

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

**Nachweis von Interleukin-1 α , Interleukin-1 β , Interleukin-5 und Interleukin-10 im
vaginalen Abstrich von gesunden Frauen**

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

vorgelegt von
Juliette-Christin Miriam Schmid-Lossberg
aus
München

2010

...

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Tina Buchholz

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. habil. H. Spitzbart
Dr. G. Anton

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2010

meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	5
1.1. Einleitung.....	5
1.2. Fragestellung.....	15
2. Material und Methode	16
2.1. Material.....	16
2.1.1. Patientinnen	16
2.1.1.1. Gesunde Patientinnen	16
2.1.1.2. Patientinnen mit bakterieller Vaginose	16
2.2. Methode	17
2.2.1. Vaginalabstriche.....	17
2.2.2. Amintest.....	17
2.2.3. pH-Wert	18
2.2.4. Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und IL-10.....	18
2.2.4.1. Reagenzien zur Bestimmung der Zytokine	18
2.2.4.2. Herstellung der Standardverdünnungsreihe	19
2.2.4.2.1. Humanes IL-1 α -Standard	19
2.2.4.2.2. Humanes IL-1 β -Standard	19
2.2.4.2.3. Humanes IL-5-Standard	20
2.2.4.2.4. Humanes IL-10-Standard	20
2.2.4.3. Streptavidin-Peroxidase (IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-10).....	21
2.2.4.4. Gepufferte Waschlösung (IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-10).....	21
2.2.4.5. Durchführung	21
2.2.4.6. Auswertung der Messergebnisse	23
2.2.4.6.1. Interleukin-1 α und Interleukin-1 β	23
2.2.4.6.2. Interleukin-5	27
2.2.4.6.3. Interleukin-10	28
3. Statistische Auswertung.....	29
4. Ergebnisse	30
4.1. Deskriptive Statistik der Interleukine bei Gesunden.....	30
4.2. Deskriptive Statistik der Interleukine bei Kranken.....	31
4.3. Deskriptive Statistik der einzelnen Interleukine	32
4.3.1. Interleukin-1 α	32
4.3.2. Interleukin-1 β	34
4.3.3. Interleukin-5	36
4.3.4. Interleukin-10	37
4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse für IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und IL-10.....	39
4.5. Häufigkeitsverteilung bei Gesunden und Kranken.....	39
4.6. Paarweise Korrelationen	44
5. Diskussion.....	46

6. Zusammenfassung	55
7. Literaturverzeichnis	57
8. Anhang	63
9. Danksagung	64
10. Lebenslauf	65

Abkürzungen

Anti-Gvh	anti-Gardnerella vaginalis hemolysin
APC	antigenpräsentierende Zellen
BV	Bakterielle Vaginose
bp	Basenpaare
CMI	Zellvermittelte Immunität
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay
FFN	Fetales Fibronectin
h-IL	humanes Interleukin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
Hsp	Hitzeschockprotein
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
INF-gamma	Interferon-gamma
IQR	Interquartilsabstand
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LAK	Lymphokin-aktivierte-Killerzellen
ml	Milliliter
n	Fallzahl
µl	Mikroliter
NK	Natural-Killer-Zellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
pg	Pikogramm
PGE ²	Prostaglandin E ²
RHG	Reinheitsgrad
rpm	rounds per minute
SSW	Schwangerschaftswoche

TMB

Tetramethylbenzidin

TNF-alpha

Tumornekrosefaktor-alpha

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

Die Vaginalflora einer Frau wird als eine natürlich vorhandene mikrobielle Besiedelung der Vagina bezeichnet. Verschiedene Arten der Laktobazillen bilden die so genannten Döderlein-Bakterien, die ein Teil der natürlichen Scheidenflora der Frau sind. Unter normalen Bedingungen befinden sich in der Flora bis zu 95% Laktobazillen, am häufigsten vertreten sind die für die Bildung von H_2O_2 verantwortlichen *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii* und *L. gasseri* [1-5]. Da die natürliche, mikrobielle Besiedelung von Frau zu Frau sehr stark variieren kann, wird für die Bewertung der vaginalen Flora der Nugent-Score herangezogen.

Zu den Hauptfunktionen der Döderlein-Bakterien zählt zum einen die Erfüllung einer Platzhalterfunktion, indem sie mit ihrer Kolonisationsresistenz ein Wachstum anderer schädlicher Keime verhindern. Zudem zählt man das durch Laktobazillen produzierte H_2O_2 zu den wichtigsten Verbindungen der vaginalen Abwehr. Durch deren Interaktion mit Peroxidasen werden Oxidantien gebildet, die für viele Bakterien toxisch wirken [6]. Zusätzlich sind Laktobazillen für die Aufrechterhaltung des sauren Scheidenmilieus verantwortlich. Die Ansäuerung wird unter dem Einfluss von Östrogenen und Gestagenen hervorgerufen. Sie stellen aus der Glucose, welche aus den Epithelzellen der Vagina gewonnen wurden, Milchsäure her, wodurch eine Ansäuerung des Scheidenmilieus hervorgerufen wird. Der niedrige Scheiden-pH von 3,8-4,5 bietet einen effektiven Schutz vor vaginalen Infektionen, da eine Vielzahl von pathogenen Keimen unter diesen Bedingungen nicht gedeihen kann.

Die normale Vaginalflora ist von großer Bedeutung für den Schutz vor vaginalen Infektionen durch pathogene, genitale Keime, zu denen man auch HIV zählt.

Wird die physiologische Laktobazillenpopulation durch anaerobe Bakterien wie z.B. *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus species*, *Prevotella species* und anderen Anaerobiern [7-14] verdrängt, kommt es zu einer verminderten Milchsäureproduktion. Unabhängig von der Klinik kommt es zu einer

Alkalisierung des Scheidenmilieus, welches wiederum ein ideales Milieu für die Besiedelung mit opportunistischen Keimen bietet.

Zu den weltweit häufigsten Erkrankungen des Urogenitaltraktes bei gebärfähigen [15, 16] Frauen gehört neben Infektionen mit *Candida albicans* und Trichomonaden [17] die bakterielle Vaginose (BV) mit einer Prävalenz von 9-37% je nach untersuchter Population [18, 19]. Durch diese Erkrankungen werden schwerwiegende Komplikationen sowohl bei schwangeren, als auch bei nicht schwangeren Frauen hervorgerufen, wodurch eine frühzeitige Erkennung der Erkrankung von Nöten ist. Die momentane Diagnostik wird jedoch durch den zu 50% asymptomatischen Krankheitsverlauf deutlich erschwert [21], zumal die Pathogenese dieser Krankheit noch nicht vollständig geklärt ist.

Ein wichtiger Gesichtspunkt der Pathogenese der BV ist die Verminderung vaginaler Laktobazillen. Eine Kohortenstudie über 182 Frauen, die in einer Klinik in Amerika im urogenitalen Bereich behandelt wurden, bewies, dass der Erwerb einer BV mit einem Mangel an H_2O_2 – produzierenden Laktobazillen assoziiert ist (HR 4.0, $P < 0,001$). Dieser Zusammenhang konnte bei Frauen mit einer *Candida*- oder Trichomonadeninfektion nicht nachgewiesen werden [22].

Die Bakterien der BV sind durch die Produktion der Enzyme Decarboxylase und Aminopeptidase in der Lage, Aminosäuren und andere Verbindungen zu Aminen umzuwandeln [11, 12], welche für den typischen, fischähnlichen Geruch des Fluors bei BV verantwortlich sind. Dieser Vorgang, kombiniert mit der fehlenden Bildung von Milchsäure durch die verringerte Anzahl an Laktobazillen, bewirkt eine Alkalisierung des vaginalen pH und einen starken Ausfluss [11, 12].

Wenn Symptome vorhanden sind, handelt es sich meistens um einen fischähnlich riechenden Ausfluss [12-14], seltener um Juckreiz, vaginales Brennen [23, 24] und dadurch bedingte Dyspareunie. Allerdings kann sich die BV auch mit einer Vielzahl von atypischen Symptomen, verursacht durch ein Ungleichgewicht der normalen Vaginalflora, manifestieren.

Es existieren eine Vielzahl von Risikofaktoren, die mit Hilfe von Studien belegt wurden [23]:

- Schwarze Hautfarbe
- Rauchen
- Sexualverkehr bereits in sehr frühem Alter [25]
- Oraler Sex
- Neuer oder viele verschiedene Sexualpartner
- Häufige Intimpflege [26]
- Sex während der Menstruation
- Sexuelle Aktivitäten unter Frauen

Bakterielle Vaginose betrifft dreimal so häufig Frauen aus einer schwarzen Bevölkerung, als aus einer Weißen [7, 27, 28]. In Verbindung mit diesen Ergebnissen kann vielleicht auch die vermehrte Frühgeburtlichkeit und das geringe Geburtsgewicht von Neugeborenen bei schwarzen Frauen erklärt werden [29].

Ein signifikanter Zusammenhang mit BV besteht bei Frauen, die ein Intrauterinpeessar verwenden [30-33].

Auch verschiedene sexuelle Verhaltensweisen, zu denen oraler Sex, häufiger Wechsel von Geschlechtspartnern [25, 30, 34], Geschlechtsverkehr während der Menstruation und Sexualität unter Frauen zählen, gelten als Risikofaktoren [29, 35-37]. Als sexuell übertragbare Krankheit wird die bakterielle Vaginose jedoch nicht bezeichnet, da es durchaus erkrankte Frauen gibt, die noch nie vaginalen Geschlechtsverkehr hatten. 2003 wurde in Amerika eine Studie über Frauen durchgeführt, die dem amerikanischen Militär beitreten wollten. 27% dieser Frauen waren an BV erkrankt, darunter waren 28% der Frauen mit sexueller und 18% der Frauen ohne sexueller Erfahrung [38]. Allerdings konnte weder in dieser Studie, noch in der Studie von Gutmann 2005 [27] ein Zusammenhang zwischen bereits in der Krankengeschichte vorkommenden sexuell-übertragbaren Krankheiten und einer erhöhten Prävalenz von bakterieller Vaginose festgestellt werden.

Die Ursachen für die Erkrankung mit bakterieller Vaginose sind derzeit noch nicht geklärt [9, 11, 24, 34]. Jedoch gibt es einen Ansatzpunkt, der hormonelle Schwankungen während des Menstruationszyklus mit mikrobiologischen Veränderungen in der Vagina assoziiert [4, 8, 39]. Meistens kommt es kurz nach der Menstruation, wenn der Östradiolspiegel am höchsten ist, zur Erkrankung. Diese These wird auch durch die Feststellung unterstützt, dass kaum präpubertäre Mädchen oder postmenopausale Frauen an bakterieller Vaginose erkranken [4, 8].

Die Diagnose der BV erfolgt in der Praxis am häufigsten anhand der Amsel Kriterien, von denen mindestens drei positiv sein müssen [30]:

- typischer grau-weißer, homogener Ausfluss
- vaginaler pH-Wert $> 4,5$ [12]
- positiver Amintest (Whiff-Test): Geruchsverstärkung (typischer Fischgeruch) bei Zugabe von 10%iger KOH-Lösung zum Fluor
- mikroskopischer Nachweis von Schlüsselzellen (clue cells)

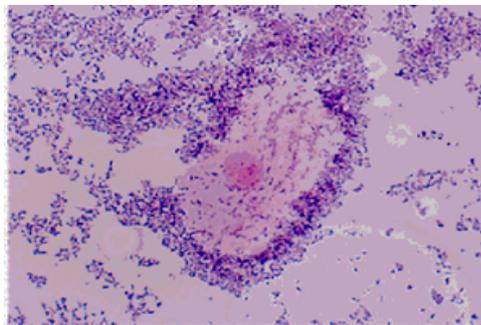


Abbildung 1: Schlüsselzellen [40]

Die Schlüsselzellen entstehen als Folge einer Desquamation durch bakterielle Zytotoxine. Diese beschädigten Plattenepithelzellen werden mit vielen Bakterien, vor allem *Gardnerella vaginalis*, besetzt und als „clue cells“ bezeichnet [11].

Alternativ kann die Differentialdiagnose von vaginalen Infektionen durch die mikroskopische Untersuchung des Abstrichpräparates nach Gram-Färbung gestellt werden.

Diese sollte aber nach eindeutigen Kriterien nach Spiegel oder Nugent beurteilt werden [41, 42]. Dabei wird die durchschnittliche Anzahl von Laktobazillen, von *Gardnerella vaginalis* und von Anaerobiern, vor allem *Bacteroides* spp. , *Mobiluncus* spp. , pro Gesichtsfeld bestimmt. Diese Methode wird von vielen als Goldstandard der Diagnostik von BV bezeichnet. Die Interpretation von Grampräparaten ist jedoch sehr zeitaufwendig und benötigt ein gewisses Maß an Erfahrung, weshalb sie für eine tägliche Diagnostik nur selten herangezogen wird.

Kulturuntersuchungen hinsichtlich *Gardnerella vaginalis* und *Candida* spp. sind einerseits hoch sensitiv, können andererseits nicht für die Diagnose der bakteriellen Vaginose empfohlen werden, da es einen hohen Anteil von Frauen gibt, die zwar in der Kultur positive Befunde bezüglich *G. vaginalis* aufweisen, ansonsten völlig asymptomatisch sind. Diese Frauen haben keine Infektion sondern eine physiologische Besiedelung und sind daher nicht behandlungsbedürftig. Folge dessen besteht die Notwendigkeit einer einfachen und unkomplizierten Methode der Diagnostik, die in der Klinik jederzeit anwendbar ist [27]. Ein alleiniger Nachweis von *Gardnerella vaginalis* im Vaginalabstrich ist nicht hinweisend auf eine BV, da *Gardnerella* auch bei gesunden Frauen in der Vaginalflora anzutreffen ist [14].

Die Untersuchung von Zervikalschleimhaut durch Papanicolauteests zur Diagnose von BV ist durch eine sehr niedrige Sensitivität gekennzeichnet [10]. Eine frühe und rechtzeitige Diagnose ist entscheidend für die Vermeidung folgender möglicher Komplikationen: Endometritis [12, 13, 43], nicht durch Gonokokken oder Chlamydien hervorgerufene Beckenbodenentzündung [44, 45] oder ein erhöhtes Risiko der Infizierung und Übertragung von HIV [16, 46-51] oder HSV-2 [16, 52].

Das Ungleichgewicht der normalen Scheidenflora und die damit verbundenen Zytokinverschiebungen sind häufig auch eine Ursache für idiopathische Infertilität [53].

In der Schwangerschaft ist BV oft assoziiert mit frühzeitigem Blasensprung [54], Chorioamnionitis [55, 56], Amnioninfektionssyndrom [57], vorzeitiger Wehentätigkeit [12, 58], Frühgeburtlichkeit [11, 16, 57-60] und postpartaler Endometritis [7, 10, 61-63].

Auch bei Kindern wurden postpartum Komplikationen dokumentiert. Bakteriämie, nekrotisierende Enterokolitis, hypoxische, ischämische Enzephalopathie und zerebrale Kinderlähmung, werden mit bakterieller Vaginose in Verbindung gebracht [64-67].

Die orale bzw. vaginale Antibiotikatherapie mit Metronidazol oder Clindamycin stellt das Mittel der Wahl dar und heilt die meisten Frauen. Allerdings ist zu beachten, dass es bei 1/3 der Patientinnen zu einer Spontanremission kommt.

Die Rezidivkrankung mit bakterieller Vaginose wird sehr häufig beobachtet [68]. Nicht selten kommt es zu rezidivierenden Episoden [8, 11] und die Wahrscheinlichkeit nach bereits erfolgter Therapie wieder an BV zu erkranken, ist dreifach erhöht [20]. Die hohe Anzahl an Rezidiven lässt sich damit erklären, dass die Behandlung der bakteriellen Vaginose mit Metronidazol die bakterielle Mikroflora nur kurzzeitig unterdrückt. Bereits kurz nach einer Therapie mit Metronidazol konnte wieder ein Biofilm vor allem der Leitkeime *Gardnerella Vaginalis*, als auch *Atopobium vaginae* festgestellt werden [69].

Neueste Forschungsergebnisse zeigen eine starke Assoziation von *Atopobium vaginae* (*A. vaginae*) mit BV [69-71]. *A. vaginae* wurde bis vor kurzem noch zu den Laktobazillen gezählt, da sich dieser Erreger mikroskopisch kaum von Laktobazillen unterscheiden lässt. *A. vaginae* konnte ausschließlich bei Patientinnen, die an BV erkrankt waren, festgestellt werden. Es zeigte sich eine Resistenz von *A. vaginae* gegenüber Metronidazol, da sich der bakterielle Biofilm durch dieses Chemotherapeutikum nicht beseitigen lässt [69, 72]. Damit wäre erklärt, warum nach der Therapie und einem anfänglich normalen Vaginal-pH, sowie Beschwerdefreiheit und unauffälligen Nativpräparaten bereits nach einigen Wochen bei über 60% der Frauen eine Rezidivkrankung auftritt.

Des Weiteren konnte *A. vaginae* nur selten ohne die Präsenz von *G. vaginalis* festgestellt werden. Bei Frauen, die mit beiden Erregern erkrankt waren, zeigte sich eine deutlich höhere Rezidivrate (83%) als bei Frauen, in deren Vaginalflora nur *G. vaginalis* nachweisbar war (38%) [71].

Im Hinblick auf die Vielzahl der Komplikationen der BV ist es wichtig, Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, deren Effektivität durch eine lang anhaltende Veränderung und Aufrechterhaltung des natürlichen, vaginalen Biofilms charakterisiert ist.

