

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Campus Innenstadt –
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Frieze

**Zytokinbestimmung im Verlauf der Schwangerschaft und deren Bedeutung bei
intrauterinen Infektionen - Konzentrationsbestimmung der Zytokine Interleukin-6, In-
terleukin-15, pro-Interleukin-1 β und CXCL10/IP-10 im Fruchtwasser**

Dissertation

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

vorgelegt von

Florian Matthias Maximilian Stumpfe
aus Starnberg

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Ulrich Seybold Priv. Doz. Dr. Bianca Schaub
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. Tobias Weissenbacher
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	20.03.2014

Meiner Oma und Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	6
1.1	Frühgeburtlichkeit.....	6
1.1.1	Risikofaktoren der Frühgeburtlichkeit	6
1.1.2	Pathophysiologie der Frühgeburtlichkeit	7
	Amnioninfektionssyndrom	8
1.2	8
1.2.1	Definition.....	8
1.2.2	Theorie zur Entstehung des Amnioninfektionssyndroms	8
1.2.3	Amnioninfektionssyndrom – Gefahren für Mutter und Kind	10
1.3	Diagnostik	11
1.3.1	Klinische Parameter	11
1.3.2	Fruchtwasseruntersuchungen – Ansätze	11
1.3.3	Zytokindiagnostik.....	12
1.4	Fragestellung.....	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Geräte	18
2.2	Material	20
2.3	Studiendesign.....	21
2.4	Patientinnen	21
2.4.1	Amniozentesen	23
2.4.2	Sectiones.....	25
2.4.3	Spontangeburt.....	26
2.4.4	Amnioninfektionssyndrome	26
2.5	Probengewinnung	27
2.5.1	Amniozentesen	27
2.5.2	Sectiones.....	28
2.5.3	Spontangeburt.....	28
2.5.4	Amnioninfektionssyndrome	28
2.6	Methoden	28
2.6.1	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	28
2.6.2	Vorbereitung der Proben	29
2.6.3	Reagenzien	30
2.6.4	Herstellung der Standardverdünnungsreihen	31
2.6.5	Waschlösung	33
2.6.6	Substratlösungen	33
2.6.7	Verdünnung der Fruchtwasserproben	33
2.6.8	Durchführung ELISA IL-6, IL-15, pro-IL-1 β und CXCL10/IP-10	33
2.6.9	Auswertung	36
2.7	Statistik.....	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Zytokinkonzentrationen	37
3.1.1	Interleukin-6	37
3.1.2	Interleukin-15	38
3.1.3	Pro-IL-1 β	39
3.1.4	CXCL10/IP-10	40
3.2	ROC-Kurven.....	41
3.2.1	Interleukin-6	41
3.2.2	Interleukin-15	42
3.2.3	Pro-IL-1 β	42

3.2.4	CXCL10/IP-10	43
3.3	Zytokinexpression im Verlauf der Schwangerschaft	44
3.3.1	Interleukin-6	45
3.3.2	Interleukin-15	46
3.3.3	Interleukin-1 β	47
3.3.4	CXCL10/IP-10	48
3.4	Korrelation der Zytokinkonzentrationen in Abhängigkeit des fetalen Geschlechts	49
3.4.1	Interleukin-6	49
3.4.2	Interleukin-15	49
3.4.3	Interleukin-1 β	49
3.4.4	CXCL10/IP-10	49
3.5	Korrelation der Zytokinkonzentration in Abhängigkeit des Alters der Mutter	50
3.5.1	Interleukin-6	50
3.5.2	Interleukin-15	50
3.5.3	IL-1 β	50
3.5.4	CXCL10/IP-10	50
3.6	C-reaktives Protein und Leukozyten	51
3.6.1	C-reaktives Protein	52
3.6.2	Leukozyten	53
4	Diskussion	54
4.1	Zytokinexpression im Schwangerschaftsverlauf	54
4.2	Interleukine als Infektionsmarker?	59
4.3	Ausblick	65
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	67
7	Anhang	77
7.1	Abkürzungsverzeichnis	77
7.2	Abbildungsverzeichnis	79
7.3	Tabellenverzeichnis	81
7.4	Danksagung	82
7.5	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
7.6	Selbstständigkeitserklärung	83
7.7	Eidesstaatliche Versicherung	84

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Frühgeburtlichkeit

Unter einer „Frühgeburt“ versteht man die Beendigung einer Schwangerschaft vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (Goldenberg et al., 2008).

Bis heute zählt die Frühgeburtlichkeit zu einem der bestimmenden Probleme der Perinatalmedizin. In Europa liegt die Frühgeburtsrate bei ca. 5-9%, in den USA beträgt sie ca. 12-13% (Goldenberg et al., 2008). Trotz intensiver Forschung und gezielten Präventionsprogrammen konnte sie in den entwickelten Ländern nicht gesenkt werden. Im Gegenteil – im Jahr 2005 stieg die Frühgeburtsrate in den USA gegenüber 1981 von 9,5% auf 12,7% (Goldenberg et al., 1998). Auch in Deutschland ist in den letzten 10 Jahren ein leichter Anstieg zu verzeichnen (EU_Benchmarking_report, 2010). Die wirtschaftlichen Folgen durch die klinische Versorgung von Frühgeborenen sind immens. So entfallen ungefähr die Hälfte der Kosten für die Hospitalisierung von Säuglingen und ca. ein Viertel der pädiatrischen Kosten auf frühgeborene Kinder (Russell et al., 2007). Man schätzt die Ausgaben für Krankenhausaufenthalte bei Frühgeborenen während den ersten 10 Lebensjahren etwa doppelt so hoch wie bei Kindern, die termingerecht geboren wurden (Petrou, 2005). Die hierdurch entstehenden Gesamtkosten in Deutschland belaufen sich pro Jahr auf über eine Milliarde Euro (Frieze, 2003). In den USA beliefen sich die Kosten im Jahr 2001 auf 5,8 Milliarden US-Dollar. Dies entsprach 27% aller Ausgaben pädiatrischer Krankenhausaufenthalte (Russell et al., 2007).

1.1.1 Risikofaktoren der Frühgeburtlichkeit

Aufgrund der Komplikationen und der ökonomischen Folgen wurden die Pathophysiologie und Risikofaktoren für eine Frühgeburtlichkeit intensiv untersucht.

Dabei hat man verschiedene Ursachen herausgefunden: Frühgeburtlichkeit kann Folge vorzeitiger Wehentätigkeit, eines frühen vorzeitigen Blasensprungs oder aber ärztlicher Indikationsstellung sein. Berkowitz et al. untersuchten in einer Studie 31107 schwangere Patientinnen, von denen 3176 Patientinnen (10,1%) eine Frühgeburt hatten. In 1335 (42,0%) Fällen war die Ursache ein früher vorzeitiger Blasensprung, bei 1215 (38,3%) Patientinnen kam es zu vorzeitiger Wehentätigkeit und in 626 (19,7%) Fällen waren ärztliche Indikationsstellungen ausschlaggebend (Berkowitz et al., 1998). Dies verdeutlicht, welche Rolle die durch ärztliches

Handeln verursachte Frühgeburtslichkeit spielt. Die Entscheidung über Notwendigkeit einer frühzeitigen Entbindung sollte kritisch und sorgfältig geprüft werden.

Prädisponiert für eine Frühgeburt sind zudem Patientinnen mit sehr niedrigem oder hohem Alter (Martin et al., 2007), niedrigem sozioökonomischen Status (Smith et al., 2007), Patientinnen mit Mehrlingsgravidität (Kiely, 1998) und Patientinnen mit Frühgeburten bei vorausgegangenen Schwangerschaften (Esplin et al., 2008; Swamy et al., 2008).

Als mögliche pathogenetische Faktoren in der Entstehung der vorzeitigen Wehentätigkeit kommen sowohl Plazentationsstörungen, Uteruspathologien, mütterliche Erkrankungen als auch fetale Ursachen in Betracht.

Der bedeutendste Risikofaktor für die Entwicklung eines vorzeitigen Blasensprungs und vorzeitiger Wehentätigkeit scheint aber die ascendierende Genitalinfektion zu sein (Kimberlin et al., 1998; Romero et al., 2004; EU_Benchmarking_report, 2010). Hierauf soll im nächsten Abschnitt detaillierter eingegangen werden.

1.1.2 Pathophysiologie der Frühgeburtslichkeit

Einige Arbeitsgruppen haben sich mit dem pathogenetischen Geschehen beschäftigt, das zwischen der bakteriellen Besiedelung und der letztendlich resultierenden Frühgeburt liegt. Es wurde klar, dass eine Reihe von molekularbiologischen und biochemischen Vorgängen an der Zervix, der Dezidua und an den Eihäuten der Auslöser von Wehentätigkeit und der zervikalen Reifung sind.

Durch eine „bakterielle Besiedelung der Vagina mit pathogenetisch relevanten Mikroorganismen“ (Büscher, 2000) und folglich verändertem Milieu der Scheide kommt es zu einer bakteriellen Vaginose. Aufgrund des veränderten pH-Wert können sich pathogene, vorwiegend anaerobe Keime vermehren und in Richtung des choriodezidualen Raum ascendieren (Büscher, 2000).

Bei der Auslösung der Wehentätigkeit spielen unter anderem Zytokine eine wichtige Rolle. Zytokine sind regulatorische Peptide, die innerhalb eines sehr komplexen Netzwerks zusammenspielen und von verschiedenen Zellen freigesetzt werden.

Im Rahmen der ascendierenden Infektion setzen aktivierte Makrophagen die Zytokine IL-1 und TNF- α frei, die zusammen mit von Bakterien freigesetztem Endotoxin an Dezidua-, Chorion- und Amnionzellen zur vermehrten Freisetzung von Prostaglandinen, Corticotropin-releasing Hormon (CRH) und Endothelin (Casey et al., 1989; Romero et al., 1989; Romero et

al., 1989; Holst et al., 2008) führen.

Prostaglandine und Endothelin induzieren am Myometrium die Wehentätigkeit. CRH verstärkt die Wehentätigkeit noch einmal über die parakrine Induktion der Sekretion von weiteren Prostaglandinen über die Plazenta. Weiterhin induzieren IL-1 und TNF- α die Freisetzung von IL-6 aus Chorion- und Deziduazellen, wobei IL-6 ebenfalls parakrin eine Freisetzung von Endothelin und Prostaglandin aus der Plazenta bewirkt (Dudley et al., 1992).

1.2 Amnioninfektionssyndrom

1.2.1 Definition

Unter einem Amnioninfektionssyndrom (AIS) versteht man alle prä- und subpartal auftretenden Infektionen der Eihäute, des Fruchtwassers, der Plazenta und auch des Kindes zusammengefasst (Briese, 1999; Roche, 2006).

1.2.2 Theorie zur Entstehung des Amnioninfektionssyndroms

Im Jahre 1988 schlugen Romero et al. ein 4-Stadien-Modell (Abbildung 1) vor, bei dem eine intrauterine Infektion aus einer anfänglich bakteriellen Besiedelung der Scheide hervorgeht (Romero et al., 1988). Wichtig zu erwähnen ist allerdings, dass nicht jede bakterielle Besiedelung zu einer intrauterinen Infektion führen muss. Das im Folgenden beschriebene Modell geht jedoch von der Entwicklung solch einer intrauterinen Infektion aus.

