

**Bedeutung der Zytokine Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ ,  
Interleukin-2, Interleukin-3 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$   
im Vaginalsekret bei Frauen mit Bakterieller Vaginose**

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

**Bedeutung der Zytokine  
Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-3  
und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$   
im Vaginalsekret bei Frauen mit Bakterieller Vaginose**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

An der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Mathias Cronjäger

Feldkirchen-Westerham

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer.nat. Hubert Hilbi

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. G. Anton

Prof. Dr. med. H. Spitzbart

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2013

*Gewidmet meiner Familie*



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IV
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Einleitung .....	1
1.1.1 Bakterielle Vaginose .....	1
1.1.1.1 Transmission.....	1
1.1.1.2 Klinik .....	2
1.1.1.3 Ursache und Pathogenese der BV .....	2
1.1.1.4 Diagnostik .....	6
1.1.1.5 Assoziationen der BV mit verschiedenen Erkrankungen .....	8
1.1.2 Immunologie .....	9
1.1.3 Zytokine .....	12
1.1.3.1 Einteilung der Zytokine.....	12
1.1.3.1.1 Interleukin-1 $\alpha$ und Interleukin-1 $\beta$ .....	13
1.1.3.1.2 Interleukin 2.....	15
1.1.3.1.3 Interleukin 3.....	15
1.1.3.1.4 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ .....	17
1.2 Fragestellung .....	18
2. Material und Methodik.....	19
2.1 Materialien .....	19

2.1.1 Geräte .....	19
2.2 Patientinnen .....	20
2.2.1 Studiengruppe .....	20
2.2.2 Vaginalabstriche .....	21
2.3 Zytokinbestimmung .....	21
2.3.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay .....	21
2.3.1.1 Testansatz und Durchführung .....	21
2.3.1.2 Auswertungen der Messergebnisse .....	26
2.4 Reinheitsgrad .....	28
2.5 Amintest .....	29
2.6 pH-Wert .....	29
2.7 Clue cells .....	29
2.8 Statistische Auswertung .....	30
3. Ergebnisse .....	31
3.1 Zytokinbestimmung mittels ELISA .....	31
3.1.1 Interleukin-1 $\alpha$ .....	32
3.1.2 Interleukin-1 $\beta$ .....	34
3.1.3 Interleukin-2 .....	36
3.1.4 Interleukin-3 .....	38
3.1.5 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ .....	40
3.3 Amintest .....	41
3.4 pH-Wert .....	42
3.5 Alter .....	44

4. Diskussion.....	46
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literaturverzeichnis .....	60
7. Anhang .....	70
7.1. Tabellenverzeichnis .....	70
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	70
8. Danksagung.....	71
9. Lebenslauf .....	72

## Abkürzungen

BV	Bakterielle Vaginose
bp	Basenpaare
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin- $\beta$
IL-2	Interleukin-2
IL-3	Interleukin-3
h-IL-1-3/ TNF- $\alpha$	Humanes Interleukin / Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
kDA	Kilo Dalton
l	Liter
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
pg	Pikogramm
rpm	rounds per minute
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

# **1. Einleitung und Fragestellung**

## **1.1 Einleitung**

### **1.1.1 Bakterielle Vaginose**

Bakterielle Vaginose (BV) ist ein klinischer Begriff zur Beschreibung eines Symptomenkomplexes, der mit vaginalem Ausfluss (Fluor), einem fischartigen Geruch und einer Erhöhung des pH-Wertes des Vaginalsekrets von pH 4,0 auf pH 5,0-6,0 einhergeht. Es kommt zu einer Alteration der natürlichen vaginalen Flora durch polymikrobielle Fehlbesiedelung der Scheide. Die dominierende Spezies der Lactobazillen wird von *Gardnerella vaginalis* und anderen gram-positiven Stäbchen verdrängt. Der kausale Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Besiedelung bei BV und der damit verbundenen Pathologie ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt [1]. *Gardnerella vaginalis* und die anderen gram-positiven Stäbchen gehören zur kommensalen Besiedelung der Vaginaschleimhaut, verdrängen jedoch im Falle einer Bakteriellen Vaginose die Laktobazillen. Kommensale Bakterien sind nicht pathogenen Mikroorganismen, die auf der Haut- und Schleimoberfläche angesiedelt sind und die sie vor von außen auf sie einwirkenden, schädigenden Einflüssen und vor anderen Mikroorganismen schützen.

#### **1.1.1.1 Transmission**

Am häufigsten erkranken heterosexuell aktive Frauen im geschlechtsreifen Alter. Es erkranken jedoch auch homosexuelle Frauen, Virgines, und nicht sexuell aktive Frauen.

Die in der Literatur gefundenen Prävalenzzahlen der Erkrankung implizieren, dass zwischen 10% und 50% [2] der Frauen zwischen Menarche und Menopause ein- oder mehrmals an einer bakteriellen Vaginose erkranken. In den USA erkranken

pro Jahr ungefähr 3 Millionen Frauen. Die BV ist die häufigste vaginale Infektion von Frauen im gebärfähigen Alter [3]

#### **1.1.1.2 Klinik**

Das klinische Beschwerdebild der BV beinhaltet einen zum Teil fischartigen riechenden Fluor vaginalis, sowie Jucken und Brennen in der Scheide. Da eine ähnliche Symptomatik auch bei einer vaginalen Infektion mit Trichomonaden, Pilzen oder auch einer Zervizitis [4] auftreten kann, müssen diese Erkrankungen vor der Diagnosestellung durch die Mikroskopie und die bakterielle Kultur ausgeschlossen werden [5].

Der typische „fischartige“ Geruch entsteht durch Abspaltung und Decarboxylierung der Aminogruppe der Aminosäuren durch die Enzyme Decarboxylase und Aminopetidase. Diese werden von anaeroben Bakterien produziert [6, 7].

#### **1.1.1.3 Ursache und Pathogenese der BV**

Bei der bakteriellen Vaginose handelt es sich um ein lokales Phänomen, das ohne die klassischen Entzündungszeichen abläuft. Es kommt nicht zu einer Rötung der Schleimhaut der Vagina oder zu einer übermäßigen Sekretion von Leukozyten. Da eine systemische Immunreaktion unterbleibt und eine Wiederherstellung der Normalflora nicht gelingt, handelt es sich um eine Störung der lokalen Abwehrreaktionen der Vagina.

Die Vagina ist mit Plattenepithel ausgekleidet, deren Stärke (Dicke) von der Östrogenkonzentration innerhalb der Epithelzellen abhängig ist. Dieses Epithel mit seiner Schleimhautoberfläche ist ein wesentlicher Bestandteil der Abwehr von bakteriellen und viralen Pathogenen im weiblichen Genitaltrakt [8].

Glykogen aus den vaginalen Epithelzellen liefert das Substrat zur Bildung von Laktat durch die Lactobazillen.

Es kommt dabei durch die Kolonisation von  $H_2O_2$ -produzierenden Lactobazillen in der Vagina zu einem Milieu, das es pathogenen Keimen erschwert, eine Infektion zu

induzieren. Insbesondere die pH-Wert – Erniedrigung durch die Bildung von Laktat durch die dominanten Spezies *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* und *L. jensenii* unterdrückt die Besiedlung oder Vermehrung pathogener Bakterien in der Vagina und ein Überwuchern durch andere kommensale Flora wie *Gardnerella vaginalis* [9].

Diesen Laktobazillen kommt die Aufgabe zu, Laktat, Bacteriocines, Hydrogenperoxid, ein spezielles Bisurfactant und organische Säuren zu produzieren. Darüber hinaus stehen sie im Wettbewerb mit pathogenen Keimen um vaginale Zellrezeptoren und Nährstoffe.

Durch molekulare Identifikation konnten aber auch, in Abwesenheit von Laktobazillen, andere Laktat - produzierende Bakterien in der vaginalen Flora gesunder Frauen isoliert werden. Spezies der Gruppe *Atopobium* können bei fehlenden Laktobazillen diese Nische füllen und den vaginalen pH-Wert senken.[10]

Die gesunde Vaginalflora ist durch eine hohe Konzentration von Laktobazillen und einen pH-Wert niedriger als 4,7 gekennzeichnet [4].

Die in der Menopause reduzierte Östrogenkonzentration führt zu einer herabgesetzten Produktion von Glykogen in den Epithelzellen der Vagina. Die Reduktion von Glykogen als essentieller Nährstoff der Laktobazillen führt zu einer geringeren Anzahl an Laktobazillen.

Als Folge dessen erhöht sich der Anteil anderer kommensaler Bakterien (*Mycoplasmen* und anaeroben Bakterien), die normalerweise nur in geringer Konzentration in der Vagina vorkommen [11].

Nicht alle bakteriellen Keime der vaginalen „Normalflora“ haben einen unterstützenden Effekt in der Abwehr anderer Mikroorganismen. Dennoch werden sie von der vaginalen Immunität toleriert. Ein typischer Vertreter dieser Bakterien ist *Gardnerella vaginalis*. Trotz einer Besiedlung kommt es unter physiologischen Verhältnissen nicht zu einer Infektion durch diesen Keim.

Unter mikrobiologischen Gesichtspunkten kommt es bei der BV zu einer Verminderung der Besiedlung mit Laktobazillen - der so genannten „Döderleinflora“- und zu einer pathologischen Vermehrung von *Gardnerella vaginalis* und anderen Anaerobiern. Dieser Keim wurde von Gardner erstmalig 1955

beschrieben und als „*Haemophilus vaginalis*“ benannt und erhielt in der Folge noch verschiedene andere Bezeichnungen, bevor man sich auf den Namen „*Gardnerella vaginalis*“ einigte [12].

*Gardnerella vaginalis* fördert direkt durch eigene Stoffwechselprodukte eine Alkalisierung des vaginalen pH- Wertes. Dies führt zu einem eigenen Wachstumsvorteil und dem anderer potentielle pathogener Keime [13].

Es liegen keine verlässlichen epidemiologischen Daten über die Besiedelung mit *Gardnerella vaginalis* vor, da der Keim bei 20-40% aller gesunden Frauen intravaginal nachweisbar ist [9].

Etliche dieser subjektiv beschwerdefreien Frauen zeigen aber in der Mikroskopie und in der Aminprobe BV-positive klinische Befunde. GV verhält sich wie ein Oberflächenparasit und dringt nicht in das vaginale Schleimhautepithel ein.

Es konnte in molekularen Untersuchungen gezeigt werden, dass bei der BV nicht eine einzelne Keimart die Erkrankung verursacht. Vielmehr sind häufig verschiedene Keime an der Pathogenese beteiligt sein [14].

Es finden sich vor allem *G. vaginalis*, *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp., *Bacterioides* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus viridans*, coagulase-negative Staphylokokken, *Enterococcus faecalis*, *Atopobium vaginalis* und *Mycoplasma hominis* [11, 15] .

Welche Keime allerdings für die symptomatische BV primär verantwortlich sind, ist bisher nicht abschließend geklärt. Wesentlich scheint die Veränderung der vaginalen Flora von Laktobazillen zu *Gardnerella vag.* und anderen Anaerobiern[16-22].

Pathogenetisch werde zwei unterschiedliche Hypothesen diskutiert. Diese sind in der Abbildung 1 dargestellt.

Die eine Hypothese geht von einer Depletion der Laktobazillen und einer sekundären Überwucherung durch *Gardnerella vaginalis* aus.

Die andere Überlegung lautet, dass im Sinne einer Infektion ein einzelner Keim oder eine Kombination von Keimen als neues Pathogen in der Vagina die Laktobazillen verdrängen und somit deren Zahl und protektive Wirkung verringern.

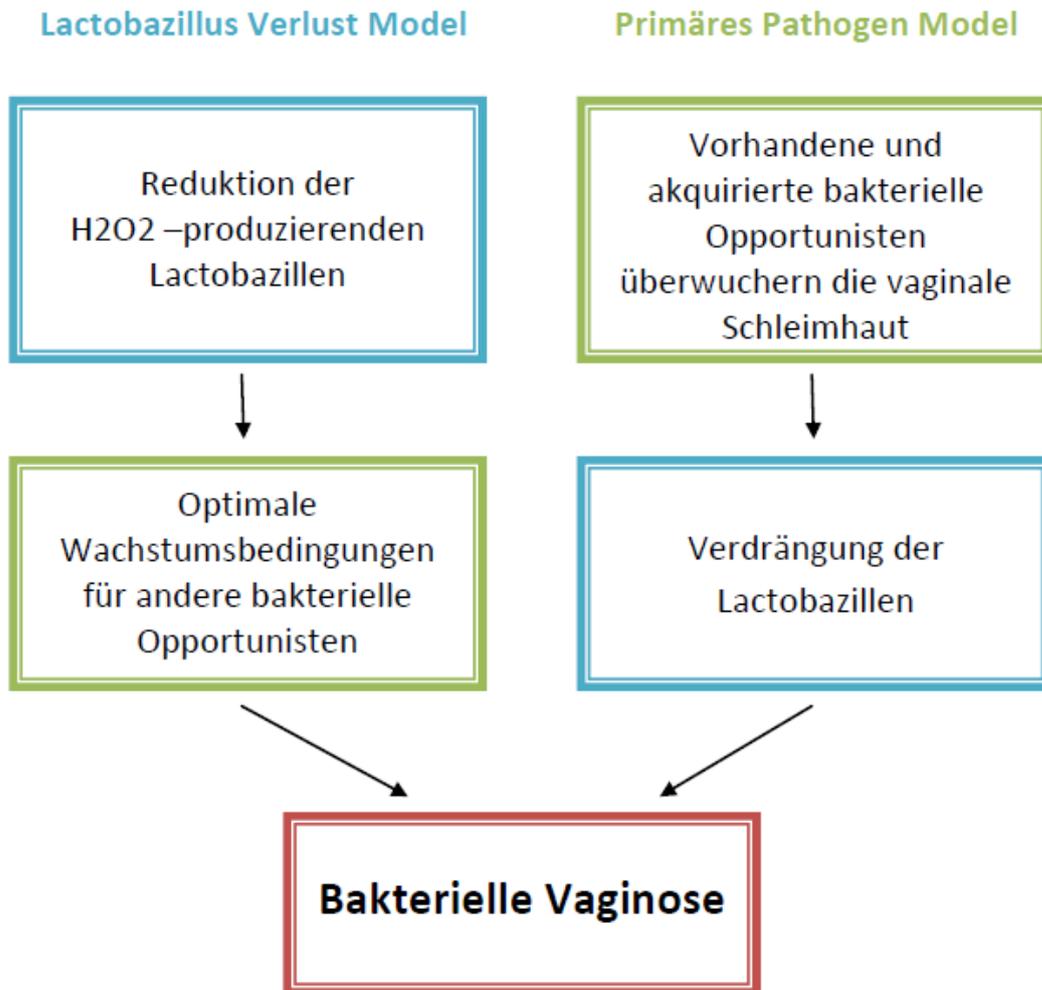


Abbildung 1 Eigene Darstellung der diskutierten möglichen Pathogenese

Es zeigten sich in etlichen Studien Faktoren, die einen signifikanten Zusammenhang mit der BV haben. Dazu gehören häufig wechselnde Sexualpartner, vaginales Duschen, chronischer Stress, das Verwenden eines Intrauterinpressars, sogar das Tragen von sehr engen Jeanshosen scheint einen Einfluss auf das Entstehen einer BV zu haben [9, 23].

Auch Schwankungen des Östradiolspiegels im Rahmen des Menstruationszyklus werden für die Entstehung der BV mit verantwortlich gemacht, da es häufig bei erhöhtem Östradiolspiegel in der ersten Zyklushälfte zum Auftreten einer BV kommt [24]. Für diese These spricht, dass äußerst selten postmenopausale Frauen oder Mädchen vor der Menarche an bakterieller Vaginose erkranken [25].

Darüber hinaus können auch die Verwendung von Antibiotika oder der Nikotinabusus sowie die Ernährung die Zusammensetzung der vaginalen Flora verändern und das Entstehen einer BV begünstigen[26].

#### 1.1.1.4 Diagnostik

Es kommt bei der BV nicht zu einer klassischen Entzündungsreaktion des Epithels oder des Stromas. Im Gewebeschnitt (Histologie) lässt sich somit in der Regel kein Keim nachweisen [4]. Das Ausstrichbild hingegen ist typisch: Epithelzellen, die von einem Bakterienrasen übersät sind, wirken getüpfelt und am Zellrand ausgefranst. Diese Zellen werden „clue cells“ genannt, sozusagen der „Schlüssel zur Diagnose“ [27].

Klinisch wird die bakterielle Vaginose (BV) durch einen typischen, homogenen und dünnflüssigen Fluor, das Vorhandensein von Clue Cells im Ausstrichpräparat und den Nachweis des spezifischen Geruchs durch die Aminprobe mit 10% KOH Lösung nachgewiesen.

Es bestehen zwei anerkannte Diagnostikschemas für die BV:

Zum einen hat R. Amsel 1983 eine klinische Diagnostik zusammengefasst [5]:

Zur Diagnose einer BV sind drei von vier Kriterien notwendig:

Vaginaler pH > 4,5

Der Nachweis von „clue cells“ in der mikroskopischen Untersuchung der vaginalen Lavage

Positiver Amintest ( Zugabe von 1-2 Tropfen 10% Kalilauge zu der Lavage)

Charakteristischer vaginaler Fluor

Dem steht die Methode nach Nugent [28] gegenüber, die eine Einteilung nach gramgefärbten Ausstrichpräparaten vorsieht. Zur Illustration dieser Methode dient die Abbildung 2 aus der Originalpublikation von Nugent. In der Praxis werden nach wie vor am häufigsten die Amsel Kriterien zur klinischen Diagnose verwendet.