Ein ganz neuer Gesichtspunkt der Diagnostik ist der Immunstatus der Vagina. Hierbei stellt sich die Frage, ob bei BV-Veränderungen der lokalen Immunantwort in der Scheide vorliegen, die eine bessere und frühere Diagnose ermöglichen könnten, selbst, wenn die Frauen noch asymptomatisch sind. Über die lokale Immunantwort bei vaginalen Infektionen, zu denen man auch die BV zählt, ist noch nicht allzu viel bekannt. Eine offene Frage ist zum Beispiel, in wieweit das lokale Immunsystem in den Verlauf der Krankheit involviert ist, insbesondere wenn es sich um einen sichtbar symptomlosen Verlauf handelt. Laut momentanem Wissensstand ist die zellvermittelte Immunantwort hauptsächlich verantwortlich für die Abwehr von lokalen, bakteriellen Infektionen in der Vagina.

Beim Menschen werden zwei Abwehrmechanismen unterschieden. Ein Abwehrsystem stellt die natürliche, angeborene Resistenz dar, die auf den biologischen und chemischen Eigenschaften der Grenzflächenorgane, sowie auf dem unspezifischen Abwehrsystem beruht. Dabei unterscheidet man die unspezifische zelluläre Abwehr durch Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Natürlichen Killerzellen (NK) von der unspezifischen humoralen Abwehr mit Akute-Phase-Proteine, Komplementsystem und Gerinnung. Auch bei wiederholten Infektionen bleibt diese Form der Resistenz unverändert.

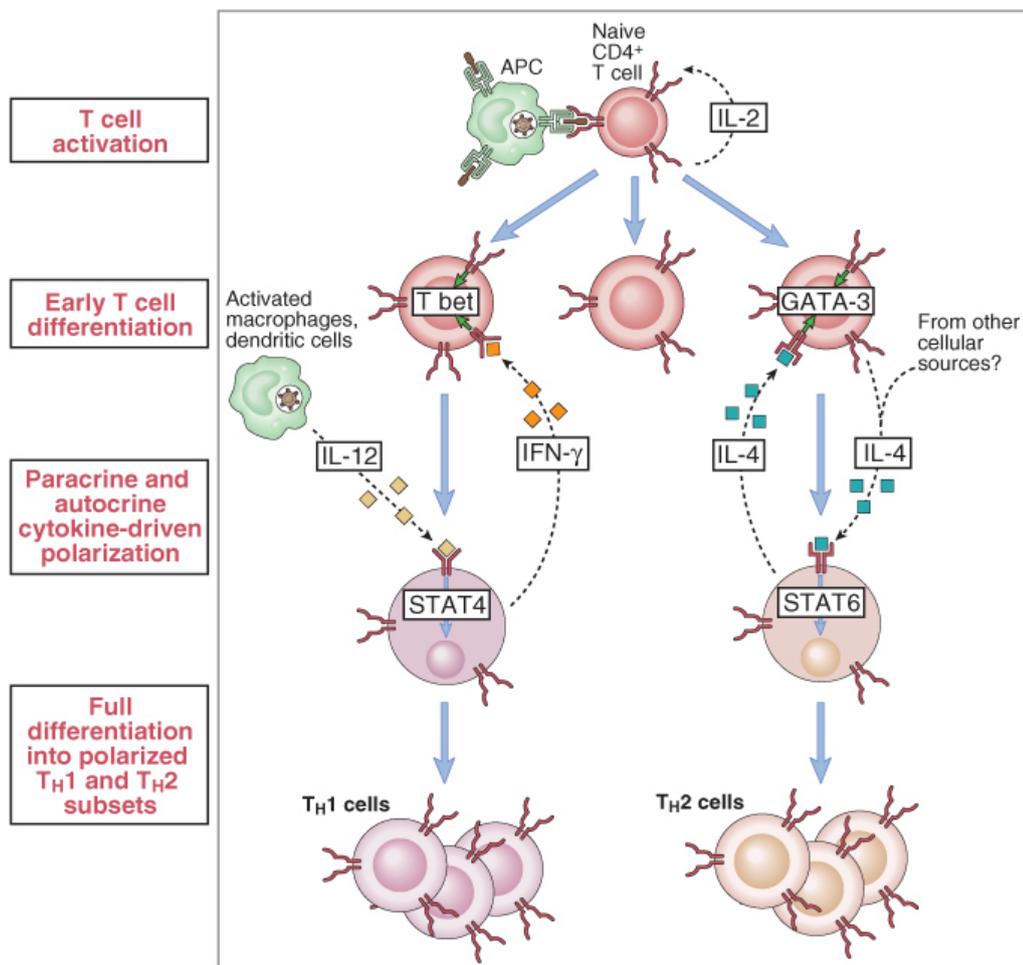
Hauptzellen der angeborenen Immunantwort sind die Phagozyten, deren Aufgabe es ist, Fremdzellen aufzunehmen und abzutöten. Viele Mikroorganismen haben Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen zu überleben und sich teilweise sogar in den Phagozyten zu vermehren, so dass es der natürlichen Immunabwehr nicht immer möglich ist, diese Fremdzellen zu eliminieren [73]. Genau in dieser Situation kommt es auf den zweiten Abwehrmechanismus des menschlichen Körpers an: die spezifische, erworbene Immunität. Dabei unterscheidet man zwischen der spezifischen zellulären Abwehr (T-Lymphozyten) und der spezifischen humoralen Abwehr (Immunglobuline). Die Resistenz wird nach wiederholten Infektionen verbessert. Im Zuge der spezifischen zellulären Abwehr (CMI) kommt es auf die Aktivierung der T-Lymphozyten an. Eine zentrale Rolle spielen die APC's, so genannte antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. Makrophagen und

dendritische Zellen. Deren Aufgabe ist es, Mikroorganismen aufzunehmen, zu den Lymphknoten zu transportieren und deren Antigene auf der Oberfläche zusammen mit HLA-Klasse-1, bzw. -2- Molekülen den T-Lymphozyten zu präsentieren. Durch die Bindung an ihre spezifischen Antigene werden T-Lymphozyten aktiviert und setzen Interleukine frei. Dieser Vorgang löst eine Entzündungsreaktion aus und beeinflusst die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten zu antigenspezifischen T-Lymphozyten [73-75]. Ein Teil dieser entwickelt sich zu Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Antigenkontakt zu einer schnelleren und stärkeren Immunreaktion führen können. Der andere Teil proliferiert zu Effektorzellen, differenziert zu zytotoxischen T-Killer-Zellen oder zu T-Helfer-Zellen.

Entscheidend für die T-zelluläre Abwehr bakterieller Infektionen sind native $CD4^+$ -T-Helferzellen der MHC-Klasse-2. Durch frühe Stimulatoren während der Immunantwort kommt es zu einer Differenzierung aus der nativen $CD4^+$ -Vorläuferzelle in Subpopulationen von T_H1 - und T_H2 -Typ. Der wichtigste Auslöser für die T_H1 -Differenzierung ist IL-12, als Antwort auf intrazelluläre Bakterien. Man zählt zu ihnen Listeria oder Mycobakterien, aber auch Parasiten, wie z.B. Leishmania, die sowohl Makrophagen, als auch NK infizieren oder aktivieren können. Manche Mikroorganismen greifen direkt den Toll-like Rezeptor von Makrophagen und dendritischen Zellen an und aktivieren diese zur direkten Ausschüttung von IL-12. Andere Mikroorganismen stimulieren indirekt über die Stimulierung von NK, die Produktion von IFN-gamma und somit die Ausschüttung von IL-12 aus Makrophagen. IL-12 bindet an den Rezeptor von antigen-stimulierten $CD4^+$ -T-Lymphozyten und aktiviert somit den Transkriptionsfaktor STAT4, der für die Differenzierung in die Subpopulation von T_H1 -Typ verantwortlich ist. T-bet ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, aktiviert durch IFN-gamma, der eine wesentliche Rolle in diesem Reaktionsweg spielt. In der T_H1 -Subpopulation werden vorwiegend proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-2, IL-6 und IL-12 produziert. Deren Aufgabe ist es die CMI zu fördern, die Produktion von NO zu unterstützen und die Freisetzung von T_H2 -Zytokinen zu inhibieren. Die Differenzierung der $CD4^+$ -T-Lymphozyten in den Reaktionsweg des T_H2 -Typ erfolgt bei Kontakt mit Wurmerkrankungen oder Allergenen, die oft eine chronische T-Zell-Stimulierung bewirken und nicht unbedingt assoziiert sind mit einer akuten Makrophagenaktivierung. IL-4 spielt bei diesem Weg eine sehr bedeutende Rolle, indem es den Transkriptionsfaktor

4 aktiviert und somit die Differenzierung zur T_H2 -Subpopulation induziert. GATA-3 ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor für diesen Aktivierungsweg der Immunreaktion. IL-4, IL-5, IL-10 [76] sind die maßgeblichen Zytokine der T_H2 -Subpopulation und unterbinden die Ausschüttung von T_H1 -Typ-Zytokinen [73]. Im Gegensatz zur CMI bewirken die Zytokine der T_H2 -Zellen die Aktivierung der B-Lymphozyten und somit die humorale Immunreaktion mit der Ausschüttung von antigenspezifischen Antikörpern.

Mit Hilfe der nachfolgenden Abbildung soll der Weg von der nativen $CD4^+$ -T-Zelle zu T_H1 - und T_H2 -Lymphozyten noch einmal verdeutlicht werden.



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Abbildung 2: Die Entstehung von T_H1 - und T_H2 - Subpopulationen [73]

In dieser Studie wurde unter anderem Interleukin-1 im Vaginalsekret von Patientinnen und einer Kontrollgruppe bestimmt. IL-1 wird hauptsächlich von mononuklearen Phagozyten produziert und besteht aus zwei unterschiedlichen Formen: IL-1 α und IL-1 β . Beide binden an den gleichen Rezeptor und haben die gleiche Funktion, sind aber unterschiedliche Proteine. In niedriger Konzentration ist IL-1 ein Mediator von lokalen Infektionen. Auf Endothelzellen bewirkt es eine erhöhte Expression von Oberflächenmolekülen, um eine Leukozytenadhäsion zu verstärken und die Chemokinproduktion zu fördern. In hoher Konzentration tritt das Interleukin in die Blutbahn ein und hat endokrine Funktionen. Systemisches IL-1 hat die Möglichkeit, gemeinsam mit TNF, Fieber zu erzeugen und die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteine durch die Leber zu induzieren.

Bei IL-1 α handelt es sich um ein nicht-glykolisiertes Polypeptid mit 159 AS und einer molekularen Masse von 18kDa.

IL-1 β ist ebenfalls ein nicht-glykolisiertes Polypeptid mit 153 AS und einer Molekularmasse von 17 kDa.

IL-5, welches auch in dieser Studie untersucht wurde, liegt als nicht-glykolisiertes Dimer vor mit 132 AS und einer Molekularmasse von 26,5kDa. Es wird hauptsächlich von T_H2-Lymphozyten und aktivierten Mastzellen produziert und ist sowohl für die Aktivierung, als auch für die Differenzierung von eosinophilen Granulozyten verantwortlich.

Des Weiteren bestimmten wir IL-10 im Vaginalsekret, welches als 160 AS langes, nicht kovalent-gebundenes Homodimer vorliegt und die Größe von 35 kDa ausweist. IL-10 inhibiert als antiinflammatorisches Zytokin die Synthese der T_H1-Zytokine und ist somit ein wichtiger Mediator in der Suppression der Immunantwort bei Entzündungsreaktionen.

1.2. Fragestellung

Ziel der vorliegenden, experimentellen Studie ist es, die proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine im vaginalen Fluor bei gesunden Frauen und bei Frauen, welche an bakterieller Vaginose erkrankt sind zu bestimmen. Im Hinblick auf die Veränderung der Interleukinzusammensetzung bei Gesunden im Vergleich zu Erkrankten, erhoffen wir uns Ergebnisse, die uns einen Einblick in die lokale Immunabwehr im Krankheitsverlauf der BV verschaffen. In diesem Zusammenhang wäre es möglich, das Verständnis für die Pathogenese zu erweitern und auf lange Sicht verbesserte diagnostische und therapeutische Ansätze zu etablieren.

Im Folgenden wurde das Vaginalsekret von 160 gesunden und 50 an BV erkrankten Frauen, als Kontrollgruppe, untersucht. Mittels Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) konnten sowohl die proinflammatorischen Interleukine IL-1 α , IL-1 β , als auch die antiinflammatorischen Interleukine IL-10 und IL-5 bestimmt werden.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Patientinnen

2.1.1.1. Gesunde Patientinnen

Die Interleukinzusammensetzung der Vaginalflora gesunder Frauen wurde als Basiswert benötigt, um diese mit den Konzentrationen der jeweiligen Interleukine an BV erkrankten Frauen vergleichen zu können.

Die Proben gesunder Frauen (n=160) wurden aus den Praxen von Dr. Grum in Altdorf und von Dr. Wohlsberger in Ingolstadt zur Verfügung gestellt.

Bei den Gesunden handelte es sich um Patientinnen mit einem Altersmedian von 26 Jahren (Alter 18-35 Jahre), die ganz normal zur Vorsorge in diese Praxen gekommen waren und keinerlei Symptomatik zeigten oder Beschwerden äußerten.

2.1.1.2. Patientinnen mit bakterieller Vaginose

Die Proben der Kontrollgruppe (n=50) von Patientinnen mit bakterieller Vaginose wurden in der Praxis von Dr. Mielzarek entnommen. Dabei handelte es sich um Patientinnen mit einem Altersmedian von 33 Jahren (zwischen dem 16. und 50. Lebensjahr), die drei der folgenden vier Kriterien erfüllten: vaginaler, dünnflüssiger, homogener Ausfluss, Amingeruch des Fluors, besonders nach Alkalisierung mit 10% KOH und einem vaginalen pH \geq 4,5. Außerdem waren im Nativpräparat der Patientinnen teilweise so genannte „clue cells“ auffindbar. Dabei handelt es sich um dichte Ansammlung von Bakterien, ein so genannter Bakterienrasen, auf den Epithelzellen.

Die Vaginalflora von Patientinnen in der Schwangerschaft, in der Stillzeit und innerhalb der ersten 8 Wochen postpartal wurden in dieser Studie ebenso wenig herangezogen wie die Vaginalflora von prä- oder postmenopausalen Patientinnen. Auch Patientinnen mit momentaner Menstruationsblutung und vaginalem Begleitinfekt, wie z.B. Soor wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

2.2. Methode

2.2.1. Vaginalabstriche

Bei jeder Patientin wurde mittels eines geprüften Watteträgers eine Probe aus dem hinteren Scheidengewölbe entnommen.

Um für die Zytokinbestimmung entsprechendes Abstrichmaterial zu erhalten, wurden die Vaginalabstriche folgendermaßen durchgeführt: 2ml 0,9%-iger Kochsalzlösung wurde mittels einer 3ml Spritze in die Vagina gegeben, mit einem Watteträger kurz mit dem Vaginalsekret im hinteren Scheidengewölbe durchmengt und dann wieder mit der gleichen Spritze aufgenommen. Der gewonnene Spritzeninhalt wurde auf zwei Eppendorfgläser aufgeteilt und zur Vermengung des Inhaltes kurz auf den Vortex gegeben. Anschließend wurde das Abstrichmaterial in den Eppendorfgläsern bei 5000 rpm zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipetiert und in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Das Pellet, kombiniert mit 0,5ml Phosphat-Borate-Saline, wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Der Überstand, der für die Bestimmung der Zytokine nötig war, wurde ebenfalls eingefroren.

2.2.2. Amintest

Das gewonnene Vaginalsekret wurde auf einen Objektträger mit 1-2 Tropfen 10%iger Kalilauge versetzt. Der fischartige Geruch durch Amine, die von Anaerobiern gebildet wurden, intensivierte sich und verifizierte somit den Verdacht auf bakterielle Vaginose.

2.2.3. pH-Wert

Zur pH-Bestimmung wurden folgende pH-Indikator-Streifen der Firma Merck, Darmstadt verwendet: pH 4,0-7,0 Spezialindikator nicht blutend. Diese wurden mit blutfreier Vaginalflora versehen. Die Ablesung des pH-Wertes erfolgte sofort durch den Vergleich mit der abgebildeten Farbskala auf der Verpackung.

2.2.4. Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und IL-10

Zur Bestimmung der Interleukine 1 α , 1 β , 5 und 10 wurden ELISA-Platten von Biosource international, Camarillo, California/USA (Immunoassay Kit # IL-1 α -KAC1192/KAC1191, IL-1 β - KH0012, IL-5-KHC0052/KHC0051, IL-10- KHC0102) verwendet. Die Bestimmung der Interleukinkonzentration verlief für IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und IL-10 Proben nahezu identisch, weshalb im Folgenden auf einige Abschnitte der Probenaufbereitung für alle zu analysierenden Proben gemeinsam eingegangen wird.

2.2.4.1. Reagenzien zur Bestimmung der Zytokine

- Humanes Interleukin -IL-1 α , -IL-1 β , -IL-5, -IL-10-Standard
- Standard Diluent Puffer
- Inkubationspuffer
- Mikrotiterplatte mit 96 Mikrotitergefäßen pro Platte (ligand-beschichtet)
- Humanes IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-10 Biotin Konjugat
- Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase
- gepufferte Waschlösung
- Stabilisiertes Chromogen
- Stopplösung
- Plattenüberdeckung mit Klebestreifen

2.2.4.2. Herstellung der Standardverdünnungsreihe

Das humane Interleukin Standard, welches in Pulverform vorlag, musste für jedes Interleukin mit unterschiedlichen Mengen an Standardpuffer versetzt werden, um eine Stammlösung gewünschter Konzentration zu erhalten.