Die erste Stufe (Stadium I) ist die bakterielle Besiedelung der Vagina mit pathogenetisch bedeutsamen Keimen wie *Ureaplasma urealyticum*, *Fusobacterium spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides*, *Mobiluncus spp.*, und *Mycoplasma hominis* u.a. (Romero et al., 2003). Nach vorzeitigem Blasensprung und Eröffnung der Zervix durch die oben beschriebenen Vorgänge können Bakterien die Dezidua erreichen (Stadium II). Eine Besiedelung der fetalen Gefäße führt zur Choriovaskulitis, eine Besiedelung des Amnions zu einer Amnionitis. Stadium III ist erreicht, wenn die Erreger Chorion und Amnion überwinden und die Amnionhöhle besiedeln. Im Stadium IV kommt es zum direkten Kontakt der Bakterien mit dem Feten oder zur Aspiration des bakteriell besiedelten Fruchtwassers mit der Folge einer kongenitalen Pneumonie.

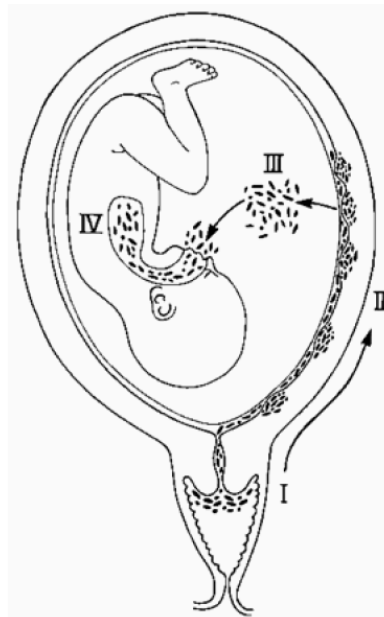


Abbildung 1 4-Stadien-Modell der intrauterinen Infektion nach Romero et. al (Romero et al., 2003)

In seltenen Fällen kann es auch bei intakter Fruchtblase zur Infektion des Fruchtwassers kommen. Hier sind vor allem Streptokokken der Gruppe B beteiligt. In der Folge kommt es durch die endogene Prostaglandinsynthese zur sekundären Reifung der Zervix, Wehenbeginn und vorzeitigem Blasensprung (Briese, 1999). Sehr selten kann sich ein Amnioninfektionssyndrom aus einer hämatogenen und lymphogenen Ausbreitung eines extragenitalen infektiösen und eitrigen Geschehens entwickeln (Briese, 1999). Speziell für eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* ist eine transplazentare hämatogene Streuung bei mütterlicher Bakteriämie beschrieben worden (Silver, 1998). Auch durch eine Amniozentese kann es zu bakterieller Keimverschleppung mit Folge einer Amnioninfektion kommen (Romero et al., 2007).

Das Modell beschreibt die Vorgänge nur sehr schematisch und oberflächlich. Dabei werden die Zytokine als wichtige Mediatoren dieses Vorganges nicht berücksichtigt. Tatsächlich ist dieses Geschehen viel komplexer anzusehen und zum heutigen Zeitpunkt noch nicht gänzlich verstanden.

1.2.3 Amnioninfektionssyndrom – Gefahren für Mutter und Kind

Die Infektion der Amnionhöhle birgt große Gefahren für die Mutter und den Feten. Intrapartal sehr gefürchtet ist die mütterliche Gefährdung durch eine disseminierte intravasale Gerinnungsstörung. Neben einer Puerperalinfektion im frühen Wochenbett oder unter der Geburt kann eine weitere Ausbreitung der Infektion zu Endometritis, Endomyometritis, Adnexitis puerperalis, Pelveoperitonitis und einer Sepsis führen.

Auch die Gefahren für das Kind sind nicht zu vernachlässigen. Innerhalb der ersten 5 Tage post partum kann es zu einer „early onset infection“ mit Ausbildung einer Pneumonie, Otitis, Gastroenteritis oder gar einer Meningitis kommen. Eine kindliche Sepsis kann sich durch verschiedene unspezifische Prodromalzeichen andeuten. Hierunter fallen Fieber, Hypotonie, Trinkschwäche, Irritabilität, Tremor, Hypotonie, grau-blasses Aussehen und Zyanose (Driggers et al., 1985; Briese, 1999). Ein geeigneter Prognosefaktor stellt hierbei das Ausmaß eines eventuell auftretenden FIRS (fetal inflammatory response syndrome) dar (Gomez et al., 1998).

Die langfristigen Folgen durch eine intrauterine Infektion stellen zusätzlich ein sehr ernstzunehmendes Problem dar und wurden in den letzten Jahren verstärkt erforscht. Dabei steht die pulmonale und zerebrale Problematik im Vordergrund. Experimentelle Studien belegen eine neurozytotoxische Wirkung bakterieller Mediatoren und inflammatorischen Zytokine, insbesondere TNF- α (Garnier, 2004). Es hat sich gezeigt, dass perinatale Hirnschäden die Hauptursache für die Entwicklung chronischer neurologischer Krankheitsbilder im Erwachsenenalter sind (Berger et al., 1999). Kinder, die intrauterin einer entzündlichen Reaktion ausgesetzt waren, haben ein 11-fach erhöhtes Risiko, eine periventrikuläre Leukomalazie zu entwickeln. Bedingt ist dies durch die erhöhte Anfälligkeit des unreifen fetalen Gehirns gegenüber intrauterinen Sauerstoffmangelzuständen (Leviton et al., 1999). Diese Anfälligkeit wird durch eine gleichzeitig stattfindende Infektion noch verstärkt (Zupan et al., 1996; Eklind et al., 2001). Experimentell konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Prozesse zur einer Störung der Markscheidenreifung führen, welche heute als eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer periventrikulären Malazie diskutiert wird (Dammann et al., 2002).

1.3 Diagnostik

1.3.1 Klinische Parameter

Im Alltag bedient man sich einer Fülle an klinischen Parametern, um eine intrauterine Infektion zu diagnostizieren. Kennzeichnend sind neben einem druckschmerzhaften Uterus mütterliches Fieber $>38^{\circ}\text{C}$, mütterliche Tachykardie, ein erhöhter CRP-Wert über 10 mg/l sowie der Abgang fötiden Fruchtwassers. Oftmals liegt eine Leukozytose mit Linksverschiebung vor. Vorzeitige Wehentätigkeit oder vorzeitiger Blasensprung treten in den allermeisten Fällen als erste Symptome auf. Mithilfe des Kardiotokogramms (CTG) lässt sich der Zustand des Feten objektivieren. Eine persistierende fetale Tachykardie über 150 Schläge pro Minute ist charakteristisch für das Vorliegen eines Amnioninfektionssyndroms und kann die Folge einer erhöhten mütterlichen Temperatur oder Anzeichen einer fetalen Infektion sein (Briese, 1999).

1.3.2 Fruchtwasseruntersuchungen – Ansätze

Aufgrund der begrenzten Aussagekraft der oben genannten klinischen Parameter wurde in der Vergangenheit ein stärkerer Fokus auf die Amniozentese zur Diagnostik einer intrauterinen Infektion mittels verschiedener Marker gelegt. Auf der Suche nach sensitiven und spezifischen Markern wurde u.a. die Gramfärbung untersucht. Hier zeigte sich aber neben einer geringen Sensitivität von 45% auch der Nachteil, dass eine bakteriologische Kultur 2-3 Tage dauert, bis sie ausgewertet werden kann (Tita et al., 2010). Das ist in der akuten Situation nicht schnell genug.

Dildy et al. zeigten, dass Fruchtwasserkulturen aufgrund des antibakteriellen Milieus des Fruchtwassers negativ ausfallen können (Bratlid et al., 1978; Dildy et al., 1994). Sie vergleichen in ihrer Arbeit die Sensitivität der Gramfärbung gegen die Glukosekonzentration im Fruchtwasser hinsichtlich der Diagnostik einer intrauterinen Infektion. Sie konnten zeigen, dass die Spezifität für die Diagnostik einer Chorioamnionitis mit einem Cut-off von 15 mg/dl bei 73,3% und damit über der der Gramfärbung (45%) liegt. Der prädiktive Wert beträgt 68,8%. Trotz des Nachteils, dass Glukosewerte im Fruchtwasser durch maternalen Diabetes oder Wachstumsretardierung des Kindes verändert sein können, ist die Bestimmung der Glukosekonzentration - neben der Bestimmung von Interleukin-6 im Fruchtwasser - bis heute die einzige etablierte Methode zur invasiven Diagnostik einer Infektion in utero.

1.3.3 Zytokindiagnostik

Die vorhandenen klinischen Parametern zur Diagnostik einer intrauterinen Infektion stellen den Kliniker vor große Probleme, da sie weder ausreichend spezifisch, noch sensitiv genug sind, um tatsächlich eine Infektion in utero und somit Gefährdung für Mutter und Kind zu diagnostizieren (Romero et al., 2006). Eine Aussage über die tatsächliche Situation in utero lässt sich so oftmals nicht zuverlässig treffen. Der Fokus ist nicht zwingend auf den Uterus beschränkt - mütterliches Fieber, Tachykardie oder ein erhöhter CRP-Wert müssen nicht zwangsläufig durch ein Amnioninfektionssyndrom bedingt sein.

Folglich erlauben die klinischen Möglichkeiten der Diagnostik eines Amnioninfektionssyndroms keinen sicheren Rückschluss auf eine Infektion in utero und in deren Folge auf eine Gefährdung des Feten. Auch die Tatsache, dass der Großteil der Infektionen subklinisch verläuft und es gar nicht oder sehr spät zur Ausbildung klinischer Symptome kommt, macht die frühe Diagnosestellung um einiges komplizierter (Monga et al., 1995). Umso mehr ist die Kenntnis von sensitiven und spezifischen Infektionsmarkern von großer Relevanz. Auf der Suche nach diagnostischen Markern sind in den letzten Jahren Zytokine als Biomarker in den Vordergrund gerückt. Mittlerweile ist die Tatsache, dass es zur erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine während eines Entzündungsgeschehens in utero kommt, unbestritten.

1.3.3.1 Zytokine und das Immunsystem

Bei Zytokinen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 8-40 kDa (Dinarello, 2000). Zytokine üben eine wichtige Rolle als Mediatoren der Immunantwort aus.

Membrangebundene Zytokine ermöglichen den Kontakt zwischen benachbarten Zellen. Der Informationsaustausch entfernter Zellen im gleichen Gewebe wird über die Sekretion löslicher Zytokine möglich gemacht. Auch die Kommunikation verschiedener Gewebezellen wird durch Interleukine ermöglicht. Je nachdem, ob ein Zytokin an der Verstärkung einer Immunantwort beteiligt ist, oder einer Immunantwort entgegenwirkt, unterscheidet man proinflammatorische von anti-inflammatorischen Zytokinen.

Geläufiger ist die Einteilung in TH1-, TH2- und auch TH17-Zytokine. Ursprung dieser Unterteilung ist im Allgemeinen eine naive T-Zelle, die durch antigenpräsentierende Zellen (APC)

zur T-Helferzelle (T_H) differenziert. TH-1-Zellen produzieren hauptsächlich IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ und TNF- α und fördern die zelluläre Immunität, wohingegen TH-2-Zellen für die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und GM-CSF verantwortlich gemacht werden und die humorale Immunität zu vertreten scheinen (Belardelli, 1995; Raghupathy, 1997). Mittlerweile gibt es neben TH-1 und TH-2-Zytokinen auch die Gruppe der TH17-Zytokine. Diese neuere Subpopulation wird gefördert durch die Anwesenheit von TGF- β und IL-6 und zeichnet sich durch die Produktion von IL-17 und IL-22 aus. TH17-Zellen werden für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht (Marwaha et al., 2012).

In der folgenden Betrachtung der in dieser Arbeit untersuchten Interleukine soll auf deren jeweilige Funktion innerhalb der Immunantwort eingegangen werden. Die bisherigen Ergebnisse in in-vitro-Untersuchungen geben einen guten Überblick über die Funktion, können allerdings nicht uneingeschränkt auf die in-vivo-Funktion übertragen werden.