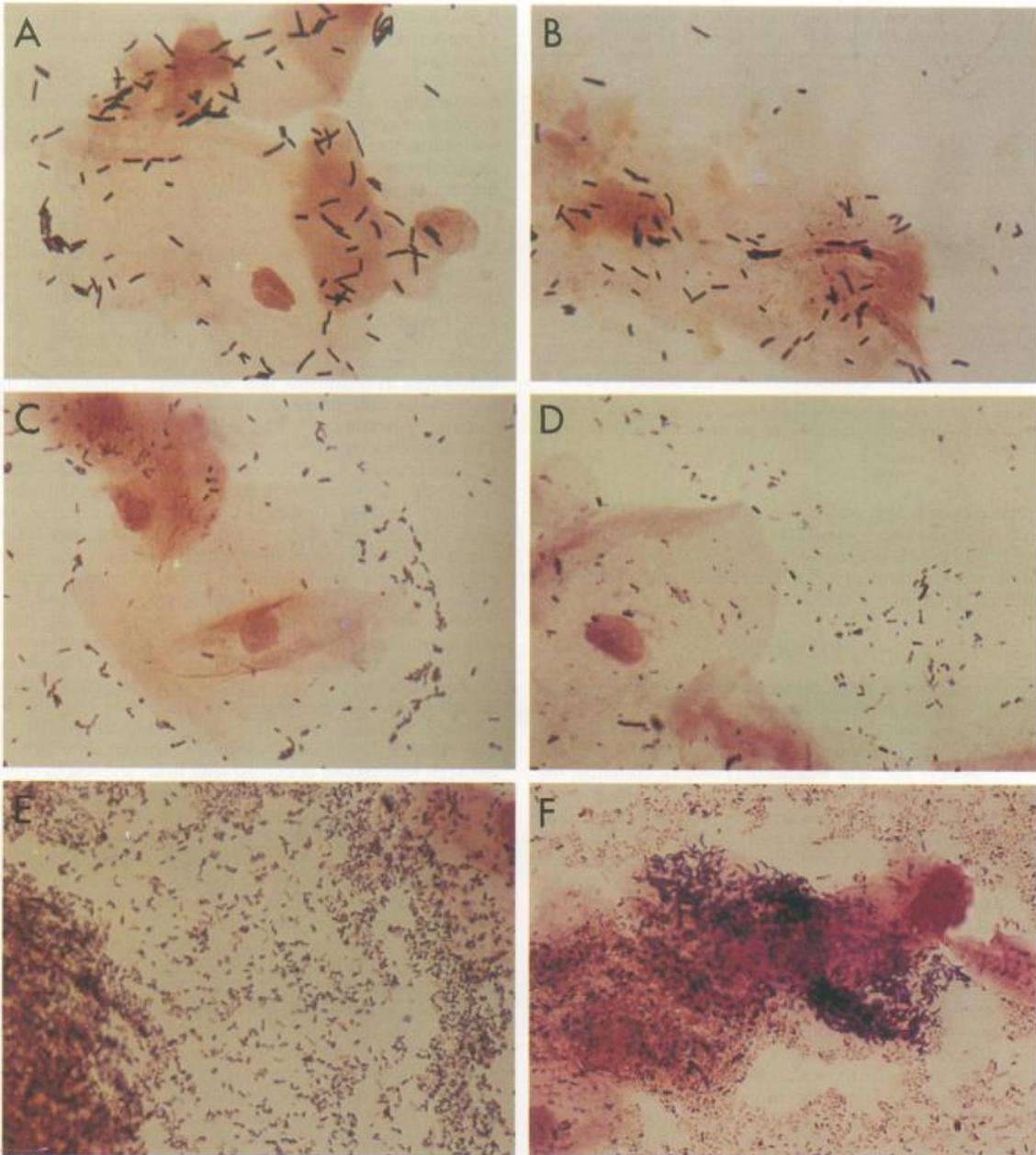


FIG. 1. Gram-stained vaginal smears from women with normal vaginal flora (A and B), intermediate vaginal flora (C and D), or bacterial vaginosis (E and F). (A) The 4+ lactobacillus morphotypes, no small gram-negative or gram-variable rods (score = 0); (B) 3+ lactobacillus morphotypes, 1+ *Gardnerella* spp. morphotypes (score = 2); (C) 3+ lactobacillus morphotypes and 3+ small gram-variable rods (score = 4); (D) 2+ lactobacillus morphotypes and 4+ small gram-negative and -variable rods (score = 6); (E) no lactobacilli and 4+ gram-negative and -variable rods (score = 8); note the margin of clue cells on the left; (F) no lactobacilli and 4+ gram-negative rods and curved rods (score = 10); note the *Mobiluncus* spp. morphotypes on the clue cell (center of field).

## Abbildung 2 Mikroskopische Darstellung der "clue cells"

Nugent, R.P., Journal of Clinical. Microbiology 1991. 29(2): p. 299 [28]

### **1.1.1.5 Assoziationen der BV mit verschiedenen Erkrankungen**

Die möglichen Komplikationen der BV sind mannigfaltig und teilweise lebensbedrohlich:

So kommt es bei schwangeren Frauen im Rahmen einer BV häufiger zu einer Amnioninfektion und daraus resultierend zu Frühgeburtsbestrebungen [27].

Schwangere Frauen mit BV und sehr hohen lokalen Cytokinspiegeln scheinen ein erhöhtes Frühgeburtsrisiko zu haben [29, 30]. Ein Screening und die Behandlung der BV in der Schwangerschaft wird in der Literatur als mögliches Mittel zur Reduktion der Rate der Frühgeburten angesehen [31]. Darüber hinaus kommt es häufiger zu Chorioamnionitis, zu Fruchtwasserinfektionen, und zu Endometritis nach Kaiserschnittentbindung [3].

Desweiteren ist die Bakterielle Vaginose mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen mit teils erheblicher Morbidität assoziiert.

Es wurde über einen Zusammenhang zwischen BV und dem Erwerb einer Herpes Simplex Virus Infektion Typ 2 (HSV2) Infektion berichtet [32].

Bei nicht schwangeren Frauen soll eine BV das Risiko für eine postoperative Infektion nach einer Hysterektomie erhöhen. Auch das Risiko, eine Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae* oder mit Chlamydien ist bei Vorliegen einer BV erhöht [33].

Es gibt darüber hinaus den Hinweis aus einer Studie, dass eine Korrelation zwischen einer BV und einer cervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) oder eines Cervixcarcinoms besteht [34].

In einer Studie von Sturm-Ramirez wurde gezeigt, dass Frauen mit einer BV ein höheres Risiko für eine HIV-Infektion haben, als das Kontrollkollektiv mit vaginaler Normalflora [35].

### 1.1.2 Immunologie

Im Rahmen des Evolutionsprozesses hat sich beim Menschen neben der primären unspezifischen Immunantwort eine adaptive, spezifische Immunantwort entwickelt. Beide Antworten des Immunsystems erfolgen jeweils durch zelluläre und lösliche Bestandteile.

Die natürliche (angeborene), unspezifische Immunantwort ist die erste Reaktion und wesentlicher Bestandteil der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen.

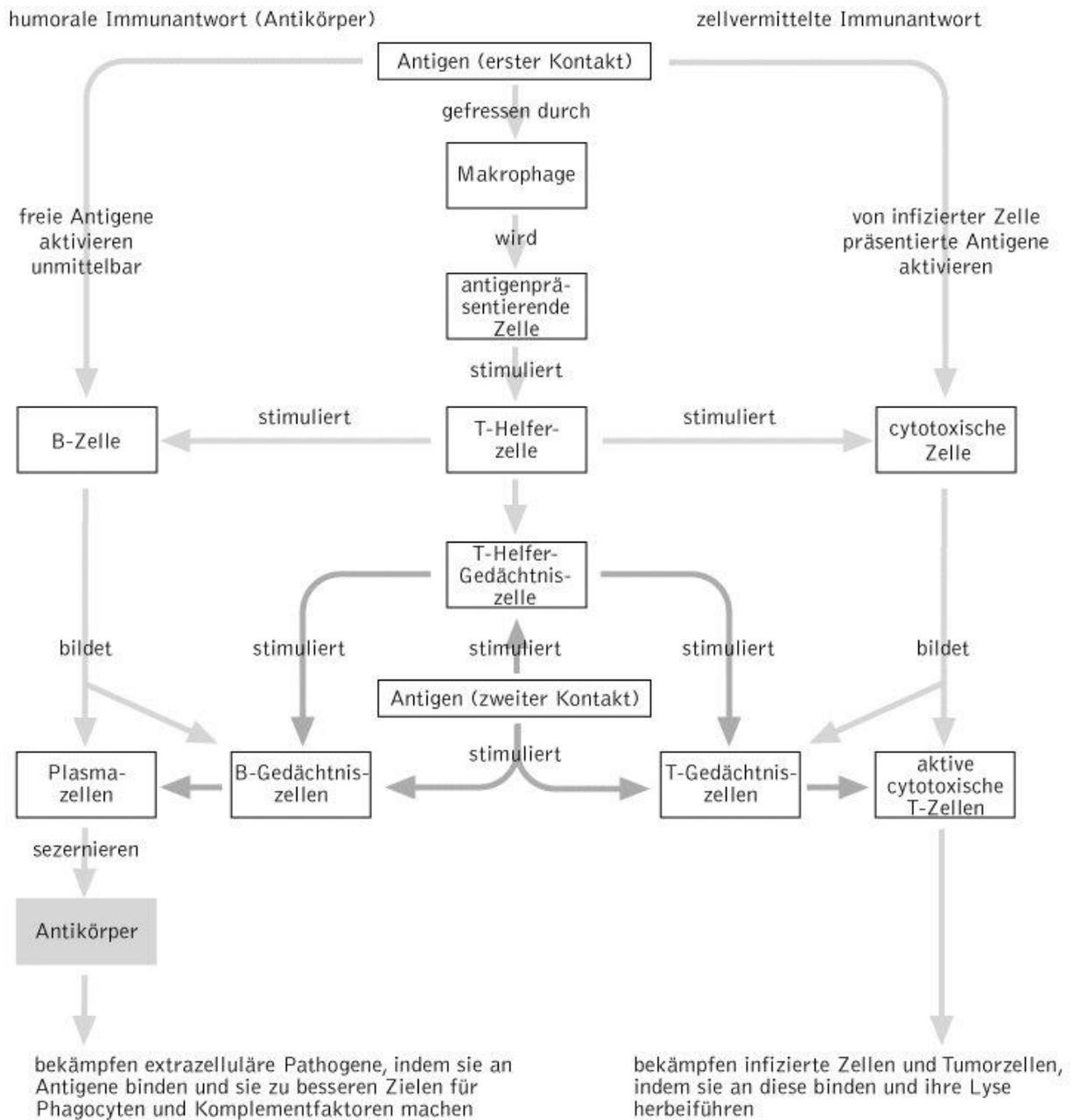
Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen, Natürliche Killer Zellen (NKZ) und Epithelzellen bilden den zellulären Anteil der unspezifischen Immunität. Die löslichen Faktoren der natürlichen (unspezifischen) Immunantwort bilden das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, Defensine, Chemokine und Zytokine.

Die unspezifische Immunantwort erkennt pathogen - assoziierte molekulare Muster, die als unveränderliche Bestandteile von vielen mikrobiellen Organismen exprimiert werden, „pathogen associated molecular pattern“ (PAMP) genannt.

Transmembranöse Proteine, so genannte „Toll like receptors“ (TLR) dienen den Zellen als ein wichtiges Instrument in der Erfassung der PAMP und in der Initiierung einer Immunantwort [36].

Die Erkennung von PAMP durch die TLR führt über eine Signalkaskade zu einer Freisetzung von Zytokinen. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion und zu einer Aktivierung und Differenzierung der Zellen des angeborenen Immunsystems wie Phagozyten und Natürliche Killer Zellen (NKZ).

Die Aufgabe dieser „Zellvermittelte Immunität“ (cell mediated immunity CMI) ist es, die Pathogene durch Phagozytose oder Lyse zu beseitigen. Es kommt aber auch zu einer Stimulation der Zellen des adaptiven, erworbenen Immunsystems, der T-Lymphozyten. Die unterschiedlichen Pfade der T-zellulären Abwehr werden von CD4+ -T-Helferzellen beeinflusst [37].



**Abbildung 3 Spezifische Immunantwort**

schematische Darstellung der Reaktionen der spezifischen Immunantwort. Die hellen Pfeile kennzeichnen die primäre, die dunklen Pfeile die sekundäre Immunantwort [38]

T-Helferzellen lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen: T<sub>H</sub>1 Typ und T<sub>H</sub>2 Typ. Beide Zelltypen sezernieren und reagieren auf unterschiedliche Zytokine, die sich in ihrer Wirkung teilweise unterscheiden, aber auch überschneiden. Unterschiedliche Zytokinwirkung auf die T-Helferlymphozyten (Th0) führt zur Differenzierung der T-Helferzellen in T<sub>H</sub>1 Typ oder T<sub>H</sub>2 Typ. So führt Interleukin 12 und Interleukin 18, Interferon- $\gamma$  und auch Interleukin 2 zu einer Aktivierung und Differenzierung der Th1-Helferzellen. Diese Helferzellen vermitteln eine zelluläre Immunreaktion, deren Ziel insbesondere die Abwehr von intrazellulären Viren, Bakterien und Protozoen ist.

Die T-Helferzellen vom T<sub>H</sub>2 Typ führen zu einer humoralen Immunreaktion. Diese wird durch Stimulation der B-Zellen initiiert und in Folge kommt es zur Bildung von spezifischen Antikörpern durch Plasmazellen [39]. Die unterschiedlichen Wege der Immunantwort werden in der Abbildung 3 dargestellt.

Die Immunologie der Mukosa des Menschen unterscheidet sich in ihrer Funktion von der systemischen Immunabwehr. Das etablierte Wissen bezieht sich Großteils auf die Mukosa des Verdauungstraktes.

Die Immunologie der Vagina (und des übrigen weiblichen Genitaltraktes) ist in ihrer gesamten Komplexität nicht abschließend erforscht.

Die Toleranz von kommensalen Bakterien (Laktobazillen), die lokal begrenzten Infektionen z. B. BV, Chlamydien), die Toleranz von allogenen Sperma seien als Beispiele genannt.

Die Mukosaoberfläche der Vagina stellt eine Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen, Makromolekülen und Toxinen dar. Diese besondere immunologische Barrierefunktion geht über die reine physische Abgrenzung hinaus [40]. Es muss sowohl eine lokale spezifische Immunabwehr als auch eine immunologische Toleranzinduktion hergestellt werden.

Die Rolle der zytotoxischen T-Lymphozyten, die Induktion der Antikörperantwort und das Verhältnis von Serumantikörpern zu mukosal produzierten AK unterscheidet das Immunsystem des weiblichen Genitaltrakts von anderen mukosalen Immunbereichen des Körpers.

Östrogen und Progesteron regulieren u. a. den Transport der Immunglobuline, die Höhe der Zytokinlevel und die Antigenpräsentation im Gewebe des weiblichen Genitaltraktes.

In dieser Studie soll die immunologische Reaktion der Vagina bei dem Auftreten einer bakteriellen Vaginose untersucht werden.

### **1.1.3 Zytokine**

Auch wenn die BV als lokales Geschehen betrachtet wird, sollten in dieser Untersuchung verschiedene Aspekte der Immunabwehr analysiert werden. Die angeborene unspezifische Immunreaktion und die erworbene Immunreaktion sind eng miteinander verzahnt und beeinflussen sich gegenseitig. Daher wurden verschiedene Zytokine untersucht.

Die Zytokine unterteilen sich in die sechs Familien der Interleukine, der zytotoxischen Zytokine, Kolonie stimulierende Faktoren, Interferone, Wachstumsfaktoren und Chemokine.

Zytokine sind Polypeptide, die als teils sezernierte, teils membrangebunden Botenstoffe, alle Aspekte einer Immunantwort beeinflussen können. Sie werden unter anderem als Reaktion auf mikrobielle Pathogene und andere zelluläre Antigene von Zellen des natürlichen und des erworbenen Immunsystems bereitgestellt [39]. Zytokine wirken pleiotroph und redundant [39, 41]. Jedes einzelne der untersuchten Zytokine wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert und wirkt auf unterschiedliche immunologische Effektorzellen.

#### **1.1.3.1 Einteilung der Zytokine**

Eine Unterteilung der unterschiedlichen Zytokine erfolgt nach ihrer Wirkung. So gibt es die Gruppe der Zytokine, die das Wachstum hämatopoetischer Zellen fördert. Eine weitere Gruppe beeinflusst das Wachstum und die Differenzierung lymphoider Zellen.

Schließlich gibt es die große Gruppe, die eine proinflammatorische Wirkung hervorruft. Darüber hinaus wird noch die Gruppe der antiviralen Zytokine und die Gruppe der immunregulierenden Zytokine unterschieden[41].

Die folgenden Zytokine wurden als wesentliche Immunmodulatoren untersucht:

Interleukin-1 $\alpha$	(IL-1 $\alpha$ )
Interleukin-1 $\beta$	(IL-1 $\beta$ )
Interleukin 2	(IL-2)
Interleukin 3	(IL-3)
Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	(TNF- $\alpha$ )

#### **1.1.3.1.1 Interleukin-1 $\alpha$ und Interleukin-1 $\beta$**

(früher: Lymphocyte Activation Factor = LAF)

Die Zytokinfamilie Interleukin -1 wird in drei unterschiedliche Zytokine unterteilt:

Interleukin 1 $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-1Rezeptor Antagonist (IL-1Ra)

Die beiden Agonisten sind durch Genduplikatur entstanden und besitzen eine zu 30 % gleiche Molekülstruktur. Beide binden an dieselben Rezeptoren und haben identische biologische Wirkung.

Interleukin-1 $\alpha$  ist ein Protein mit einer Größe von 17 kDa, bestehend aus 159 Aminosäuren. Interleukin-1 $\alpha$  wird als Pro-IL-1 $\alpha$  synthetisiert. Diese Vorstufe ist bereits ein biologisch aktives Protein [42]. Pro-IL-1 $\alpha$  kann von einer membrangebundenen Cystein-Protease zu dem Cytokin IL-1 $\alpha$  abgespalten werden, das die Zelle verlässt. Der Großteil des Cytokines bleibt intrazellulär, membrangebunden oder nahe des Nukleus. Pro-IL-1  $\alpha$  kann im Nukleus als autokriner Wachstumsfaktor dienen.

Interleukin 1 $\beta$  besteht aus 153 Aminosäuren.

Beide Zytokine werden durch differentielles Spleißen eines Gens gebildet. Dieses Gen codiert auf dem langen Arm des Chromosom 2 [43].

Interleukin -1 wird von aktivierten Makrophagen, Monozyten und von neutrophilen Granulozyten gebildet und sezerniert.

Intraluminal wird IL-1 hauptsächlich von vaginalen Epithelzellen produziert.

Die Synthese und Freisetzung von IL-1 ( $\alpha + \beta$ ) wird als Reaktion auf exogene Mikroorganismen (z.B. bakterielle Endotoxine, Exotoxine, virale Haemagglutinine) hervorgerufen.

Auch endogene Entzündungsmediatoren (Leukotriene, Komplementfaktoren, Interferon  $\gamma$  [INF- $\gamma$ ] und TNF- $\alpha$ ) können zu einer Freisetzung von IL-1 führen.

Die pleiotrope Wirkung von Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-1 $\alpha$  sind sowohl lokaler, als auch systemischer Natur.