2.2.4.2.1. Humanes IL-1 α -Standard

Zur Herstellung der Stammlösung mit einer Konzentration von 10 000 pg/ml wurde das Pulver mit 0,695 ml Standardpuffer vermengt. Bis zur weiteren Verarbeitung musste eine Ruhezeit von 10 Minuten eingehalten werden, um die vollständige Auflösung des Standards zu gewährleisten. Währenddessen wurden 8 Eppendorfgefäße mit den Zahlen 1-8 beschriftet und in eine Halterung gestellt. Nach Ablauf der Ruhezeit wurden 0,010 ml der Stammlösung mit 0,390 ml Standard Diluent Puffer des ersten Eppendorfgefäßes versetzt und gevortext. Von der so entstandenen 250 pg/ml-Verdünnung wurden 0,200 ml abpipetiert und in das zweite Gefäß gegeben, welches, wie die restlichen 5 Eppendorf Gefäße, bereits mit 0,200 ml Standard Diluent Puffer gefüllt war. Aus dieser 125 pg/ml-Mischung wurden wieder 0,200 ml in das dritte Röhrchen gegeben.

Auf diese Weise wurden auch die restlichen drei Verdünnungen hergestellt, wobei das letzte ausschließlich Diluent Puffer enthielt. Daraus ergaben sich folgende Konzentrationen der IL-1- α -Standardverdünnungsreihe: 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 0 pg/ml.

2.2.4.2.2. Humanes IL-1 β -Standard

Für die IL-1 β -Stammlösung mit einer Konzentration von 2500 pg/ml wurden 1,126 ml Standardpuffer mit dem Pulver gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur zur vollständigen Auflösung des Pulvers inkubiert. Mit der Beschriftung und Vorbereitung der 8 Eppendorfgefäße wurde wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, verfahren.

In das erste Gefäß wurden 0,900 ml und in die restlichen sieben Gefäße 0,250 ml des Standardpuffers gefüllt. 0,100 ml der IL-1 β -Stammlösung wurden mit dem Inhalt des ersten Eppendorfgefäßes gemischt. Aus dieser Lösung wurden 0,250 ml in das nächste Eppendorfgefäß gegeben und wie bereits bei Interleukin-1- α fortgefahren, um eine standardisierte IL-1- β -Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 0 pg/ml herzustellen.

2.2.4.2.3. Humanes IL-5-Standard

Im Falle des Interleukin 5 wurde 1,5 ml Standardpuffer mit dem Standardpulver vermengt, woraus sich eine Stammlösung mit einer Konzentration von 7500 pg/ml ergab. 0,100 ml dieser Lösung wurden mit 0,900 ml des im ersten Eppendorfgefäß vorgelegten Standardpuffers gemischt. Darauf folgte eine Verdünnung der hergestellten 750 pg/ml-Mischung mit je 0,300 ml Verdünnungspuffer in den darauf folgenden Gefäßen. Das Letzte enthielt wiederum nur Standardpuffer. Daraus ergaben sich folgende Konzentrationen der IL-5-Verdünnungsreihe: 750 pg/ml, 375 pg/ml, 187,5 pg/ml, 93,7 pg/ml, 46,8 pg/ml, 23,4 pg/ml, 11,7 pg/ml, 0 pg/ml.

2.2.4.2.4. Humanes IL-10-Standard

Zur Herstellung der IL-10-Standardlösung mit einer Konzentration von 5000 pg/ml wurden 2,29 ml des Standardverdünnungspuffers benötigt. Um eine vollständige Lösung des Standardpulvers zu gewährleisten folgte analog der Probenvorbereitung der andern zu analysierenden Interleukine eine Inkubationszeit von 10 Minuten. Im Anschluss daran wurden 0,05 ml dieser Lösung zu 0,450 ml Standardpuffer, welcher im ersten Eppendorfgefäß vorgelegt war, hinzugefügt. Aus dem jeweils vorangegangenen Gefäß wurden 0,200 ml in das Darauffolgende pipettiert. Bis auf das achte Eppendorfgefäß, welches nur Standardverdünnungspuffer enthielt. Durch diese Verdünnungsschritte konnte eine IL-10-Standardverdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt werden: 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, 0 pg/ml.

2.2.4.3. Streptavidin-Peroxidase (IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-10)

Die Herstellung der Streptavidin-Peroxidase erfolgte bei allen vier Interleukinen auf die gleiche Art und Weise. Für eine Reihe der verwendeten Mikrotiterplatten war eine Mischung von 1 μ l des 100-fachen Streptavidin-HRP-Konzentrats mit 1 ml Streptavidin-Verdünnungspuffer vorgegeben. In den Versuchen wurden alle zwölf Reihen verwendet und dementsprechend 12 ml Verdünnungspuffer mit 120 μ l Streptavidin-HRP-Konzentrat vermischt.

2.2.4.4. Gepufferte Waschlösung (IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-10)

Die gepufferte Waschlösung, 25-fach konzentriert, musste mit 24 Einheiten destilliertem Wasser gemischt werden.

2.2.4.5. Durchführung

Die Durchführung des Experiments erfolgte bei den Interleukinen 1- α , 1- β , 5 und 10 nach dem gleichen Prinzip. Nur in den ersten Schritten der Versuchsreihe gab es Abweichungen zwischen den Zytokinen im Bereich der Inkubationszeiten und Volumenangaben, die im Folgenden spezifisch beschrieben werden.

Die Reihen 1 und 2 der Mikrotiterplatten wurden für die Interleukin-Standard-Verdünnungsreihen und die Reihen 3 bis 8 für die Proben der Patientinnen verwendet.

IL-1 α : 50 μ l Probe musste 1:10 verdünnt werden. Dementsprechend wurden 5 μ l Probe mit 50 μ l Inkubationspuffer und 50 μ l Biotin-markierten Anti-IL-1- α Antikörper vermischt, mit einer Plattenabdeckung mit Klebestreifen versehen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte eine vierfach Waschung der Mikrotiterplatten mit der bereits vorbereiteten Waschlösung. Nach jeder

einzelnen Spülung wurden die Platten umgedreht und die überstehende Flüssigkeit vorsichtig ausgeklopft. Auf diese Art wurden sowohl die Antigene, die sich in der Inkubationszeit nicht an die Antikörper gebunden hatten, als auch die restliche Waschlösung in den Vertiefungen vollständig entfernt.

IL-1 β : 50 μ l Probe wurde mit 100 μ l Biotin-markierten Anti-IL-1- β Antikörpern vermischt und mit einer Klebefolie abgedeckt. Nach zweistündiger Inkubationszeit in Raumtemperatur, wurde wie mit den Mikrotiterplatten von IL-1- α verfahren.

IL-5: 100 μ l Patientenprobe wurde in die Platten pipettiert, abgedeckt und ebenfalls für zwei Stunden inkubiert. Daraufhin wurde IL-5 mit 100 μ l Biotin-markierten Anti-IL-5 Antikörpern versehen, eine Inkubationszeit von 30 Minuten gewährt und noch einmal ausgewaschen, wie bereits oben beschrieben.

IL-10: 50 μ l Probe wurde mit 50 μ l Inkubationspuffer auf der Platte versehen und zwei Stunden abgedeckt inkubiert. IL-10 musste ebenfalls mit 100 μ l Biotin-markierten Anti-IL-10 Antikörpern vermischt werden. Für IL-10 war eine Inkubationszeit von zwei Stunden vorgegeben, bevor auch diese wieder gewaschen werden konnte.

Die anschließenden Versuchsschritte wurden für alle vier Interleukine auf die gleiche Art und Weise durchgeführt.

Für die nachfolgende Farbreaktion wurden in die Platten 100 μ l der bereits vorbereiteten HRP-Streptavidin-Peroxidase pipettiert und mit Deckpapier abgeklebt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Mikrotiterplatten, wie bereits oben beschrieben, erneut 4 mal gewaschen, mit 100 μ l TMB-(Tetramethylbenzidin)-Substratlösung versehen. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt unter Lichtausschluss von 30 Minuten.

An dieser Stelle muss hinzugefügt werden, dass die vorgegebene Inkubationszeit teilweise, wie z.B. bei IL-1 α , verkürzt werden musste, damit der Farbumschlag und die daraus resultierende optische Dichte eine bestimmte obere Messgrenze des jeweils verwendeten Photometers nicht überschritten wurde.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit folgte die Zugabe von 100 μ l Stopplösung pro Mikroküvette, woraufhin ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgte. Schließlich konnte die optische Dichte mittels eines Spektralphotometers bei einer Referenzwellenlänge von 492 nm und einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden.

2.2.4.6. Auswertung der Messergebnisse

2.2.4.6.1. Interleukin-1 α und Interleukin-1 β

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte für Interleukin-1 α , Interleukin-1 β , Interleukin-5 und Interleukin-10 nach demselben Schema.

Die genaue Durchführung der Auswertung wird daher nur einmal beschrieben. Für die einzelnen Interleukine werden nur noch die jeweilig festgesetzten Standardkonzentrationen beschrieben und die Standardkurven gezeigt.

Um die gemessene optische Dichte in die entsprechende Konzentration umrechnen zu können, wurden die dazu nötigen Standardkurven in Excel erstellt. Zuerst wurden die festgesetzten Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe, nämlich 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 0 pg/ml in die Exceltabelle eingegeben. Aus den zwei, mittels Spektralphotometer gemessenen, Werten der optischen Dichte wurde der Mittelwert berechnet und ebenfalls in die Tabelle übertragen, um sie der jeweiligen Konzentration gleichzusetzen. Mittels einer Gleichung Polynom 3. Ordnung konnte aus diesen Werten die Standardkurve erstellt werden.

Interleukin-1 α

1	2	3	4
Standard	Interleukin:	IL-1 α	Datum:28.6
Reihe 1	Reihe 2	Mittelwert	Konz[pg/ml]
0,879	0,929	0,904	250,0
0,549	0,545	0,547	125,0
0,323	0,317	0,320	62,5
0,170	0,180	0,175	31,3
0,081	0,084	0,083	15,6
0,054	0,058	0,056	7,8
0,030	0,033	0,032	3,9
0,024	0,026	0,025	0,0

Tabelle 1: *Eingabe von Standardkonzentrationen und OD für IL-1 α in das Computerprogramm Excel*

In Spalte 1 ist der photometrisch gemessene OD-Wert der Reihe 1 der Mikrotiterplatte angegeben. Spalte 2 gibt den ebenfalls per Photometrie bestimmten OD-Wert der Reihe 2 der Mikrotiterplatte an. Der aus den OD1- und OD2-Werten berechnete Mittelwert ist in Spalte 3 angegeben, die Konzentration der Standardkurve in pg/ml in Spalte 4.

Des Weiteren musste die gemessene optische Dichte als abhängige Variable und die Konzentration als unabhängige Variable zugeordnet werden. Daraufhin konnte mittels einer kubischen Gleichung [$f(x) = a_3x^3 + a_2x^2 + a_1x + a_0$] über eine Kurvenanpassung die Standardkurve ermittelt werden. Die Konstanten und Variablen wurden in Excel eingegeben, wodurch die jeweiligen Konzentrationen in pg/ml abgelesen werden konnten.

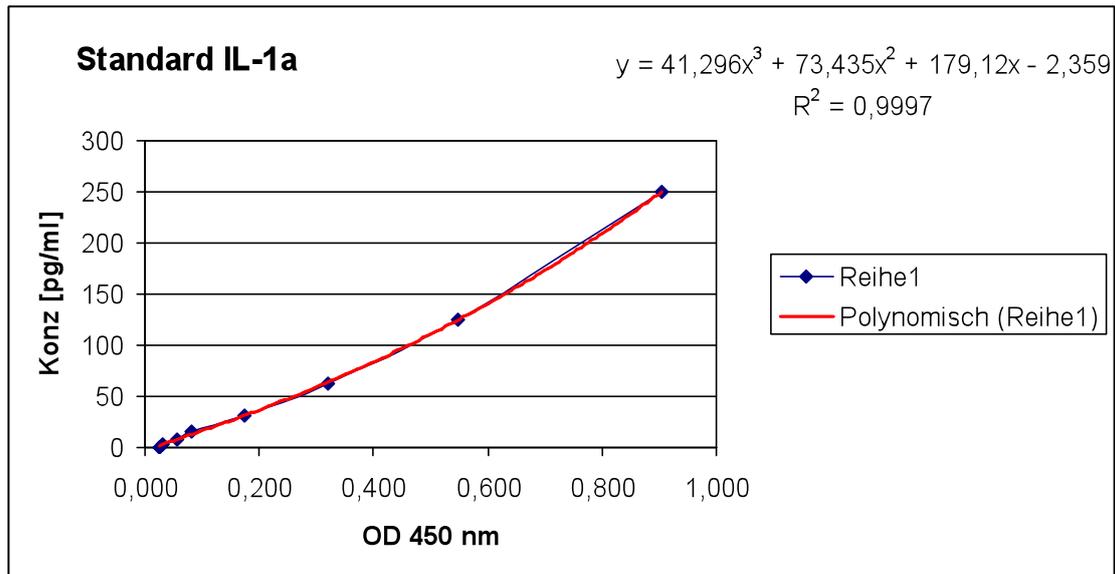


Abbildung 3: *Im Computerprogramm Excel erstellte Standardkurve für IL-1 α*

Die festgesetzten Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe für Interleukin-1 α lauteten 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 0 pg/ml.

Interleukin-1β

1	2	3	4
Standard	Interleukin: IL-1β		Datum:17.6
Reihe 1	Reihe 2	Mittelwert	Konz[pg/ml]
2,153	2,122	2,138	250,0
1,510	1,509	1,510	125,0
0,903	0,926	0,915	62,5
0,552	0,557	0,555	31,2
0,335	0,353	0,344	15,6
0,267	0,263	0,265	7,8
0,219	0,221	0,220	3,9
0,181	0,188	0,185	0,0

Tabelle 2: Eingabe von Standardkonzentrationen und OD für IL-1β in das Computerprogramm Excel

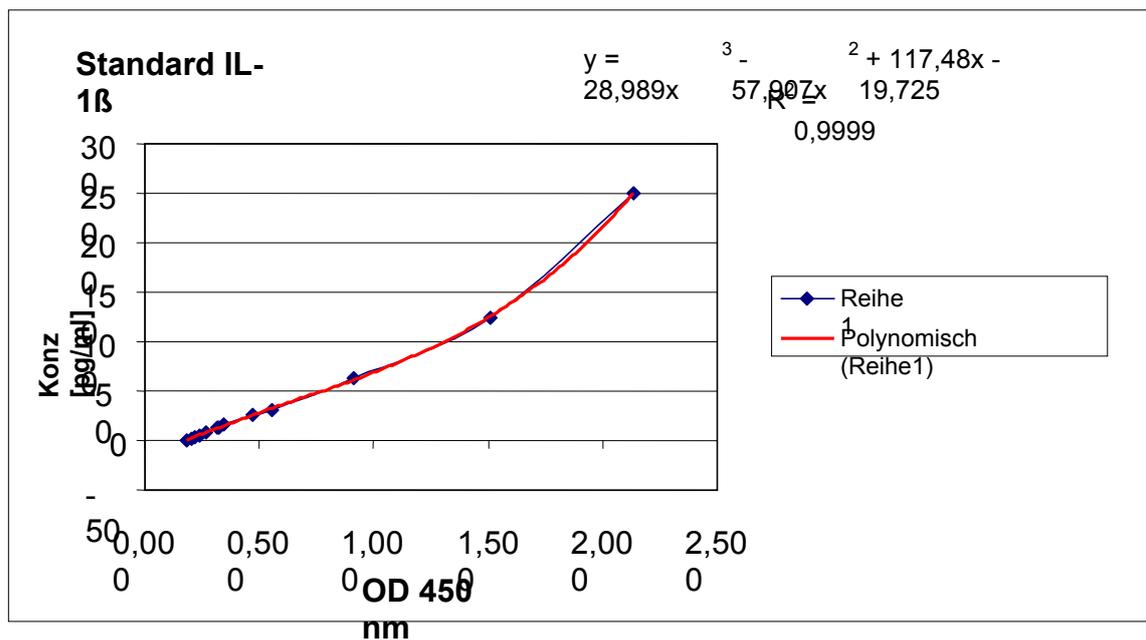


Abbildung 4: Im Computerprogramm Excel erstellte Standardkurve für IL-1β

Die festgesetzten Konzentrationen der Standardverdünnsreihe für Interleukin-1β lauteten 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 0 pg/ml.

2.2.4.6.2. Interleukin-5

Die festgesetzten Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe für Interleukin-5 lauteten 750 pg/ml, 375 pg/ml, 187,5 pg/ml, 93,7 pg/ml, 46,8 pg/ml, 23,4 pg/ml, 11,7 pg/ml, 0 pg/ml. Mit der Auswertung der Messergebnisse wurde in der gleichen Art und Weise verfahren, wie bereits für IL-1α und -1β beschrieben.