1.3.3.2 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 als Teil der TH2-Immunität gehört zur Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine und wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Fibroblasten freigesetzt. Wichtiger Bildungsort in der feto-maternalen Einheit sind die Endothelzellen der Plazenta sowie Deziduazellen nach dem Kontakt des fetalen Organismus mit Lipopolysaccharid (LPS) (Fortunato et al., 1996; Figueroa-Damian et al., 1999).

Über IL-6 werden die Hepatozyten der fetalen Leber zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen angeregt, u.a. C-reaktives Protein.

1.3.3.3 Interleukin-15 (IL-15)

IL-15 spielt als inflammatorisches TH1-Zytokin eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen. Nach mikrobieller Stimulation wird es von Monozyten und dendritischen Zellen produziert. Dendritische Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und der Schlüssel bei der Initiierung der T-Zell-gebundenen Immunantwort. Einmal von einem Antigen aktiviert, migrieren sie in die sekundären Lymphorgane und aktivieren naive T-Zellen über die Präsentation des Antigens. Die Produktion von IL-15 durch Monozyten ist für die Synthese von INF- γ durch NK-Zellen essentiell (Mattei et al., 2001). Durch IL-15 und andere Zytokine werden NK- und T-Zellen zur Produktion von INF- γ angeregt (Carson et al., 1994; Yoshikai et al., 2000). Weiterhin bewirkt IL-15 die Förderung der Entwicklung von B-Zellen. Die Verstärkung der Expression von TNF- α , IL-1 β und inflammatorischen Chemokinen ist ebenfalls eine wichtige Funktion von IL-15.

1.3.3.4 Pro-IL1 β

Das TH1-Zytokin IL-1 β entsteht aus dem Vorläufermolekül pro-IL-1 β , das im Zytosol lokalisiert ist. Eine Cystein-Protease, IL-1 β Converting Enzyme, spaltet einen Teil des Moleküls ab, wodurch IL-1 β in seine aktivierte Form überführt wird und über die Zellmembran das Zytosol verlassen kann. Innerhalb der feto-maternalen Einheit wird IL-1 β von Zellen der Dezidua und der Plazenta produziert (Romero et al., 1989). Neben der Dezidua sind die Hauptproduzenten im Rahmen einer Immunantwort während einer Chorionamnionitis Makrophagen und Neutrophile. Bei Schwangeren konnten im Vergleich zu Nicht-Schwangeren signifikant höhere IL-1 β -Spiegel im Serum nachgewiesen werden (Kauma et al., 1990). IL-1 β ermöglicht die Translokation der zytosolischen Phospholipase A2 an die Membran - das kann zur Auslösung vorzeitiger Wehentätigkeit führen (Xue et al., 1995). Weiterhin hemmt IL-1 β zusammen mit LPS die Aktivität der 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase, welches eines der wichtigsten Enzyme zur Inaktivierung von Prostaglandinen darstellt. Hierunter wird die Prostaglandinwirkung verstärkt (Brown et al., 1998).

1.3.3.5 CXCL10/IP-10

CXL10 als Bestandteil der CXC-Zytokinfamilie ist ein Zytokin aus der Gruppe der Chemokine. Es wird nach Kontakt mit Interferon- γ von Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen und in geringem Maße auch von Endothelzellen produziert (Sauty et al., 1999). Allerdings ist für die Ausschüttung ein paralleler Kontakt mit LPS oder TNF α nötig. Wegen der Induktion durch Interferon-gamma wird CXCL10 auch als „Interferon-inducible Protein-10“ bezeichnet. Interferon-gamma wird von T-Zellen gebildet. Ein erhöhter IP-10-Spiegel ist somit ein ausgezeichneter Marker, um die Aktivität von T-Lymphozyten zu bestimmen. Auf Neutrophile hat IP-10 keine Wirkung (Dewald et al., 1992).

1.4 Fragestellung

Infektionen sind die Hauptursache für die Entwicklung vorzeitiger Wehentätigkeit mit nachfolgender Frühgeburtslichkeit (El-Bastawissi et al., 2000). Durch eine ascendierende Infektion kann sich eine intrauterine Infektion ausbilden, welche einen akuten Gefahrenzustand für Mutter und Kind darstellt. Eine frühzeitige Diagnose ist anhand klinischer Zeichen und laborchemischer Parameter wie CRP nicht immer sicher möglich. Die Parameter sind zu unspezifisch und bei subklinischen Infektionen nicht vorhanden. Bei der Verdachtsdiagnose „Amnioninfektionssyndrom“ ist laut Empfehlungen die sofortige Entbindung zu veranlassen, um die Risiken für Mutter und Kind möglichst gering zu halten. Eine frühzeitige Diagnostik ist deshalb überaus wichtig. Da es bisher nicht möglich ist, ein Amnioninfektionssyndrom sicher auszuschließen, wird schon bei klinischem Verdacht und steigenden Infektparametern eine vorzeitige Schwangerschaftsbeendigung durchgeführt. Berücksichtigt werden hier besonders maternales Fieber, fetale Tachykardie, Wehentätigkeit und ansteigenden CRP - Serumkonzentrationen unter Antibiose. Durch die vorzeitige Schwangerschaftsbeendigung lassen sich zwar mögliche infektionsbedingte Gefahren für Mutter und Kind reduzieren, doch sind die Patienten häufig mit den Folgen einer Frühgeburt konfrontiert. Eine möglichst spezifische und sensitive Diagnostik hätte also den Vorteil, die Rate an durch den Geburtshelfer verursachten Frühgeburtslichkeit und die Morbidität für Mutter und Kind zu senken.

Es gibt Hinweise, dass Biomarkerkombinationen, als auch andere Zytokine als IL-6 für die Diagnostik inflammatorischer Prozesse im Uterus von Bedeutung sind. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Zytokine IL-6, IL-15, pro-IL-1 β und CXCL10/IP-10 auf ihren prädiktiven Wert bezüglich der Aussage, ob eine Infektion vorliegt oder nicht, zu untersuchen und mit den Daten in der Literatur zu vergleichen.

Folgende Fragestellungen ergaben sich für unsere Arbeit:

1. Inwiefern eignen sich die untersuchten Zytokine als Marker einer intrauterinen Infektion? Gibt es signifikante Konzentrationsunterschiede der Zytokine IL-6, IL-15, IL-1 β und CXCL10/IP-10 im Fruchtwasser von Patientinnen mit klinischer Symptomatik eines Amnioninfektionssyndroms verglichen mit Patienten ohne Vorliegen einer intrauterinen Infektion?
2. Lassen sich signifikante Konzentrationsunterschiede der Zytokine IL-6, IL-15, IL-1 β und CXCL10/IP-10 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft nachweisen?
3. Hat das Alter der Mutter einen Einfluss auf die Zytokinkonzentration?
4. Wie wirkt sich das Geschlecht des Kindes auf die Zytokinexpression aus? Bestehen signifikante Konzentrationsunterschiede bei weiblichen Feten im Vergleich zu männlichen?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Produkt	Bezugsquelle
Einkanal-Pipette „Research“ 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einkanal-Pipette „Research“ 10 - 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einkanal-Pipette „Research“ 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISA-Reader „Microplate Reader MRX II“	Dynex Technologies, Chantilly, USA
ELISA-Auswertungsprogramm „Revelation“, Version 4.22	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Eisherstellungsmaschine „AF 80“	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Eisschrank (-32°C) „Premium NoFrost“	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Eisschrank (-80°C) „Forma 900 Series“	Thermo Fisher Scientific, 81 Wyman Street, Waltham, MA 02454, USA
Glasbehälter 500 ml	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Kühlkammer (7°C)	Kajetan Hierhammer, München, Deutschland
Kühlschrank „Cooler“	Siemens AG, München, Deutschland
Mehrkanal-Pipette „Research“, 8fach, 30 – 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanal-Pipettier-Reservoir	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroküvetten „SafeLock Tubes“, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroküvetten „SafeLock Tubes“, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen „epT.I.P.S. Filter“ 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen „epT.I.P.S. Filter“ 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen „epT.I.P.S. Filter“ 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen „epT.I.P.S. Dualfilter“ 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe „Easypet“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfen-Einsatz „serological pipet“	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen „Blue Max Conical Tube“ 15 ml	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Polypropylen-Röhrchen „Blue Max Conical Tube“ 50 ml	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Reaktionsgefäßständer „Tube Rack“	Microtest Laboratories, Agawam, USA
Rüttler „Varishaker“	Dynatech, Guernsey, Großbritannien
Styropor-Halter für Mikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vortexgerät „Genie II“	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasser, vollentsalzt	Apotheke Innenstadt, Pettenkoferstraße, München
Zentrifuge „MiniSpin“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2 Material

Die zur Zytokinbestimmung nötigen ELISA-Kits bezogen wir von der Firma R&D Systems, Inc. in Minneapolis, USA.

ELISA-Kits	Bezugsquelle
Quantikine® Human CXCL10/IP-10 Immunoassay <i>Catalog Number: DIP100</i>	R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN 55413, USA
Quantikine® Human IL-6 Immunoassay <i>Catalog Number: D6050</i>	R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN 55413, USA
Quantikine® Human IL-15 Immunoassay <i>Catalog Number: D1500</i>	R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN 55413, USA
Quantikine® Human pro-IL-1 β Immunoassay <i>Catalog Number: DLBP00</i>	R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN 55413, USA

2.3 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive Fall-Kontroll-Studie, bei der die Konzentrationen verschiedener Zytokine während der Schwangerschaft untersucht wurden.

Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

2.4 Patientinnen

Im Zeitraum zwischen 2008 und 2010 wurden 215 schwangere Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München einbezogen. Das zu untersuchende Fruchtwasser gewannen wir entweder während der Geburt oder durch Amniozentese im Rahmen einer klinischen Untersuchung. Alle Patientinnen wurden in einem ausführlichen Gespräch über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis vor Aufnahme in unsere Studie. Ein entsprechendes Ethikvotum wurde erteilt.

Je nach Modus der Fruchtwasserentnahme teilten wir die Patientinnen in vier verschiedene Studiengruppen ein. Fruchtwasser, das im Rahmen einer Amniozentese gewonnen wurde, teilten wir der Gruppe „Amniozentesen“ zu. Während der Geburt entnommene Fruchtwasserproben teilten wir je nach Geburtsmodus den Gruppen „Spontangeburt“ – im Rahmen einer Spontangeburt durch Amniotomie - oder „Sectiones“ – im Rahmen einer operativen Entbindung - zu. Die vierte Gruppe wurde gebildet aus Fruchtwasserproben, die wir im Rahmen einer Amniozentese bei Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom erhielten. Eine Aufstellung der Patientenzahlen innerhalb der Gruppen sowie die deskriptive Statistik zeigt Tabelle 1. Die Spannweite und der Median hinsichtlich der Parität und Gravidität der untersuchten Patientinnen werden in Tabelle 2 dargestellt.

