wahl. Eine begleitende Therapie mit Laktobazillen zur Stabilisierung der Mikroflora erscheint sinnvoll, bedarf aber noch weiteren Untersuchungen.

So konnten wir in unserer Studie keine statistisch signifikanten Veränderungen in Patientengruppe im Vergleich zu asymptomatischen Frauen sowohl für die T_H1-vermittelten Zytokine IL-6 (p = 0,782807) und IL-12 (p = 0,671506) als auch für das Zytokin vom T_H2-Typ IL-10 (p = 0,389744) feststellen. Diesen Ergebnissen zufolge scheint zum jetzigen Zeitpunkt eine immun-modulatorische Therapieform den Patientinnen keinen Benefit zu bringen.

6. Zusammenfassung

Die Bakterielle Vaginose stellt in der gynäkologischen Infektiologie nach wie vor eine der häufigsten Erkrankungen der Vagina dar. Die auftretenden Symptome wie gräulich homogener Fluor vaginalis oft verbunden mit fischartigem Geruch sind für die Patientinnen sehr belastend und werden nicht selten aufgrund fehlender Diagnosestellung nicht gezielt behandelt.

Bis jetzt konnten die der Bakteriellen Vaginose zugrunde liegenden Ursachen noch nicht hinreichend geklärt werden. Um die immunmodulatorischen Effekte zu untersuchen, die mit den Veränderungen der vaginalen Mikroflora im Sinne der Bakteriellen Vaginose assoziiert sind, und in Hinblick auf mögliche neue sowohl therapeutische als auch diagnostische Ansätze, bestimmten wir bei insgesamt 81 nicht schwangeren Frauen die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und IL-12 und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 im Vaginalsekret mittels Elisa. Wir untersuchten 45 Patientinnen im Durchschnittsalter von 30,0 Jahren mit der klinischen Diagnose Bakterielle Vaginose und 36 asymptomatische Frauen im Durchschnittsalter von 33,7 Jahren.

Interleukin-6 und IL-12 werden über die Immunantwort vom T_H1-Typ vermittelt und zählen zu den pro-inflammatorischen Zytokinen, während Interleukin-10 hingegen ein T_H2-vermittelter anti-inflammatorischer Immunmediator ist. Ziel war die Beurteilung der Rolle der zellvermittelten Immunität beim Krankheitsbild der BV.

Die Auswertungen unserer Messergebnisse zeigten weder für die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 ($p = 0,782807$) und IL-12 ($p = 0,671506$) noch für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 ($p = 0,389744$) einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die für die BV-typischen diagnostischen Marker, wie beispielsweise der pH-Wert, waren statistisch signifikant ($p < 0,0001$) verändert. Für die Aminprobe ließen sich in der Patientengruppe 42 / 45 positive Ergebnisse finden, während in der Kontrollgruppe 0 / 36 positiv waren.

Anhand unserer Ergebnisse scheint die lokale Immunität zumindest in Bezug auf die von uns bestimmten Zytokine bei der Bakteriellen Vaginose eine untergeordnete Rolle zu spielen. Demzufolge lassen sich kaum Anhaltspunkte erkennen, aufgrund derer neue therapeutische Ansätze im Sinne einer Immuntherapie als effektiv zu sehen wären. So gilt eine Behandlung mit Metronidazol oder Clindamycin weiterhin

als Mittel der Wahl, eine begleitende Therapie mit Laktobazillen zur Stabilisierung der Mikroflora wäre zu überlegen.

Bei Frauen, die an BV erkrankt sind, kommt es vermehrt zu Komplikationen sowohl während der Schwangerschaft, wie ein Spontanabort oder eine Frühgeburt, als auch bei nicht schwangeren Frauen, wie eine Adnexitis oder Endometritis. Aufgrund dessen, dass das Krankheitsbild der Bakteriellen Vaginose möglicherweise in direktem Zusammenhang mit solchen Komplikationen steht, ist die Forschung auf dem Gebiet der BV notwendig und sinnvoll. Es wäre wichtig, Richtlinien für eine schnelle und sichere Diagnosestellung zu erarbeiten, um eine höhere therapeutischen Effektivität zu erreichen.