Interleukin-5

1	2	3	4
Standard	Interleukin: IL-5		Datum:08.07.
Reihe 1	Reihe 2	Mittelwert	Konz [pg/ml]
2,110	2,102	2,106	750,0
1,263	1,196	1,230	375,0
0,652	0,591	0,622	187,5
0,365	0,358	0,362	93,7
0,186	0,205	0,196	46,8
0,133	0,145	0,139	23,4
0,110	0,112	0,111	11,7
0,085	0,086	0,086	0,0

Tabelle 3: Eingabe von Standardkonzentrationen und OD für IL-5 in das Computerprogramm Excel

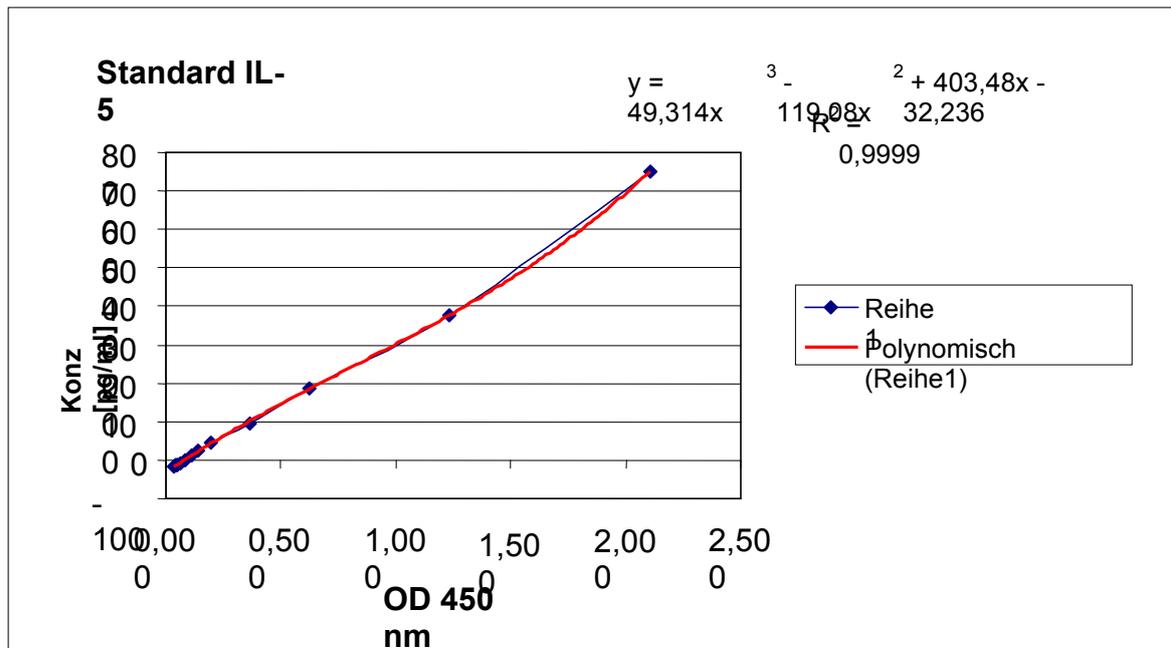


Abbildung 5: Im Computerprogramm Excel erstellte Standardkurve für IL-5

2.2.4.6.3. Interleukin-10

Für Interleukin waren folgende Konzentrationen für die Standardverdünnungsreihe vorgegeben: 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, 0 pg/ml.

Interleukin 10

1	2	3	4
Standard	Interleukin:	IL-10	Datum:21.6
Reihe 1	Reihe 2	Mittelwert	Konz[pg/ml]
2,182	2,237	2,210	500,0
1,346	1,337	1,342	250,0
0,776	0,752	0,764	125,0
0,431	0,446	0,439	62,5
0,240	0,235	0,238	31,2
0,145	0,142	0,144	15,6
0,097	0,096	0,097	7,8
0,073	0,069	0,071	0,0

Tabelle 4: Eingabe von Standardkonzentrationen und OD für IL-10 in das Computerprogramm Excel

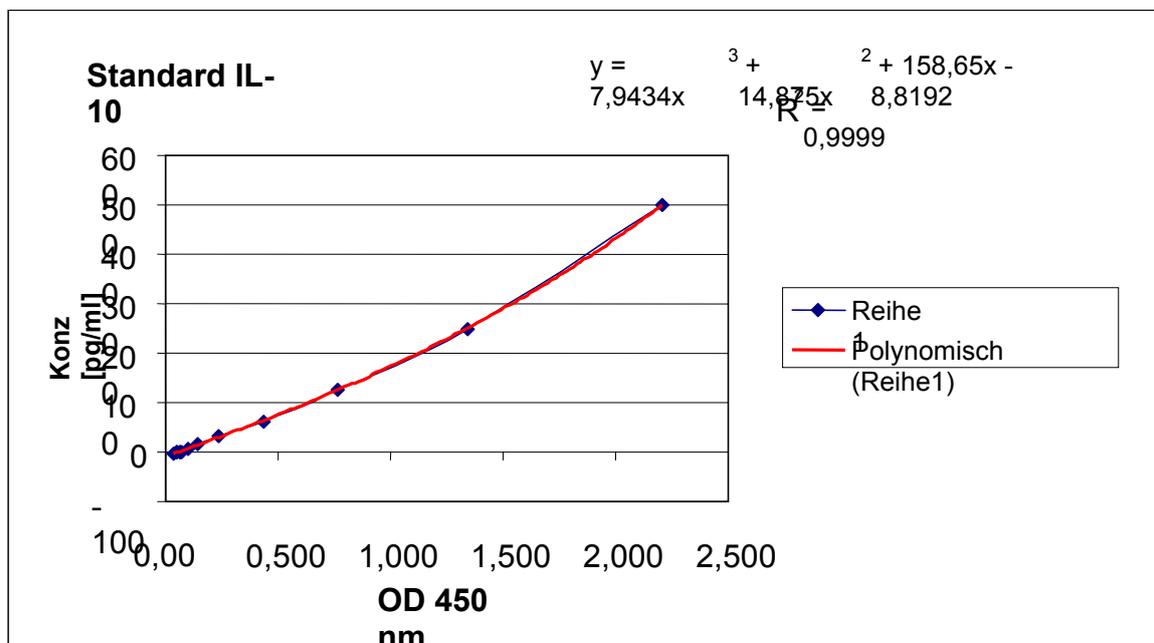


Abbildung 6: Im Computerprogramm Excel erstellte Standardkurve für IL-10

3. Statistische Auswertung

Bei den ersten Analysen der Daten ließen sich Extremwerte nach oben hin aufweisen. Aus diesem Grund kamen für die statistische Auswertung keine parametrische Verfahren (Student-t-Test) in Frage und es mussten nicht-parametrische Testverfahren angewandt werden. Dadurch wurden keine Annahmen der Normalverteilung benötigt. Die statistische Auswertung erfolgte deshalb mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests (U-Test). Für die Testergebnisse wurde der p-Wert bestimmt, welcher mit Werten unter 0,05 als signifikant eingestuft werden konnte.

Aus bereits erwähntem Grund war es auch sinnvoller den Median, das Minimum und Maximum an der Stelle des Mittelwerts zu betrachten.

Zur Bestimmung der Korrelation zwischen den Interleukin-Werten gesunder und an BV erkrankter Patientinnen, wurde der nicht-parametrische Spearman-Rank-Koeffizient herangezogen.

4. Ergebnisse

4.1. Deskriptive Statistik der Interleukine bei Gesunden

Die folgenden Tabellen zeigen die statistischen Kenngrößen der Daten der einzelnen Praxen von Dr. Wohlsberger und Dr. Grum, welche das Probenmaterial von gesunden Frauen gewonnen und zur Verfügung gestellt haben.

Praxis Wohlsberger

	IL-1 α	IL-1 β	IL-5	IL-10
n	47,00	48,00	48,00	48,00
Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00
Maximum	4231,00	560,00	345,49	8,01
Median	493,35	15,24	0,00	0,06
Mean	796,89	49,43	7,92	0,73
Standardab.	875,74	98,93	49,81	1,42

Tabelle 5: Minimal-, Maximal-, Median-, Meanwert und Standardabweichung von IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-10 gesunder Frauen

Praxis W: Praxis von Dr. Wohlsberger

Praxis G: Praxis von Dr. Grum

Praxis M: Praxis von Dr. Mielzarek

Praxis Grum

	IL-1 α	IL-1 β	IL-5	IL-10
n	112,00	112,00	112,00	112,00
Minimum	0,00	1,71	0,00	0,00
Maximum	4704,00	602,00	87,01	6,78
Median	369,50	16,33	0,00	0,43
Mean	641,70	59,49	1,46	1,16
Standardab.	782,80	110,39	8,49	1,59

Tabelle 6: Minimal-, Maximal-, Median-, Meanwert und Standardabweichung von IL-1 α ; IL-1 β , IL-5, IL-10 gesunder Frauen

Bei genauer Betrachtung der obigen Tabellen, z.B. im Bezug auf den Median, zeigten sich vergleichbare Daten der beiden Praxen. Der Medianwert von Interleukin-1 α betrug bei Dr. Wohlsberger 493,35pg/ml und in der Praxis von Dr. Grum 369,50pg/ml. Ähnlich

verhielten sich die Medianwerte in Bezug auf das Interleukin-1 β mit 15,24pg/ml bei Dr. Wohlsberger und 16,33pg/ml aus der Praxis von Dr. Grum.

4.2. Deskriptive Statistik der Interleukine bei Kranken

Die Proben der Kontrollgruppe, d.h. von Patientinnen mit bakterieller Vaginose, wurden von Dr. Mielzarek zur Verfügung gestellt, der die Vaginalspülungen und Probengewinnung in seiner Praxis durchgeführt hatte.

	IL-1 α	IL-1 β	IL-5	IL-10
n	50,00	50,00	50,00	50,00
Minimum	33,05	0,00	0,00	0,00
Maximum	2373,92	580,32	16,02	7,42
Median	518,45	38,60	0,00	0,00
Mean	602,96	163,54	0,71	0,46
Standardab.	494,25	204,69	3,00	1,12

Tabelle 7: Minimal-, Maximal-, Median-, Meanwert und Standardabweichung von IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-10 kranker Frauen aus der Praxis Mielzarek

Im Vergleich der Werte gesunder Frauen mit den Werten von Patientinnen mit BV ergaben sich folgende Ergebnisse:

Der Medianwert von IL-1 α der Praxis Mielzarek war deutlich über dem Wert von Praxis Grum und leicht über dem von Praxis Wohlsberger.

Im Bezug auf IL-1 β liegt der Medianwert von Mielzarek deutlich über dem von Praxis Grum und Praxis Wohlsberger.

IL-5 und IL-10 weisen in nahezu allen Fällen einen Median von Null auf. Nur die Medianwerte von IL-10 aus den Praxen Grum und Wohlsberger sind leicht erhöht: 0,43pg/ml (Grum) und 0,06pg/ml (Wohlsberger).

4.3. Deskriptive Statistik der einzelnen Interleukine

4.3.1. Interleukin-1 α

Parameter	IL-1 α Gesund	IL-1 α BV	P (Man-Whitney- U-Test)
n	159	50	
Minimum	0,000	33,046	
Maximum	4704,000	2373,922	
Median	388,000	518,453	0,485
Mean	687,573	602,955	
Standardab.	811,675	494,252	

Tabelle 8: Minimal-, Maximal-, Median-, Meanwert, Standardabweichung und p-Wert von IL-1 α

Medianwert IL-1 α

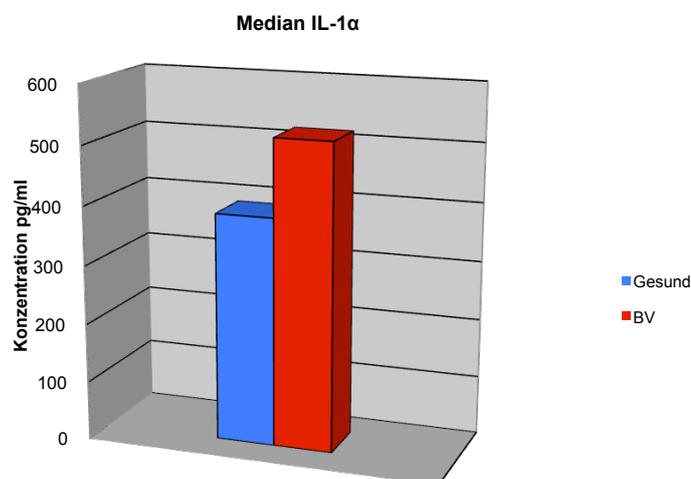


Abbildung 7.1: Darstellung des Medianwertes von IL-1 α bei gesunden Frauen und Patientinnen mit BV

Wie in Tabelle 8 und Abbildung 7.1. veranschaulicht wird, ist der Medianwert bei gesunden Frauen 388 pg/ml und bei Patientinnen mit BV 518,45 pg/ml. Zwischen diesen beiden Konzentrationen konnte allerdings mit Hilfe des Man-Whitney-U-Testes kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p-Wert 0,485).

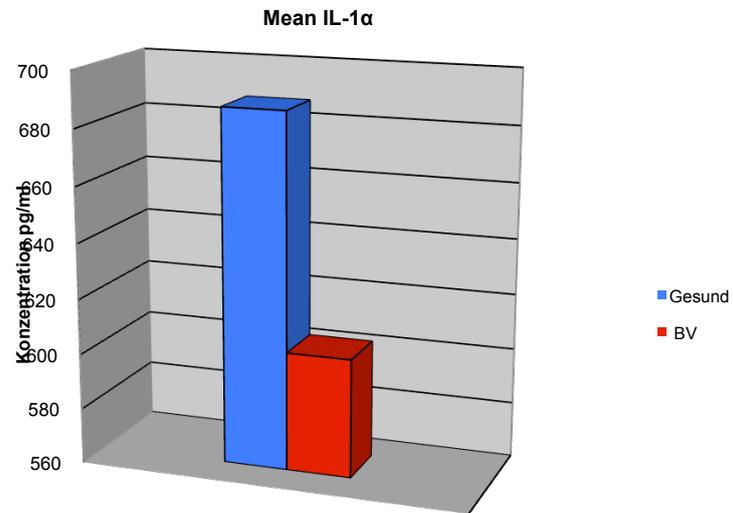
Meanwert IL-1 α 

Abbildung 7.2: Darstellung des Meanwertes von *Il-1 α* bei gesunden Frauen und Patientinnen mit *BV*

4.3.2. Interleukin-1 β

Parameter	IL-1 β gesund	IL-1 β BV	P (Man-Whitney- U-Test)
n	160	50	
Minimum	0,000	0,000	
Maximum	602,000	580,316	
Median	15,530	38,597	0,008
Mean	56,473	163,535	
Standardab.	106,870	204,694	

Tabelle 9: Minimal-, Maximal-, Median-, Meanwert, Standardabweichung und p-Wert von IL-1 β

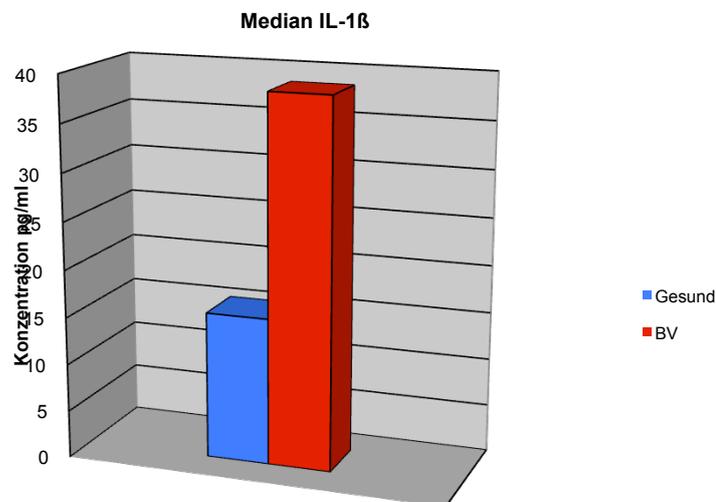
Medianwert IL-1 β 

Abbildung 8.1.: Darstellung des Medianwertes von IL-1 β bei gesunden Frauen und Patientinnen mit BV

Meanwert IL-1 β

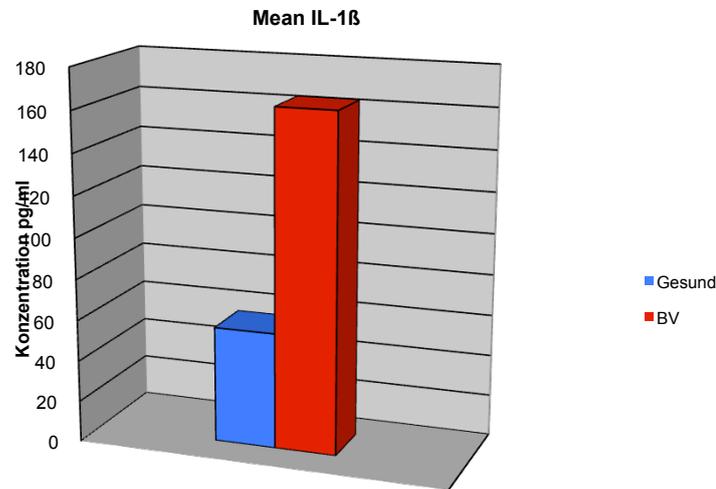


Abbildung 8.2.: Darstellung des Meanwertes von IL-1 β bei gesunden Frauen und Patientinnen mit BV

Anders verhielten sich die Medianwerte bei Interleukin-1 β . Es zeigte sich eine über 50%-ige Konzentrationserhöhung bei Frauen mit bakterieller Vaginose im Vergleich zu gesunden Frauen. Ein p-Wert von 0,008 bestätigte den signifikanten Unterschied.

In Bezug auf den Meanwert konnte fast eine dreifache Erhöhung der Interleukinkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden.