Interleukin-1 bewirkt eine Neutrophilie, fördert die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und wirkt als einer der wesentlichen Effektoren der Entzündungskaskade.

Durch die proinflammatorische Wirkung von IL-1 werden Interleukin 6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bereitgestellt, sowie der Arachidonsäuremetabolismus gesteigert.

IL-1 führt auch zu einer Steigerung der IL-2 Synthese der T-Helferlymphozyten und zu einer vermehrten Expression der IL-2 Rezeptoren.

B-Lymphozyten steigern die Produktion der Immunglobuline als Reaktion auf IL-1. Darüber hinaus kommt es zu einer Proliferation und Aktivierung von Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen), von Fibroblasten und Thymozyten.

Interleukin-1 wirkt als endogenes Pyrogen [39, 41, 43-45].

Somit sind die Interleukine 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  wesentliche Schlüsselzytokine der Immunreaktion auf Pathogene.

Ein erhöhter Wert dieser Zytokine in der Vaginallavage bei BV könnte für eine indirekte, verstärkte T<sub>H</sub>1 Antwort sprechen.

### **1.1.3.1.2 Interleukin 2**

(früher: T-Cell Growth Factor)

Interleukin-2 ist ein 14-17 kDa großes Protein, das aus 133 Aminosäuren besteht und vor allem von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gebildet und sezerniert wird.

Interleukin- 2 bindet an einen hochaffinen Interleukin- 2 Rezeptor, welcher auf den meisten hämatopoetischen Zellen, einschließlich B- und T-Zellen, NK-Zellen, mononukleären Phagozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird [46].

Interleukin-2 ist in seiner Wirkung ein essentieller Wachstums- und Differenzierungsfaktor von reifen T-Zellen. Bei B-Zellen fördert IL-2 das Zellwachstum und stimuliert die Synthese der J-Kette der IgM - Pentamere und der IgA - Dimere.

Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen werden von IL-2 zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität angeregt [39, 41, 46, 47].

Somit ist auch Interleukin-2 ein wesentliches Schlüsselzytokin der Immunreaktion auf Pathogene. Eine Erhöhung von IL-2 in der Vaginallavage bei BV spricht für eine verstärkte T<sub>H</sub>1 Antwort.

### **1.1.3.1.3 Interleukin 3**

Interleukin- 3 ist ein 20-32 kDa großes monomeres Glykoprotein, welches aus 133 Aminosäuren besteht. Es wird auf dem Chromosom 5 codiert und hauptsächlich von T-Zellen, Makrophagen, und Natürlichen- Killer - Zellen gebildet und sezerniert.

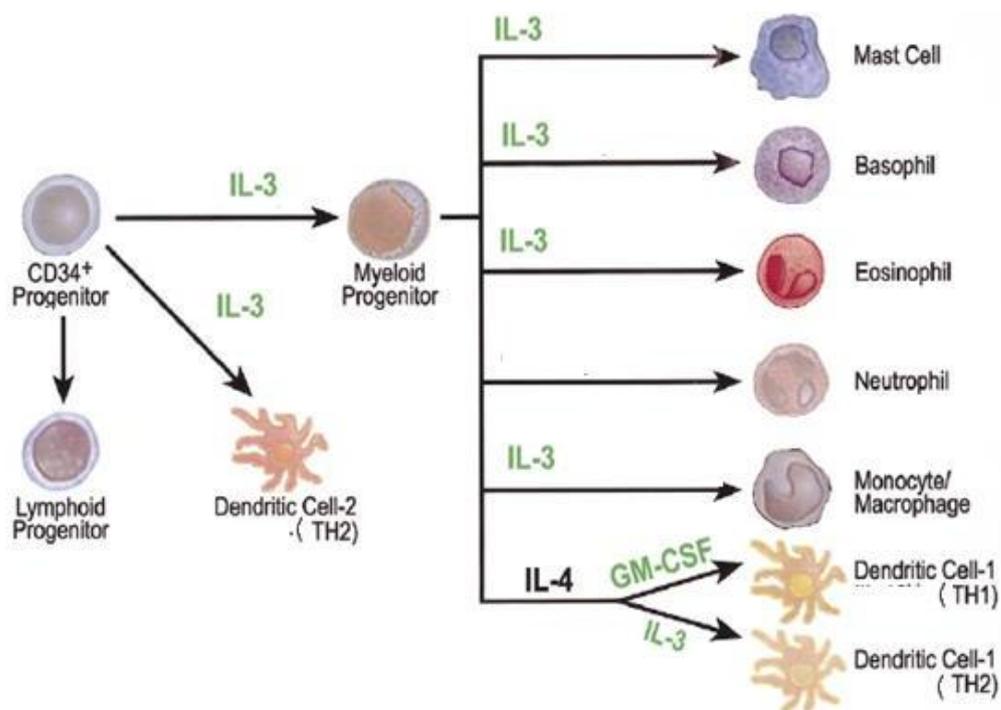
IL-3 hat aufgrund seiner molekularen Struktur starke Ähnlichkeit mit Interleukin- 5 und Kolonie stimulierender Faktor für Granulozyten - Makrophagen (GM-CSF) und wirkt mit diesen beiden Cytokinen synergistisch bei der myeloischen Zellproliferation und Differenzierung[48].

IL-3 bewirkt eine Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen und ihrer linienspezifischen Vorläuferzellen. Lediglich die lymphoiden Stamm –und Vorläuferzellreihen werden nicht durch IL-3 beeinflusst[48].

IL-3 wirkt auf das Überleben von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Makrophagen synthetisieren unter dem Einfluß von IL-3 vermehrt die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  [39]

IL-3 scheint eine besondere Wirkung auf die Differenzierung von Dendritischen Zellen zu haben. Es kommt unter dem Einfluss von IL-3 zu einer verstärkten T<sub>H</sub>2 – artigen Immunreaktion (s.o.) [49].



**Abbildung 4 IL-3 und die Differenzierung von immunologischen Zellen**

Die grünen Buchstaben stehen für eine stimulierende Wirkung auf die jeweils folgende Zelle. [49]

Somit ist Interleukin-3 ein wesentliches Schlüsselzytokin der Immunreaktion auf Pathogene. Ein erhöhter IL-3 Wert in der Vaginallavage bei BV könnte für eine verstärkte T<sub>H</sub>2 Antwort sprechen.

#### **1.1.3.1.4 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$**

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ist Mitglied der TNF -„Superfamily“ die aus mindestens 20 Polypeptiden besteht, die derzeit bekannt sind [50].

Es ist in seiner biologischen Form ein nicht glykolisiertes Protein mit der Größe von 17,3 kDa und besteht aus 157 Aminosäuren und wird vor allem von Makrophagen und Monozyten synthetisiert. Darüber hinaus wird das Zytokin in Immunzellen ( T-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, Mastzellen) synthetisiert [50]

TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen in großer Menge, auf verschiedene Stimuli hin, freigesetzt. Zu diesen Stimuli gehören Gram-negative und Gram-positive Bakterien, LPS, Viren, Parasiten, Mykoplasmen, Immunkomplexe, Zytokine (GM-CSF, IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , Tumorzellen, Komplementfaktoren [51].

Andererseits kann die TNF- $\alpha$  –Synthese durch Dexamethason, Prostaglandin E2, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, Cyclosporin A und andere Moleküle gehemmt werden [39].

Somit ist Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ein wesentliches Schlüsselzytokin der Immunreaktion auf Pathogene.

## 1.2 Fragestellung

Ziel der Studie war es die lokalen immunologischen Veränderungen bei klinisch gesicherter BV darzustellen.

Als Parameter haben wir die Zytokine Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin- 2, Interleukin- 3 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  im Vaginalsekret gemessen. Eine Reihe von Studien mit Patientinnen mit BV hat gezeigt, dass verschiedene Zytokine in die lokale immunologische Abwehrreaktion involviert sind.

Durch unsere Studie sollen genauere Erkenntnisse über den Zusammenhang der lokalen Immunität Im Rahmen der Bakteriellen Vaginose gewonnen werden, um unter Umständen neue diagnostische als auch therapeutische Ansätze bei dieser weit verbreiteten und mit hoher Morbidität vergesellschafteten Erkrankung zu erlangen.

Die Messungen der Zytokine erfolgten mittels Enzyme-linked-immuno-assay (Elisa).

Unsere Hypothese war, dass bei BV die Zytokine IL-1 $\alpha$  +  $\beta$ , IL-2, IL-3, und TNF- $\alpha$  Anteil haben an der Modulation einer lokale Abwehrreaktion der Vagina und somit in den jeweiligen untersuchten Gruppen in unterschiedlicher Konzentration nachzuweisen sind.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Einmalspritzen (3ml)	B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Pipetten
Pipetten, Filter-Tipps PE/PP	Nerbe plus GmbH, Winsen / Luhe, Deutschland
Pipettenspitzen	SLG
Vortexgerät VF 2	Janke & Kunkel, IKA –Labortechnik Staufen im Breisgau, Deutschland
Tischzentrifuge	UniEquip München, Deutschland
Vibromix 301 EVT	Tehtnica, AS-B Laborsysteme, Greiling, Deutschland
Spektralphotometer	Anthos Labtec Instruments Österreich
Drucker Epson LX 400	Epson Deutschland GmbH Düsseldorf, Deutschland

Die Materialien der ELISA-Kits für die Bestimmung der Zytokine Interleukin-1  $\alpha$ , Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-2, Interleukin-3 und Tumor-Nekrose-Faktor-  $\alpha$  wurden von der Firma Biosource Europe S.A., 1400 Nivelles, Belgien bezogen.

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

## **2.2 Patientinnen**

### **2.2.1 Studiengruppe**

Es wurden 150 Proben untersucht. Davon waren 100 Proben von Patientinnen mit bakterieller Vaginose und 50 Proben von gesunden Patientinnen (Probandinnen).

Im Rahmen der gynäkologisch-infektiologischen Sprechstunde der Frauenklinik im Klinikum Großhadern wurden 100 Patientinnen mit symptomatischer bakterieller Vaginose in die Studie aufgenommen. Das typische Beschwerdebild der Frauen mit BV war bestimmt von einem wässrigen Fluor und einem fischartigen Geruch. Bei manchen Patientinnen kam es zusätzlich zu Brennen oder vaginalem Juckreiz. Es wurde eine Vaginallavage, eine pH-Messung, ein Abstrich und ein Amintest durchgeführt. Zusätzlich wurde eine vaginale Spekulumuntersuchung durchgeführt und das subjektive Beschwerdebild erfasst. Bei 100 Patientinnen wurde die Diagnose BV gestellt, und sie wurden in die Studie inkludiert.

Nachweis der BV bei den Patientinnen erfolgte gemäß dem klinischen Standard der derzeit gilt zum Nachweis der Entität. (Nach den klinischen Kriterien von Nugent [28]).

Als Kontrollgruppe dienten 50 asymptomatische Patientinnen ohne BV, die meist zur jährlichen Routineuntersuchung in die Sprechstunde kamen. Die Proben der Kontrollpatientinnen wurden in einer auswärtigen gynäkologischen Praxis entnommen. Dies war notwendig, da in der gynäkologisch-infektiologischen Sprechstunde in der Frauenklinik Großhadern selten asymptomatische Patientinnen untersucht werden.

Die Probandinnen kamen zu einer regelmäßigen Vorsorgeuntersuchung und waren subjektiv beschwerdefrei. Es wurde eine Vaginallavage, eine pH-Messung, ein Abstrich und ein Amintest durchgeführt. Zusätzlich wurde eine vaginale Spekulumuntersuchung durchgeführt.

Patientinnen und Probandinnen mit anderen vaginalen Infektionskrankheiten, wie Chlamydien, Gonorrhoe, Trichomonaden oder *Candida albicans* wurden aufgrund klinischer und anamnestischer Befunde nicht in die Studie eingeschlossen. Die schriftlichen Befunde der Probandinnengruppe lagen erst nach der Analyse der Proben vor. Daher wurden im Nachhinein 6 Probandinnen mit entweder einer

subjektiv asymptomatische BV (n=1) oder einer Candidainfektion (n=5) von der Studie ausgeschlossen.

In keiner der beiden Gruppen wurden schwangere Frauen aufgenommen.

Das Durchschnittsalter der BV-Patientinnen lag bei 33,9 (Alter 19 bis 50), das der Patientinnen der Kontrollgruppe bei 20,6 (Alter 16 bis 34).

Alle Patientinnen und Probandinnen gaben Ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme der Studie.

## **2.2.2 Vaginalabstriche**

Bei jeder Studienteilnehmerin wurden Vaginalabstriche vom hinteren Scheidengewölbe mit geprüften Watteträgern entnommen. Anschließend wurde die Vaginallavage durchgeführt. Dabei wurden 2ml einer 0,9% Kochsalzlösung mit einer 3ml-Spritze in die Vagina eingebracht, kurz mit einem Watteträger im hinteren Scheidengewölbe mit dem vorhandenen vaginalen Sekret vermischt. Anschließend mit derselben Spritze wieder abgesaugt und die gesamte Flüssigkeit sofort weiterverarbeitet. Die Flüssigkeit wurde in ein Eppendorfgefäß gefüllt, kurz auf einem Vortexgerät vermischt und danach wurde das Eppendorfgefäß zwei Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert, mit PBS (0,5ml) suspendiert und anschließend bei -80°C tief gefroren. Dieser suspendierte und gefrorene Überstand wurde zur Analyse der Zytokine mittels ELISA verwendet.

## **2.3 Zytokinbestimmung**

### **2.3.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay**

#### **2.3.1.1 Testansatz und Durchführung**

Das Prinzip der Methode wird in der Abbildung 5 veranschaulicht.

Es wurden Mikrotiterplatten verwendet, deren Vertiefungen mit einem für das jeweilige Cytokin spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet sind. Proben und Standardreihen werden in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert.

Während der ersten Inkubation bindet das Cytokin der Probe (des Standards) an die Antikörper der Platte. Nach dem Auswaschen des Überstandes wird ein Biotin – Konjugat- Antikörper (B-K-Ak) (spezifisch für das untersuchte Cytokin) in die Vertiefungen pipettiert. Während der zweiten Inkubation bindet das auf der Platte fixierte Cytokin den B-K-Ak.

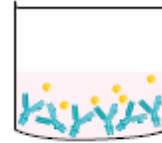
Der ungebundene Überschuss des B-K-Ak wird anschließend ausgewaschen.

Danach wird das Enzym Streptavidin – Peroxidase hinzu gegeben. Es kommt jetzt zu einem „Sandwich“ bestehend aus vier Komponenten, der auf der Mikrotiterplatte fixiert ist. Wiederum folgen eine Inkubationsphase und ein Waschvorgang, um den ungebundenen Enzymüberschuss zu entfernen.

Nun wird stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidin) hinzu pipettiert. Dieses Substrat bindet konzentrationsabhängig an die vorhandenen Komplexe auf der Platte. Es kommt zu einer Färbung die in ihrer Intensität direkt proportional zur Konzentration der Komplexe und somit direkt proportional zur Konzentration des untersuchten Cytokins ist. Da die Bindung des Chromogens auch zeitabhängig ist, wird diese Reaktion nach exakt 30 Minuten durch Hinzugabe einer Stopplösung beendet. Die Stopplösung führt zu einem Farbumschlag ins Gelbe.

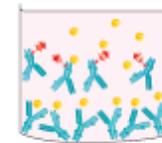
### Generic ELISA Assay Procedure

Incubate standards, controls & samples



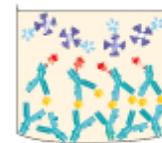
aspirate and wash 4x

Incubate Biotin Conjugate



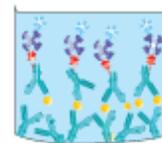
aspirate and wash 4x

Incubate Streptavidin-HRP



aspirate and wash 4x

Incubate Stabilized Chromogen



Add Stop Solution and read

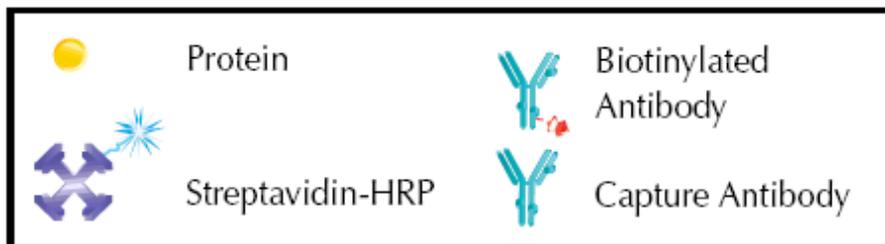
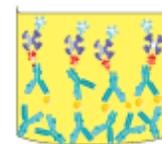


Abbildung 5 Allgemeine Darstellung des Essays

Entnommen aus dem Handbuch der Firma BioSource International S.A. deren Reagenzien verwendet wurden [52]

## Reagenzien

Die Konzentrationen der folgenden Zytokine wurden alle mit den entsprechenden ELISA-Kits von Biosource Europe S.A., 1400 Nivelles, Belgien bestimmt:

Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-2, Interleukin-3, Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ .

Die Kits beinhalten alle verwendeten Reagenzien bis auf die Waschlösung (s.u.)

- Humaner Cytokin Standard Puffer zur Verdünnung des Standards
- Antikörper beschichtete Mikroplatten für das jeweilige Cytokin
- Biotin Konjugat der einzelnen Zytokine (B-K-Ak)
- 100-fach konzentrierte Streptavidin - Peroxidase (HRP)
- Lösung zur Verdünnung der Streptavidin - Peroxidase (HRP)
- Tetramethylbenzidin
- Stopplösung
- Abdeckstreifen
- Halterahmen

Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25 x Konzentration)

(Ampuwa, Fresinus Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H. )

## Reagenzienvorbereitungen

Zuerst wurde in das Gefäß mit dem getrockneten Standard die gepufferte Standardlösung hinzugefügt (Menge nach den Angaben des jeweiligen Kits). Nach zehn Minuten Ruhezeit hatte sich der Standard in der Pufferlösung aufgelöst und gleichmäßig verteilt (Grundlösung). Die Konzentration betrug jetzt für IL-1 $\alpha$  250, für IL-1 $\beta$  250, für IL-2 1000, für IL-3 500 und für TNF- $\alpha$  1000 (alle Angaben in pg/ml)

Durch Verdünnung wurden die Standardreihen erzeugt:

<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-2</b>	<b>IL-3</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
250	250	1000	500	1000
125	125	500	250	500
62,5	62,5	250	125	250
31,3	31,3	125	62,5	125
15,6	15,6	62,5	31,3	62,5
7,8	7,8	31,3	15	31,3
3,9	3,9	15,6	6	15,6
0	0	0	0	0

**Tabelle 1** Standardreihen durch Verdünnung

Streptavidin – HRP - Verdünnungslösung

100  $\mu$ l der 100-fach konzentrierten Streptavidin - Peroxidase wurden mit 10ml der Streptavidin - HRP - Verdünnung gemischt.