7. Anhang

7.1. Geräte

3ml-Einmalspritzen	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, Adad S.J., De Lima R.V., Sawan Z.T., Silva M.L., De Souza M.A., Saldanha J.C., Falco V.A., Da Cunha A.H., Murta E.F.: Frequency of Trichomonas vaginalis, Candida sp and Gardnerella vaginalis in cervical-vaginal Smears in four different decades. Sao Paulo Med J 119, pp. 200-205 (2001).
- 2, Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A., Chen K.C., Eschenbach D., Holmes K.K.: Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am J Med 74, pp. 14-22 (1983).
- 3, Antonio M.A.D., Hillier S.L.: DNA fingerprinting of Lactobacillus crispatus strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. J Clin Microbiol 41, pp. 1881-1887 (2003).
- 4, Avonts S., Sercu M., Heyerick P., Vandermeeren I., Meheus A., Piot P.: Incidence of uncomplicated genital infections in women using oral contraception or an intrauterine device: a prospective study. Sex Transm Dis 17, pp. 23-29 (1999).
- 5, Bates S.: Vaginal discharge. Curr Opin Obstet Gynecol 13, pp. 218-223 (2003).
- 6, 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 10, pp. 181-186 (2002).
- 7, Bühling K.J., Friedmann W.: Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe. Urban & Fischer Verlag München – Jena (2004).

- 8, Bump R., Buesching B., III W, Bacterial vaginosis in virginal and sexually active adolescent females: evidence against exclusive sexual transmission. *Am J Obstet Gynecol* 158, pp. 935-939 (1988).
- 9, Carvey P.M., Chang Q., Lipton J.W., Ling Z.: Prenatal exposure to the bacteriotoxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: a potential, new model of Parkinson's disease. *Front Biosci* 8, pp. S826-S837 (2003).
- 10, Cauci S., Guaschino S., Driussi S., De Santo D., Lanzafame P., Quadrifoglio F.: Correlation of Local Interleukin-8 with Immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* Hemolysin and with Prolidase and Sialidase Levels in Women with Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis* 185, pp. 1614-1620 (2002).
- 11, Cauci S., Monte R., Driussi S., Lanzafame P., Quadrifoglio F.: Impairment of the mucosal immune system: IgA and IgM cleavage detected in vaginal washings of s subgroup of patients with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 178, pp. 1698-1706 (1998).
- 12, CDC: Non-reported sexually transmissible diseases – United States. *MMWR* 28, pp. 61-63 (1979).
- 13, Chernoff A.E., Granowitz E.V., Shapiro L., Vannier E., Lonnemann G., Angel J.B., Kennedy J.S., Rabson A.R., Wolff S.M., Dinarello C.A.: A randomized controlled trial of IL-10 in humans: Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 154, pp. 5492-5499 (1995).
- 14, Cherpes T.L., Meyn L.A., Krohn M.A., Lurie J.G., Sharon L.: Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 37, pp. 319-325 (2003).

- 15, Cohen C.R., Plummer F.A., Mugo N., Maclean I., Shen C., Bukusi E.A., Irungu E., Sinei S., Bwayo J., Brunham R.C.: Increased Interleukin-10 in the endocervical secretions of women with non-ulcerative sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission? *AIDS* 13, pp. 327-332 (1999).
- 16, Del Sero G., Mencacci A., Cenci E., D'Ostiani C.F., Montagnoli C., Bacci A., Mosci P., Kopf M., Romani L.: Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. *Microbes Infect* 1, pp. 1169-1180 (1999).
- 17, De Lima Soares V., De Mesquita A.M.T.S., Cavalcante F.G.T., Silva Z.P., Hora V., Diedrich T., De Carvalho Silva P., De Melo P.G., Dacal A.R.C., De Carvalho E.M.F., Feldmeier H.: Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: Prevalence, morbidity and risk factors. *Trop Med Int Health* 8, pp. 595-603 (2003).
- 18, De Waal Malefyt R., Yssel H., Roncarolo M.G., Spits H., de Vries J.E.: Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 4, pp. 314-320 (1992).
- 19, Donders G.G.G., 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* 109, pp. 34-43 (2002).
- 20, Donders G.G., Van Bulck B., Caudron J., Londers L., Vereecken A., Spitz B.: Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 183, pp. 431-437 (2000).
- 21, Famularo G., Pieluigi M., Coccia R., Mastroiacovo P., De Simone C.: Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. *Med Hypotheses* 56, pp. 421-430 (2001).
- 22, Filler S.G., Pfunder A.S., Spellberg B.J., Edwards J.E. Jr.: *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* 64, pp. 2609-2617 (1996).