4.3.3. Interleukin-5

Parameter	IL-5 gesund	IL-5 BV	P (Man- Whithney- U-Test)
n	160	50	
Minimum	0,000	0,00	
Maximum	345,497	16,017	
Median	0,000	0,000	0,144
Mean	3,397	0,709	
Standardab.	28,151	3,001	

Tabelle 10: Minimal-, Maximal-, Median-, Meanwert, Standardabweichung und p-Wert von IL-5

Meanwert IL-5

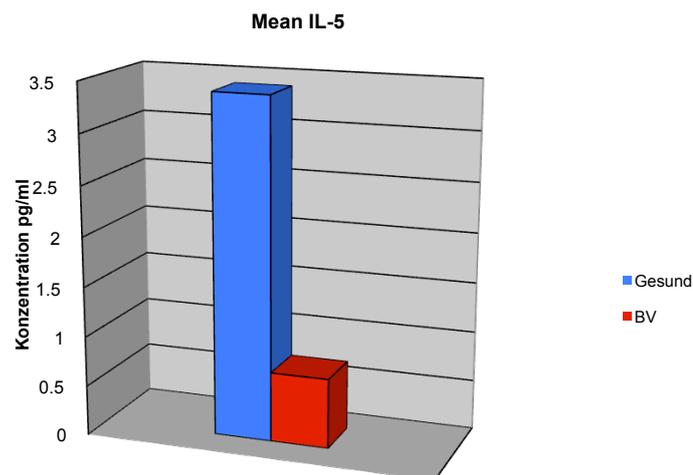


Abbildung 9: Darstellung des Meanwertes von IL-5 bei gesunden Frauen und Patientinnen mit BV

Sowohl für gesunde Frauen, als auch für Patientinnen mit BV, ergaben sich Medianwerte von Null. Aus diesem Grund konnten nur die Meanwerte graphisch dargestellt werden.

Der Meanwert bei gesunden Frauen war 3,4 pg/ml und bei der Kontrollgruppe 0,7 pg/ml. Generell waren die Konzentrationswerte von IL-5 sehr niedrig, weshalb statistisch kein signifikantes Ergebnis geliefert werden konnte.

4.3.4. Interleukin-10

Parameter	IL-10 gesund	IL-10 BV	P (Man- Whitney- U-Test)
n	160	50	
Minimum	0,000	0,000	
Maximum	8,012	7,421	
Median	0,172	0,00	0,011
Mean	1,028	0,455	
Standardab.	1,546	1,119	

Tabelle 11: Minimal-, Maximal-, Median-, Meanwert, Standardabweichung und p-Wert von IL-10

Medianwert IL-10

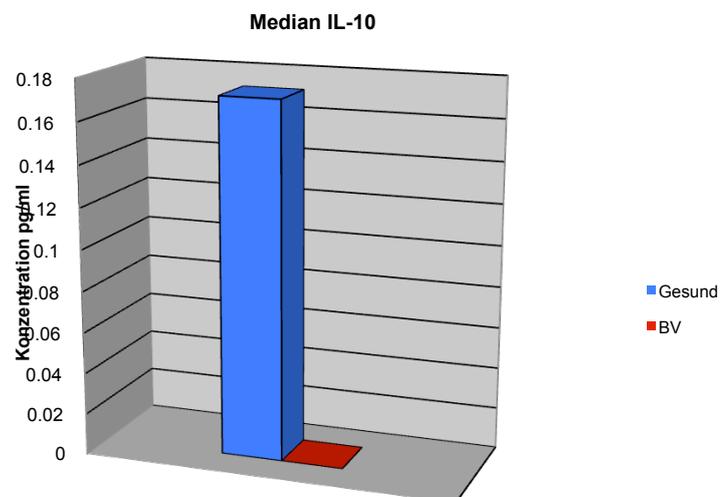


Abbildung 10.1.: Darstellung des Medianwertes von IL-10 bei gesunden Frauen und Patientinnen mit BV

Meanwert IL-10

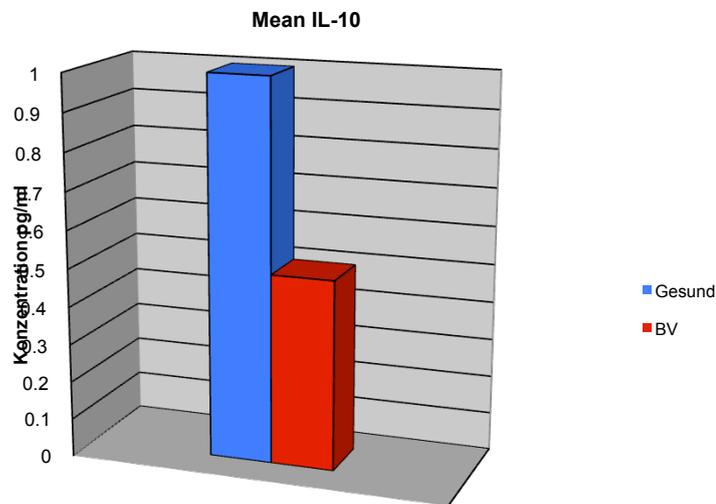


Abbildung 10.2.: Darstellung des Meanwertes von IL-10 bei gesunden Frauen und Patientinnen mit BV

Auch die gemessenen Konzentrationen von IL-10 lagen in einem sehr niedrigem Konzentrationsbereich, konnten aber im Gegensatz zu IL-5 mit einem p-Wert von 0,011. als signifikant bewertet werden.

Der Medianwert bei gesunden Frauen lag bei 0,172 pg/ml und bei erkrankten Frauen bei Null.

Der Meanwert wies bei Gesunden einen Wert von 1,028 pg/ml und bei der Kontrollgruppe einen Wert von 0,455 pg/ml auf.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse für IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und IL-10Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und IL-10

	Gesunde n= 160 Median pg/ml (Spanne)	Kontrollgruppe n=50 Median pg/ml (Spanne)	p-Wert
Interleukin-1α	388,000	518,453	0,485
Interleukin-1β	15,530	38,597	0,008
Interleukin-5	0,000	0,000	0,144
Interleukin-10	0,172	0,000	0,011

Tabelle 12: Vergleich der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-5 und IL-10 im Vaginalsekret zwischen gesunden Frauen und Kontrollgruppe mittels ELISA. Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test

Bei IL-1 α konnte bei Erkrankten eine leichte und bei IL-1 β eine deutliche Tendenz zur Erhöhung der Interleukinkonzentration festgestellt werden.

IL-5 und IL-10 waren in beiden Gruppen meist nicht nachweisbar. Allerdings scheinen die wenigen positiven Befunde aus den aggregierten Daten auf minimal erniedrigte Werte bei den Erkrankten hinzudeuten.

4.5. Häufigkeitsverteilung bei Gesunden und Kranken

Die bildliche Darstellung der jeweiligen Häufigkeitsverteilungen wird in den folgenden Grafiken 11-18 verdeutlicht.

Mit Hilfe eines Histogrammes stellt man die Häufigkeitsverteilung von Messwerten graphisch dar. Man geht dabei von den nach Größe geordneten Daten aus und teilt den gesamten Bereich in k Klassen auf. Über jeder Klasse wird ein Rechteck errichtet, dessen Fläche proportional zu der klassenspezifischen Häufigkeit ist. Die Werte werden nicht durch die Höhe der Balken, sondern durch die Fläche der Balken repräsentiert.

Des Weiteren wird zur Darstellung der statistischen Daten der Boxplot verwendet. Aufgabe des Boxplots ist die Veranschaulichung des Bereichs in welchem alle Werte liegen sowie die Darstellung der Verteilung über diesen Bereich. Es werden der Median, die 2 Quartile (Streuungsmaß) und die beiden Extremwerte dargestellt. Ein Boxplot besteht immer aus einem Rechteck (=Box) und zwei Linien (=“Whisker“,“Antennen“). Die Box entspricht dabei dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Sie wird also durch das obere und das untere Quartil begrenzt und die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand (interquartile range, IQR).

Die Boxen – blau für Gesunde, rot für an BV erkrankte Patientinnen – verdeutlichen graphisch die statistischen Daten zwischen der 25. und 75. Perzentile. Die darin befindliche schwarze Linie beschreibt den Median. Durch die Whisker werden die Werte abseits der Boxen dargestellt, d.h. 1,5 IQR außerhalb der 25. und 95. Perzentile. Ausreißer zwischen 1,5 und 3 IQR werden als “mild“ und über 3 IQR als “extrem“ bezeichnet. Diese werden durch Punkte dargestellt.

IL-1 α

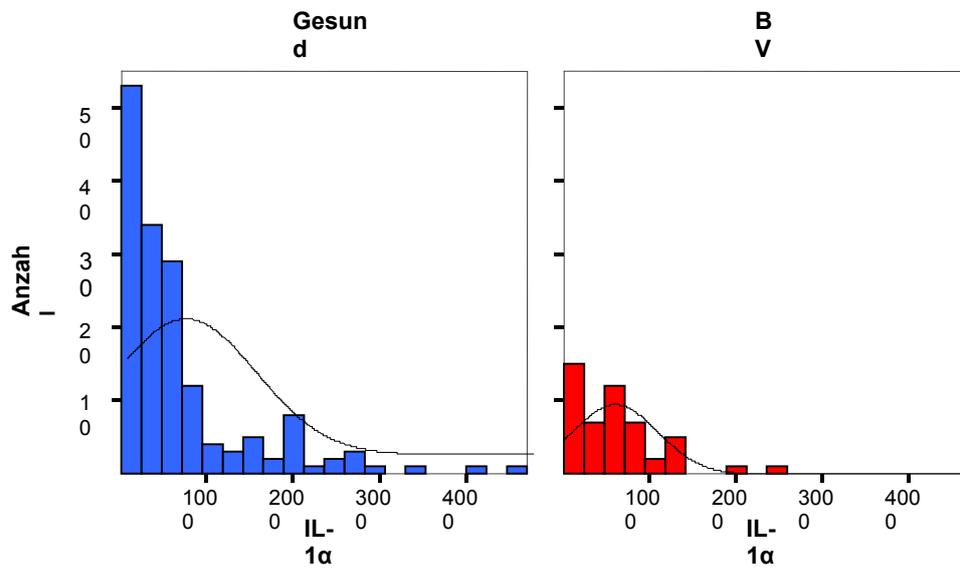


Abbildung 11 : *Histogramm: Interleukin-1 α – Gesunde und Kontrollgruppe mit BV*

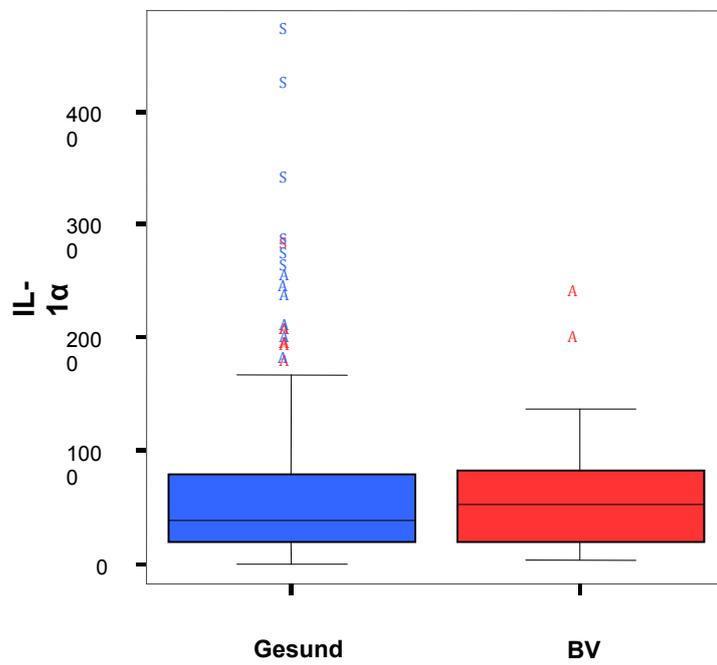


Abbildung 12: *Boxplot: Zur Verdeutlichung von Median, Maximum und Minimum von IL-1 α*

IL-1 β

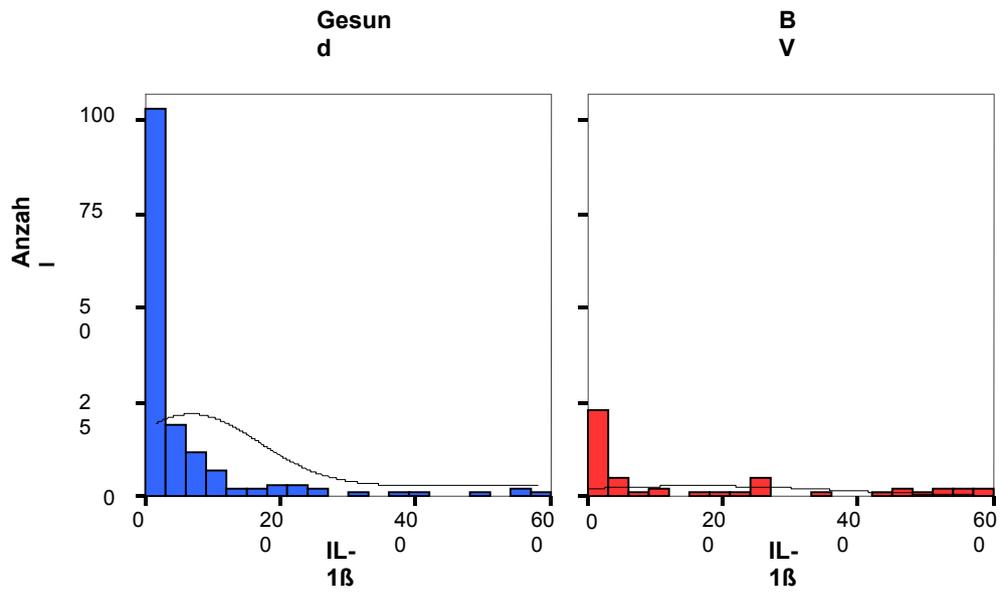


Abbildung 13: Histogramm: Interleukin-1 β – Gesunde und Kontrollgruppe mit BV

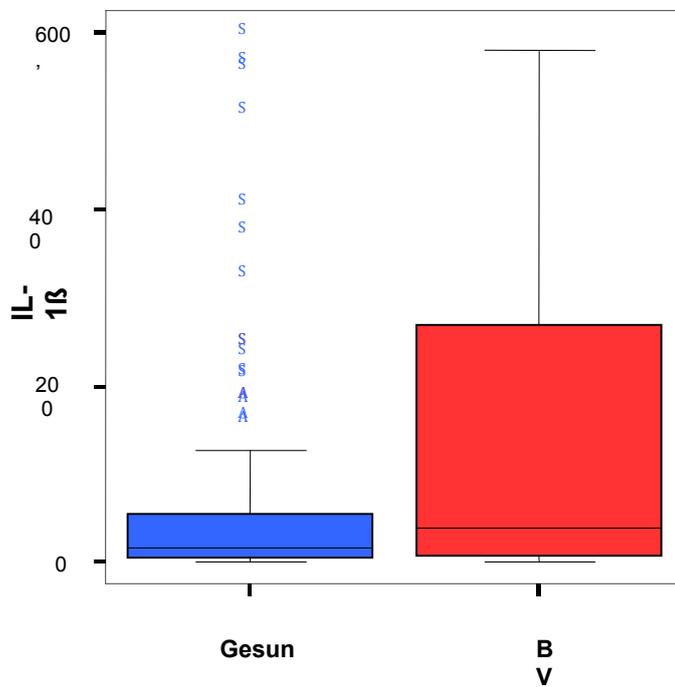


Abbildung 14: Boxplot: Zur Verdeutlichung von Median, Maximum und Minimum von IL-1 β

IL-5

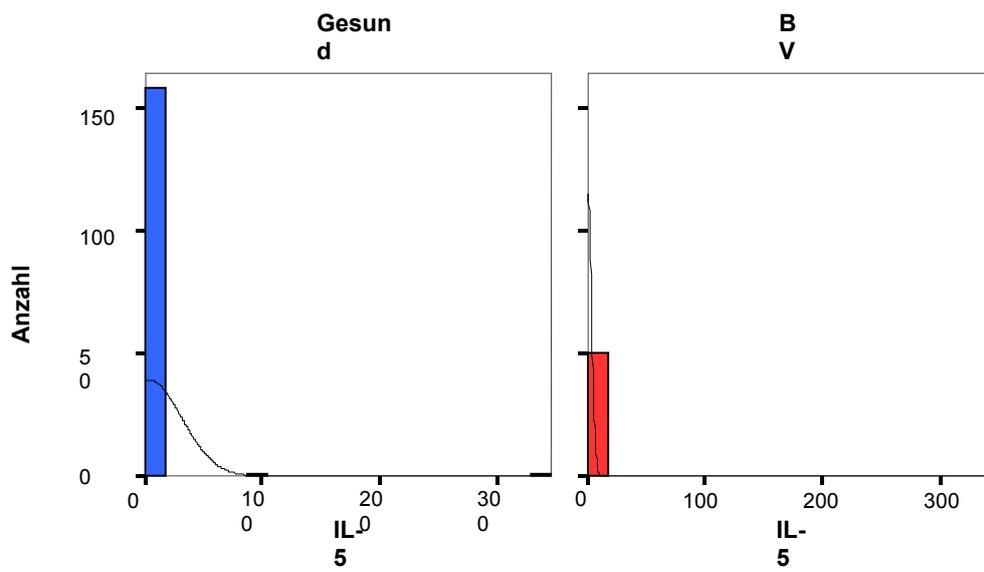


Abbildung 15: Histogramm: Interleukin-5 – Gesunde und Kontrollgruppe mit BV

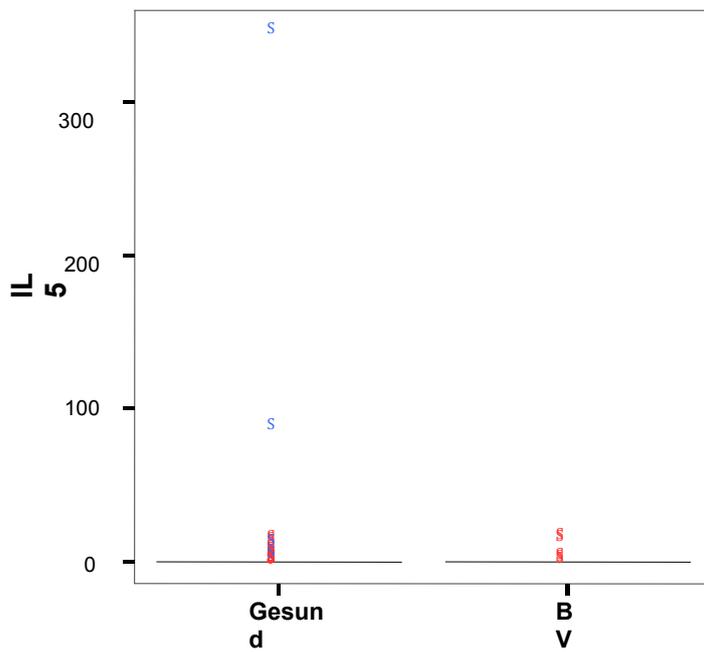


Abbildung 16: Boxplot: Zur Verdeutlichung von Median, Maximum und Minimum von IL-5