Alle Patientinnen	→	<table><tr><td></td><td>n</td><td>von</td><td>bis</td><td>Mittelwert</td></tr><tr><td>Alter</td><td>215</td><td>19</td><td>48</td><td>34,34</td></tr></table>		n	von	bis	Mittelwert	Alter	215	19	48	34,34
	n	von	bis	Mittelwert								
Alter	215	19	48	34,34								
Amniozentesen	→	<table><tr><td></td><td>n</td><td>von</td><td>bis</td><td>Mittelwert</td></tr><tr><td>Alter</td><td>81</td><td>19</td><td>45</td><td>34,57</td></tr></table>		n	von	bis	Mittelwert	Alter	81	19	45	34,57
	n	von	bis	Mittelwert								
Alter	81	19	45	34,57								
Sectiones	→	<table><tr><td></td><td>n</td><td>von</td><td>bis</td><td>Mittelwert</td></tr><tr><td>Alter</td><td>101</td><td>22</td><td>48</td><td>34,16</td></tr></table>		n	von	bis	Mittelwert	Alter	101	22	48	34,16
	n	von	bis	Mittelwert								
Alter	101	22	48	34,16								
Spontangeburt	→	<table><tr><td></td><td>n</td><td>von</td><td>bis</td><td>Mittelwert</td></tr><tr><td>Alter</td><td>20</td><td>24</td><td>44</td><td>33,65</td></tr></table>		n	von	bis	Mittelwert	Alter	20	24	44	33,65
	n	von	bis	Mittelwert								
Alter	20	24	44	33,65								
Amnioninfektionssyndrome	→	<table><tr><td></td><td>n</td><td>von</td><td>bis</td><td>Mittelwert</td></tr><tr><td>Alter</td><td>13</td><td>26</td><td>47</td><td>35,64</td></tr></table>		n	von	bis	Mittelwert	Alter	13	26	47	35,64
	n	von	bis	Mittelwert								
Alter	13	26	47	35,64								

Tabelle 1 Übersicht über die Patientenzahlen im Gesamten und innerhalb der einzelnen Gruppen





Amniozentesen			n	von	bis	Median
		Gravidität	81	1	7	1
		Parität	81	0	4	1
Sectiones			n	von	bis	Median
		Gravidität	101	1	6	2
		Parität	101	1	4	2
Spontangeburt			n	von	bis	Median
		Gravidität	20	1	7	2
		Parität	20	1	6	1
Amnioninfektionssyndrome			n	von	bis	Median
		Gravidität	13	1	6	2
		Parität	13	1	3	1

Tabelle 2 Übersicht über Gravidität und Parität innerhalb der einzelnen Gruppen

2.4.1 Amniozentesen

In diese Gruppe haben wir 81 Patientinnen eingeschlossen. Diese stellten sich bei uns aus verschiedenen Gründen zur Amniozentese vor. Die Fruchtwasserentnahme erfolgte zwischen der 15. und 31. SSW (Median: 17. SSW). Eine Übersicht über die Häufigkeit der Entnahmepunkte zeigt Abbildung 2. Der genaue Ablauf ist im Kapitel 2.5.1 beschrieben.

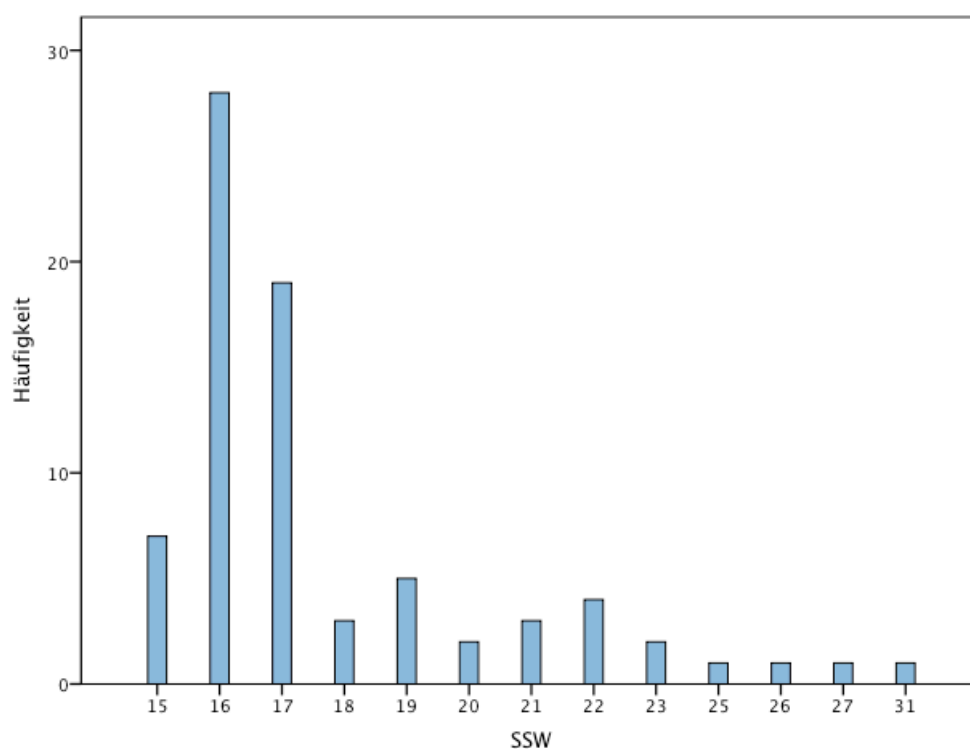


Abbildung 2 Zeitpunkt der Fruchtwasserentnahme per Amniozentese (Häufigkeit in Prozent)

Die Hauptindikation (37% der Fälle) zur Durchführung einer Amniozentese war das Alter der Mutter über 35 Jahre (entsprechend der Mutterschaftsrichtlinien in Deutschland). Weitere Indikationen waren u.a. Amniozentesen aufgrund auffälliger Befunde in der Sonographie (21%) oder die Durchführung einer Amniozentese aus Sorge der Eltern (8,6%). Eine genaue Aufstellung der unterschiedlichen Indikationen zeigt Tabelle 3.

Indikation	Häufigkeit	Prozent
Maternales Alter >35 Jahre	30	37,0
Auffälligkeit in der Sonographie	17	21,0
Unbekannt	12	14,8
Wunsch aus Sorge der Eltern	7	8,6
Auffälligkeiten Biochemie	6	7,4
Auffällige Familienanamnese	3	3,7
Andere Gründe	3	3,7
V.a. Trisomie 21	2	2,5
Toxoplasmoseinfektion	1	1,2
Gesamt	81	100,0

Tabelle 3 Indikationen zur Durchführung einer Amniozentese

2.4.2 Sectiones

In diese Gruppe schlossen wir insgesamt 101 Patientinnen ein. Im Rahmen der operativen Entbindung entnahmen wir das Fruchtwasser (direkt nach Amniotomie). Die Patientinnen waren im Mittel 34 Jahre alt (von 22 bis 48 Jahre). Die Entbindung mit Fruchtwassergewinnung fand zwischen der 27. und 42. SSW statt (Median: 39 SSW) (Abbildung 3). Die Hauptindikation für eine Schnittentbindung war ein schon durchgeführter Kaiserschnitt bei einer früheren Schwangerschaft (Z.n. Sectio) gefolgt von der Indikation bei Beckenendlage (BEL) des Kindes. Weitere Indikationen waren Mehrlingsgravidität, Sectio auf Wunsch der Mutter, pathologisches CTG, Makrosomie des Kindes, Oligohydramnion oder sonstige Gründe. Sekundäre Sectiones wurden aus dem Studienkollektiv ausgeschlossen.

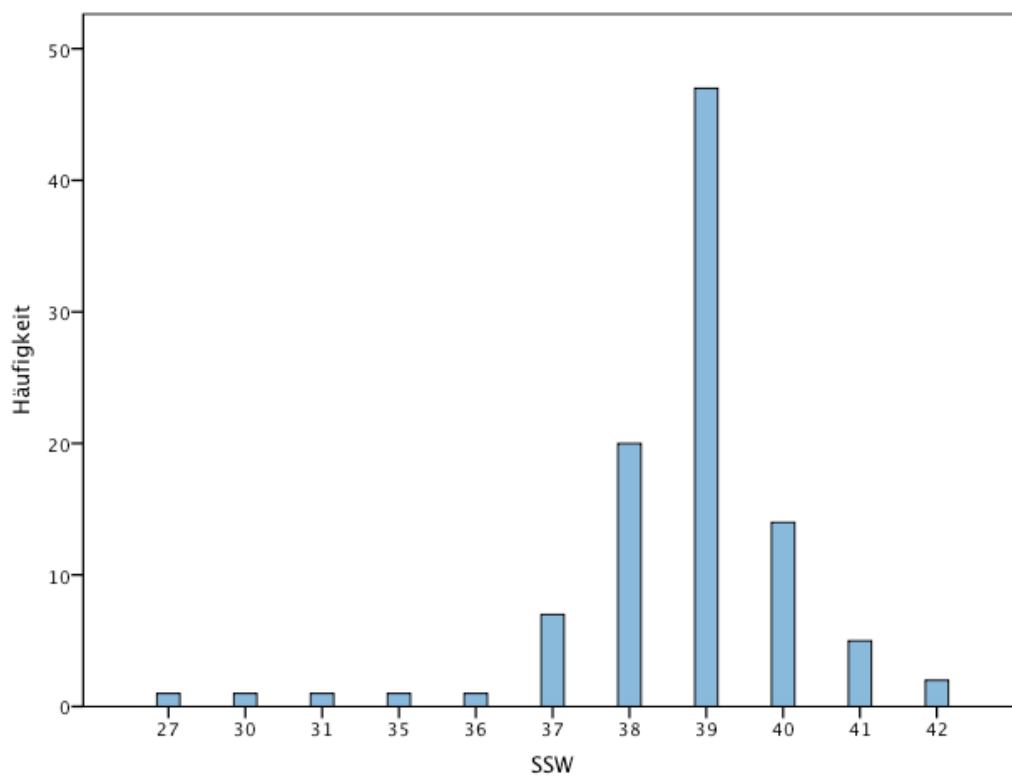


Abbildung 3 Zeitpunkt der Fruchtwasserentnahme per Sectio caesaria

2.4.3 Spontangeburt

Diese Gruppe beinhaltete 20 Fälle, bei denen wir Fruchtwasser durch Amniotomie im Rahmen einer Spontangeburt gewannen (Verweis Probengewinnung). Diese fand zwischen der 34. und 42. SSW statt (Median: 40 SSW) (Abbildung 4). Das durchschnittliche Alter der Patientinnen lag bei 33,65 Jahren (von 24 bis 44 Jahre).