- 23, Hill G.B.: The microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 169, pp. 450-454 (1993).
- 24, Hollier L., Rivera M., Promecene P., Mastrobattista J., Gilstrap L.: Type-1 and type-2 cytokines in bacterial vaginosis during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 189, pp. S99 (2003).
- 25, Hussey J., Edirisinghe D.N., Pattman R.S., Sankar K.N., Wipat W., Kearns A., Turner A.J.L.: Does bacterial vaginosis alter the sensitivity of screening tests for *Chlamydia trachomatis*? An analysis of patient characteristics. *Int J STD AIDS* 14, pp. 448-450 (2003).
- 26, Ibelgaufts H.: *Lexikon Zytokine*. Medikon Verlag München (1992).
- 27, Imseis H.M., Greig P.C., Livengood III C.H., Shunior E., Durda P., Erikson M.: Characterization of the Inflammatory Cytokines in the Vagina During Pregnancy and Labor and With Bacterial Vaginosis. *J Soc Gynecol Investig* 4, pp. 90-94 (1997).
- 28, Janeway C.A., Travers P.: *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag – Heidelberg Berlin Oxford (1997).
- 29, Kaneko T., Kubota T., Takada M., Oguri T.: Colonization rates of *Mobiluncus* spp. in female lower genital tract and its relationship with bacterial vaginosis. *Kansenshogaku Zasshi* 66, pp. 382-389 (1992).
- 30, Keane F., Ison C., Taylor-Robinson D.: A longitudinal study of the vaginal flora during the menstrual cycle. *Int J STD AIDS* 8, pp. 489-494 (1997).
- 31, Keane F.E.A., Ison C.A., Taylor-Robinson D.: A longitudinal study of the vaginal flora during the menstrual cycle of healthy female volunteers. *Int J STD AIDS* 8, p. 10 (1997).

- 32, Kiniwa M., Gately M., Gubler U., Chizzonite R., Fargeas C., Delespesse G.: Recombinant Interleukin-12 suppresses the synthesis of Immunoglobulin E by Interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 90, pp. 262-266 (1992).
- 33, Kramer M.D.: *Immunologie und Immunpathologie*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1997).
- 34, Küster H., Weiss M., Willeitner A.E., Detlefsen S., Jeremias I., Zbojan J., Geiger R., Lipowsky G., Simbruner G.: Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* 352, pp. 1271-1277 (1998).
- 35, Larsson P.G., Platz-Christensen J.J.: Bacterial vaginosis and the vaginal leucocyte/epithelial cell ratio in women attending an outpatient gynaecology clinic. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 42, pp. 217-220 (1991).
- 36, Larsson P.G., Platz-Christensen J.J.: Enumeration of clue cells in rehydrated air-dried vaginal wet smear for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 76, pp. 727-730 (1990).
- 37, Larsson P., Platz-Christensen J., Sundstrom E.: Is bacterial vaginosis a sexually transmitted disease? *Int J STD AIDS* 2, pp. 362-364, (1991).
- 38, Mardh P.A.: The definition and epidemiology of bacterial vaginosis. *Rev Fr Gynecol Obstet* 88, pp. 195-197 (1993).
- 39, Mardh P.A.: Bacterial vaginosis: a threat to reproductive health? Historical perspectives, current knowledge, controversies and research demands. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 5, pp. 208-219 (2000).
- 40, Martius G., Breckwoldt M., Pfeleiderer A.: *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe*. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1996).