Durchführung

In der Durchführung unterscheiden sich die einzelnen Elisa der Zytokine IL-1, IL-2, IL-3 und TNF- $\alpha$  nur durch unterschiedliche Mengen der Reagenzien. Der detaillierte Ablauf war ansonsten identisch.

Es wurden stets alle Vertiefungen einer ELISA-Kit-Platte verwendet. Die ersten beiden Reihen à acht Vertiefungen für zwei identische Standardverdünnungsreihen.

Aus den vorbereiteten Eppendorf-Gefäßen mit den Standardverdünnungen wurden jeweils 100 $\mu$ l (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$ ) oder 50ml (IL-1 $\alpha$ ) in die Mikroküvette pipettiert.

Später erfolgte die Ermittlung des Mittelwerts der beiden Standardverdünnungsreihen. Die restlichen zehn Reihen à acht Vertiefungen

dienten für jeweils 80 Proben. Nachdem nun alle 100 Vertiefungen befüllt waren, wurde jetzt jeweils entweder 50µl (IL-1β, IL-2) oder 100µl (IL-1α, IL-3, TNF-α) B-K-Ak hinzupipettiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Plastikfolie abgedeckt, um Verunreinigungen zu vermeiden. So vorbereitet konnte eine Inkubation der Platte über 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nach der Inkubationsphase wurden die nicht gebundenen Antikörper aus der Mikroküvette ausgewaschen. Dazu wurde zuerst die einpipettierten Flüssigkeiten ausgeschüttet und anschließend jede Vertiefung jeweils viermal mit 400µl des Waschpuffers mittels einer Spülflasche ausgewaschen. Danach wurden die Mikrotiterplatten vorsichtig auf einem Fließpapier ausgeklopft. Nun wurde die Streptavidin – HRP – Verdünnungslösung in einer Menge von 100µl pro Vertiefung hinzugefügt. Durch die Bindung von Streptavidin – Peroxidase an den Cytokin – Antikörper – Komplex erfolgt die notwendige, letzte Vorstufe für eine konzentrationsabhängige Färbung. Um die vorgesehene Bindung zu erreichen, wurden die Platten genau 30 Minuten inkubiert und anschließend erneut wie oben beschrieben gewaschen. Durch Hinzufügen von Tetramethylbenzidin erfolgte dann die Färbung ins Blaue. Dies geschah in einer weiteren Inkubationsphase von 30 Minuten. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Reaktion wurde die Inkubationszeit in Dunkelheit durchgeführt. Danach wurde die Stopplösung hinzugefügt, um die Farbreaktion zu beenden. Durch das Hinzufügen der Stopplösung schlug die Farbe von blau nach gelb um. Schließlich wurde mit dem Spektralphotometer die optische Dichte des Komplexes bei einer Wellenlänge von 450 / 492 nm gemessen.

### **2.3.1.2 Auswertungen der Messergebnisse**

Die zur Berechnung der Konzentration der Zytokine nötige Standardkurve wurde mittels der Computerprogramme SPSS und Excel von Microsoft erstellt. Hierzu wurden die Standardkonzentrationen, die jeweils einer über photometrische Bestimmung ermittelten optischen Dichte zugeordnet werden konnten in SPSS eingegeben, wodurch ein Mittelwert der optischen Dichte (OD) im Vergleich zur gemessenen OD errechnet wurde (Tabelle 2).

1	2	3	4	5	6
konz	dichte	fit_1	err_1	lcl_1	ucl_1
0,00	0,121	0,1077	0,01335	0,0613	0,15400
11,70	0,124	0,1397	0,01566	0,09541	0,18391
23,40	0,171	0,1720	0,00095	0,12891	0,21499
46,80	0,231	0,2373	0,00632	0,19467	0,27997
93,70	0,387	0,3708	0,01615	0,32533	0,41636
187,50	0,635	0,6429	-0,00790	0,59419	0,69162
375,00	1,168	1,167	0,00142	1,1119	1,22131
750,00	1,812	1,812	-0,00008	1,7569	1,86725

**Tabelle 2 Beispiel für das Fenster zur Dateneingabe in SPSS**

(Standardkonzentrationen und Dichte einer IL-1- $\alpha$  Messung mit den von SPSS errechneten Werten)

Spalte 1: Konzentrationen der Standardkurve

Spalte 2: Photometrisch gemessene optische Dichte

Spalte 3: Mittels SPSS errechneter Wert

Spalte 4: Abweichung vom tatsächlich gemessenen Wert

Spalte 5: Untergrenze des Konfidenzintervalls

Spalte 6: Obergrenze des Konfidenzintervalls

Des Weiteren mussten die gemessene optische Dichte als abhängige Variable und die Konzentration als unabhängige Variable eingegeben werden. Somit konnte mittels einer kubischen Gleichung  $[f(x)=a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3]$  über eine Kurvenanpassung die Standardkurve ermittelt werden. Die sich hieraus ergebende Konstante und die Variablen wurden daraufhin in Excel eingegeben, wodurch aufgrund der gemessenen optischen Dichte die jeweiligen Konzentrationen in pg/ml abgelesen werden konnten. Da sich die Standardkurven der gemessenen Zytokine

ähnlich sind, wird zur Veranschaulichung eine Standardkurve von IL-1 als Beispiel herausgenommen (Abbildung 6).

Anhand der Konzentration der beiden Standardreihen und der gemessenen Dichte der Standardreihen wurde eine Standardkurve dargestellt. Über eine Annäherung der Standardkurve mit einem Polynom dritter Ordnung konnte die entsprechende Funktion ermittelt werden. Danach wurden die gemessenen Dichtewerte der Patientinnen und gesunden Probandinnen mit der Funktion errechnet und somit die Zytokinkonzentration ermittelt.

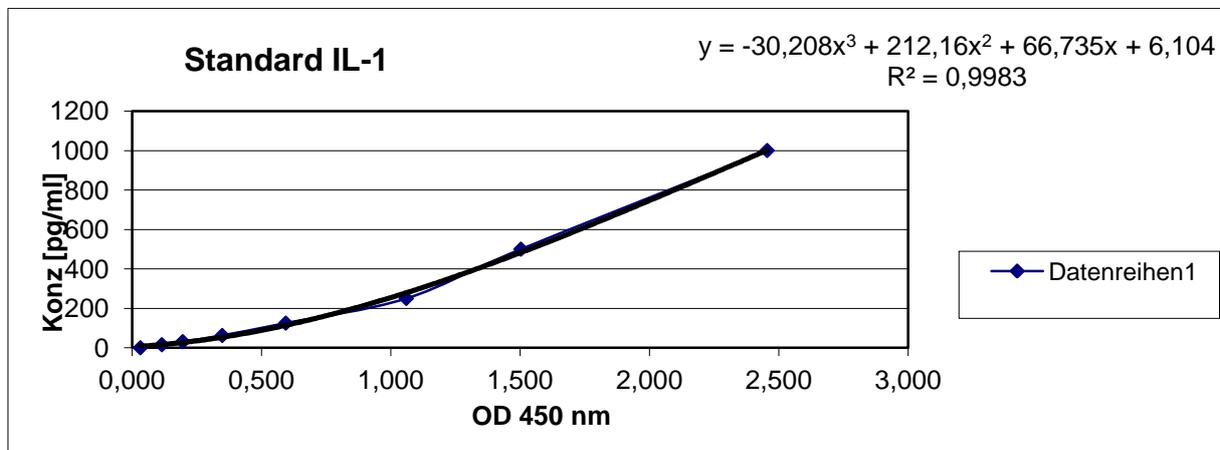


Abbildung 6 Relation zwischen Zytokinkonzentration und der optischen Dichte

## 2.4 Reinheitsgrad

Der vaginale Abstrich wird als Nativpräparat beurteilt. Dabei wird zur Unterteilung der Zell- und Erregermenge der Reinheitsgrad verwendet. Die Einteilung lautet wie folgt:

Reinheitsgrad 0: „leeres Bild“ nur Epithelzellen, keine oder wenige Mikroorganismen

Reinheitsgrad I: Reine Döderleinflora: nur Laktobazillen, keine weiteren Bakterien.

Reinheitsgrad II: Mischflora mit wenig Döderleinstäbchen, überwiegend Bakterien, Leukozyten

Reinheitsgrad III: Reine Bakterienflora ohne erkennbare Laktobazillen, massenhaft Bakterien und Leukozyten.

Da die Befunde häufig nicht exakt einem Grad zu zuordnen sind, werden Zwischenstufen gewählt: Grad I-II, II-III.

## **2.5 Amintest**

Es wurde dem Scheidensekret ein bis zwei Tropfen einer gebrauchsfertigen Kalilauge hinzugefügt. Dadurch wurde der typische fischartige Geruch verstärkt oder erst entdeckt. So wurde ein Kriterium der BV analysiert. Als Synonym wird auch der Begriff KOH-Probe verwendet.

## **2.6 pH-Wert**

Um den pH-Wert des vaginalen Sekrets zu messen, wurden handelsübliche pH-Teststreifen verwendet. Diese Teststreifen wurden kurz in den Fluor eingetaucht und der Wert abgelesen.

## **2.7 Clue cells**

Ein weiterer Bestandteil der Diagnostik ist der Ausstrich. Bei der BV ist das Bild typisch: Epithelzellen, die von einem Bakterienrasen übersät sind, wirken getüpfelt und am Zellrand ausgefranst. Diese Zellen werden „clue cells“ genannt, sozusagen der „Schlüssel zur Diagnose“ [27].

Es wird ein Tropfen des vaginalen Sekrets auf einen Objektträger gegeben und mit Alkohol fixiert. Anschließend wurde das Präparat mit einem Tropfen Methyleneblau gefärbt. Unter dem Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung erfolgte die Beurteilung des Ausstrichs.

## **2.8 Statistische Auswertung**

Bei den untersuchten Daten handelt es sich um unverbundene Stichproben zweier Gruppen, die nicht normalverteilt sind und mit dem Mann-Whitney-Test statistisch ausgewertet wurden. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Um die nicht normalverteilten Werte besser zeigen zu können, wurden sie im Logarithmus dargestellt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Zytokinbestimmung mittels ELISA**

Die Vagina ist ein immunkompetentes Organ, welches unter anderem durch Produktion von Zytokinen lokal auf Infektionen reagiert.

In dieser Arbeit ist es das Ziel diese lokale immunologische Reaktion bei einer bakteriellen Vaginose zu untersuchen.

Es wird versucht aus dem Zusammenhang zwischen einer klinisch diagnostizierten bakteriellen Vaginose und der Höhe der Konzentration von Zytokinen im Vaginalsekret den Weg der immunologischen Reaktion genauer zu bestimmen.

Dies geschieht im Vergleich mit einer Kontrollgruppe von asymptomatischen Patientinnen ohne bakterielle Vaginose. Wir untersuchten, ob bei Patientinnen im Gegensatz zu gesunden Probandinnen die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3 und TNF- $\alpha$  vermehrt produziert werden.

Zur besseren graphischen Darstellung wurden die Daten jeweils logarithmiert.

### 3.1.1 Interleukin-1 $\alpha$

Die Analyse der Interleukin-1 $\alpha$  Werte der Vaginallavage ergab folgendes Ergebnis:  
Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen.

Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab keinen signifikanten Unterschied der IL-1 $\alpha$  Werte der beiden Gruppen.

( $p < 0,39$  zweiseitiger Test,  $p < 0,19$  einseitiger Test).

	Patientinnen (n =100)	Kontrollgruppe (n =41)
IL-1 $\alpha$ Mittelwert (pg/ml)	1059,47	818,39
IL-1 $\alpha$ Minimum (pg/ml)	0,0	47,7
IL-1 $\alpha$ Maximum (pg/ml)	9900,6	8834,47
IL-1 $\alpha$ Median (pg/ml)	413,97	432,4

Tabelle 3 IL-1 $\alpha$  Werte der beiden Gruppen

Häufigkeitsverteilung der IL 1 $\alpha$  Konzentration in der Gruppe der Patientinnen und in der Kontrollgruppe

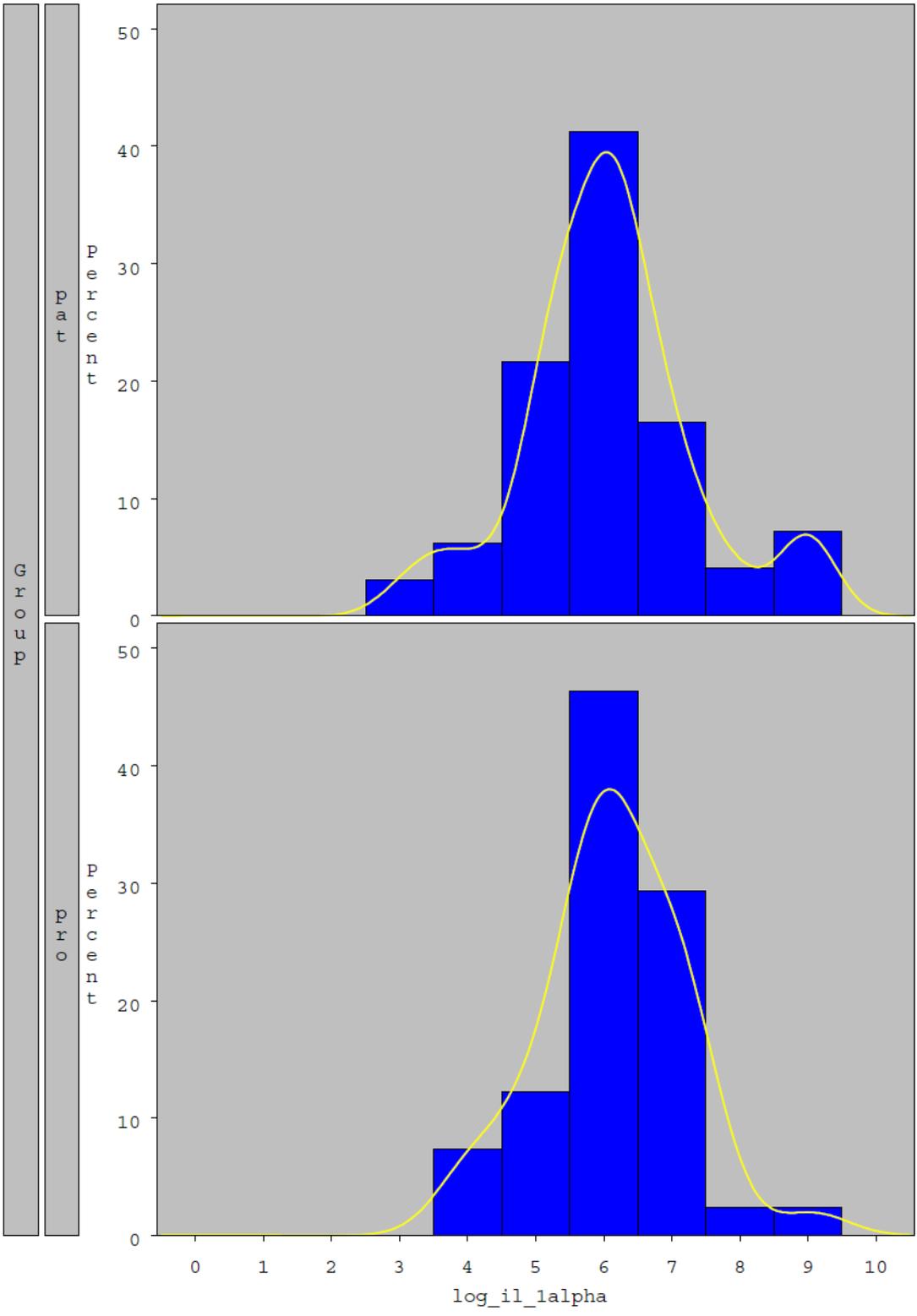


Abbildung 7 Konzentration des Zytokins Interleukin-1  $\alpha$

### 3.1.2 Interleukin-1 $\beta$

Die Analyse der Interleukin-1 $\beta$  Werte der Vaginallavage ergab folgendes Ergebnis:  
Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen.

Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab einen signifikanten Unterschied der IL-1  $\beta$  Werte der beiden Gruppen.

( $p < 0,001$ ).