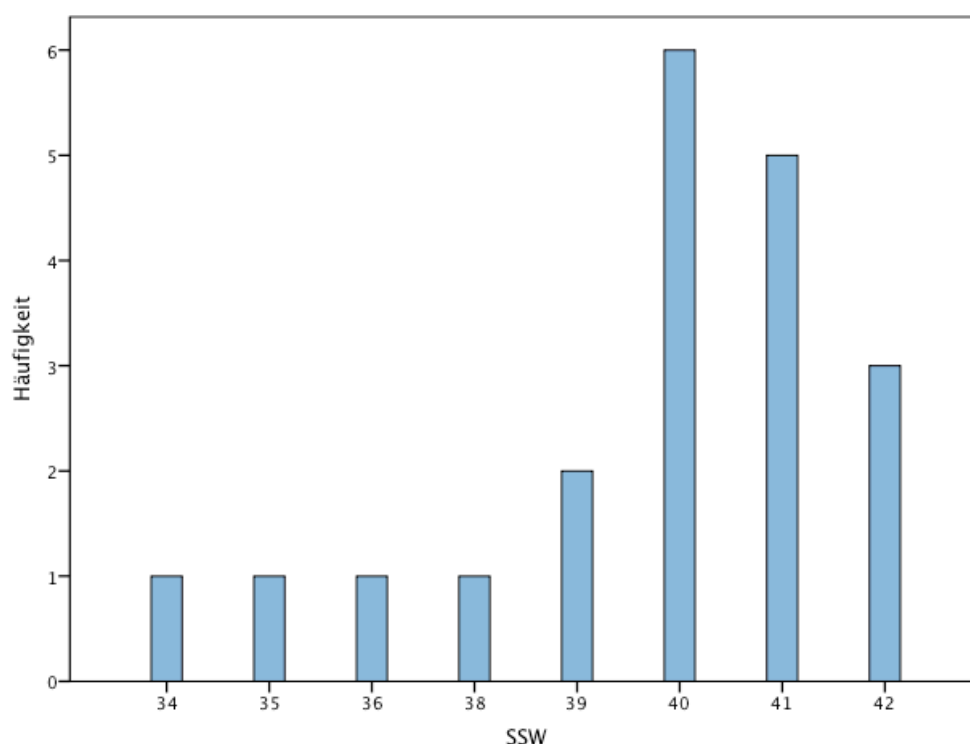


Abbildung 4 Zeitpunkte der Spontangeburt

2.4.4 Amnioninfektionssyndrome

Diese Gruppe beinhaltete 13 Fälle. Im Durchschnitt waren die Patientinnen 35,64 Jahre alt (von 26 bis 47 Jahre) und wurden zwischen der 17. und 34. SSW entbunden (Median: 27,0 SSW). In diese Gruppe eingeschlossen wurden Fälle, bei denen aufgrund klinischer Parameter die Verdachtsdiagnose „Amnioninfektionssyndrom“ gestellt wurde. Einschlusskriterien waren steigende Infektparameter unter Antibiose, Wehentätigkeit im CTG und fetale Tachykardie. Zusätzlich wurde per Amniozentese Fruchtwasser gewonnen, das auf die Konzentration von Interleukin-6 hin untersucht wurde.

2.5 Probengewinnung

Nachfolgend werden die genauen Bedingungen erläutert, unter denen wir das Fruchtwasser von den Patientinnen der einzelnen Gruppen gewannen. Je nach Indikation und Methode der Fruchtwasserentnahme ergaben sich zwischen den Studiengruppen verschiedene Zeitpunkte der Fruchtwasserentnahme.

2.5.1 Amniozentesen

Die Indikationen zur Durchführung einer Amniozentese wurden oben aufgezeigt. Vor Beginn des Eingriffes fand ein ausführliches Aufklärungsgespräch statt, bei dem die Patientin über den Ablauf und die Risiken der Amniozentese aufgeklärt wurde. Der Patientin wurde entsprechende Bedenkzeit eingeräumt und nach schriftlicher Einverständniserklärung ein Termin vereinbart.

Vor dem Eingriff wurden die nötigen Materialien auf einem sterilen Tuch bereitgelegt: sterile Handschuhe, sterile Tücher, sterile Tupfer, sterile Pflaster, eine sterile Spritze (Volumen 20 ml), eine Verschlusskappe für die Spritze und eine Punktionskanüle (20G x 3,5). Die Patientin wurde in Rückenlage gelagert. Zur größtmöglichen Minimierung des Risikos einer Infektion von Mutter und Kind wurde das Areal rund um die Punktionsstelle großzügig und gründlichst desinfiziert. Die optimale Punktionsstelle wurde sonographisch unter Berücksichtigung der Kindslage und des Plazentasitzes ermittelt. Vorzugsweise wurde abdominal punktiert.

Zu diagnostischen Zwecken wurden 15-20 ml Fruchtwasser entnommen. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden noch einmal 5 ml Fruchtwasser gewonnen und zu gleichen Teilen à 1 ml in verschließbare Mikroküvetten verteilt, nummeriert und bei -80°C umgehend eingefroren konserviert.

Nach Herausziehen der Punktionskanüle wurde die Einstichstelle noch einmal desinfiziert und mit einem sterilen Pflaster abgedeckt. Eine CTG-Kontrolle fand im unmittelbaren Anschluss an den Eingriff statt. Bei Rhesus-negativen Patientinnen wurde eine Rhesusprophylaxe durchgeführt.

2.5.2 Sectiones

Die zu untersuchenden Proben wurden während der operativen Entbindung gewonnen. Hierfür wurden unmittelbar nach der Uterotomie mittels einer sterilen Spritze 10 ml Fruchtwasser entnommen. Wie bei der Gruppe „Amniozentesen“ wurde das Fruchtwasser auch in dieser Gruppe in Mikroküvetten à 1 ml verteilt und diese bei -80°C tiefgefroren.

2.5.3 Spontangeburt

Die Fruchtwasserentnahme fand während des Geburtsvorgangs statt. Im Rahmen einer medizinisch indizierten Amniotomie wurden 10 ml Fruchtwasser mit einer sterilen Spritze gewonnen. Direkt nach der Eröffnung der Fruchtblase wurde Fruchtwasser aus dem hinteren Blatt eines Spekulum (im Rahmen der Spiegeleinstellung) entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht mit Blut „verunreinigt“ wurden. Analog zu den vorhergegangenen Gruppen wurden die Proben nach Verteilen auf Mikroküvetten nummeriert und bei -80°C tiefgefroren.

2.5.4 Amnioninfektionssyndrome

Das Fruchtwasser wurde per Amniozentese gewonnen. 10ml wurden entnommen: 5ml eingefroren und 5ml in das mikrobiologische Institut geschickt. Wie bei der Fruchtwasserentnahme der „Amniozentesen“-Gruppe wurde die Patientin in Rückenlage gelagert und nach ausführlicher Desinfektion zur Keimreduktion durch abdominale Punktion 10 ml Fruchtwasser gewonnen und auf Mikroküvetten à 1 ml verteilt. Zusätzlich sendeten wir einen Teil der Proben zur Kultivierung des Fruchtwassers in ein mikrobiologisches spezialisiertes Labor unserer Klinik.

2.6 Methoden

2.6.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

In dieser Arbeit wurden mithilfe der ELISA-Methode die Zytokine IL-6, IL-15, pro-IL-1 β und CXCL10/IP10 im Fruchtwasser bestimmt. In unserem Falle wurde ein sog. Sandwich-ELISA angewendet, dessen Funktionsprinzip nachstehend kurz erläutert wird (siehe auch Abbildung 5). An die feste Phase - bei unseren Versuchen spezielle 96-Well-Mikrotiterplatten - ist ein spezifischer Antikörper („coating antibody“) gebunden. Dieser Antikörper bindet

einen bestimmten Teil des gesuchten Antigens, das sich in der Probe befindet. Nach Zugabe des Antigens kommt es während der folgenden Inkubationsphase zu einer Antikörper-Antigen-Bindung. Nicht gebundene Antigene werden durch einen anschließenden Waschvorgang entfernt, übrig bleibt ein Antikörper-Antigen-Komplex. Ein zweiter hinzu gegebener Antikörper, an dem ein bestimmtes Enzym, meist Meerrettichperoxidase (HRP), hängt, bindet ein anderes Epitop des Antigens. Hierdurch behindern sich die Antikörper nicht. Nach erneuter Inkubationsphase wird die Platte wieder gewaschen, überschüssige Antikörper entfernt. Übrig bleibt nun ein sog. Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch Zugabe eines zum Enzym passenden chromogenen Substrates kommt es zum Farbumschlag, dessen Intensität mithilfe eines Photometers bestimmt werden kann. Hierdurch lässt sich die Konzentration des gesuchten Antigens bestimmen. Um Vergleichswerte für den Farbumschlag zu erhalten, wird parallel zum Versuch eine Standardserie mit bekannten Konzentrationen hergestellt.

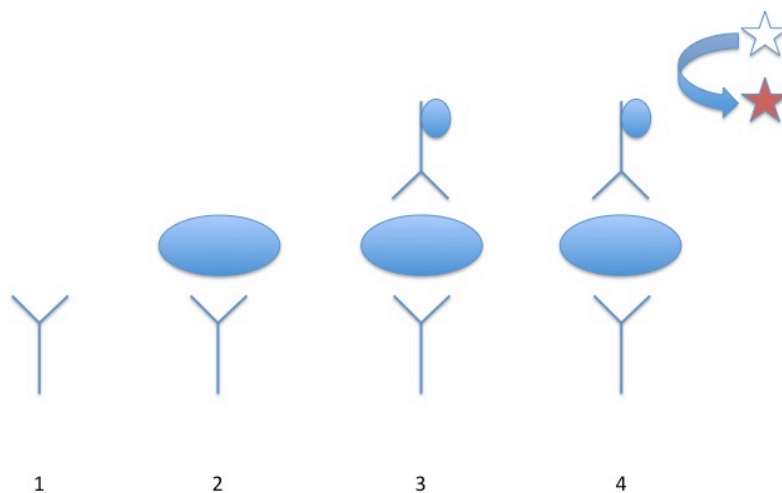


Abbildung 5 Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISAs, nach Jeffrey M. Vinocur (Vinocur, 2008)

(1) Coating-Antikörper (2) an Coating-Antikörper gebundenes Antigen (3) Zugabe des Detektionsantikörpers unter Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes (4) Farbumschlag nach Substratzugabe

2.6.2 Vorbereitung der Proben

Nach Gewinnung der Fruchtwasserproben wurden diese wie in Kap. 2.4.3 beschrieben bei -80°C konserviert. Vor Verwendung mussten die zu untersuchenden Proben auf Raumtemperatur gebracht werden. Hierfür wurden sie über Nacht in einem Kühlraum bei 7°C aufgetaut. Vor Versuchsbeginn wurde jede Probe ca. 10 Sekunden gevortext.

2.6.3 Reagenzien

Humanes IL-6, IL-15, IL-1 β und CXCL10/IP10-Standard
Standard Diluent Puffer
Inkubationspuffer
Mikrotiterplatten mit 96 Mikrotitergefäßen pro Platte (Ligand-beschichtet)
Humanes IL-6, IL-15, IL-1 β und CXCL10/IP10-Konjugat
Streptavidin-Peroxidase (HRP)
Verdünnungslösung für die Streptavidin-Peroxidase
gepufferte Waschlösung
Stabilsiertes Chromogen
Stopplösung
Klebestreifen zum Überdecken der Mikrotiterplatten

Tabelle 4 Reagenzien

2.6.4 Herstellung der Standardverdünnungsreihen

2.6.4.1 Humanes IL-6-Standard

Zu Beginn wurden acht 1,5 ml Safelock-Tubes vorbereitet, diese von 1 bis 8 durchnummeriert und in einer Halterung gesichert. Der Standard wurde in Pulverform geliefert und musste vor Verwendung mit 5,0 ml der gelieferten Kalibratorlösung gelöst werden. Hieraus ergab sich eine Standardlösung mit einer Konzentration von 300 pg/ml. Die Standardlösung musste nun 15 Minuten unter leichter Bewegung ruhen. Nach Ablauf der Ruhezeit wurden in das erste Safelock-Tube 667 µl der Pufferlösung pipettiert, in die verbleibenden sieben Röhrchen jeweils 500 µl. Anschließend wurden exakt 333 µl der Standardlösung in das erste Röhrchen pipettiert und die entstandene Standardlösung kurz gevortext. Diese hatte eine Konzentration von 100 pg/ml. Aus dieser wurden daraufhin 500 µl in das nächste Röhrchen pipettiert und die Lösung wieder kurz gevortext. Wiederum wurden 500 µl abgezogen und in das dritte Röhrchen gegeben. So wurde weiter verfahren, bis die komplette Verdünnungsreihe hergestellt war. Das achte Eppendorfgefäß enthielt ausschließlich Pufferlösung. Schließlich ergab sich eine Standardverdünnungsreihe mit den folgenden Standardkonzentrationen (pg/ml): 300 – 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,12 – 0. Zur Veranschaulichung der Herstellung einer Verdünnungsreihe sei auf die unten stehende Abbildung 6 verwiesen. Abweichungen zur Herstellung der anderen Verdünnungsreihen werden in den jeweiligen Textabschnitten erläutert.