- 41, Mattsby-Baltzer I., Platz-Christensen J.J., Hosseini N., Rosén 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* 77, pp. 701-706 (1998).
- 42, McCaffrey M.: Bacterial vaginosis: A review of etiological factors and effects on fertility. *Symposia-The Art of Peeling S031*, p.12.
- 43, McGregor J.A., French J.I., Jones W., Milligan K., McKinney P.J., Patterson E., Parker R.: Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamycin cream. *Am J Obstet Gynecol* 170, pp. 1048-1060 (1994).
- 44, Moodley P., Connolly C., Sturm A.W.: Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. *J Infect Dis* 185, pp. 69-73 (2002).
- 45, Morris M., Nicoll A., Simms I., Wilson J., Catchpole M.: Bacterial vaginosis: a public health. *BJOG* 108, pp. 439-450 (2001).
- 46, Munoz Bellido J.L., Garcia Sanchez J.E., Garcia-Rodriguez J.A.: Epidemiological factors and vaginal flora changes in vaginal bacteriosis (bacterial vaginosis). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 10, pp. 340-344 (1992).
- 47, Myziuk L., Romanowski B., Johnson S.C.: BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 41, pp. 1925-1928 (2003).
- 48, Nillson U., Hellberg D., Shoubnikova M., Nillson S., Mardh P.: Sexual risk behaviour associated with bacterial vaginosis and Chlamydia trachomatis infection. *Sex Transm Dis* 24, pp. 241-246 (1997).
- 49, Platz-Christensen J.J., Pernevi P., Hagmar B., Andersson E., Brandberg A., Wiqvist N.: A longitudinal follow-up of bacterial vaginosis during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72, pp. 99-102 (1993).

- 50, Puccetti P., Romani test L., Bistoni F.: A Th₁-Th₂-like switch in Candidiasis: New perspectives for therapy. *Trends Microbiol* 3, pp. 237-240 (1999).
- 51, Reid G., Bocking A.: The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 189, pp. 1202-1208 (2003).
- 52, Rogge L., Barberis-Maino L., Biffi M., Passini N., Presky D.H., Gubler U., Sinigaglia F.: Selective expression of an Interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 185, pp. 825-831 (1997).
- 53, Roitt I.M.: *Leitfaden der Immunologie*. Blackwell Wissenschaft – Berlin (1993).
- 54, Schoel B., Kaufmann S.H.E.: The unique role of heat shock proteins in infections. In: *Stress Proteins In Medicine*, edited by van Eden W., Young DB. Marcel Dekker, Inc., New York – Basel – Hong Kong, 1996, pp. 27-52.
- 55, Shaio M.F., Lin P.R., Liu J.Y., Yang K.D.: Generation of Interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. *Infect Immun* 63, pp. 3864-3870 (1995).
- 56, Shoubnikova M., Hellberg D., Nilsson S., Mardh P.: Contraceptive use in women with bacterial vaginosis. *Contraception* 55, pp. 355-358 (1997).
- 57, Sobel J.D.: Bacterial vaginosis. *Br J Clin Pract Suppl* 71, pp. 65-69 (1990).
- 58, Sobel J.D.: Genital Candidiasis. In: Bodey G.P.: *Candidiasis – Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*, Second Edition, Raven press, New York 1993.
- 59, Soper D.E.: Gynecologic Complications of Bacterial Vaginosis: Fact or Fication? *Curr Infect Dis Rep* 1, pp. 393-397 (1999).

- 60, Spandorfer S.D., Neuer A., Giraldo P.C., Rosenwaks Z., Witkin S.S.: Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. *J Reprod Med* 46, pp. 806-810 (2001).
- 61, Strassmann G., Patil-Koota V., Finkelmann F., Fong M., Kambayashi T.: Evidence for the involvement of Interleukin-10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E₂. *J Exp Med* 180, pp. 2365-2370 (1994).
- 62, Sweet R.L.: Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. *Infect Dis Obstet Gynecol* 8, pp. 184-190 (2000).
- 63, Szabo G., Girouard L., Mandrekar P., Catalano D.: Regulation of monocyte IL-12 production: augmentation by lymphocyte contact and acute ethanol treatment, inhibition by elevated intracellular cAMP. *Int J Immunopharmacol* 20, pp. 491-503 (1998).
- 64, Szabo S.J., Dighe A.S., Gubler U., Murphy K.M.: Regulation of the Interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th₁) and Th₂ cells. *J Exp Med* 185, pp. 817-824 (1997).
- 65, Taylor E., Barlow D., Blackwell A.L., Phillips I.: *Gardnerella vaginalis*, anaerobes, and vaginal discharge. *Lancet* 319, pp. 1376-1379 (1982).
- 66, Taylor-Robinson D.: The future of bacterial vaginosis-related research. *Int J Gynaecol Obstet* 67, pp. 35-38 (1999).
- 67, Taylor-Robinson D: Bacterial vaginosis-Pathogenesis and the importance. *Symposia-Genital Candida and Anaerobes S030*, pp.11-12.
- 68, Thomason J.L., Gelbart S.M., Broekhuizen F.F.: Advances in the understanding of bacterial vaginosis. *J Reprod Med* 34, pp. 581-586, discussion pp. 586-587 (1989).