	Patientinnen (n = 100)	Kontrollgruppe (n = 44)
IL-1 $\beta$ Mittelwert (pg/ml)	183,5	83,3
IL-1 $\beta$ Minimum (pg/ml)	0,0	0,0
IL-1 $\beta$ Maximum (pg/ml)	1431,7	956,1
IL-1 $\beta$ Median (pg/ml)	79,0	11,7

Tabelle 4 IL-1  $\beta$  Werte der beiden Gruppen

Häufigkeitsverteilung der IL-1  $\beta$  Konzentration in der Gruppe der Patientinnen und in der Kontrollgruppe

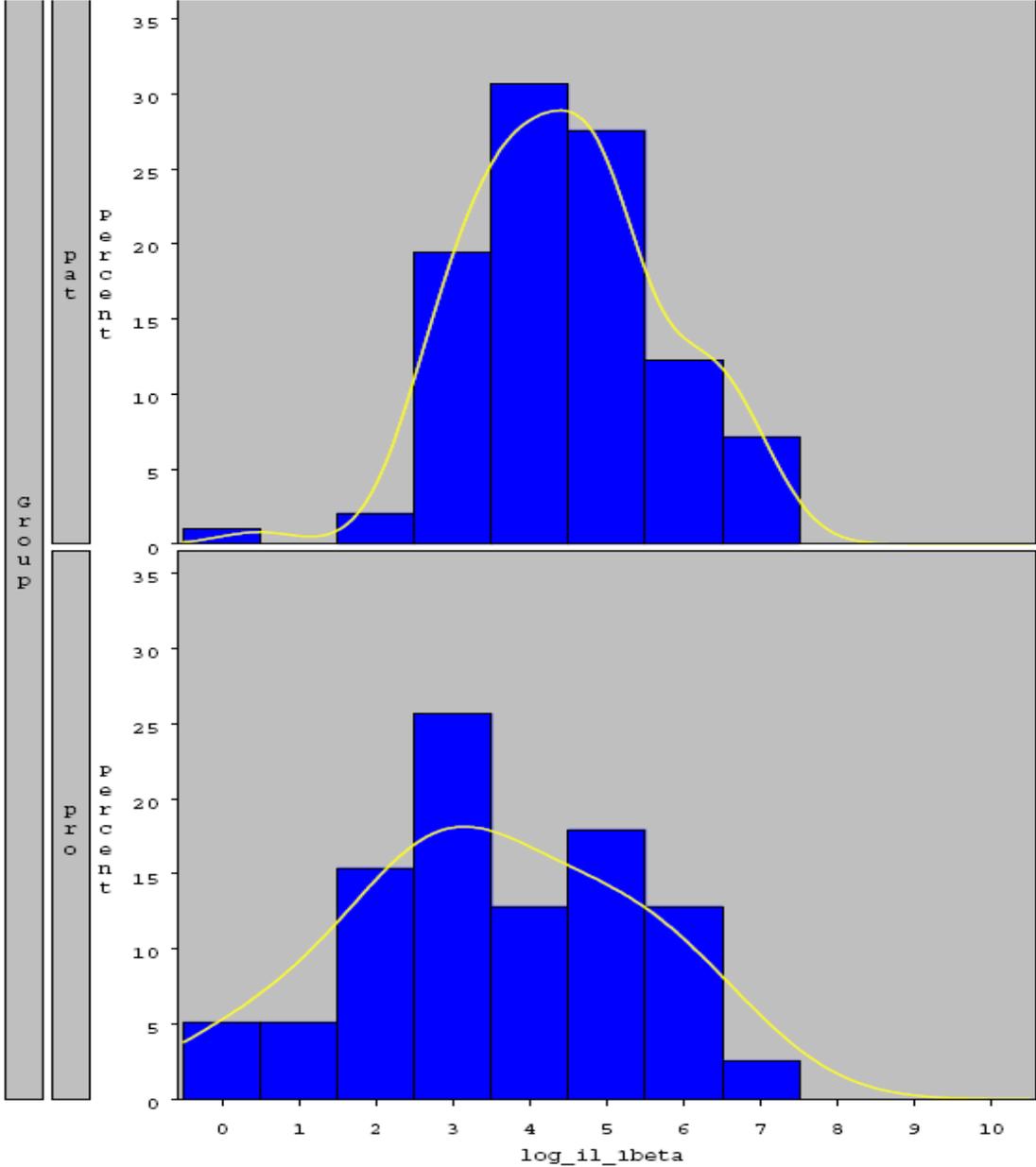


Abbildung 8 Konzentration des Zytokins Interleukin-1  $\beta$

### 3.1.3 Interleukin-2

Die Analyse der Interleukin-2 Werte der Vaginallavage ergab folgendes Ergebnis:  
Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen.

Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab einen signifikanten Unterschied der IL-2 Werte der beiden Gruppen.  
( $p < 0,001$ ).

	Patientinnen n =100	Kontrollgruppe n = 44
IL 2 Mittelwert (pg/ml)	22,0	2,6
IL 2 Minimum (pg/ml)	0,0	0,0
IL 2 Maximum (pg/ml)	98,0	14,6
IL 2 Median (pg/ml)	15,5	0,0

Tabelle 5 IL-2 Werte der beiden Gruppen

Häufigkeitsverteilung der IL 2 Konzentration in der Gruppe der Patientinnen und in der Kontrollgruppe

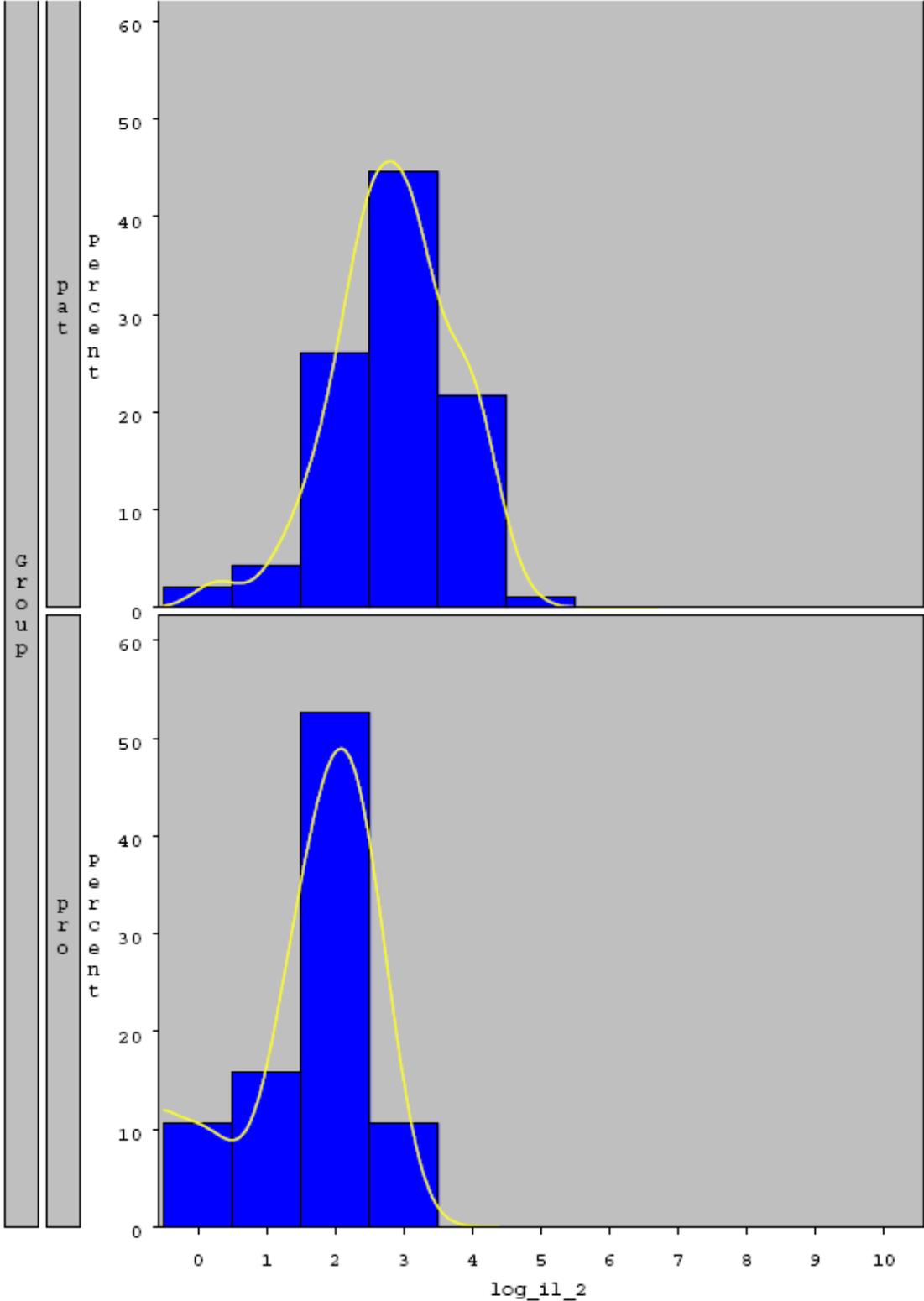


Abbildung 9 Konzentration des Zytokins Interleukin-2

### 3.1.4 Interleukin-3

Die Analyse der Interleukin-3 Werte der Vaginallavage ergab folgendes Ergebnis: Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen. Sechs Probandinnen mussten ausgeschlossen werden. Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab keinen signifikanten Unterschied der IL-3 Werte der beiden Gruppen. ( $p = 0,48$  einseitiger Test,  $p < 0,96$  zweiseitiger Test).

	<b>Patientinnen n = 100</b>	<b>Kontrollgruppe n = 44</b>
<b>IL 3 Mittelwert</b>	25,18	26,0
<b>IL 3 Minimum</b>	2,5	2,2
<b>IL 3 Maximum</b>	114,53	93,9
<b>IL 3 Median</b>	21,1	22,2

Tabelle 6 IL-3 Werte der beiden Gruppen

Häufigkeitsverteilung der IL 3 Konzentration in der Gruppe der Patientinnen und in der Kontrollgruppe

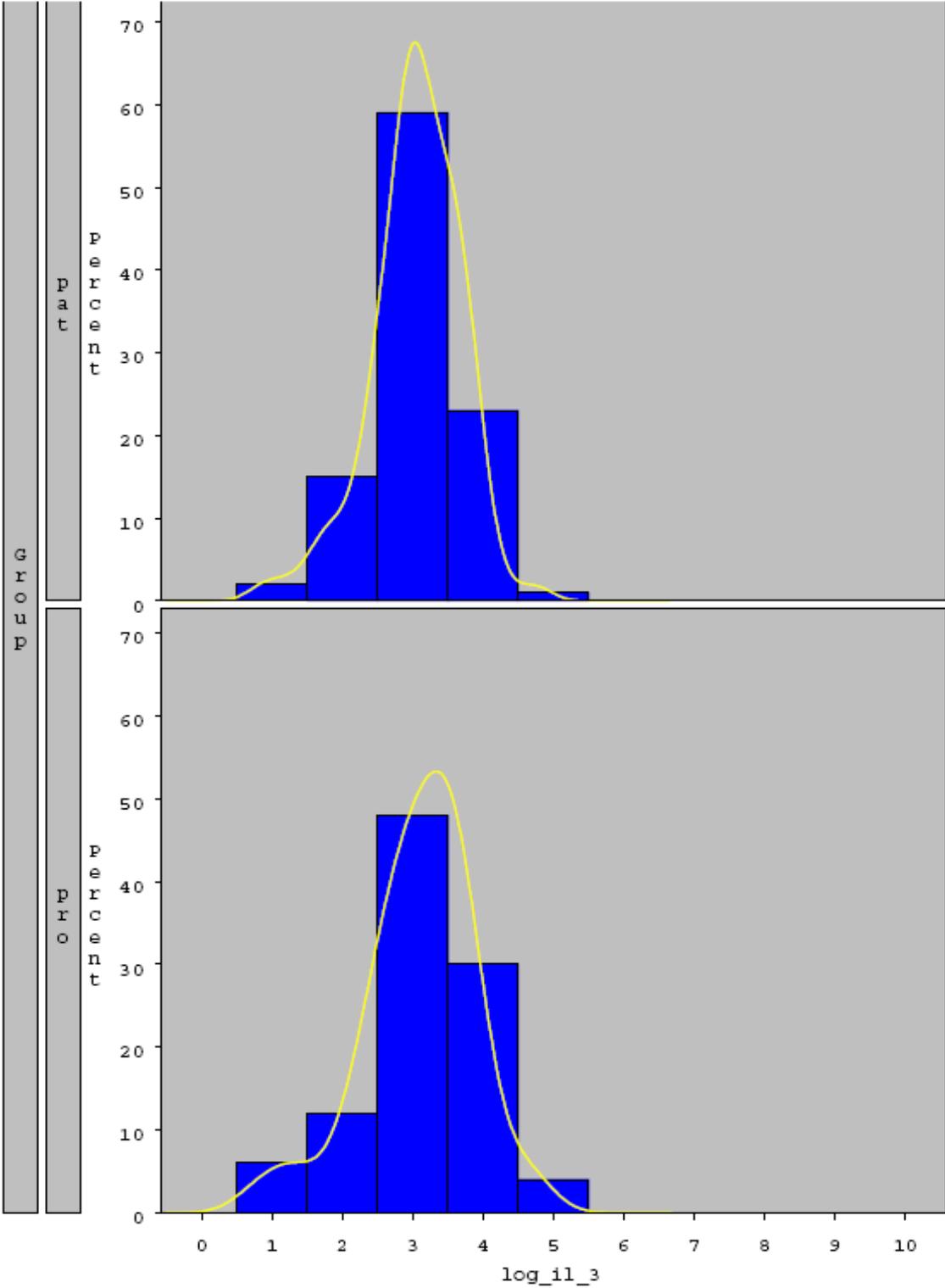


Abbildung 10 Konzentration des Zytokins Interleukin-3

### 3.1.5 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

Die Analyse der TNF- $\alpha$  Werte der Vaginallavage ergab folgendes Ergebnis:

Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen.

Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab einen signifikanten Unterschied der TNF-  $\alpha$  Werte der beiden Gruppen.

( $p= 0,001$ ).

	Patientinnen n = 100	Kontrollgruppe n = 44
TNF $\alpha$ Mittelwert	7,19	0,1
TNF $\alpha$ Minimum	0,0	0,0
TNF $\alpha$ Maximum	41,8	6,9
TNF $\alpha$ Median	8,18	0,0

Tabelle 7 TNF-  $\alpha$  Werte der beiden Gruppen

Diagramm der Häufigkeitsverteilung der TNF- $\alpha$  Konzentration in der Gruppe der Patientinnen und in der Kontrollgruppe

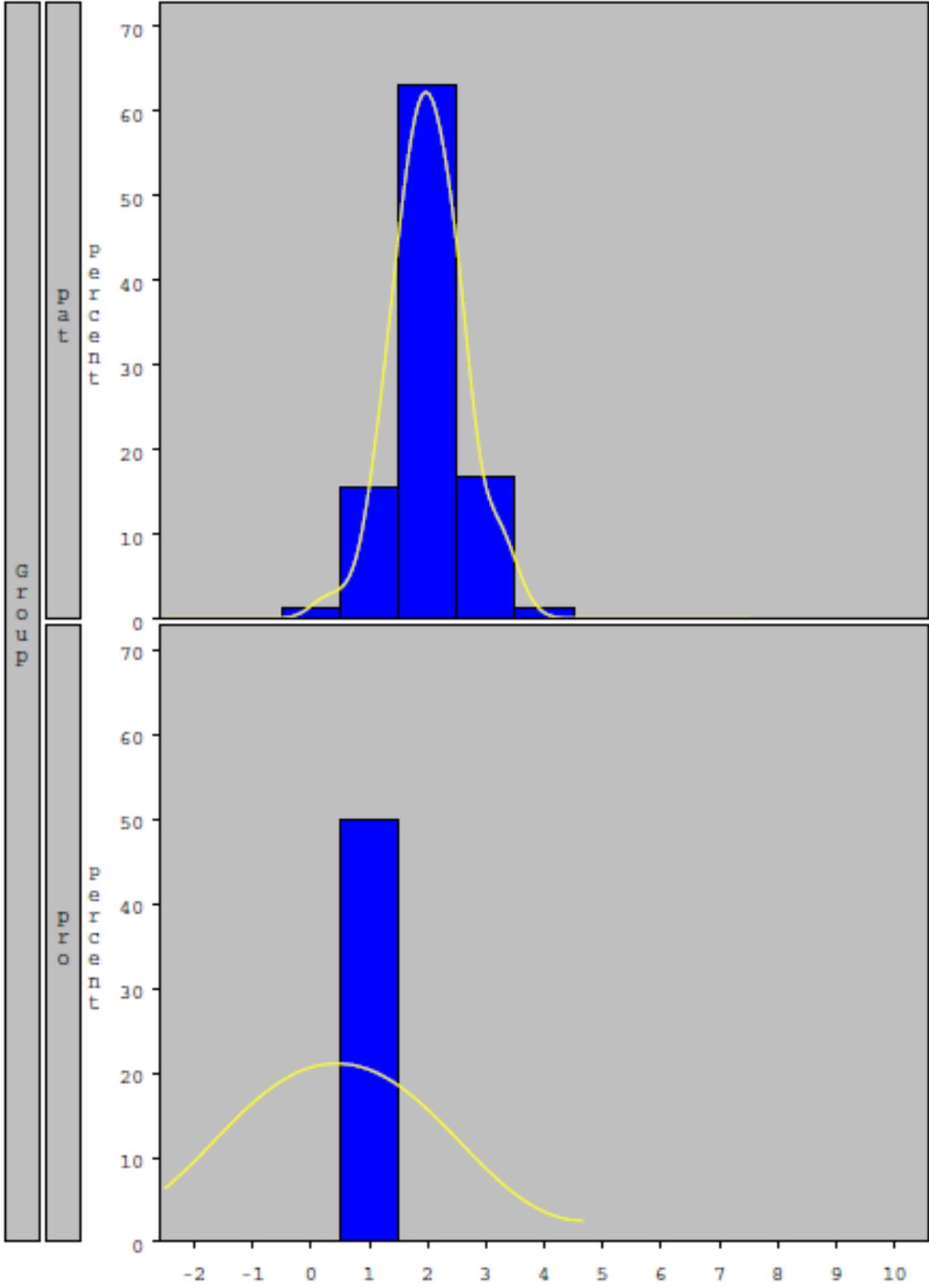


Abbildung 11 Konzentration des Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

### 3.3 Amintest

Die Amintestanalyse ergab folgendes Ergebnis:

Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen. Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab einen signifikanten Unterschied der Werte der beiden Gruppen.

( $p > 0,0001$ ).

	Patientinnen n = 100	Kontrollgruppe n = 44
Amintest negativ	5	44
Amintest positiv	95	0

Tabelle 8 Amintestanalyse

### 3.4 pH-Wert

Die Analyse der vaginalen pH-Werte ergab folgendes Ergebnis:

Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen. Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab einen signifikanten Unterschied der Werte der beiden Gruppen.

( $p = 0,001$ ).