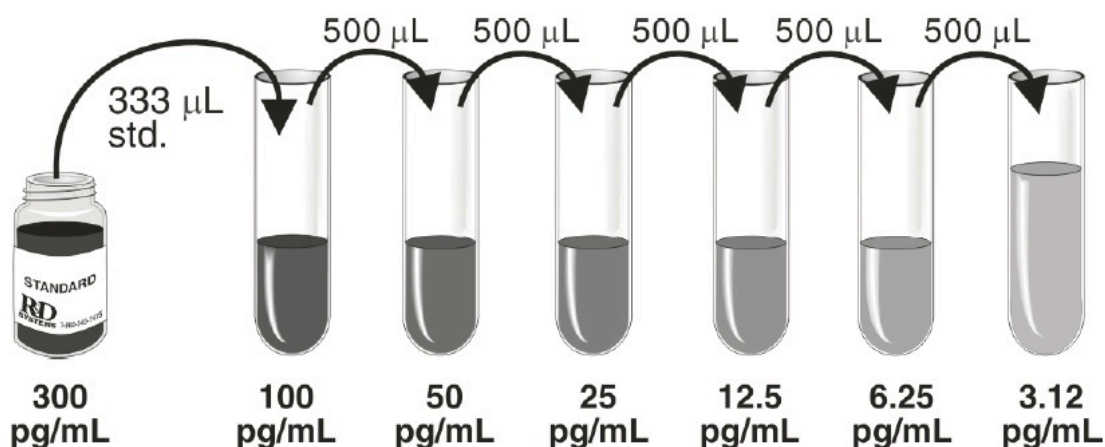


Abbildung 6 Beispiel: Herstellung der Standardverdünnungsreihe für die Bestimmung von IL-6 (R&D, 2011)

2.6.4.2 Humanes IL-15-Standard

Diese Standardverdünnungsreihe wurde im Prinzip wie die oben beschriebene hergestellt. Auch hier musste der pulverisierte Standard in eine Lösung überführt werden. Dazu wurde der pulverisierte Standard mit 1,0 ml deionisiertem Wasser gelöst und 15 Minuten ruhen gelassen. Es ergab sich eine Standardkonzentration von 2500 pg/ml. In das erste der acht vorbereiteten Reaktionsgefäße wurden 900 µl der Pufferlösung pipettiert, in die verbleibenden sieben Gefäße jeweils 500 µl. Nun wurden aus der Standardlösung 100 µl in das erste Röhrchen pipettiert, es ergab sich eine Lösung mit der Konzentration von 250 pg/ml. Aus der entstandenen Lösung wurden 500 µl in das nächste Reaktionsgefäß pipettiert. Dieser Schritt wurde für alle Röhrchen wiederholt, zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurde die entstandene Lösung kurz gevortext. Es ergaben sich folgende Konzentrationen (pg/ml): 250 – 125 – 62,5 – 31,2 – 15,6 – 7,8 – 3,9 – 0.

2.6.4.3 Humanes pro-IL-1β-Standard

Auch hier musste der pulverisierte Standard mit 1,0 ml deionisiertem Wasser gelöst werden. Es ergab sich eine Konzentration von 10000 pg/ml. Wieder wurden acht Safelock-Tubes vorbereitet, wobei in das erste 800 µl Kalibratorlösung und in die verbleibenden sieben Röhrchen jeweils 500 µl pipettiert wurden. Vom gelösten Standard wurden 200 µl in das erste Röhrchen pipettiert, dann schrittweise 500 µl. Das letzte Röhrchen enthielt ausschließlich Kalibratorlösung. Es ergaben sich folgende Konzentrationen (pg/ml): 2000 – 1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,2 – 0.

2.6.4.4 Humanes CXCL10/IP-10-Standard

Für diese Standardverdünnungsreihe wurde die Vorbereitung von acht Polypropylen-Röhrchen verlangt. Der pulverisierte Standard wurde mit 1,0 deionisiertem Wasser gelöst und 15 Minuten unter leichter Bewegung stehen gelassen. In das erste Röhrchen wurden 900 µl Kalibratorlösung pipettiert, in die restlichen sieben jeweils 500 µl. Aus der Standardlösung (5000 pg/ml) wurden 100 µl in das erste Röhrchen pipettiert, die Lösung kurz gevortext und davon 500 µl in das zweite Röhrchen pipettiert. Aus dem zweiten Röhrchen wurden nach kurzem Vortexen 500 µl in das Dritte gegeben und diese Schritte bis zum siebten Röhrchen wiederholt. Das letzte Röhrchen enthielt ausschließlich Kalibratorlösung. Es ergaben sich hierdurch die folgenden Konzentrationen (pg/ml): 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,2 – 15,6 – 7,8 – 0.

2.6.5 Waschlösung

Die Herstellung des Waschpuffers war bei allen Zytokinbestimmungen identisch. Das gelieferte Konzentrat wurde auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden 20 ml des Konzentrats in 480 ml destilliertes Wasser pipettiert. Es ergab sich 500 ml Waschlösung für die unten beschriebenen Waschvorgänge.

2.6.6 Substratlösungen

Auch die Herstellung der Substratlösung war für alle Versuchsreihen identisch. Jeweils 12,5 ml geliefertes Reagenz A wurde mit 12,5 ml Reagenz B in eine Waschwanne pipettiert. Der geforderte Einsatz innerhalb von 15 Minuten nach Herstellung wurde stets eingehalten. Reagenz A beinhaltete stabilisiertes Hydrogenperoxid, Reagenz B stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidine).

2.6.7 Verdünnung der Fruchtwasserproben

Je nach zu erwartender Interleukinkonzentration wurden die Fruchtwasserproben vor Durchführung des ELISAs verdünnt. Für die Konzentrationsbestimmung von IL-6 wählten wir eine Verdünnung von 1:10, die Zytokine IL-15, pro-IL-1 β und CXCL-10/IP-10 wurden unverdünnt gemessen.

2.6.8 Durchführung ELISA IL-6, IL-15, pro-IL-1 β und CXCL10/IP-10

Der Ablauf des ELISA für die Interleukine IL-6, IL-15, pro-IL-1 β und CXCL10/IP-10 war vom Prinzip her gleich und wird daher gemeinsam beschrieben. Abweichungen werden im Folgenden erwähnt. Nach oben beschriebener Vorbereitung aller Reagenzien wurde mittels Multichannel-Pipette der gelieferte Ansatzpuffer in jedes Well titriert. Die entsprechenden Mengen zeigt Tabelle 5.

	IL-6	IL-15	Pro-IL-1 β	CXCL10/IP-10
Bezeichnung	RD1W	RD1-19	RD1S	RD1-56
Menge (μ l)	100	100	50	75

Tabelle 5 Bezeichnung des Ansatzpuffers und geforderte Titrationsmenge

Nachfolgend wurde in die ersten acht Mikroküvetten Standard-Lösung der Standardverdünnungsreihe pipettiert, in die restlichen 88 Wells titrierten wir Probenlösung. Die jeweiligen Mengen unterschieden sich und sind in Tabelle 6 gezeigt.

	IL-6	IL-15	Pro-IL-1 β	CXCL10/IP-10
Menge (μ l)	100	50	200	75

Tabelle 6 Mengenangaben der titrierten Standard-bzw. Probenlösung

Nach Abdeckung mittels eines gelieferten Klebestreifens wurden die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur inkubiert. Für IL-6 und CXCL10/IP-10 waren zwei Stunden Inkubation gefordert, die Platte für pro-IL-1 β wurde 1,5 Stunden und IL-15 über drei Stunden inkubiert. Die Platten für die Bestimmung von IL-6, IL-15 und CXCL10/IP-10 wurden nachfolgend mit insgesamt 4 Wiederholungen gewaschen, der ELISA zur Pro-IL-1 β -Bestimmung erforderte 3 Wiederholungen.

An den Waschvorgang schlossen sich für IL-6, IL-15 und CXCL-10/IP-10 die Zugabe von 200 μ l der gelieferten Konjugatlösung an. Für die Konzentrationsbestimmung des Zytokins pro-IL-1 β war vor Konjugatzugabe (100 μ l) die Titration von 100 μ l Antiserum je Well, eine anschließende Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur und nachfolgend ein dreimaliger Waschvorgang gefordert.

Nach Titration der Konjugatlösung wurden die Platten mit Klebestreifen abgedeckt und entsprechend der Anweisung des Herstellers für eine bestimmte Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Die jeweiligen Inkubationszeiten zeigt Tabelle 7.

	IL-6	IL-15	Pro-IL-1 β	CXCL10/IP-10
Zeit (min)	120	60	30	120

Tabelle 7 Inkubationszeiten

Mit Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten wie oben beschrieben gewaschen. Wiederum waren bei IL-6, IL-15 und CXCL10/IP-10 vier Wiederholungen gefordert, bei pro-IL-1 β drei.

Die nachfolgende Titration der Substratlösung war mengenmäßig bei allen 4 ELISAs identisch. Mittels einer Mehrkanal-Pipette wurde in jede Mikroküvette 200 μ l Substratlösung titriert. Die Substratlösung musste vor Titration hergestellt und innerhalb von 15 Minuten verwendet werden. Dementsprechend stellten wir die Lösung kurz vor Ablauf der vorherigen Inkubationsphase her, um die vorgegebene Zeitspanne einzuhalten.

Die Mikrotiterplatten der Zytokine IL-6 und pro-IL-1 β wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, die Platten zur Bestimmung von IL-15 und CXCL10/IP-10 für einen Zeitraum von 30 Minuten.

Mit Ablauf der Inkubationsphase wurde wieder mithilfe einer Mehrkanalpipette 50 μ l Stopp-lösung in jede Mikroküvette pipettiert. Die geforderte Menge von 50 μ l war hierbei für jeden

ELISA identisch.

Innerhalb von 30 Minuten wurde die Konzentration jeder Mikroküvette mit dem Microplate-Reader „MRX-II“ bestimmt.

2.6.9 Auswertung

Die uns bekannten Konzentrationen der Verdünnungsstufen der hergestellten Standardverdünnungsreihen definierten wir in der Auswertungssoftware „Revelation“ als Referenzwerte. Durch Messung der optischen Extinktion der Verdünnungsstufen berechnete „Revelation“ die Zytokinkonzentration in pg/ml aus dem Verhältnis zur optischen Dichte und erstellte hieraus eine Kalibrierungskurve. Die Messung des optischen Wertes (OD-Wert) jeder Mikroküvette bei 450 nm in Relation zur errechneten Standardkurve ergab die genaue Zytokinkonzentration in pg/ml.

2.7 Statistik

Bei der Auswertung der Ergebnisse verzichteten wir auf die Annahme einer Normalverteilung. Infolge teilweise extremer Ausreißer kamen bei unserer Arbeit keine parametrischen Testverfahren infrage. Vielmehr wendeten wir nicht-parametrische Testverfahren an. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben bei einem definierten Signifikanzniveau von 5% ($p < 0,05$). Das Alter der Patientinnen stellte eine Ausnahme dar, da dieses Merkmal einer Normalverteilung folgte. Folglich wurde hier der parametrische Student-T-Test angewendet. Das festgelegte Signifikanzniveau lag ebenfalls bei 5% ($p < 0,05$).

Zur Neutralisierung der α -Fehler-Kumulierung bei multiplen Tests kam im Rahmen der Auswertung der Zytokinexpression während der Schwangerschaft die „Bonferroni-Holm-Prozedur“ zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf 1,25% festgelegt ($p < 0,125$).