IL-10

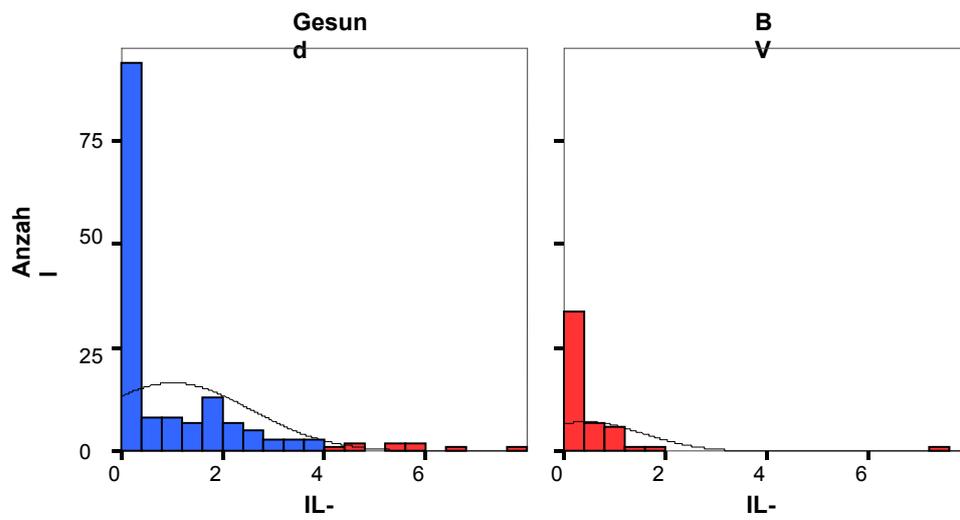


Abbildung 17: Histogramm: Interleukin-10 – Gesunde und Kontrollgruppe mit BV

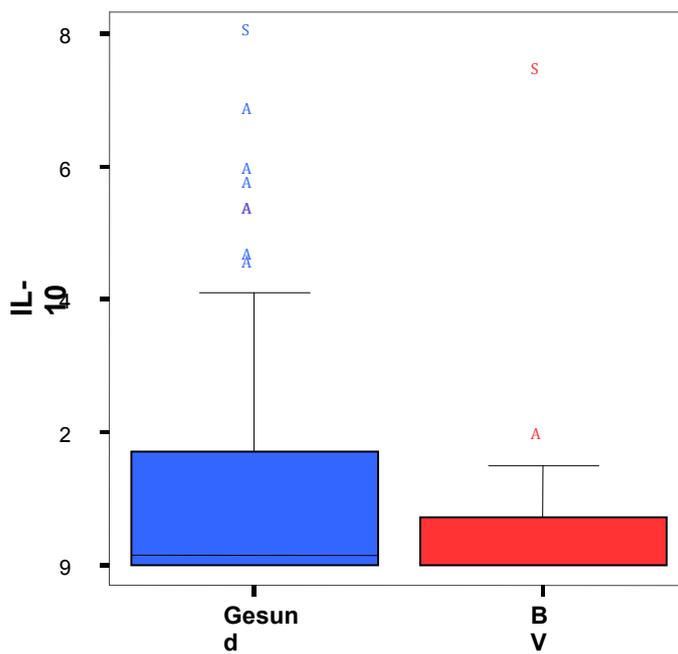


Abbildung 18: Boxplot: Zur Verdeutlichung von Median, Maximum und Minimum von IL-10

4.6. Paarweise Korrelationen

Die Korrelationen zwischen den Interleukinen waren zwischen IL-1 α und IL-1 β mässig positiv korreliert (Spearman-Korrelationskoeffizient $p=0,508$). Dies war der einzige Wert, der sinnvoll interpretierbar war, wie die folgende Tabelle veranschaulicht.

Die anderen Korrelationen ergaben sich aus den Extremwerten bei IL-5 und waren deshalb verzerrt.

Spearman-Korrelation-Matrix

	IL-1α	IL-1β	IL-5	IL-10
IL-1α	1,000			
IL-1β	**0,508	1,000		
IL-5	-0,068	-0,039	1,000	
IL-10	** -0,276	** -0,296	*0,162	1,000

Tabelle 13: Spearman-Korrelations-Koeffizienten gemessen zwischen den einzelnen Interleukinen. Signifikante Korrelationen sind markiert: **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$

5. Diskussion

Der Vaginalbereich der Frau ist ein hochkomplexer Bereich, indem eine Vielzahl von Mikroorganismen in einem Gleichgewicht leben. Kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichts z.B. durch einen herabgesetzten Immunstatus oder Medikamenteneinnahme, besiedeln rasch pathogene Keime die Vagina. Die primäre Abwehr pathogener Mikroorganismen stellt die angeborene Abwehr in Form von Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen, sowie Endothel- oder auch Epithelzellen dar. Diese ist bedeutend für die Vermehrung der neutrophilen Granulozyten, als auch für deren Aktivierung weiterer Abwehrmechanismen durch Zytokine.

Die angeborene Immunantwort ist als Vorläufer für die erworbene Immunantwort notwendig [77]. Einige Studien haben bereits vor uns Zytokine im vaginalen Abstrich untersucht, allerdings konnte bis jetzt noch nicht festgelegt werden, welcher vaginale Marker sich am besten für die Diagnose und entsprechende Schweregradeinteilung einer vaginalen Dysbalance eignet [78].

Bisher hat sich keine Studie mit den inflammatorischen Interleukinen-1- α und -1 β und antiinflammatorischen Interleukinen-5 und -10 sowohl bei gesunden Frauen als auch bei Frauen, die an BV erkrankt waren befasst. In diesem Zusammenhang untersuchten wir 160 asymptomatische, gesunde Frauen und als Kontrollgruppe 50 Patientinnen mit dem klinischen Bild der bakteriellen Vaginose, diagnostiziert durch Messung des pH-Wertes, Durchführung der Aminprobe und mikroskopische Beurteilung der Scheidenflora und Nachweis von „clue cells“. Bei beiden Patientengruppen handelte es sich um nichtschwängere Patientinnen, zum Ausschluss schwangerschaftsbedingter Veränderungen der Interleukinzusammensetzung. Sowohl in der Patientengruppe, als auch in der Kontrollgruppe untersuchten wir mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) die proinflammatorischen Interleukine-1 α und -1 β , sowie die antiinflammatorischen Zytokine IL-5 und IL-10.

Ziel war es primär den lokalen Immunstatus bei gesunden Frauen darzustellen. Im Bezug auf Interleukin-1 α konnten wir in unserer Auswertung einen Medianwert von 388,0 pg/ml

messen. Aufgrund der hohen Interleukinkonzentrationen bereits bei Gesunden waren wir gezwungen die Proben für die Messung von IL-1 α 1:10 mit NaCl zu verdünnen.

Die Konzentration von Interleukin-1 β zeigte deutlich niedrigere Werte bei gesunden Frauen mit einem gemessenen Medianwert von 15,530 pg/ml. Sowohl IL-1 α , als auch IL-1 β zeigten eine Erhöhung des Medianwertes bei an BV erkrankten Frauen, allerdings nur bei IL-1 β signifikant. Die Ergebnisse könnten auf eine Immunantwort zur Bekämpfung pathogener Mikroorganismen im Rahmen der bakteriellen Vaginose zurückzuführen sein, hingegen steht dies allerdings nicht im Einklang mit der Klinik, die äußerst selten klinische Symptome einer Entzündung aufweist.

Im Bezug auf Interleukin-5 und -10 waren die Medianwerte bei gesunden Frauen fast immer unterhalb der Nachweisgrenze. Bei Interleukin-10 konnte jedoch ein signifikanter Medianwert von 0,17 pg/ml dargestellt werden. Im Bezug auf die Kontrollgruppe zeigte sich eine Erniedrigung der IL-10-Konzentration auf Null. Die niedrigen Werte antiinflammatorischer Interleukine sind bei den meisten Erkrankten im Falle einer Entzündung vereinbar mit der Abwesenheit von klinischen Symptomen

Donders *et al.* [79] befassten sich mit dem Immunstatus der Vagina bei gesunden, nichtschwangeren Frauen und verglichen diesen mit dem Status gesunder, schwangerer Frauen. Interleukin-6, Interleukin-8, Interleukin-1 β , Interleukin-1-Rezeptorantagonist, Leukämie-inhibierender-Faktor und Tumornekrosefaktor wurden untersucht. Die Studie zeigte in Bezug auf Interleukin-1 β vergleichbare Werte bei beiden Patientengruppen. Bei anderen Zytokinen wie z.B. bei Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) konnten schwangerschaftsbedingte Veränderungen festgestellt werden. Die Konzentration von IL-1RA war während der gesamten Schwangerschaft erniedrigt. Bei Interleukin-6 und -8 konnten während des Schwangerschaftsverlaufes im 2. Trimester ein starker Abfall und im 3. Trimester wieder ein deutlicher Anstieg der Konzentration festgestellt werden. Weder der Tumornekrosefaktor noch der Leukämie-inhibierende-Faktor zeigten signifikante Konzentrationsveränderungen im Vergleich der beiden Patientengruppen.

Bélec *et al.* [80] untersuchten die Konzentration von IL-1 β und -6, sowie TNF-alpha bei gesunden Frauen und HIV-infizierten Frauen. Das Ergebnis ihrer Studie war entsprechend

der These, dass proinflammatorische Interleukine die Replikation und Verbreitung von HIV fördern, wodurch eine wesentlich höhere Expression der Zytokine bei HIV-positiven Frauen nachzuweisen war. Bélec [80] räumte ein, dass dieses Ergebnis sehr wichtig für die Aufklärung des Übertragungsweges von HIV wäre.

Die lokale Immunantwort ist bei vielen gynäkologischen vaginalen Infektionen von grosser Bedeutung. Shaio *et al.* [81] befassten sich mit vaginalen Trichomonasinfektionen und konnten zeigen, dass das proinflammatorische Zytokin IL-8 eine bedeutende Rolle bei akuten Entzündungsreaktionen spielt, welche für diese Erkrankung typisch sind.

Filler *et al.* [82] zeigten in Ihrer Studie, dass es bei einer *Candida albicans* Infektion der Vagina zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Interleukine wie Interleukin-6 und Interleukin-8, kommt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die lokale Immunität in diesem Krankheitsbild eine wichtige Rolle spielt. In Bezug auf die bakterielle Vaginose ist dies jedoch nicht so eindeutig. Auch wenn die normale vaginalflora durch eine Überwucherung von Anaerobiern aus dem Gleichgewicht gebracht wird, fehlen dennoch die gewöhnlichen Symptome, die für ein entzündliches Geschehen sprechen würden.

Donders *et al.* [24] haben sich mit den Veränderungen der normalen vaginalflora befasst und versucht, die bakterielle Vaginose von der aeroben Vaginitis abzugrenzen. Die typischen Symptome einer lokalen Entzündung, vertreten bei der aeroben Vaginitis, wie zum Beispiel Brennen, Schmerzen und Dyspareunia zeigen sich bei einer BV-Infektion nur selten. Die vaginalschleimhaut erscheint weder entzündet noch gerötet. Hinzu kommt das Fehlen einer erhöhten Anzahl von Leukozyten bei der mikroskopischen Beurteilung. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der aeroben Vaginitis eine stark erhöhte Anzahl von Leukozyten im vaginalen Abstrich und eine deutliche lokale Erhöhung proinflammatorischer Zytokine im vaginalsekret.

Falls man die bakterielle Vaginose als eine lokale Infektion ansieht ist laut momentanem Wissensstandpunkt hauptsächlich die zelluläre Immunantwort für die Abwehr von Fremdkörpern und Infektionen verantwortlich.

Der lokale Entzündungsprozess beginnt mit der Produktion von IL-1 α und IL-1 β durch Makrophagen nach Kontakt mit fremden Antigenen, Bakterien oder Viren. Diese Interleukine sind für die Stimulation von T-Helfer-Zellen verantwortlich, die ihrerseits IL-2 ausschütten und sich zu T_H1- oder T_H2-Untergruppen differenzieren. Die T_H1-Subpopulation fördert vorwiegend die Produktion proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-2, IL-6, IL-12, welche primär für die zelluläre Immunabwehr verantwortlich sind. Die T_H2-Subpopulation ist gekennzeichnet durch die Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-10, deren Aufgabe es mitunter ist, die Aktivierung der T_H1-Subpopulation zu unterbinden. Zusätzlich besteht ihre Aufgabe darin, B-Lymphozyten und dementsprechend die humorale Immunreaktion zu aktivieren. In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen BV und lokalen proinflammatorischen, als auch antiinflammatorischen Interleukinkonzentrationen in vaginalen Spüllösungen nachgewiesen.

Nicht übereinstimmend mit den eben erwähnten Studien sind unsere Ergebnisse. Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokinkonzentrationen in vaginalen Spüllösungen von gesunden Frauen und einer Kontrollgruppe, an BV erkrankten Frauen. Obwohl die Symptomatik der Frauen mit BV nicht für eine entzündliche Infektion spricht, haben wir lokale Veränderungen des Immunstatus der vaginalen Flora feststellen können.

In unserer Studie konnten erhöhte IL-1 α -Konzentrationen bei Frauen mit BV nachgewiesen werden. Die Zunahme des IL-1 α -levels wurden auch durch weitere Studien festgestellt [83-86].

Platz-Christiansen [84] zeigte in seiner Studie, dass die miteinander korrelierenden Konzentrationen von Endotoxinen und Interleukin-1 α im vaginalen Fluor von schwangeren Frauen mit BV wesentlich höher waren, als die Konzentrationen in der gesunden Kontrollgruppe.

In der Studie von Wasiela *et al.* [86] wurden Frauen in der 22. bis 35. SSW in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe I mit normaler Flora, Gruppe II mit einer Mischflora und Gruppe III mit BV. Interleukin-1 α -Konzentrationen waren in der erkrankten Gruppe siebenfach erhöht im Vergleich zur gesunden Gruppe (128,45 pg/ml versus 19,1 pg/ml).

Auch die Werte der IL-1 β , IL-6 und IL-8 verhielten sich entsprechend. Wasiela [86] zufolge gibt es eine positive Korrelation zwischen dem Anstieg lokaler proinflammatorischer Interleukine und der bakteriellen Vaginose.

Kalinka *et al.* [85] untersuchten den Interleukin-Status von IL-1 α , -1 β , -6 und -8 im zervikovaginalen Fluor bei Frauen mit vorzeitiger Wehentätigkeit und bei Frauen, deren Schwangerschaft normal verlief. Zusätzlich wurde die Beeinflussung durch Veränderungen der vaginalen Mikroflora auf die Interleukine untersucht. Die Interleukin-Konzentrationen von IL-1 α , -1 β und -8 zwischen den Frauen mit vorzeitigen Wehen und der Kontrollgruppe waren sehr ähnlich. Lediglich Interleukin-6 war bei Schwangeren mit Wehentätigkeit signifikant erhöht, nicht aber bei der Kontrollgruppe. In Bezug auf die BV konnte ein signifikanter Anstieg von IL-1 α , und -1 β , allerdings keine Erhöhung des Interleukins-6 festgestellt werden. Daraus ergab sich für Kalinka die Schlussfolgerung, dass man bevor man Interleukine im vaginalen Fluor zur Diagnostik für vorzeitige Wehentätigkeit heranzieht eine Infektion des Urogenitaltraktes ausschließen sollte.

Wennerholm *et al.* [83] befassten sich mit der Analyse von IL-1 α , IL-6 und IL-8 als Screeningmethode für Frühgeburtlichkeit bei Zwillingschwangerschaften. IL-8 war signifikant höher bei Frauen mit Frühgeburten, allerdings war die Aussagekraft zu schwach, um sie als Screeningmethode heranziehen zu können. Interleukin-6 und IL-1 α waren nicht signifikant assoziiert mit Frühgeburtlichkeit. Aber auch diese Studiengruppe stellte eine deutliche Erhöhung von IL-1 α und IL-8 bei Frauen fest, die an bakterieller Vaginose erkrankt waren.

Zusätzlich konnten wir eine signifikante Erhöhung von IL-1 β bei erkrankten Frauen im Vergleich zu Gesunden feststellen. Die lokale Erhöhung IL-1 β in vaginalen Spüllösungen wurde auch von anderen Autoren untersucht und bestätigt [53, 85-92].