	Patientinnen n = 100	Kontrollgruppe n = 44
Mittelwert	5,45	4,48
Minimum	4,7	4,0
Maximum	6,1	5,0
Median	5,5	4,7

Tabelle 9 Analyse der vaginalen pH-Werte

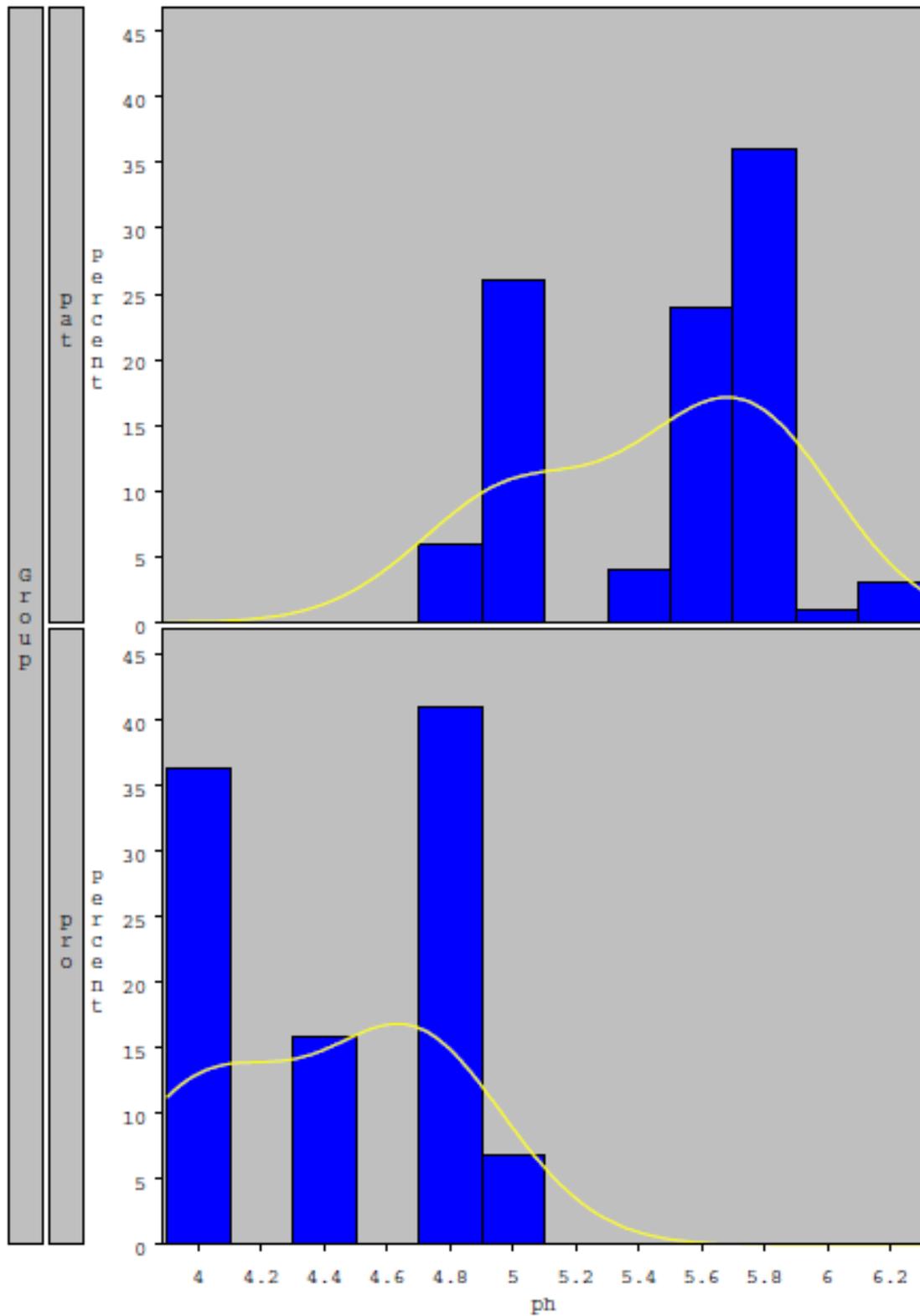


Abbildung 12 vaginale pH-Werte in den jeweiligen Gruppen

### 3.5 Alter

Die Analyse der Alterswerte ergab folgendes Ergebnis:

Es wurden die Daten von 100 Patientinnen mit BV mit den Daten von 44 gesunden Probandinnen verglichen. Der Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon Rangsummentest) ergab einen signifikanten Unterschied der Werte der beiden Gruppen.

( $p = 0,001$ ).

	Patientinnen n = 100	Kontrollgruppe n = 44
Durchschnittsalter (Jahre)	33,93	20,6
Spannbreite (Jahre)	19-50	16-34

Tabelle 10 Analyse der Alterswerte

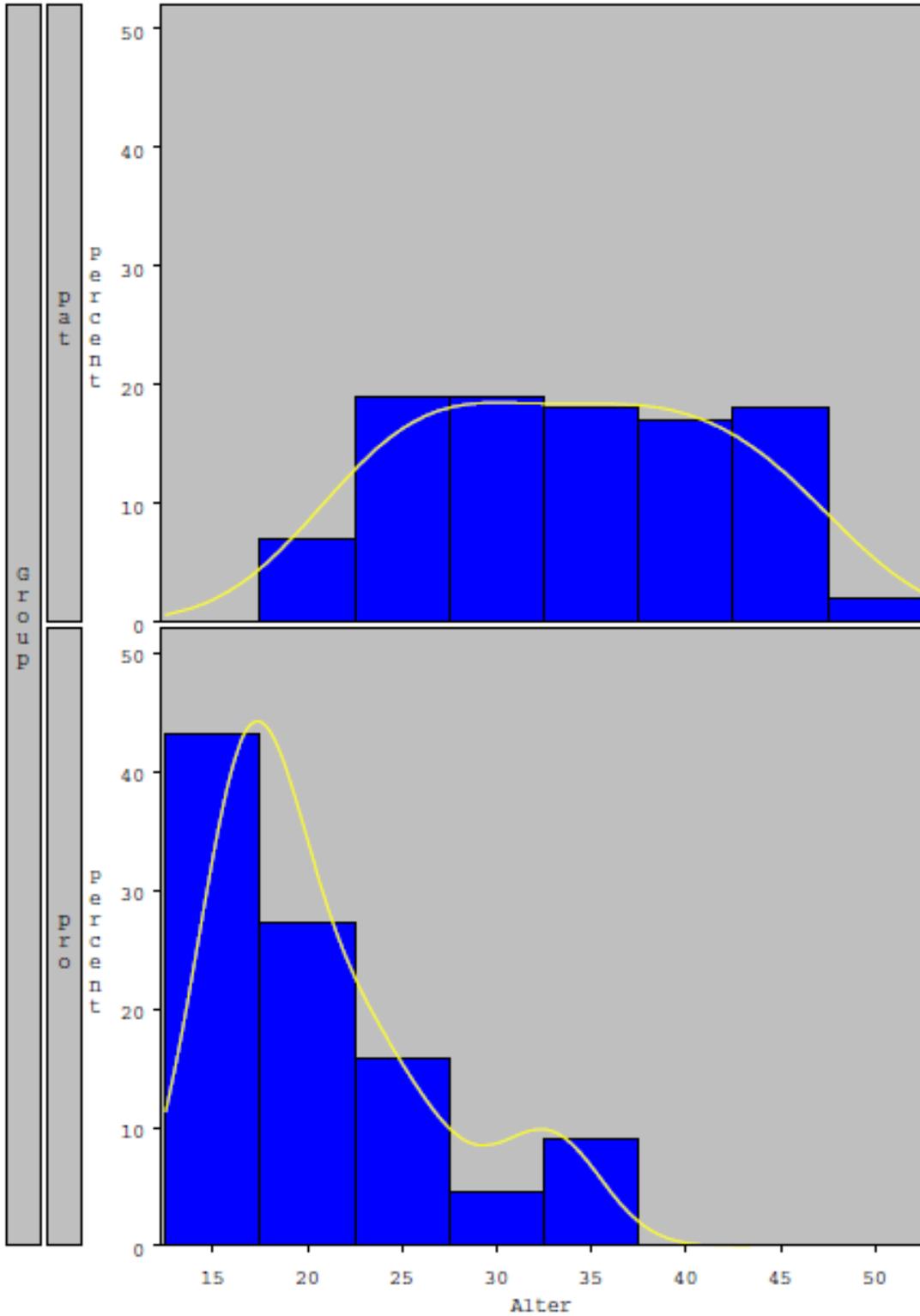


Abbildung 13 Alter der Frauen in den jeweiligen Gruppen

## 4. Diskussion

Bei vielen gynäkologisch-infektiologischen Erkrankungen beschränkt sich die immunologische Reaktion auf die Vagina (und ggf die Vulva). Eine systemische immunologische Reaktion tritt nicht in allen Fällen auf.

Die häufigste dieser Erkrankungen ist bei Frauen im gebärfähigen Alter die bakterielle Vaginose. Es handelt sich um eine lokal begrenzte Entität, die keine systemische Abwehrreaktion des Immunsystems hervorruft.

Betrachtet man das Konzept der „vaginalen Inflammation“, so ist es von wesentlicher Bedeutung, eine ausgewogene und der jeweiligen Situation angepasste Immunantwort durch die Produktion von antimikrobiellen Substanzen, Phagozytose, und somit letztendlich durch die Beseitigung der Mikroorganismen zu gewährleisten.

Ein Charakteristikum der BV ist das Fehlen klassischer inflammatorischer Zeichen, wie sie von anderen vaginalen Infektionen verursacht werden. Die vaginale Schleimhaut ist nicht gerötet, es besteht kein Pruritus, kein Brennen auch keine Dyspareunie [2].

Trotz der massiven Besiedelung mit mikrobiellen Keimen bei der BV kann bei den Patientinnen keine Erhöhung der Neutrophilenzahl im Vergleich zu gesunden Kontrollen gesehen werden [53, 54].

Darüber hinaus sind andere Faktoren der angeborenen Immunantwort, wie z.B. das antimikrobielle Protein „secretory leukocyte peptidase inhibitor“ (SLPI) bei BV-positiven Frauen erniedrigt [55].

Teilweise kommt es zu einer exzessiven lokalen und systemischen Immunantwort, in anderen Fällen kommt es kaum zu einer Immunreaktion. Dabei kann sich aber das Risiko einer nicht mehr einzugrenzenden Infektion erhöhen [31, 56].

In diesem Zusammenhang ist das Verhältnis zwischen Veränderungen der vaginalen Flora, der inflammatorischen Antwort und dem klinischen Ergebnis zu sehen.

Wir haben in dieser Studie die lokale, vaginale Immunität bei bakterieller Vaginose untersucht. Es wurden dabei die Zytokinkonzentrationen im Vaginalsekret bei Frauen mit BV und gesunden Kontrollen gemessen.

Die Unterschiede in den Konzentrationen der Zytokine zwischen Erkrankten und Gesunden wurde als Marker für das Ausmaß der immunologischen Reaktion auf das Krankheitsbild der BV gewertet.

Das Vaginalsekret von 100 Frauen mit klinisch gesicherter BV (typischer Fluor, pH-Wert >5, positivem Amintest, Reinheitsgrad II-III, und Clue Cells im mikroskopischen Präparat) wurde untersucht. Es wurden die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3 und TNF- $\alpha$  der vaginalen Sekretprobe mittels ELISA bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten 44 subjektiv gesunde Probandinnen.

Da es sich um eine Untersuchung der lokalen immunologischen Reaktion bei einer BV handelt, wurde keine Kultur oder PCR von *Gardnerella vaginalis* durchgeführt, weil *Gardnerella vaginalis* ein wesentlicher Bestandteil, aber nicht sicher der Hauptverursacher der BV ist.

Es erfolgte ein klinischer Ausschluss der möglichen Differentialdiagnosen.

Der vaginale Fluor bei der BV stellt eines der führenden Symptome dar. Diese Art von Fluor unterscheidet sich von dem anderer gynäkologisch - infektiologischer Erkrankungen [4]. Die für die Untersuchung gewonnene Vaginallavage ist in verschiedenen Studien erfolgreich zur Bestimmung von immunologischen Parametern herangezogen worden [57].

Eine immunologische Reaktion auf einen Mikroorganismus betrifft zumeist verschieden Teile der Immunität: Sowohl die angeborene, als auch die erworbene Immunität, mit den jeweiligen zellulären und humoralen Bestandteilen [39].

Um bei extrazellulären Keimen ein umfassendes Bild der Abwehrreaktion zu gewinnen, haben wir die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3 und TNF- $\alpha$  gewählt. Aus der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine haben wir IL-1( $\alpha$  und  $\beta$ ) und TNF- $\alpha$  untersucht.

In unserer Studie waren das Zytokin IL-1 $\alpha$  bei den Frauen mit BV nicht signifikant erhöht im Gegensatz zu den gesunden Probandinnen.

Im Gegensatz zu IL- $\beta$  findet sich IL-1 $\alpha$  im Serum oder in Körperflüssigkeiten nur in geringem Masse. Es lässt sich somit zumeist freies IL-1 $\alpha$  messen, dass durch Zelllyse oder durch Zellnekrose freigesetzt wird [58, 59]. Dies erklärt möglicherweise auch die ähnlichen Werte bei beiden Gruppen. Es sind zwar clue cells ein typischer Befund bei der BV, allerdings in relativ geringer Menge. Zudem sind Clue cells abgeschilferte Epithelzellen der obersten Epithelschicht, die mit einem Bakterienrasen übersät sind [60]. Das von *Gardnerella vag.* produzierte Cytolysin (VGL CD 59) hat zwar die Eigenschaft humane Erythrozyten zu lysieren, aber bei den vaginalen Epithelzellen steht die Aktivierung der proinflammatorischen Immunantwort durch Hochregulierung der mRNA von Interleukin-8 im Vordergrund [61]. Somit fehlt die für einen Anstieg der IL-1 $\alpha$  nötige Voraussetzung. Ein deutliche Erhöhung der IL-1 $\alpha$  Werte ist somit nicht zu erwarten.

Jedoch in den Studien von Wasiela, Platz-Christensen, Imseis, Ryckman und Wennerholm [62-66] war IL-1 $\alpha$  stets in der BV-Gruppe signifikant höher als in der gesunden Vergleichsgruppe.

Wasiela untersuchte schwangere Frauen und konnte sowohl eine IL-1 $\alpha$  Erhöhung in der BV- Gruppe, als auch eine starke positive Korrelation zwischen den Zytokinen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in dieser Gruppe zeigen. Es wurden Frauen zwischen der 22. und 36. Schwangerschaftswoche untersucht. Auch Platz-Christensen hatte Schwangere untersucht und bei den Patientinnen mit einer BV eine Erhöhung der IL-1  $\alpha$  Werte gemessen. Es gab in dieser Studie eine starke positive Korrelation von hohen IL-1 $\alpha$  Werten zur Zahl der Neutrophilen Granulozyten im Vaginalsekret. Auch Ryckman hatte in der BV-Gruppe höhere IL-1 $\alpha$  Wert messen können. Auffällig hier, dass die IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Werte absolut nur geringe Unterscheidung aufzeigten

In unserer Untersuchung hingegen lagen die IL-1 $\alpha$  Werte um nahezu eine Zehnerpotenz höher als die IL-1 $\beta$  Werte. Ob sich dies nur aus den unterschiedlichen ELISA Essays ergibt, ist unklar.

Auch Wennerholm hatte Schwangere untersucht. Ihre Untersuchung wurde an Frauen mit Zwillingschwangerschaften durchgeführt. Es konnte keine Korrelation zwischen einer Frühgeburt und IL-1 $\alpha$  hergestellt werden. Jedoch auch hier waren die IL-1 $\alpha$  Werte in der BV Gruppe signifikant höher.

Imseis hingegen konnte in seiner Studie zeigen, dass IL-1 $\beta$  bei den Schwangeren mit BV erhöht war, nicht jedoch die Werte von IL-1 $\alpha$ .

Der wesentliche Unterschied dieser Ergebnisse hinsichtlich unserer Werte bezieht sich auf die Patientinnen. Die bakterielle Vaginose während einer Schwangerschaft scheint zu höheren Werten bei dem Zytokin Interleukin-1 $\alpha$  zu führen.

Die einzige Studie mit nichtschwangeren Frauen konnte auch keine signifikante Korrelation bezüglich der IL-1 $\alpha$  Erhöhung und einer BV herstellen [67].

Das Zytokin IL-1 $\beta$  wurde im Vaginalsekret der BV-Gruppe in deutlich höherer Konzentration gefunden ( $p < 0,0001$ ).

Interleukin-1 $\beta$  ist ein „first response“ Zytokin, dass bei Antigenkontakt als erstes eine proinflammatorische Reaktion des Immunsystems verursacht. Neben der Aktivierung der angeborenen Immunantwort triggert IL-1 $\beta$  auch auf unterschiedlichen Wegen die spezifische humorale Immunantwort. IL-1 $\beta$  ist einer der zentralen Botenstoffe der Immunabwehr, der zudem eine Verbindung zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität herstellt. IL-1  $\beta$  wirkt als Kostimulator von T-Zellen und spielt eine nicht unwesentliche Rolle in der Antikörperproduktion der B-Zellen [42].

Cauci konnte in ihrer Studie erstmals einen Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$  und IgA Antikörpern gegen das Cytolysin (VGL CD59), das von Gardnerella vaginalis bei einer BV produziert wird, herstellen. Dabei wird einerseits die Funktion als Hauptfaktor der Aktivierung der angeborenen Immunantwort hervorgehoben. Andererseits wird die unterstützende Aktivierung der antigenspezifischen IgA Funktion im Serum und im Bereich der Mukosa betont [68]. Cauci untersuchte

bewusst nur nicht-schwangere Frauen, um eine immunologische Aktivierung durch die Schwangerschaft auszuschließen.

Mattsby-Baltzer konnte bei BV positiven Schwangeren keine Erhöhung der IL-6 oder TNF- $\alpha$  Werte feststellen. Die IL-1 $\beta$  Werte dieser schwangeren Patientinnen jedoch waren erhöht [69].

Der Cytokinlevel von IL-1 $\beta$  im Vaginalsekret von BV positiven Frauen ist erhöht, unabhängig davon, ob sie schwanger sind oder nicht [54, 66, 67, 69, 70].

Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen der Reduktion der Laktobazillenkonzentration in der Vagina und dem Anstieg von IL- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [54].

Dies zeigt, dass durch das angeborene Immunsystem eine deutliche Immunantwort zur Abwehr der abnormen mikrobiellen Kolonisation entsteht.

Bei der Konzeption unserer Untersuchung wurde IL-8 nicht berücksichtigt. In der Literatur scheint dieses proinflammatorische Zytokin aber ein möglicher Angriffspunkt für die Abwehrmechanismen der pathogenen Mikroorganismen bei BV zu sein. Zudem besteht in der Inflammationskaskade ein enger Zusammenhang zwischen IL-1 ( $\alpha$  &  $\beta$ ) und IL-8.

Die niedrige Leukozytenzahl in der Vaginallavage bei BV und die fehlenden Inflammationszeichen könnte durch den niedrigen IL-8 Level für verursacht sein.

IL-8 scheint genau wie IL-1 $\beta$  mit der BV korreliert zu sein. IL-8 Werte sind nicht so deutlich erhöht, wie die IL-1 $\alpha$  Werte in der Vaginallavage [66]. Die Flora bei BV scheint Virulenzfaktoren zu produzieren, die jedoch IL-8 mehr inhibieren, als IL-1 $\beta$  [54]. Spezifische bakterielle Proteasen bei BV könnten für die Reduktion des IL-8 Levels verursachen [29]. Denkbar ist auch, dass mikrobielle Virulenzfaktoren wie das Gardnerella Cytolysin die Zahl der IL-8 produzierenden Zellen reduziert.

In einer Studie von Yudin führte eine systemische und lokale Metronidazolbehandlung von BV positiven Patientinnen zu einer Reduktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 im Vaginalsekret [30].

Bei Patientinnen mit persistierender BV trotz Metronidazoltherapie veränderte sich das Niveau der gemessenen Zytokine nicht. Dies könnte eine Folge der fortwährenden Stimulation mit bakteriellem Endotoxin sein.

Die mikrobielle hydrolytische Enzyme Prolidase und Sialidase scheinen Immunglobuline in ihrer Wirkung zu beeinträchtigen und dadurch die Immunantwort zu modifizieren.