Die statistische Untersuchung von Sensitivität und Spezifität der untersuchten Zytokine hinsichtlich der Aussagekraft einer vorliegenden Infektion erfolgte durch eine ROC- (receiver operating characteristics) Analyse.

3 Ergebnisse

3.1 Zytokinkonzentrationen

3.1.1 Interleukin-6

Zur Bestimmung der Konzentration des Zytokins IL-6 untersuchten wir das Fruchtwasser der Patientinnen der Kontrollgruppe und der Patientinnen mit V.a. intrauterine Infektion. Tabelle 8 zeigt eine Aufstellung der jeweiligen Messwerte von IL-6 in den untersuchten Gruppen. Aufgezeigt sind jeweils der minimale und maximale Messwert sowie der sich ergebende Mittelwert und der dazugehörige Median. Mittels Mann-Whitney-U-Tests für unverbundene Stichproben wurden die Medianwerte der Kontrollgruppe (bestehend aus den Gruppen „Sectiones“, „Spontangeburt“ und „Amniozentese“) mit den Werten der Gruppe „Amnioninfektionssyndrom“ verglichen. Hier ergab sich ein p-Wert von 0,78 das entspricht keinem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 7).

	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Amniozentese	78	1070,77	638,57	6,45	7444,92
Sectiones	79	2272,17	788,75	120,84	21275,00
Spontangeburt	17	1550,93	1162,41	440,92	6500,77
AIS	6	1131,09	1014,53	162,76	2692,03

Tabelle 8 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von IL-6 in den verschiedenen Gruppen. Konzentrationsangaben in pg/ml

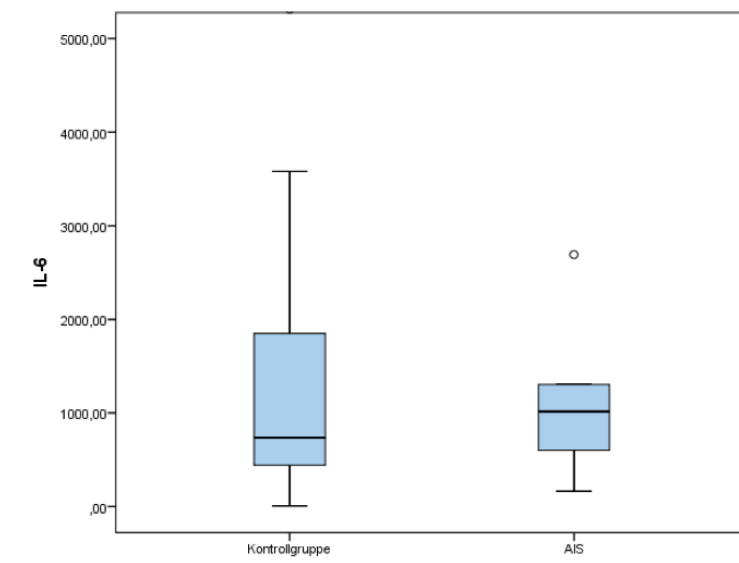


Abbildung 7: Boxplot zum Vergleich von IL-6 der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrom“ (AIS). Konzentration in pg/ml

3.1.2 Interleukin-15

Analog zu IL-6 werteten wir den Minimal-, Maximal- und Mittelwert sowie den Median der Messergebnisse für IL-15 aus (Tabelle 9). Beim Vergleich der Kontrollgruppe analog zu IL-6 gegenüber der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ ergab sich auch hier bei einem p-Wert von 0,665 kein signifikanter Unterschied der Messwerte (Abbildung 8).

	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Amniozentesen	74	15,19	11,84	1,33	92,78
Sectiones	100	41,23	35,31	2,59	169,46
Spontangeburt	19	17,24	13,57	4,52	43,02
AIS	11	20,23	19,87	10,81	38,99

Tabelle 9 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von IL-15 in den verschiedenen Gruppen.
Konzentrationsangaben in pg/ml

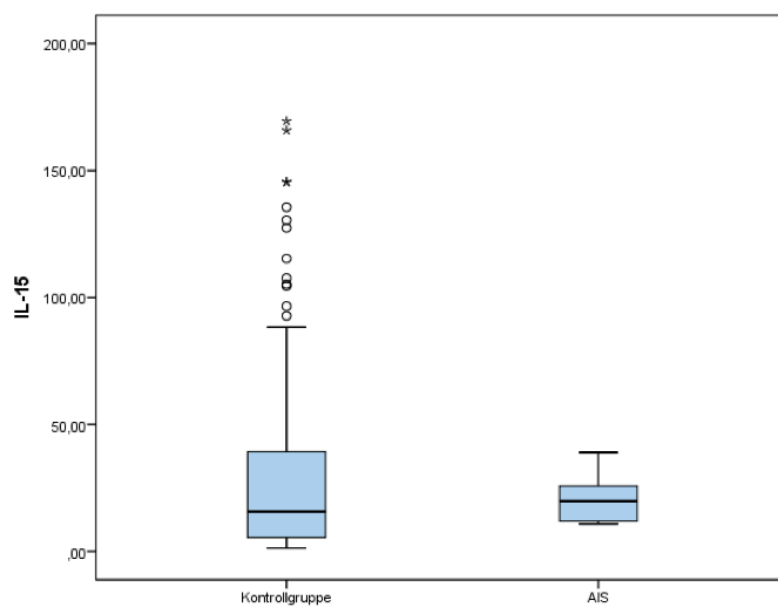


Abbildung 8: Boxplot zum Vergleich von IL-15 der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrome“ (AIS).
Konzentrationsangaben in pg/ml

3.1.3 Pro-IL-1 β

Die berechneten Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie den Median der Konzentrationen von pro-IL-1 β zeigt Tabelle 10. Mittels Mann-Whitney-U-Tests verglichen wir auch hier die Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ gegen die Kontrollgruppe, zusammengefasst aus den Gruppen „Sectiones“, „Amniozentesen“ und „Spontangeburt“. Hier zeigte sich bei einem p-Wert von 0,01 ein statistisch signifikanter Unterschied der Konzentrationen zwischen den verglichenen Gruppen. Das Ergebnis wird in Abbildung 9 veranschaulicht.

	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Amniozentesen	72	25,29	20,27	11,56	69,54
Sectiones	85	284,1	16,51	2,01	8048,79
Spontangeburt	20	752,12	297,23	12,55	3068,49
AIS	13	1407,37	26,63	20,77	5667,22

Tabelle 10 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von pro-IL-1 β in den verschiedenen Gruppen.
Konzentrationsangaben in pg/ml

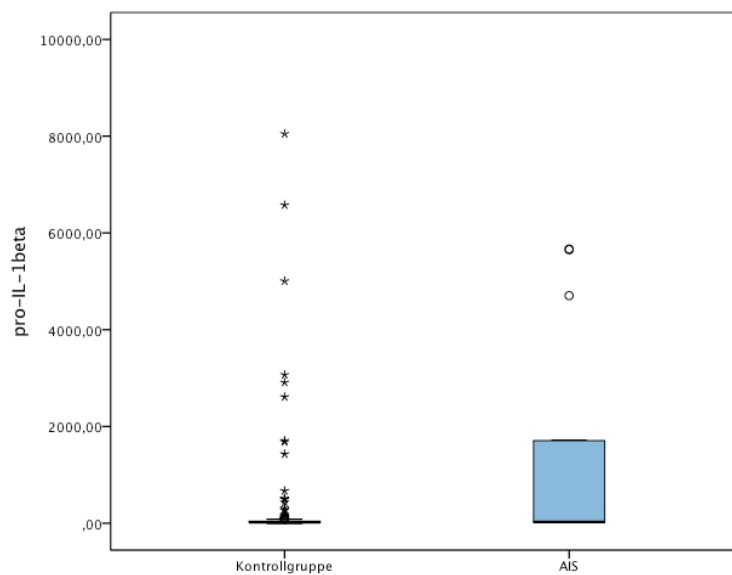


Abbildung 9: Boxplot zum Vergleich von pro-IL-1 β der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrome“ (AIS). Konzentrationsangaben in pg/ml

3.1.4 CXCL10/IP-10

Die gemessenen Werte analog zu den vorhergehenden Zytokinen sind in

Tabelle 11 gezeigt. Der Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ ergab bei einem p-Wert von 0,694 keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 10).

	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Amniozentesen	73	2131,5	1042,5	0,48	32366,32
Sectiones	85	1009,78	686,12	5,42	5184,86
Spontangeburt	20	1028,00	566,00	2,18	8953,42
AIS	13	1647,07	799,96	1,31	8707,82

Tabelle 11 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von CXCL10/IP-10 in den verschiedenen Gruppen
Konzentrationsangaben in pg/ml

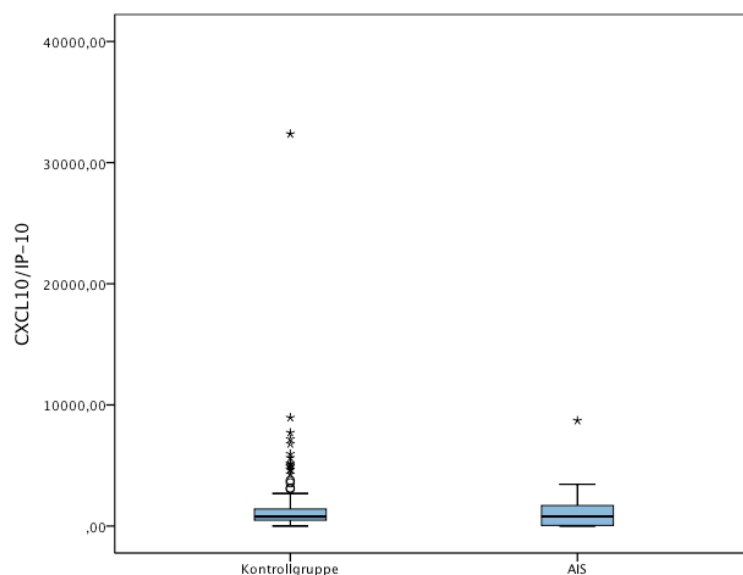


Abbildung 10: Boxplot zum Vergleich von CXCL10/IP-10 der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrome“ (AIS); Konzentrationsangaben in pg/ml

3.2 ROC-Kurven

Mithilfe einer ROC - (receiver operating characteristics) Analyse werteten wir den prädiktiven Wert der untersuchten Zytokine hinsichtlich eines intrauterinen Infektionsgeschehens aus. Die Einschätzung der Genauigkeit einer Methode zur Vorhersage einer Erkrankung – in unserem Fall dem Vorhandensein eines Amnioninfektionssyndroms – ergibt sich durch Eintragen von Spezifität (Abszisse) und 1-Spezifität (Ordinate) in ein Koordinatensystem.

3.2.1 Interleukin-6

Die ROC-Analyse bezüglich des prädiktiven Werts des von uns untersuchten Zytokins Interleukin-6 ergab einen AUC von 0,534. Hier zeigt sich keine Diskriminierung zwischen richtig und falsch positiven Ergebnissen (Abbildung 11).