Hedges *et al.* [89] untersuchten IL-1 β , TNF, IL-6 und IL-8-Konzentrationen sowohl im Serum, als auch von vaginalen Abstrichen bei Frauen mit allen drei Stadien der vaginalen Flora. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass sowohl im Übergangsstadium, als auch mit BV die Konzentration von IL-1 β signifikant höher war, als bei gesunden Frauen. Trotz der Veränderungen in der vaginalen Flora kam es zu keiner nachweisbaren

Interleukinerhöhung im Serum. Dies würde eher für ein lokales Geschehen der BV sprechen.

Mattsby-Baltzer [90] befasste sich in seiner Studie mit dem Zusammenhang von IL-1 β , IL-6, TNF und fetalem Fibronectin im zervikalen Fluor und bakterieller Vaginose. Im Vergleich zu gesunden Frauen war bei erkrankten Frauen die Zytokinkonzentration von IL-1 β , nicht aber IL-6, TNF oder FFN, signifikant erhöht ($p < 0,05$). *In vitro* konnte festgestellt werden, dass sowohl aufbereitetes Endotoxin von *Prevotella Bivia*, als auch hohe Endotoxinkonzentrationen in Verbindung mit bakterieller Vaginose, Monozyten/Makrophagen aktivieren, vermehrt Zytokine zu produzieren (IL-6). Dies würde erklären, warum es bei einer Erkrankung mit BV zu einer lokalen Erhöhung von Interleukinen kommt.

Cauci *et al.* [87] untersuchten den Zusammenhang zwischen IL-1 β Konzentrationen und dem anti-Gardnerella vaginalis hemolysin (anti-Gvh) im vaginalen Fluor. Sie kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass BV eine Erhöhung der lokalen IL-1 β -Konzentration bewirkt, allerdings zusätzlich auch vergesellschaftet ist mit einer parallelen antigenspezifischen, erworbenen Immunantwort.

Ziel der Untersuchung von Beigi [93] war es zu zeigen, dass die Immunantwort des unteren Genitaltraktes durch eine Schwangerschaft beeinflusst ist. Es galt zu vergleichen, wie sich das Verhalten der Immunantwort mittels proinflammatorischer Zytokinexpression sich bei schwangeren im Gegensatz zu nichtschwangeren Frauen verhält. Beigi kam zu dem Ergebnis, dass IL-1 β , IL-6 und IL-8 bei schwangeren Frauen mit BV signifikant höher waren, als bei nichtschwangeren mit BV.

Eine wichtige Komplikation der BV stellt das erhöhte Risiko einer HIV-Infektion dar. Dieser Zusammenhang zwischen BV und HIV wurde bereits mehrfach beschrieben [51, 91, 94]. Laut Osborn *et al.* [94] soll IL-1 β die HIV-Replikation fördern, indem es eine wichtige Promoterregion im Signalübertragungsweg aktiviert. Dieser Zusammenhang mit BV wird durch hohe Levels an IL-1 β oder TNF-alpha im vaginalen Fluor gekennzeichnet und scheint eine Erklärung dafür zu sein, dass die Ansteckungsgefahr bei diesen Patientinnen erhöht ist [91].

Im Gegensatz zu den eben beschriebenen Studien stellte Genc [95] eine Erniedrigung proinflammatorischer Zytokine bei abnormer vaginaler Flora schwangerer Frauen dar. Er analysierte vaginale Abstriche von 205 Frauen in der 18. bis 22. SSW auf die mikrobiologische Flora, das 70-kd Hitzeschockprotein, Interleukin-1 β , TNF und auf den Interleukin-1-Rezeptorantagonist. Das Hitzeschockprotein konnte bei 18,5% der Frauen festgestellt werden. Dessen Vorkommen wurde assoziiert mit einem erhöhten vaginalen pH, was für eine Erkrankung mit BV spricht, und einer Erhöhung von IL-1ra (> 80 % des Median). Folgedessen schlussfolgerte er, dass eine Erhöhung des Hsp70kd vergesellschaftet ist mit einer Steigerung von IL-1ra und dementsprechende Downregulierung proinflammatorischer Interleukine [95].

Unsere Studie befasste sich nicht nur mit proinflammatorischen Interleukinen im vaginalen Fluor, sondern auch mit antiinflammatorischen Zytokinen.

Interleukin-5 und -10 zählt man zu den T_H2-Typ-Zytokinen, die für die Aktivierung der B-Lymphozyten und dementsprechend für die humorale Immunantwort verantwortlich sind. Sie wirken antiinflammatorisch, indem sie T_H1-Zytokine inhibieren und somit als Gegenregulation den Verlauf und das Ausmaß der Entzündungsreaktion beeinflussen.

Interleukin 5 ist hauptsächlich verantwortlich für die Aktivierung und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten und steigert die Synthese und Sekretion von Immunglobulin A durch Plasmazellen. Es spielt somit eine wichtige Rolle bei chronischen entzündlichen Erkrankungen und wird als das Hauptzytokin allergischer Prozesse bezeichnet [96].

Ricer *et al.* [97] stellten eine erhöhte Anzahl von eosinophilen Granulozyten bei Patientinnen mit rezidivierenden Beschwerden ohne Nachweis einer Infektion fest. Als Ursache der Beschwerden kam aus diesem Grund eine intravaginale allergische Reaktion in Betracht.

Interleukin-10 agiert als antiinflammatorisches Zytokin, indem es die Makrophagenfunktion und die Synthese der T_H1-Zytokine hemmt und somit eine überschießende Entzündungsreaktion verhindert. Durch die späte Expression (24h nach Stimulation) und die Fähigkeit zur Autoregulation spielt IL-10 eine Schlüsselrolle in der

Regulation der Entzündungsantwort im Monozyten/Makrophagen System [98]. Darüber hinaus stimuliert IL-10 die Expression des IL-1 Rezeptorantagonisten und komplettiert somit die antiinflammatorische Wirkung.

Simha *et al.* [99] stellten fest, dass bei schwangeren Frauen ohne vaginale Infektion das Rauchen von Zigaretten eine Erhöhung der antiinflammatorischen Interleukine im zervikalen Fluor, nicht jedoch der proinflammatorischen Zytokine bewirkt. Dies könnte eine Erklärung für ein erhöhtes Infektionsrisiko bei Raucherinnen sein.

Im Gegensatz zu unserer Studie zeigte sich in der Untersuchung von Cohen *et al.* [51] eine deutliche Erhöhung der Interleukin-10-Konzentrationen bei Frauen mit BV-, Gonorrhoe- oder Chlamydieninfektion. Sie schlussfolgerten, dass diese erhöhten Zytokinlevel von IL-10 eine Downregulation der T_H1-Immunabwehr bewirken und somit die Anfälligkeit einer HIV-Infektion erhöhen. In dieser Studie wurden allerdings nur Frauen eingeschlossen, die an einer Beckenbodenentzündung mit oder ohne zusätzliche vaginale Infektion erkrankt waren. Die erhöhten IL-10-Levels könnten auch auf die Beckenbodenentzündung zurückzuführen sein.

In der Studie von Cherpes *et al.* [100] wurde der Einfluss von hormonellen Kontrazeptiva auf die lokale Entzündungsreaktion bei bakterieller Vaginose untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl proinflammatorische, als auch antiinflammatorische Zytokine signifikant bei Frauen mit BV erhöht waren. Bei Frauen mit hormoneller Empfängnisverhütung waren die proinflammatorischen Levels von TNF, Interferon-gamma etc. signifikant niedriger, allerdings gab es keine signifikante Verminderung des antiinflammatorischen Schlüsselzytokins IL-10.

Yasodhara *et al.* [101] stellten fest, dass Unterernährung ein Risikofaktor für die bakterielle Vaginose ist und ermittelten ebenfalls eine signifikante Erhöhung von IL-10 im zervikovaginalen Fluor bei Frauen mit BV.

In der Studie von Giraldo *et al.* [102] wurde festgestellt, dass chronische Entzündungen in der Vagina eine lokale Erhöhung von IL-10 bewirken. Es zeigt sich, dass diese hohen Zytokinlevels von IL-10 hervorgerufen durch rezidivierende vaginale Infektionen

weiterhin bestanden, selbst wenn es keine akute Infektion gab. Diese würde darauf hinweisen, dass in der Phase der akuten Infektion die T_H1 -Immunantwort die hauptsächliche Abwehr darstellt und bei chronischer Erkrankung verstärkt die Interleukine der T_H2 -Immunabwehr aktiv sind. Folglich scheinen proinflammatorische Zytokine bei der bakteriellen Vaginose für die lokale Immunabwehr eine große Rolle zu spielen.

In unserer Studie konnten wir feststellen, dass antiinflammatorische Interleukine bei Frauen mit BV im vaginalen Fluor niedriger waren. In Bezug auf Interleukin-5 zeigte sich allerdings nur eine Tendenz zur Konzentrationsveränderung, da die Konzentrationswerte sehr niedrig waren und keine signifikanten Ergebnisse lieferten. Bei Interleukin-10 konnten wir in unserer Studie bei gesunden Frauen eine höhere Zytokinkonzentrationen feststellen, als bei an BV erkrankten Patientinnen.

Im Allgemeinen lagen die Werte an der Nachweisgrenze, allerdings konnte eine sinkende Tendenz von Interleukin-10 nachgewiesen werden, wenn es zu einer Erkrankung mit BV kommt. Durch die Festlegung der Nachweisgrenze auf 1pg/ml wurden Konzentrationen unter 1pg/ml mit Null bewertet. In unserer Studie konnten bei 41% der gesunden Frauen IL-10-Konzentrationen über der Nachweisgrenze festgestellt werden und bei erkrankten Frauen nur 10%.

6. Zusammenfassung

Obwohl die bakterielle Vaginose weltweit eine der häufigsten Infektionen des Urogenitaltraktes bei gebärfähigen Frauen ist, ist die Pathogenese dieser Krankheit noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund von schwerwiegenden Komplikationen sowohl bei Schwangeren, als auch bei nicht schwangeren Frauen, ist es von entscheidender Bedeutung, die Erkrankung möglichst früh zu erkennen. Die momentane Diagnostik wird durch einen asymptomatischen Verlauf in jedem zweiten Krankheitsfall deutlich erschwert.

Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, den lokalen Immunstatus der vaginalen Flora bei gesunden Frauen zu bestimmen und diesen mit der Kontrollgruppe an BV erkrankten Frauen zu vergleichen.

Wir untersuchten den vaginalen Abstrich von 160 gesunden Frauen und von 50 klinisch an bakterieller Vaginose erkrankter Frauen und verglichen diese im Anschluss. Bei beiden Patientengruppen handelte es sich um nicht schwangere Frauen.

Die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine IL-1 α , IL-1 β und antiinflammatorischen Interleukine-5 und -10 wurden mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt.

Hinsichtlich der empirischen Untersuchung der Medianwerte von IL-1 α gesunder Frauen und der Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,485$). Anders verhielten sich die Ergebnisse bei IL-1 β . Im Vergleich zu gesunden Frauen zeigten sich im vaginalen Abstrich der Frauen mit bakterieller Vaginose eine signifikante Konzentrationserhöhung des Medianwerts von über 50 % ($p=0,008$).

Die Bestimmung von IL-5 ergab Medianwerte bei beiden Untersuchungsgruppen von Null. Die Meanwerte lagen generell in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen und konnten somit keine signifikanten Ergebnisse liefern ($p=0,144$). Eine Tendenz der Zytokinverminderung konnte bei erkrankten Frauen dennoch festgestellt werden.

Auch die gemessenen Konzentrationen von IL-10 waren sehr niedrig, konnten aber als signifikant bewertet werden ($p = 0,011$). Es zeigte sich bei erkrankten Frauen eine Erniedrigung der IL-10-Konzentration im vaginalen Abstrich.

Anhand unserer Ergebnisse scheint die lokale Immunantwort bei bakterieller Vaginose eine bedeutende Rolle zu spielen. Im Hinblick auf die schwerwiegenden Folgen dieser Erkrankung wie z.B. bei Schwangeren Amnioninfektionssyndrom oder Frühgeburtlichkeit und bei nicht schwangeren Frauen z.B. Endometritis oder erhöhtes Infektionsrisiko mit HIV bzw. HSV, ist es von Bedeutung diese Ergebnisse weiterzuverfolgen und noch andere Interleukine auf deren Bedeutung in der Pathogenese dieses Krankheitsbildes zu untersuchen.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Therapie, die je früher sie begonnen wird, umso effektiver ist. Mittel der Wahl ist weiterhin die Behandlung mit Metronidazol oder Clindamycin.

Es wäre notwendig, Standarduntersuchungen zu entwickeln, die eine schnelle und sichere Diagnosestellung der bakteriellen Vaginose ermöglichen, bevor es zur Symptomatik bzw. Komplikationen kommen kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Antonio MD, H.S., Hillier SL, *The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species*. J Infect Dis, 1999. **180**: p. 1950-1956.
2. Burton JP, C.P., Reid G, *Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic installation*. Appl Environ Microbiol, 2003: p. 97-101.
3. Giorgi A, T.S., Dellaglio F, Bo G, Stola E, Bernuzzi L, *Identification of vaginal lactobacilli from asymptomatic women*. Microbiologica, 1987. **10**: p. 377-84.
4. Forsum U, H.E., Larsson PG, Vaquez A, Jakobsson T, Mattsby-Baltzer I, *Bacterial vaginosis - a microbiological and immunological enigma*. APMIS, 2005. **113**: p. 81-90.
5. Vallor AC, A.M., Hawes SE, Hillier SL, *Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: Role of hydrogen peroxide production*. J Infect Dis, 2001. **184**: p. 1431-6.
6. Hillier, *The vaginal microbial ecosystem and resistance to HIV*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**: p. 17-21.
7. Koumans EH, K.J., CDC Bacterial Vaginosis Working Group, *Preventing adverse sequelae of bacterial vaginosis: a public health program and research agenda*. Sex Transm Dis, 2001. **28**: p. 292-7.
8. Mardh, *The definition and epidemiology of bacterial vaginosis*. Rev Fr Gynecol Obstet, 1993. **88**: p. 195-7.
9. Hill, *The microbiology of bacterial vaginosis*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**: p. 450-454.
10. Prevention., U.C.f.D.C.a., *Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002*. MMWR, 2002: p. 51.
11. Sobel, *Bacterial Vaginosis*. Br J Clin Pract Suppl, 1990. **71**: p. 65-9.
12. Thomason JL, G.S., Broikhuizen FF, *Advances in the understanding of bacterial vaginosis*. J Reprod Med, 1989. **34**: p. 581-7.
13. Morris M, N.A., Simms I, Wilson J, Catchpole M, *Bacterial Vaginosis: a public health*. BJOG, 2001. **108**: p. 439-50.
14. Wang, *Bacterial vaginosis*. Prim Care Update Ob Gyns, 2000. **7**: p. 181-5.
15. González Pedraza Avilés A, O.Z.M., Irigoyen Coria A, *Bacterial vaginosis a "broad overview"*. Rev Latinoam Microbiol, 1999. **41**: p. 25-34.
16. Hillier, *The complexity of microbial diversity in bacterial vaginosis*. N Engl J Med, 2005. **353**: p. 1886-7.
17. Adad SJ, d.L.R., Sawan ZT, Silva ML, de Souza MA, Saldanha JC, Falco VA, da Cunha AH, Murta EF, *Frequency of Trichomonas vaginalis, Candida sp and Gardnerella vaginalis in cervical-vaginal smears in four different decades*. Sao Paulo Med J, 2001. **119**: p. 200-5.
18. Goldenberg RL, K.M., Nugent R, Krohn MA, Hillier S, Andrews WW, *Bacterial colonization of the vagina during pregnancy in four ethnic groups. Vaginal Infections and Prematurity Study Group*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**: p. 1618-21.
19. Hill LH, R.H., Embel JA, *Nonspecific vaginitis and other genital infections in three clinic populations*. Sex Transm Dis, 1983. **10**: p. 114-8.
20. Myziuk L, R.B., Johnson SC, *BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis*. J Clin Microbiol, 2003. **41**: p. 1925-8.

21. Woodrow N, L.R., *Bacterial vaginosis: its importance in obstetrics*. Hosp Med, 1998. **59**: p. 447-50.
22. Hawes SE, H.S., Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wolner-Hanssen P, Holmes KK, *Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections*. J Infect Dis, 1996. **174**: p. 1058-63.
23. O'Brien, *Bacterial vaginosis: many questions - any answers?* Curr Opin Pediatr, 2005. **17**: p. 437-9.
24. Donder GG, V.A., Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B, *Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis*. BJOG, 2002. **109**: p. 34-43.
25. Larsson PG, P.-C.J., Sundström E, *Is bacterial vaginosis a sexually transmitted disease?* Int J STD AIDS, 1991. **2**: p. 362-4.
26. Chiaffarino F, P.F., De Besi P, Lavezzari M, *Risk factors for bacterial vaginosis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **117**: p. 222-226.
27. Gutman RE, P.J., Weitzen S, Blume J, *Evaluation of clinical methods for diagnosing bacterial vaginosis*. Obstet Gynecol, 2005. **105**: p. 551-6.
28. Ness RB, H.S., Richter HE, Soper DE, Stamm C, Bass DC, Sweet RL, Rice P, *Can known risk factors explain racial differences in the occurrence of bacterial vaginosis?* J Natl Med Assoc, 2003. **95**: p. 201-12.
29. Fry, *Bacterial vaginosis and other maternal infections: treatable causes of the Black-White gap?* Ethn Dis, 2003. **13**: p. 3-108-11.
30. Amsel R, T.P., Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK, *Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations*. The American Journal Of Medicine, 1983. **74**: p. 14-22.
31. Shoubnikova M, H.D., Nilsson S, Mårdh PA, *Contraceptive use in women with bacterial vaginosis*. Contraception, 1997. **55**: p. 355-8.
32. Muñoz Bellido JL, G.S.J., García-Rodríguez JA., *Epidemiological factors and vaginal flora changes in vaginal bacteriosis (bacterial vaginosis)*. Enferm infec Microbiol Clín, 1992. **10**: p. 340-4.
33. Avonts S, S.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*. Sexually transmitted diseases, 1999. **17**: p. 23-29.
34. Mardh, *Bacterial vaginosis: a threat to reproductive health? Historical perspectives, current knowledge, controversies and research demands*. Eur J Contracept Reprod Health Care, 2000. **5**: p. 208-19.
35. Bailey JV, F.C., Owen C, *Bacterial vaginosis in lesbians and bisexual woman*. Sexually transmitted diseases, 2004. **31**: p. 691-694.
36. Berger BJ, K.S., Zenilman JM, et al., *Bacterial vaginosis in lesbians: a sexually transmitted disease*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 1995. **21**: p. 1402-1405.
37. Marrazzo JM, K.L., Eschenbach DA, Agnew K, Stine K, Hillier SL, *Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women*. J Infect Dis, 2002. **185**: p. 1307-13.
38. Yen S, S.M., Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB, *Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military*. Obstet Gynecol, 2003. **102**: p. 927-33.
39. Keane F, I.C., Taylor-Robinson D, *A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle*. Int J STD AIDS, 1997. **8**: p. 489-94.