Die einzige bisher nachgewiesene adaptive, humorale Immunantwort bei BV sind IgA-Antikörper gegen das Hämolysin das von Gardnerella vaginalis produziert wird.

Die Menge dieser Antikörper ist laut Cauci positiv mit der IL-8 und IL-1 $\beta$  Konzentration korreliert. Eine indirekt proportionale Korrelation besteht zum Ausmaß der mikrobiellen Enzymaktivität [29, 71],

Laut Cauci kommt es bei der BV zu einer parallelen Induktion des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

Als Ergebnis zeigte sich, dass hohe Level von anti-G.vaginalis-Hämolysin-IgA protektive Wirkung auf die Schwangerschaft hatten, während eine hohe Aktivität der Enzyme Prolidase und Sialidase mit einem erhöhten Risiko für ein zu geringes Geburtsgewicht einher gingen [72].

Somit könnte eine Dämpfung der proinflammatorischen Immunantwort nach IL-1 $\beta$  Anstieg durch diese mikrobiellen Enzyme verursacht werden [53].

Der beschriebene unzureichende Anstieg von IL-8 kann für die geringe Zahl an Neutrophilen Granulozyten verantwortlich sein.

Die niedrige Zahl dieser Abwehrzellen ist ungewöhnlich für eine massive mikrobielle Kolonisation der Vagina bei BV.

Verschiedene andere Autoren konnten ebenso zeigen, dass es bei BV zu einer Erhöhung des IL-1 $\beta$  Levels kommt. [30, 64, 73, 74].

Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass es eine Assoziation zwischen BV und HIV gibt [29, 30]. Welche Rolle dabei die BV spielt, ist derzeit noch unklar.

Sturm-Ramirez stellte die Hypothese auf, der IL-1 $\beta$  Anstieg könne teilweise die verstärkte HIV Transmission bei BV erklären.

Die lokale HIV-Replikation könnte durch den erhöhten IL-1 $\beta$  Level bei BV verstärkt werden, da IL- $\beta$  über den Transkriptionsfaktor *NF- $\kappa$ B* die „Long terminal repeat Promotor“ Region (LTR-Promotor) des Hi-Virus aktiviert [35, 75-78].

TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen in großer Menge, auf verschiedene Stimuli hin, freigesetzt. Zu diesen Stimuli gehören gramnegative und grampositive Bakterien, Zytokine(IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ ) und Komplementfaktoren[51].

Auch unsere Analyse von TNF- $\alpha$  weist auf eine stärkere Produktion dieses Zytokins im Rahmen einer BV hin ( $p < 0,0001$ ).

Mattsby-Baltzer konnte in seiner Untersuchung keine Erhöhung der TNF- $\alpha$  Werte zeigen, lediglich die IL-1 $\beta$  Werte (s.o.) waren bei einer BV erhöht.

Diese Ergebnisse weichen aber von vielen anderen Studien zu TNF- $\alpha$  und BV ab.

Zariffard konnte zeigen, dass mit der Vaginallavage von Patientinnen mit BV in vitro stimulierte Monozyten eine signifikante Mehrproduktion von TNF- $\alpha$  zeigten [79]. Diese Ergebnisse implizieren, dass in der Vaginallavage von Patientinnen mit BV die TNF- $\alpha$  Level höher sein müssten, als bei gesunden Probandinnen. Diese Hypothese stimmt mit den Ergebnissen der Studien von folgender Autoren überein: Cherpes, Imseis, Mares, Sturm-Ramirez, et al. [35, 64, 69, 79-84].

Diese Autoren untersuchten die Vaginallavage betroffener Patientinnen direkt auf die Höhe des Zytokins TNF- $\alpha$  und konnten die Ergebnisse von Zariffard somit bestätigen.

Ähnlich wie Interleukin-1 $\beta$  scheint auch TNF- $\alpha$  bei Patientinnen mit einer BV die Infektionswahrscheinlichkeit mit HIV zu erhöhen.

Die gesteigerte HIV Replikation durch IL-1 $\beta$  lässt sich auch durch TNF- $\alpha$  nachweisen. Der Membranrezeptor unterscheidet sich bei beiden Zytokinen, die weitere intrazelluläre Signalkaskade läuft jedoch über denselben Transkriptionsfaktor *NF- $\kappa$ B*, der die LTR Region des Hi-Virus aktiviert, ab [75].

Die wesentliche Wirkung von IL-2 ist die Aktivierung, die Förderung des Wachstums und die Differenzierung von reifen T-Zellen als Antwort auf extrazelluläre Pathogene. IL-2 beeinflusst die Th1-Antwort hin zu einer zellvermittelten Immunität.

Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen werden von IL-2 zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität angeregt.

Die Zytokinkonzentration von IL-2 war in unserer Untersuchung signifikant höher bei den Patientinnen im Vergleich zu den gesunden Probandinnen ( $p < 0,0001$ ).

Diese Ergebnisse stimmen mit der Studie von Cherpes [83] überein.

Dabei wurde auch gezeigt, dass die Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva die Höhe der Zytokine bei BV signifikant erniedrigte.

Die Patientinnen und Probandinnen unserer Studie wurden nicht bezüglich dieser Variablen befragt. Eine Analyse unserer Daten unter dem Gesichtspunkt der Einnahme hormoneller Kontrazeptiva ist daher nicht möglich.

Die Erhöhung der IL-2 Werte in der Gruppe der Patientinnen spricht für eine verstärkte  $T_H1$  – *Typ* Immunantwort mit Betonung der zellvermittelten Immunität als lokale Reaktion bei einer BV. Eine Erhöhung  $T_H1$  – *Typ* assoziierter Zytokine wurde auch in der Studie von Anton [67] beschrieben. Anton et al. beschrieben in ihrer Studie bei Patientinnen mit BV auch eine geringere Produktion von Interleukin 5 und Interleukin 10. Diese Zytokine wirken einerseits antiinflammatorisch und verstärken andererseits eine  $T_H2$  – *Typ* Immunantwort mit Betonung der humoralen Immunität.

Es wird somit aufgrund der Relation der analysierten Zytokine als ein „Shift“ zur  $T_H1$  – *Typ* Immunantwort beschrieben.

IL-2 kann über die Differenzierung von Dendritischen Zellen die Mobilität dieser Zellen verbessern. Im Zusammenspiel mit anderen  $T_H1$  – *Typ* assoziierten Zytokinen führt dies zu einer gesteigerten Einwanderung von Dendritischen Zellen an den Ort der Inflammation [85].

In der Studie von St. John wurde die Hypothese vertreten, dass die BV, aber nicht die Normalflora der Vagina, Einfluss auf die Funktion der Dendritischen Zellen in vivo hat. Dies wird als einer der wesentlichen Mechanismen betrachtet, mit dem bei einer BV die mukosale Immunität beeinflusst wird [86].

Es liegt somit die Vermutung nahe, dass bei Patientinnen mit BV die Funktion der Dendritischen Zellen auch über eine Erhöhung der IL-2 gesteuert wird.

IL-3 wirkt auf das Überleben von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und stimuliert bei Makrophagen nicht nur die Proliferation und Phagozytose, sondern führt bei diesen zu einer vermehrten Synthese der Zytokine IL-1, IL-6, und TNF- $\alpha$ . [39] IL-3 scheint eine besondere Wirkung auf die Differenzierung von Dendritischen Zellen zu haben. Es kommt unter dem Einfluss von IL-3 zu einer Verstärkung der Immunreaktion vom sowohl des  $T_H1$  – *Typ*

als auch des  $T_H2$  – Typ [49, 87].

Caux *et al.* [38] analysierte, ob IL-3 in Verbindung mit TNF- $\alpha$  die Entwicklung von CD1a+ Dendritischen Zellen *in vitro* unterstützen kann.

Es kam in Kulturen mit IL-3 allein, zu keiner Erhöhung der Zellzahl. In Kombination mit TNF- $\alpha$  hingegen kam es zu einem Anstieg zwischen 11-17%.

Aktivierte  $T_H1$  – Zellen produzieren ein charakteristisches Zytokinmuster: IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ .

Marcinkiewicz konnte in einer Studie zeigen, dass von aktivierten Makrophagen freigesetztes IL-6 wahrscheinlich CD8+ T Suppressor Zellen stimuliert. Diese wiederum blockierten die CD4+ TH1-Zellen, die IL-2 und IL-3 produzieren. Das Ergebnis ist das Fehlen einer Immunantwort [88]

In unserer Studie wurde sowohl IL-3 als auch TNF- $\alpha$  analysiert. Bei einer Erhöhung beider Zytokine würde auf einen supportiven Effekt bei der Maturation der Dendritischen Zellen hinweisen.

Da zwischen den IL-3 Werten und dem Vorhandensein einer BV keine Relation gezeigt werden konnte, muss sich die von St. John postulierte gesteigerte DC Expression unter anderem über die IL-2 Signalkaskade entstehen.

Die Antwort auf eine Infektion des weiblichen Genitaltraktes variiert unter den Frauen weitaus mehr als erwartet. Da die Frauen weder genetisch identisch sind, noch den gleichen umweltbedingten Faktoren ausgesetzt sind, ist nicht davon auszugehen, dass ein einzelner Organismus nur ein und dieselbe Immunreaktion hervorruft.

So konnten auch Witkin *et al* [77] zeigen, dass nicht nur genetische Veranlagung sondern auch Art und Quantität einer Infektion, oder auch Co-Infektionen mit anderen Erregern als Candida, Hypersensitivitätsreaktionen verursachen oder beeinflussen können und daher für die Symptomatik der Patientinnen mitverantwortlich sein können.

In seiner aktuellen Arbeit aus dem Jahre 2007 geht Steven S. Witkin auf die möglichen individuellen Veränderungen der angeborenen Immunität im Bezug auf die BV ein [9]. Eine pathogen verursachte Inhibition der TLR-Expression könne zu einer Blockade der proinflammatorischen Immunreaktion und somit zu einer

Proliferation von atypischen vaginalen Bakterien führen. Defizite in der Produktion von speziellen Rezeptoren und Effektoren der angeborenen Immunität (Mannose-bindendes-Lectin, Defensin, 70 kDa heat-shock Protein) würden die Möglichkeiten zur Pathogenelimination verringern. Dadurch würde sich die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die pathogenen Mikroorganismen in den oberen weiblichen Genitaltrakt aufsteigen oder zumindest das ursprüngliche Verhältnis der vaginalen Flora nicht wieder hergestellt werden kann.

Auch Schwankungen des Östradiolspiegels im Rahmen des Menstruationszyklus werden für die Entstehung der BV mit verantwortlich gemacht, da es häufig bei erhöhtem Östradiolspiegel im ersten Teil des Zyklus zum Auftreten einer BV kommt [24]. Dies würde mit der Beobachtung übereinstimmen, dass es insbesondere bei Patientinnen vor der Menarche oder nach der Menopause sehr selten zu einem Beschwerdebild wie bei BV kommt [25].

Eine unterschiedliche Östrogenisierung der Vagina könnte unser Ergebnis beeinflusst haben. Die bakterielle Vaginose tritt in den seltensten Fällen nach der Menopause auf. Das Durchschnittsalter der Patientinnengruppe lag signifikant über dem der Kontrollgruppe. Gleichzeitig war das Alter in der Patientinnengruppe sehr homogen verteilt. Die Anzahl der Frauen in dieser Gruppe zwischen 45 und 50 Jahren lag bei 11 von 100. Die Östrogenisierung und somit auch die Glykogenisierung der Epithelzellen der Vagina in der Reproduktionszeit scheint eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung einer BV zu sein. Die postmenopausale Atrophie der Epithelzellen der Vagina erschwert eine bakterielle Besiedlung [25].

Da die Menopause meist um das 50. Lebensjahr einsetzt und der damit verbundene Östrogenmangel zu einer Veränderung des Vaginalepithels führt, insbesondere der reduzierten Glykogenisierung des Epithels, kommt es postmenopausal sehr selten zu einer Bakteriellen Vaginose.

Die Patientinnengruppe mit dem höheren Durchschnittsalter hätte theoretisch eine geringere Östrogenisierung des Vaginalepithels aufweisen können. Dies wiederum hätte zu geringeren Level von IL-1 $\alpha$ + $\beta$ , IL-2, IL-3 und TNF- $\alpha$  führen müssen, da Östrogen proinflammatorisch wirkt [89]. Unsere Ergebnisse zeigen aber ein anderes Bild. Die Level der gemessenen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ ) sind in der

Patientinnengruppe höher als in der Probandinnengruppe. Somit ist der Altersunterschied der beiden Gruppen statistisch signifikant, aber physiologisch und pathophysiologisch unter dem Aspekt der BV aus unserer Sicht nicht von Bedeutung. Zudem zeigt sich auch in Studien mit bezüglich des Alters nicht statistisch signifikant unterschiedlichen Altersgruppen ein mit unseren Ergebnissen vergleichbares Outcome [67].

Pathogenetisch könnten auch die bereits erwähnten hydrolytischen Enzyme Sialidase und Prolidase den mukösen Schutzfilm zerstören und somit die vaginale Schleimhaut angreifen. Die bei BV vorkommenden bakteriellen Hydrolasen werden von *Gardnerella vag.*, *Mobiluncus spp.* sowie von *Prevotella spp.* produziert. Sialidase führt nicht nur zur Lysis des mukösen Schutzfilms und erhöht die Adhärenz von Bakterien, sondern reduziert die Wirkung der *Gardnerella vaginalis* Toxin IgA-Antikörper [72].

Es wurden verschiedene Aspekte wissenschaftlich untersucht, die eine adäquate Immunantwort bei BV negativ beeinflussen können. Auch in unserer Studie sprechen die Ergebnisse für eine Aktivierung des lokalen Immunsystems. Warum es dennoch nicht zu einer Elimination der verantwortlichen Keime kommt, bleibt weiterhin ungeklärt.

### **Schlussfolgerung**

Insgesamt muss festgestellt werden, dass der pathogenetische Mechanismus, der zu einer Bakteriellen Vaginose führt, nach wie vor nicht vollständig geklärt ist.

Die Zusammenhänge der Interaktionen unterschiedlicher, teils kommensaler Bakterien sind im Einzelnen unbekannt und erlauben kein schlüssiges Bild, dass diese Erkrankung eindeutig erklärt.

Unterschiedliche vaginale Infektionen führen zu unterschiedlichen immunologischen Antworten [33]. Die Bakterielle Vaginose führt zu einem lokalen Anstieg proinflammatorischer Zytokine. Dieser Anstieg ist signifikant höher als bei gesunden Kontrollen. Die resultierende Klinik kann nicht als klassische Entzündungsreaktion betrachtet werden. Im Vergleich zu anderen lokalen vaginalen Infektionen muss die Immunantwort bei der BV als unzureichend angesehen werden. Es kommt nicht zu einer ausreichenden Reaktion des humoralen oder zellulären Immunsystems.

Weder kommt es zu einem Anstieg von Effektorzellen der CMI noch zur Bildung Antikörpern gegen das Bakterium *Gardnerella vag.* selbst (oder den anderen bei BV beteiligten Keimen: *Mobiluncus*, *Atopodium*, *Bacterioides*, etc.) . Es werden sehr unterschiedliche Theorien angeführt, um dieses Phänomen zu erklären. Bis heute hat sich keine dieser Theorien als endgültiges tragfähiges Konzept zur Pathogenese erwiesen. Viele einzelne Faktoren im Zusammenspiel zwischen dem Wirt und den Mikroorganismen bei BV entsprechen nicht dem klassischen Abwehrmechanismus des systemischen oder auch des mukosalen Immunsystems.

Alles in allem zeigt sich, dass die erhöhten Level der proinflammatorischen Zytokine in Verbindung mit der Veränderung der vaginalen Flora keine inflammatorische Antwort im herkömmlichen Sinn hervorrufen.

Insgesamt sind die Level der untersuchten Zytokine IL-1 bei Patientinnen mit einer BV zwar signifikant erhöht, doch nur relativ gering erhöht im Vergleich zu gesunden Probandinnen [83].

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass bestimmte Bakterien die lokale Immunantwort unterdrücken.

## 5. Zusammenfassung

Die bakterielle Vaginose ist auch heute noch die häufigste gynäkologisch-infektiologische Erkrankung. Die klinische Symptomatik mit dem fischartigen Geruch, dem Fluor und dem hin und wieder auftretenden Brennen und Schmerzen ist für die Patientinnen sehr unangenehm. Zudem verdichten sich die Hinweise, dass die BV eine Infektion mit HIV erleichtert und dass es bei schwangeren Frauen vermehrt zu Frühgeburtlichkeit kommt.

Die lokale Immunität der Vagina bei BV ist im Detail nicht abschließend geklärt.

Wir haben immunologische Parameter bestimmt, um einen weiteren Einblick in die immunologischen Vorgänge der Vagina bei BV zu erhalten. Es sollten dabei besonders die proinflammatorischen Aspekte dieser lokalen Immunantwort der Vagina analysiert werden. Wir haben uns die Frage gestellt, ob es bei Patientinnen mit bakterieller Vaginose zu lokalen immunologischen Reaktionen mit Erhöhung der Zytokine IL-1 $\alpha$  +  $\beta$ , IL-2, IL-3, und TNF- $\alpha$  kommt.

Unsere Hypothese war, dass bei BV die Zytokine IL-1 $\alpha$  +  $\beta$ , IL-2, IL-3, und TNF- $\alpha$  Anteil haben an der Modulation einer lokalen Abwehrreaktion der Vagina und somit in den jeweiligen untersuchten Gruppen in unterschiedlicher Konzentration nachzuweisen sind.

Es wurde das Vaginalsekret von 100 Patientinnen und von 44 gesunden Frauen untersucht. Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 33,9 Jahre. Das Kollektiv der gesunden Frauen war durchschnittlich 20,6 Jahre alt.

Das Durchschnittsalter der beiden Gruppen war signifikant unterschiedlich. Aus unserer Sicht ist dieser Aspekt statistisch relevant, aber für die Relation zwischen BV und den gemessenen Zytokinleveln pathophysiologisch nicht bedeutsam.

Es wurden in beiden Gruppen die Zytokine IL-1 $\alpha$ + $\beta$ , IL-2, IL-3 und TNF- $\alpha$  in der Vaginallavage mittels Elisa analysiert.

Es ergaben sich für die typischen klinischen Parameter der BV, den pH-Wert der Vaginallavage, und den Amintest jeweils signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Die von uns analysierten Messwerte ergaben für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$  eine signifikante Erhöhung bei den Patientinnen im Sinne einer

proinflammatorischen Reaktion im Gegensatz zu den gesunden Probandinnen. Lediglich die Analyse der Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-3 ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen.