- 69, Trinchieri G.: Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13, pp. 251-276 (1995).
- 70, Van Kessel K., Assefi N., Marrazzo J., Eckert L.: Common complementary and alternative therapies for yeast vaginitis and bacterial vaginosis: A systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 58, pp. 351-358 (2003).
- 71, Wang J.: Bacterial vaginosis. *Prim Care Update for OB/GYNS* 7, pp. 181-185 (2000).
- 72, Weissenbacher E.R.: *Fluorpraktikum*. 4.Auflage, Medifact Verlag - München (2001).
- 73, Weissenbacher E.R.: *Infektiologische Empfehlungen und Leitlinien zur Diagnostik und Therapie in Gynäkologie und Geburtshilfe*. 3. Auflage, Medifact Verlag – München (2002).
- 74, Wennerholm U.B., Holm B., Mattsby-Baltzer I., Nielsen T., Platz-Christensen J.J., Sundell G., Hagberg H.: Interleukin-1alpha, interleukin-6 and interleukin-8 in cervico/vaginal secretion for screening of preterm birth in twin gestation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77, pp. 508-514 (1998).
- 75, West B., Morison L., Van Der Loeff M.S., Gooding E., Awasana A.A., Demba E., Mayaud P.: Evaluation of a new rapid diagnostic kit (FemExam) for bacterial vaginosis in patients with discharge syndrome in the Gambia. *Sex Transm Dis* 30, pp. 483-489 (2003).
- 76, Wilson M., Seymore R., Henderson B.: Bacterial Perturbation of Cytokine Networks. *Infect Immun* 66, pp. 2401-2409 (1998).

- 77, Yudin M.H., Landers D.V., Meyn L., Hillier S.L.: Clinical and cervical cytokine response to treatment with oral or vaginal metronidazole for bacterial vaginosis during pregnancy: a randomized trial. *Obstet Gynecol* 102, pp. 527-534 (2003).

- 78, Zariffard R.M., Saifuddin M., Sha B.E., Spear G.T.: Detection of bacterial vaginosis – related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, pp. 277-281 (2002).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Frauenklinik des Klinikums Großhadern, München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E.R. Weissenbacher danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die hilfreiche und stetige Unterstützung und eingehende Beratung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen.

Herrn Prof. Dr. H. Spitzbart möchte ich für die fachliche Betreuung sowie für die stets freundliche Zusammenarbeit danken.

Frau Dr. V. Tolbert gilt mein Dank für die praktische Unterweisung und die freundschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Außerdem habe ich Herrn Dr. M. Unterhalt für die wertvolle Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung zu danken.

Für die Geduld und Hilfe gilt mein besonderer Dank Herrn T. Weissenbacher, der mir bei auftretenden Problemen und Schwierigkeiten jederzeit hilfreich zur Seite stand.

Lebenslauf

Zur Person:

Vorname: Claudia
Nachname: Walter
Geburtsdatum: 24. September 1976
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Wohnort: Marbachstr. 4
81369 München

Ausbildung:

1987 – 1996 Theresien-Gymnasium München
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

November 1996 –
Mai 2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

August 1998 Ärztliche Vorprüfung

August 1999 1. Staatsexamen

März 2002 2. Staatsexamen

Mai 2003 3. Staatsexamen

Famulaturen:

Oktober 1999 Famulatur in der Neurologie am Behandlungszentrum für Multiple Sklerose, Kempfenhausen.

März – April 2000 Famulatur in der Anästhesie im Portiuncula Hospital in Ballinasloe, Irland.

August – September 2000 Praxis-Famulatur in der Orthopädischen Gemeinschaftspraxis Dres. Schmidt, Münch, Mayr, München

Praktisches Jahr:

April - August 2002 1. Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie im Krankenhaus München-Harlaching

August – November 2002 2. Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin (Kardiologie) im Krankenhaus München-Harlaching

November 2002 - März 2003 3. Tertial des Praktischen Jahres in der Anästhesie im Klinikum Traunstein

Seit 01.04.2004 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München