40. Administration, U.S.F.a.D., *Clue cell*. <http://www.fda.gov/cder/present/anti-infective798/bv/sld011.htm>, 2007.
41. Spiegel CA, A.R., Holmes KK, *Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid*. J Clin Microbiol, 1983. **18**: p. 170-7.
42. Nugent RP, K.M., Hillier SL, *Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation*. J Clin Microbiol, 1991. **29**: p. 297-301.
43. Sweet, *Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2000. **8**: p. 184-90.
44. Wiesenfeld HC, H.S., Krohn MA, Amortegui AJ, Heine RP, Landers DV, Sweet RL, *Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease*. Obstet Gynecol, 2002. **100**: p. 456-63.
45. Sweet, *Role of bacterial vaginosis in pelvic inflammatory disease*. Clin Infect Dis, 1995. **20**: p. 271-5.
46. Korn AP, B.G., Padian N, Ohm-Smith M, Schachter J, Landers DV, *Plasma cell endometritis in women with symptomatic bacterial vaginosis*. Obstet Gynecol, 1995. **85**: p. 387-390.
47. Larsson PG, B.B., Forsum U, Platz-Christensen JJ, Pahlson C, *Mobiluncus and clue cells as predictors of PID after first-trimester abortion*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1989. **68**: p. 217-220.
48. Faro S, M.M., Maccato M, Hammill H, Pearlman M, *Vaginal flora and pelvic inflammatory disease*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**: p. 470-4.
49. Taha TE, H.D., Dallabetta GA, Kumwenda NI, Mtimaivalye LA, Yang LP, Liomba GN, Broadhead RL, Chipangwi JD, Miotti PG, *Bacterial vaginosis and disturbances in vaginal flora: association with increased acquisition of HIV*. AIDS, 1998. **12**: p. 1699-706.
50. Martin HL, R.B., Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Bwayo J, Kreiss J, *Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition*. J Infect Dis, 1999. **180**: p. 1863-8.
51. Cohen CR, P.F., Mugo N, Maclean I, Shen C, Bukusi EA, Irungu E, Sinei S, Bwayo J, Brunham RC, *Increased interleukin-10 in the endocervical secretions of women with non-ulcerative sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission?* AIDS, 1999. **13**: p. 327-32.
52. Chernes TL, M.L., Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL., *Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis*. Clin Infect Dis, 2003. **37**: p. 319-25.
53. Spandorfer SD, N.A., Giraldo PC, Rosenwaks Z, Witkin SS, *Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF*. J Reprod Med, 2001. **46**: p. 806-10.
54. Mercer BM, G.R., Meis PJ, Moawad AH, Shellhaas C, Das A, Menard MK, Caritis SN, Thurnau GR, Dombrowski MP, Miodovnik M, Roberts JM, McNellis D, *The Preterm Prediction Study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **2000**: p. 738-45.
55. Hillier SL, M.J., Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA, *A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity*. N Engl J Med, 1988. **319**: p. 972-8.

56. Goldenberg RL, H.J., Andrews WW, *Intrauterine infection and preterm delivery*. N Engl J Med, 2000. **342**: p. 1500-7.
57. Silver HM, S.R., St Clair PJ, Gibbs RS, *Evidence relating bacterial vaginosis to intraamniotic infection*. Am J Obstet Gynecol, 1989. **161**: p. 808-12.
58. Platz-Christensen JJ, P.P., Hagmar B, Andersson E, Brandberg A, Wiquist N, *A longitudinal follow-up of bacterial vaginosis during pregnancy*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1993. **72**: p. 99-102.
59. Leitich H, B.-A.B., Brunbauer M, Kaider A, Egartner C, Husslein P, *Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **189**: p. 139-47.
60. Soper, *Gynecologic Complications of Bacterial Vaginosis: Facts or Fiction?* Curr Infect Dis Rep, 1999. **1**: p. 393-7.
61. Newton ER, P.T., Gibbs RS, *A clinical and microbiologic analysis of risk factors for puerperal endometritis*. Obstet Gynecol, 1990. **75**: p. 402-6.
62. Jacobsson B, P.P., Chidekel L, Jörgen Platz-Christensen J, *Bacterial vaginosis in early pregnancy may predispose for preterm birth and postpartum endometritis*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002. **81**: p. 1006-10.
63. Eschenbach, *History and review of bacterial vaginosis*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**: p. 441-5.
64. Dammann O, L.A., *Does prepregnancy bacterial vaginosis increase a mother's risk of having a preterm infant with cerebral palsy?* Dev Med Child Neurol, 1997. **39**: p. 836-40.
65. Eggink BH, R.C., Rowen JL, *Gardnerella vaginalis-infected scalp hematoma associated with electronic fetal monitoring*. Pediatric Infect Dis J, 2004. **23**: p. 276-278.
66. Amaya RA, A.-D.F., Demmler GJ, *Gardnerella vaginalis bacteremia in a premature neonate*. J Perinatol, 2002. **22**: p. 585-7.
67. Stelmach T, K.E., Talvik T, *Antenatal risk factors associated with unfavorable neurologic status in newborns and at 2 years of age*. J Child Neurol, 2004. **19**: p. 116-22.
68. Hay, *Recurrent bacterial vaginosis*. Dermatol Clin, 1998. **16**: p. 769-73.
69. Swidsinski A, M.W., Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dörffel Y, Scholze J, Lochs H, Verstraelen H, *An adherent Gardnerella vaginalis biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole*. Am J Obstet Gynecol, 2008. **198**: p. 97.
70. Verstraelen H, V.R., Claeys G, Temmerman M, Vanechoutte M, *Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of Atopobium vaginae with bacterial vaginosis*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**: p. 1130-2.
71. Bradshaw CS, T.S., Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM., *The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy*. J Infect Dis, 2006. **194**: p. 828-36.
72. De Backer E, V.R., Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M, Vanechoutte M, *Antibiotic susceptibility of Atopobium vaginae*. BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 51.
73. Abul K, A., Andrew H. Lichtmann, *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 5. 2005.
74. Kramer, *Immunologie und Immunpathologie*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1997.
75. Janeway Charles A., T.P., *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg Berlin Oxford, 1997.

76. Puccetti P, R.L., Bistoni F, *A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy*. Trends Microbiol, 1995. **3**: p. 237-40.
77. Medzhitov R, J.C.J., *Innate immune induction of the adaptive immune response*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 429-35.
78. Donders GG, B.E., Dekeersmaecker A, Vereecken A, Van Bulck B, Spitz B., *Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**: p. 872-8.
79. Donders GG, V.A., Bosmans E, Spitz B, *Vaginal Cytokines in normal pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **189**: p. 1433-8.
80. Bélec L, G.R., Payan C, Prazuck T, Malkin JE, Tévi-Bénissan C, Pillot J, *Proinflammatory cytokine expression in cervicovaginal secretions of normal and HIV-infected women*. Cytokine, 1995. **7**: p. 568-74.
81. Shaio MF, L.P., Liu JY, Yang KD, *Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to Trichomonas vaginalis stimulation*. Infect Immun, 1995. **63**: p. 3864-70.
82. Filler SG, P.A., Spellberg BJ, Spellberg JP, Edwards JE Jr, *Candida albicans stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells*. Infect Immun, 1996. **64**: p. 2607-17.
83. Wennerholm UB, H.B., Mattsby-Baltzer I, Nielsen T, Platz-Christensen JJ, Sundell G, Hagberg H, *Interleukin-1 alpha, interleukin-6 and interleukin-8 in cervico/vaginal secretion for screening of preterm birth in twin gestation*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1998. **77**: p. 508-14.
84. Platz-Christensen JJ, M.-B.I., Thomsen P, Wiqvist N, *Endotoxin and interleukin-1 alpha in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**: p. 1161-6.
85. Kalinka J, W.M., Brzezinska-Blaszczyk E, *Impact of threatened preterm labor and lower genital tract biocenosis on the concentrations of selected proinflammatory cytokines in cervicovaginal fluid of pregnant women*. Ginekol Pol, 2003. **74**: p. 1118-25.
86. Wasiela M, K.Z., Kalinka J, Brzezinska-Blaszczyk E, *[Correlation between levels of selected cytokines in cervico-vaginal fluid of women with abnormal vaginal bacterial flora]*. Med Dosw Mikrobiol, 2005. **57**: p. 327-33.
87. Cauci S, D.S., Guaschino S, Isola M, Quadrifoglio F, *Correlation of local interleukin-1 beta levels with specific IgA response against Gardnerella vaginalis cytolyisin in women with bacterial vaginosis*. Am J Reprod Immunol, 2002. **47**: p. 257-64.
88. Basso B, G.F., López C, *IL-1beta, IL-6 and IL-8 levels in gynecologic infections*. Infect Dis Obstet Gynecol., 2005. **13**: p. 207-11.
89. Hedges SR, B.F., Desmond RA, Schwebke JR, *Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora*. J Infect Dis, 2006. **193**: p. 556-62.
90. Mattsby-Baltzer I, P.-C.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, 1998. **77**: p. 701-6.
91. Sturm-Ramirez K, G.-D.A., Eisen G, Mboup S, Kanki PJ, *High levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus*. J Infect Dis, 2000. **183**: p. 467-73.
92. Cauci S, G.S., De Aloysio D, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Quadrifoglio F., *Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women*. Mol Hum Reprod., 2003. **9**: p. 53-8.

93. Beigi RH, Y.M., Cosentino L, Meyn LA, Hillier SL, *Cytokines, pregnancy, and bacterial vaginosis: comparison of levels of cervical cytokines in pregnant and nonpregnant women with bacterial vaginosis*. J Infect Dis, 2007. **196**: p. 1355-60.
94. Osborn L, K.S., Nabel GJ, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1989. **86**: p. 2336-40.
95. Genç MR, K.E., Onderdonk AB, Bongiovanni AM, Delaney ML, Witkin SS; Microbiology and Prematurity Study Group, *Association between vaginal 70-kd heat shock protein, interleukin-1 receptor antagonist, and microbial flora in mid trimester pregnant women*. Am J Obstet Gynecol, 2005. **192**: p. 916-21.
96. Wauwe, *Interleukin-5 as a potential target for asthma treatment*. Drug News Perspect, 2000. **13**: p. 197-205.
97. Ricer RE, G.R., *Allergic vaginitis, a possibly new syndrome. A case report*. J Reprod Med., 1988. **33**: p. 781-3.
98. Wang P, W.P., Siegel MI, Egan RW, Billah MM, *IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol, 1994. **153**: p. 811-6.
99. Simhan HN, C.S., Hillier SL, Krohn MA, *Cervical anti-inflammatory cytokine concentrations among first-trimester pregnant smokers*. Am J Obstet Gynecol., 2005. **193**: p. 1999-2003.
100. Cherpes TL, M.J., Cosentino LA, Meyn LA, Murray PJ, Hillier SL, *Hormonal contraceptive use modulates the local inflammatory response to bacterial vaginosis*. Sex Transm Infect., 2008. **84**: p. 57-61.
101. Yasodhara P, R.M., Sreeramulu D, Venu L, Hemalatha R, Krishna TP, *Local immunity in Indian women with bacterial vaginosis*. J Reprod Immunol, 2006. **70**: p. 133-41.
102. Giraldo P, N.A., Korneeva IL, Ribeiro-Filho A, Simões JA, Witkin SS, *Vaginal heat shock protein expression in symptom-free women with a history of recurrent vulvovaginitis*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **180**: p. 524-9.

8. AnhangGeräte

Pipetten

Eppendorf, Gilson

Plattenphotometer, Typ Anthos

Anthos Labtec Instruments
Österreich

Tischzentrifuge, Typ Z 230 MR

Hermle, Deutschland

Vortexgerät, Typ VF 2

Janke & Kunkel,
IKA-Labortechnik, Deutschland

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. E.R. Weissenbacher meinen besten Dank aussprechen für die Bereitstellung der Patientendaten und für die Überlassung des Themas, sowie die stets freundliche Zusammenarbeit.

Im Gedenken an Herrn Dr. H. Spitzbart möchte ich mich für die fachliche Betreuung sowie die stetige, hilfreiche Unterstützung und eingehende Beratung in allen wissenschaftlichen und organisatorische Fragen bedanken.

Frau Dr. G. Anton gilt mein besonderer Dank für Ihre grosse Unterstützung und die zeitintensive persönliche Betreuung bei der Versuchsdurchführung und Auswertung der Ergebnisse.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. L. Bichlmeier für ihre zeitintensive Unterstützung bei der Korrektur und Fertigstellung meiner Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Ehemann Philip bedanken, der mich während der Studienzeit, vor allem in der Examenszeit und jetzt auch beim Abschluss meiner Doktorarbeit mit viel Optimismus und Geduld unterstützt hat.

Zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Mutter, die mir das Medizinstudium ermöglicht hat und mir bei allen schwierigen Situationen zur Seite steht.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Schmid-Lossberg, geb. Rid
Vornamen: Juliette-Christin Miriam
Geburtsdatum/-ort: 07.08.1979, München
Adresse: Seestrasse 662
8706 Meilen, Schweiz
E-Mail: julieschmid-lossberg@web.de
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Berufliche Weiterbildung:

Seit 1.Dezember 2008 Assistenzärztin im Kantonsspitalwinterthur
Frauenklinik für Gynäkologie und
Geburtshilfe, Dr. T. Hess
Schweiz

01.10.2007-01.12.2008 Assistenzärztin im Klinikum Landsberg am
Lech
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe,
Dr. A. Motamedi
Deutschland

Kurse und Seminare:

April 2009 „Nahtkurs höhergradiger Dammriss“,
Luzern, Schweiz

Oktober 2008 Dopplersonographie Grundkurs Geburtshilfe,
Salzburg, Österreich

Mai 2008 Vaginalinfektionen- das Nativpräparat
Risikomanagement im Kreissaal
Reanimationskurs für Neugeborene,
Augsburg, Deutschland

Mai 2008 Refresher-Workshop „Das fetale Herz-
Ultraschall-Screening“,
München, Deutschland

Hochschulausbildung

Mai 2007 Ärztliche Prüfung
Mai 2003 Ärztliche Vorprüfung
April 2001-Mai 2007 Ludwig-Maximilians-Universität München
Studiengang: Humanmedizin

Praktisches Jahr

Oktober 2006-Januar 2007

Klinikum Harlaching
Städtisches Klinikum München GmbH
Klinik für Allgemein und Viszeralchirurgie,
Prof. Dr. J. Horn
Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und
Wiederherstellungschirurgie,
Prof. Dr. H. Hertlein
München, Deutschland

Juni-Oktober 2006

Klinikum Starnberg
Frauenklinik, Prof. Dr. C. Anthuber
Starnberg, Deutschland

Februar-Juni 2006

Klinikum Harlaching
Städtisches Klinikum München GmbH
Klinik für Kardiologie, Dr. R. Lindlbauer
München, Deutschland

Famulaturen

März-April 2005

Gemeinschaftspraxis für Kinderheilkunde,
Dr. S. Gaisbauer
Simbach am Inn, Deutschland

September-Oktober 2004

Centre Hospitalier Universitaire (CHU)
Hôpital Lapeyronie
Centre de Traitement des Brûles, Dr. O. Griffe
Montpellier, Frankreich

März 2004

Frauenklinik vom Roten Kreuz
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe,
Prof. Dr. W. Eiermann
München, Deutschland

September 2003

Klinikum Dritter Orden
Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und
Thoraxchirurgie, Dr. E. Pütterich
München-Nymphenburg, Deutschland

Praktika

September 2000

City Park Hospital
Abteilung für Herzchirurgie, Dr. S. Vosloo
Kapstadt, Südafrika

April-Mai 2000

Tierärztliche Gemeinschaftspraxis,
Dr. A. Laerum & P. Weiss
Simbach am Inn, Deutschland

Juli-August 1999

Tierärztliche Klinik, Dr. C. Post
Schönau/Ndb., Deutschland

Weitere Ausbildung

September 1999-April 2001

Krankenpflegeausbildung
Krankenhaus Barmherzige Brüder
München, Deutschland

Schulbildung

1997-1999

Tassilo Gymnasium, Simbach am Inn
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

1995-1997

Deutsche Schule Paris, Frankreich

1990-1995

Tassilo Gymnasium, Simbach am Inn

1986-1990

Wilhelm Grundschule, München