Unsere Ergebnisse stimmen weitestgehend mit der aktuellen wissenschaftlichen Literatur überein.

Diese Ergebnisse zeigen eine lokale proinflammatorische Immunreaktion der Vagina. Es kommt aber offensichtlich nicht zu einer ausreichenden Reaktion des humoralen oder zellulären Immunsystems. Die Immunantwort bei der BV muss als unzureichend angesehen werden. Die Folgen sind unter anderem eine erhöhte Suszeptibilität für HIV-Infektionen, vermehrte Adnexitiden und Endometritiden sowie bei schwangeren Frauen eine erhöhte Gefahr für Frühgeburtsbestrebungen. Als therapeutisch sinnvoll bei einer bakteriellen Vaginose könnte sich möglicherweise eine kontrollierte Immunstimulation des humoralen oder des zellulären Immunsystems der Mukosa der Vagina erweisen. Ein weiterer wesentlicher Aspekt zum Verständnis der Pathogenese ist das bisher nur unzureichend erforschte Verhältnis zwischen den kommensalen Lactobazillen, den pathogenen Mikroorganismen und der vaginalen Mukosa. Bei bakterieller Vaginose konnte die supportive Therapie bei mit Lactobazillen bisher keinen entscheidenden langfristigen Nutzen zeigen.

Eine weitere Forschung zur Klärung der Pathogenese und Therapie der bakteriellen Vaginose ist notwendig und sinnvoll.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Robertson, A.M., et al., *A Novel Bacterial Mucinase, Glycosulfatase, Is Associated with Bacterial Vaginosis*. J. Clin. Microbiol., 2005. **43**( 11) : p. 5504-5508.
2. Morris, M., Angus Nicoll Ian Simms Janet Wilson Mike Catchpole, *Bacterial vaginosis: a public health review*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2001. **108**( 5) : p. 439-450.
3. Sweet, R.L., *Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2000. **8**( 3-4) : p. 184-90.
4. Weissenbacher, *Fluorpraktikum*. 4. Auflage ed. 2001: Medifact Verlag, München.
5. Amsel, R., et al., *Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations*. Am J Med, 1983. **74**( 1) : p. 14-22.
6. Hillier, S.L., et al., *The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women*. Clin Infec Dis, 1993. **16**: p. S273 - 81.
7. Wolrath, H., Stahlbom B. Hallen U. Forsum, *Trimethylamine and trimethylamine oxide levels in normal women and women with bacterial vaginosis reflect a local metabolism in vaginal secretion as compared to urine*. Apmis, 2005. **113**( 7-8) : p. 513-516.
8. Witkin, S.S., *Immunology of the vagina*. Clin Obstet Gynecol, 1993. **36**( 1) : p. 122-8.
9. Witkin, S.S., et al., *An Altered Immunity Hypothesis for the Development of Symptomatic Bacterial Vaginosis*. Clin Infect Dis, 2007. **44**( 4) : p. 554-557.

10. Verhelst, R., et al., *Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis and bacterial vaginosis*. BMC Microbiol, 2004. **4**: p. 16.
11. Forsum, U., et al., *Bacterial vaginosis--a microbiological and immunological enigma*. Apmis, 2005. **113**( 2) : p. 81-90.
12. Gardner, H.L. and C.D. Dukes, *Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis*. Am J Obstet Gynecol, 1955. **69**( 5) : p. 962-76.
13. Lönning, T., Riethdorf, L., *Spezielle pathologische Anatomie*, in *Pathologie der weiblichen Genitalorgane III Pathologie des Uterus, der Vagina und der Vulva*, W. Doerr, Seifert, G., Editor. 2001, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York
14. Fredricks, D.N., T.L. Fiedler, and J.M. Marrazzo, *Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis*. N Eng J Med, 2005. **353**: p. 1899 - 1911.
15. Oakley, B.B., et al., *Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis*. Appl. Environ. Microbiol., 2008. **74**( 15) : p. 4898-4909.
16. Saunders, S., et al., *Effect of Lactobacillus challenge on Gardnerella vaginalis biofilms*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007. **55**( 2) : p. 138-142.
17. Patterson, J.L., et al., *Effect of biofilm phenotype on resistance of Gardnerella vaginalis to hydrogen peroxide and lactic acid*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2007. **197**( 2) : p. 170.e1-170.e7.

18. Josey, W.E. and J.R. Schwebke, *The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment*. Int J STD AIDS, 2008. **19**( 3) : p. 152-154.
19. Boris, S., et al., *Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens*. Infect. Immun., 1998. **66**( 5) : p. 1985-1989.
20. Zárate, G.N.-M., ME ;, *Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells*. Letters in Applied Microbiology, 2006. **43**( 2) : p. 174-180.
21. Boris, S. and C. Barbés, *Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens*. Microbes and Infection, 2000. **2**( 5) : p. 543-546.
22. Pereira, L., et al., *Variation in microbiologic profiles among pregnant women with bacterial vaginosis*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005. **193**( 3) : p. 746-751.
23. Chiaffarino, F., et al., *Risk factors for bacterial vaginosis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **117**( 2) : p. 222-6.
24. Keane, F.E.A., C.A. Ison, and D. Taylor-Robinson, *A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle*. Int J STD AIDS, 1997. **8**( 8) : p. 489-494.
25. Taylor-Robinson, D., et al., *Bacterial vaginosis in climacteric and menopausal women*. Int J STD AIDS, 2002. **13**( 7) : p. 449-452.
26. Neggers, Y.H., et al., *Dietary Intake of Selected Nutrients Affects Bacterial Vaginosis in Women*. J. Nutr., 2007. **137**( 9) : p. 2128-2133.
27. Friese, K., *The role of infection in preterm labour*. Bjog, 2003. **110 Suppl 20**: p. 52-4.

28. Nugent, R.P., M.A. Krohn, and S.L. Hillier, *Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation*. J Clin Microbiol, 1991. **29**: p. 297 - 301.
29. Cauci, S., et al., *Correlation of local interleukin-1beta levels with specific IgA response against Gardnerella vaginalis cytolyisin in women with bacterial vaginosis*. Am J Reprod Immunol, 2002. **47**( 5) : p. 257-64.
30. Yudin, M.H., et al., *Clinical and cervical cytokine response to treatment with oral or vaginal metronidazole for bacterial vaginosis during pregnancy: a randomized trial*. Obstet Gynecol, 2003. **102**( 3) : p. 527-34.
31. Romero, R., et al., *Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk of preterm birth: a role for genetic epidemiology in the prevention of preterm birth*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**( 6) : p. 1509-19.
32. Cherpes, T.L., et al., *Genital Tract Shedding of Herpes Simplex Virus Type 2 in Women: Effects of Hormonal Contraception, Bacterial Vaginosis, and Vaginal Group B Streptococcus Colonization*. Clin Infect Dis, 2005. **40**( 10) : p. 1422-1428.
33. Cauci, S. and J.F. Culhane, *Modulation of vaginal immune response among pregnant women with bacterial vaginosis by Trichomonas vaginalis, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and yeast*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2007. **196**( 2) : p. 133.e1-133.e7.
34. Discacciati, M., Jose A. Simoes Erika S. Lopes Samara M. Silva Eliana B. L. Montemor Silvia H. Rabelo-Santos Maria C. A. Westin, *Is bacterial vaginosis associated with squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix?* Diagnostic Cytopathology, 2006. **34**( 5) : p. 323-325.
35. Sturm-Ramirez, K., et al., *High Levels of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin- $1\beta$  in Bacterial Vaginosis May Increase Susceptibility to Human*

- Immunodeficiency Virus*. The Journal of Infectious Diseases, 2000. **182**( 2) : p. 467-473.
36. Janssens, S. and R. Beyaert, *Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition*. Clin. Microbiol. Rev., 2003. **16**( 4) : p. 637-646.
  37. Reis e Sousa, C., *Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls*. Semin Immunol, 2004. **16**( 1) : p. 27-34.
  38. wissenschaft-online. *Spezifische Immunantwort*. Kompaktlexikon der Biologie 2008 [cited 2008; Available from: <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biok/11026>
  39. Holländer, G.A., *Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis*. Vol. 1. 2006, München: Urban & Fischer. 291.
  40. Hedges, S.R., W.W. Agace, and C. Svanborg, *Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks*. Trends in Microbiology, 1995. **3**( 7) : p. 266-270.
  41. Roitt, I., *Leitfaden der Immunologie*. 1993, Berlin: Blackwell Wissenschaft
  42. Dinarello, C.A., *Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**( 1) : p. 519-550.
  43. Dinarello, C.A., *Interleukin-1*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 1997. **8**( 4) : p. 253-265.
  44. Vollmar, A., *Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe*.
  45. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**( 6) : p. 2095-2147.
  46. Gaffen, S.L. and K.D. Liu, *Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications*. Cytokine, 2004. **28**( 3) : p. 109-123.

47. Kim, H.P., J. Imbert, and W.J. Leonard, *Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2006. **17**( 5) : p. 349-366.
48. Ivanovic, Z., *Interleukin-3 and ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells: facts and controversies*. Eur Cytokine Netw, 2004. **15**( 1) : p. 6-13.
49. Shearer, W.T., et al., *Biology of common [beta] receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **112**( 4) : p. 653-665.
50. Schottelius, A.J.G., et al., *Biology of tumor necrosis factor- $\alpha$ - implications for psoriasis*. Experimental Dermatology, 2004. **13**( 4) : p. 193-222.
51. Pfeffer, K., *Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2003. **14**( 3-4) : p. 185-191.
52. Corporation., L.T., *IL-3 Human ELISA Kit*. 2012.
53. Cauci, S., *Vaginal Immunity in Bacterial Vaginosis*. Curr Infect Dis Rep, 2004. **6**( 6) : p. 450-456.
54. Cauci, S., et al., *Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**( 1) : p. 53-8.
55. Draper, D.L., et al., *Levels of vaginal secretory leukocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive tract infections*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2000. **183**( 5) : p. 1243-1248.
56. Simhan, H.N., et al., *Decreased cervical proinflammatory cytokines permit subsequent upper genital tract infection during pregnancy*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2003. **189**( 2) : p. 560-567.

57. Fichorova, R.N., et al., *Biological and Technical Variables Affecting Immunoassay Recovery of Cytokines from Human Serum and Simulated Vaginal Fluid: A Multicenter Study*. Analytical Chemistry, 2008. **80**( 12) : p. 4741-4751.
58. Elkon, K.B., *IL-1[alpha] responds to necrotic cell death*. Nat Med, 2007. **13**( 7) : p. 778-780.
59. Chen, C.-J., et al., *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. Nat Med, 2007. **13**( 7) : p. 851-856.
60. Swidsinski, A., et al., *Adherent Biofilms in Bacterial Vaginosis*. Obstet Gynecol, 2005. **106**( 5) : p. 1013-1023.
61. Gelber, S.E., et al., *Functional and Phylogenetic Characterization of Vaginolysin, the Human-Specific Cytolysin from Gardnerella vaginalis*. J. Bacteriol., 2008. **190**( 11) : p. 3896-3903.
62. Wasiela, M., et al., *Correlation between levels of selected cytokines in cervico-vaginal fluid of women with abnormal vaginal bacterial flora*. Med Dosw Mikrobiol, 2005. **57**( 3) : p. 327-33.
63. Platz-Christensen, J.J., et al., *Endotoxin and interleukin-1 alpha in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**( 5) : p. 1161-6.
64. Imseis, H.M., et al., *Characterization of the inflammatory cytokines in the vagina during pregnancy and labor and with bacterial vaginosis*. J Soc Gynecol Investig, 1997. **4**( 2) : p. 90-4.
65. Ryckman, K.K., S.M. Williams, and J. Kalinka, *Correlations of selected vaginal cytokine levels with pregnancy-related traits in women with bacterial*

- vaginosis and mycoplasmas*. Journal of Reproductive Immunology, 2008. **78**( 2) : p. 172-180.
66. Wennerholm, U., Holm, B., Mattsby-Baltzer, I., Nielsen, T., Platz-Christensen, J.J., 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 Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, 1998. **77**( 5) : p. 508-514.
67. Anton, G., et al., *Evidence of a TH1-Shift of Local Vaginal Inflammatory Response During Bacterial Vaginosis*. Infection, 2008. **36**( 2) : p. 147-152.
68. Staats, H.F. and F.A. Ennis, Jr., *IL-1 is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadministered with protein immunogens*. J Immunol, 1999. **162**( 10) : p. 6141-7.
69. Mattsby-Baltzer, I., et al., *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**( 7) : p. 701-6.
70. Cauci, S., et al., *Association of interleukin-1{beta} and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms with bacterial vaginosis in non-pregnant Italian women*. Mol. Hum. Reprod., 2007. **13**( 4) : p. 243-250.
71. Cauci, S., et al., *Correlation of local interleukin-8 with immunoglobulin A against Gardnerella vaginalis hemolysin and with prolidase and sialidase levels in women with bacterial vaginosis*. J Infect Dis, 2002. **185**( 11) : p. 1614-20.
72. Cauci, S., et al., *Determination of Immunoglobulin A against Gardnerella vaginalis Hemolysin, Sialidase, and Prolidase Activities in Vaginal Fluid: Implications for Adverse Pregnancy Outcomes*. J. Clin. Microbiol., 2003. **41**( 1) : p. 435-438.

73. Basso, B., F. Gimenez, and C. Lopez, *IL-1beta, IL-6 and IL-8 levels in gynecologic infections*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2005. **13**( 4) : p. 207-11.
74. Hedges, S.R., et al., *Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora*. *J Infect Dis*, 2006. **193**( 4) : p. 556-62.
75. Equils, O., et al., *Bacterial Lipopolysaccharide Activates HIV Long Terminal Repeat Through Toll-Like Receptor 4*. *J Immunol*, 2001. **166**( 4) : p. 2342-2347.
76. Sewankambo, N., et al., *HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis*. *Lancet*, 1997. **23**: p. 546 - 50.
77. Tohill, B.C., et al., *Vaginal flora morphotypic profiles and assessment of bacterial vaginosis in women at risk for HIV infection*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2004. **12**( 3-4) : p. 121-6.
78. Sha, Beverly E., et al., *Female Genital Tract HIV Load Correlates Inversely with Lactobacillus Species but Positively with Bacterial Vaginosis and Mycoplasma hominis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005. **191**( 1) : p. 25-32.
79. Zariffard, M.R., et al., *Induction of tumor necrosis factor- alpha secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis*. *J Infect Dis*, 2005. **191**( 11) : p. 1913-21.
80. Macones, G.A., et al., *A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004. **190**( 6) : p. 1504-1508.

81. Larsson, P.G., et al., *Bacterial vaginosis. Transmission, role in genital tract infection and pregnancy outcome: an enigma*. *Apmis*, 2005. **113**( 4) : p. 233-45.
82. Mares, D., et al., *TLR2-mediated cell stimulation in bacterial vaginosis*. *J Reprod Immunol*, 2007.
83. Cherpes, T.L., et al., *Hormonal contraceptive use modulates the local inflammatory response to bacterial vaginosis*. *Sex Transm Infect*, 2008. **84**( 1) : p. 57-61.
84. Genç, M.R., et al., *TNFA-308G>A polymorphism influences the TNF-[alpha] response to altered vaginal flora*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2007. **134**( 2) : p. 188-191.
85. Zou, G., Tam, YK., *Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances*. *European Cytokine Network*, 2002. **Volume 13**( Number 2,) : p. 186-99.
86. St. John, E.P., et al., *Dendritic cell activation and maturation induced by mucosal fluid from women with bacterial vaginosis*. *Clinical Immunology*, 2007. **125**( 1) : p. 95-102.
87. Ebner, S., et al., *A Novel Role for IL-3: Human Monocytes Cultured in the Presence of IL-3 and IL-4 Differentiate into Dendritic Cells That Produce Less IL-12 and Shift Th Cell Responses Toward a Th2 Cytokine Pattern*. *J Immunol*, 2002. **168**( 12) : p. 6199-6207.
88. Marcinkiewicz, J., *Cell-mediated immunity: role of IL-3 and IL-6 in the regulation of contact sensitivity reaction*. *Folia Histochem Cytobiol*, 1990. **28**( 3) : p. 107-19.
89. Cutolo, M., et al., *Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity*. *Lupus*, 2004. **13**: p. 635-638.

## 7. Anhang

### 7.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Standardreihen durch Verdünnung .....	25
Tabelle 2	Beispiel für das Fenster zur Dateneingabe in SPSS .....	27
Tabelle 3	IL-1 $\alpha$ Werte der beiden Gruppen .....	32
Tabelle 4	IL-1 $\beta$ Werte der beiden Gruppen .....	34
Tabelle 5	IL-2 Werte der beiden Gruppen .....	36
Tabelle 6	IL-3 Werte der beiden Gruppen .....	38
Tabelle 7	TNF- $\alpha$ Werte der beiden Gruppen .....	40
Tabelle 8	Amintestanalyse.....	42
Tabelle 9	Analyse der vaginalen ph-Werte .....	42
Tabelle 10	Analyse der Alterswerte .....	44

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Eigene Darstellung der diskutierten möglichen Pathogenese.....	5
Abbildung 2	Mikroskopische Darstellung der "clue cells" .....	7
Abbildung 3	Spezifische Immunantwort.....	10
Abbildung 4	IL-3 und die Differenzierung von immunologischen Zellen .....	16
Abbildung 5	Allgemeine Darstellung des Essays.....	23
Abbildung 6	Relation zwischen Zytokinkonzentration und der optischen Dichte	28
Abbildung 7	Konzentration des Zytokins Interleukin-1 $\alpha$ .....	33
Abbildung 8	Konzentration des Zytokins Interleukin-1 $\beta$ .....	35
Abbildung 9	Konzentration des Zytokins Interleukin-2 .....	37
Abbildung 10	Konzentration des Zytokins Interleukin-3 .....	39
Abbildung 11	Konzentration des Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ .....	41
Abbildung 12	vaginale pH-Werte in den jeweiligen Gruppen.....	43
Abbildung 13	Alter der Frauen in den jeweiligen Gruppen.....	45

## **8. Danksagung**

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

Herrn Prof. Dr. H. Spitzbart danke ich für die fachliche Beratung auf dem Gebiet der gynäkologischen Infektiologie, insbesondere der bakteriellen Vaginose.

Für die konstruktive und anspornende Kritik in der Endphase meiner Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. T. Weissenbacher.

Außerdem danke ich Herrn Michael Scholz (ehemals Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der TU München/Klinikum Rechts der Isar) für seine Hilfe und kompetente Unterstützung bei statistischen Fragen.

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