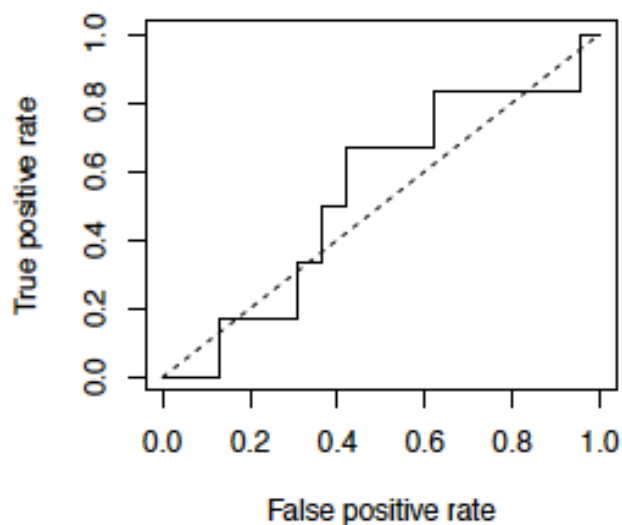


Abbildung 11: ROC für Interleukin-6

3.2.2 Interleukin-15

Für Interleukin-15 ergab sich ein AUC-Wert von 0,539. Es konnte keine Diskriminierung gezeigt werden (Abbildung 12).

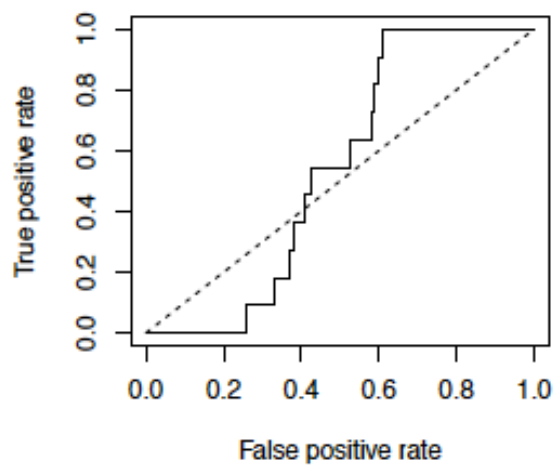


Abbildung 12: ROC für Interleukin-15

3.2.3 Pro-IL-1 β

Der AUC-Wert für pro-IL-1 β ergab 0,783. Wir konnten eine mäßige Diskriminierung zeigen (Abbildung 13).

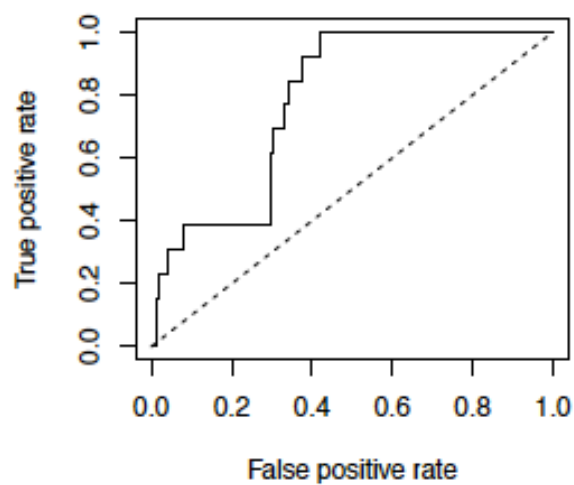


Abbildung 13: ROC für pro-IL-1 β

3.2.4 CXCL10/IP-10

Eine schlechte Diskriminierung ergab sich für CXCL10/IP-10 (AUC: 0,466) (Abbildung 14).

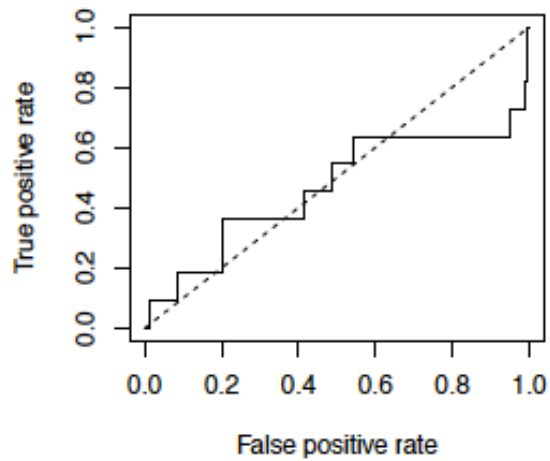


Abbildung 14: ROC für CXCL10/IP-10

3.3 Zytokinexpression im Verlauf der Schwangerschaft

Neben dem Vergleich der Kontrollgruppen mit der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ wurde in dieser Arbeit die Konzentration der einzelnen Zytokine im Verlauf der Schwangerschaft untersucht.

Hierzu führten wir eine lineare Regressionsanalyse durch, um einen etwaigen Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Interleukinkonzentration aufzuzeigen. Hierzu verglichen wir die Gruppe der Amniozentesen mit der Gruppe der Sectiones.

Tabelle 12 zeigt im direkten Vergleich die Abnahmezeitpunkte der verwendeten Fruchtwasserproben.

	n	Minimum	Maximum	Median
Amniozentesen	77	15	31	17
Sectiones	100	27	42	39

Tabelle 12: Zeitpunkte der Fruchtwassergewinnung während der Schwangerschaft [SSW]

Es zeigt sich, dass die Entnahmezeitpunkte des Fruchtwassers über die Schwangerschaft nicht regelmäßig verteilt sind. Das erste Trimenon ist bei unseren Versuchen unterrepräsentiert.

3.3.1 Interleukin-6

Für IL-6 konnten wir im Zeitraum von der 15. bis zur 31. Schwangerschaftswoche (Median 17. SSW) Zytokinwerte von 6,45 pg/ml bis 7444,92 pg/ml (Median 638,57 pg/ml) zeigen. Die gemessenen Konzentrationen im Zeitraum zwischen 27. und 42. Schwangerschaftswoche (Median 39. SSW) betrugen zwischen 120,84 pg/ml und 21275 pg/ml (Median 788,75 pg/ml). Statistisch zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen im Median zwischen den untersuchten Schwangerschaftszeitpunkten ($p=0,071$). Auch der dazugehörige Scatterplot zeigt eine regelmäßige Expression des Zytokins IL-6 über den untersuchten Zeitraum (Abbildung 15).

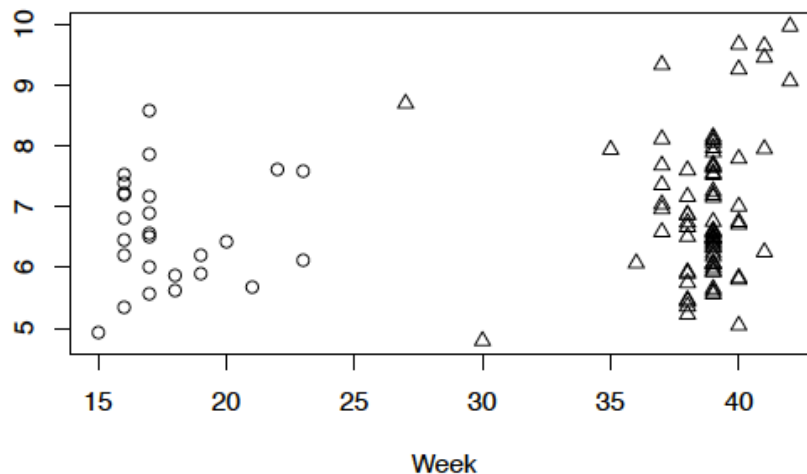


Abbildung 15: Scatterplot IL-6 gegen die Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung)

3.3.2 Interleukin-15

Im Zeitraum zwischen 15. und 31. Schwangerschaftswoche (Median 17. SSW) erhielten wir Zytokinkonzentrationen zwischen 1,33 pg/ml und 92,78 pg/ml (Median 11,84 pg/ml). Die gemessenen Konzentrationen zwischen der 27. und 42. Schwangerschaftswoche (Median 39. SSW) lagen bei 2,50 pg/ml bis 169,46 pg/ml (Median 35,31 pg/ml). Wir konnten keinen signifikanten Anstieg der Zytokinexpression über die Schwangerschaft zeigen ($p=0,109$) (Abbildung 16).

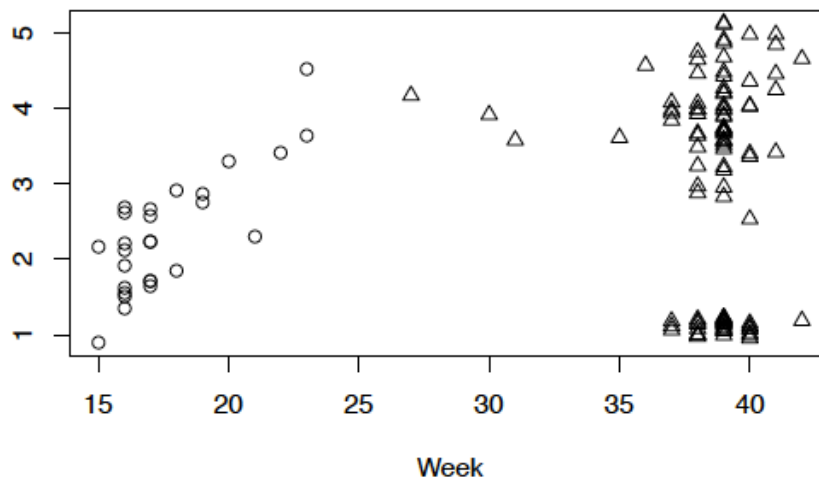


Abbildung 16: Scatterplot der IL-15-Konzentration gegen die Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung)

3.3.3 Interleukin-1 β

Für das Zytokin IL-1 β zeigten sich in der Gruppe der Amniozentesen und damit für den Schwangerschaftszeitraum zwischen 15. und 31. Schwangerschaftswoche (Median 17. SSW) Konzentrationen von 11,56 pg/ml bis 69,54 pg/ml (Median 20,27pg/ml). Der durch die Sectiones abgedeckte Zeitraum zwischen der 27. und 42. Schwangerschaftswoche (Median 39. SSW) zeigte Zytokinwerte zwischen 2,01 pg/ml und 8048,79 pg/ml (Median 16,51 pg/ml). Hier zeigt sich ebenfalls keine signifikant höhere Mediankonzentration für die Schwangerschaftswochen 15. – 31. SSW im Vergleich zu späteren Untersuchungen ($p=0,16$) (Abbildung 17).

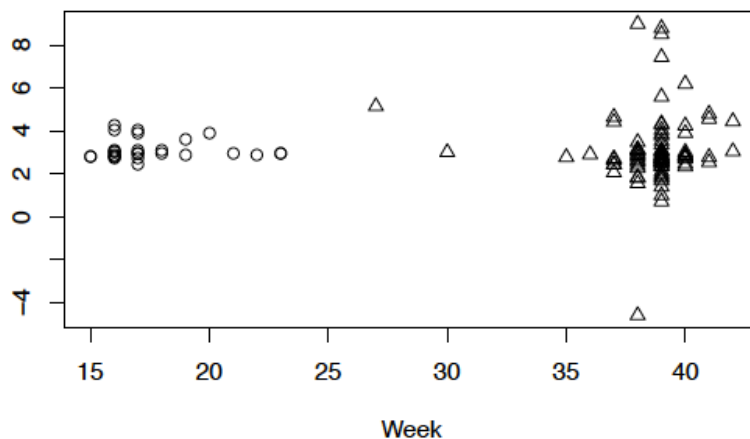


Abbildung 17: Scatterplot IL-1 β gegen Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung)

3.3.4 CXCL10/IP-10

Hinsichtlich der Expression des Zytokins CXCL10/IP-10 ergaben sich folgende Messwerte: die Konzentrationen im Zeitraum von der 15. – 31. Schwangerschaftswoche (Median 17. SSW) schwankten zwischen 0,48 pg/ml und 32366,32 (Median 1042,5 pg/ml). Zwischen der 27. und 42. SSW (Median 39. SSW) wurden Werte zwischen 5,42 pg/ml und 5184,86 pg/ml (Median 686,12 pg/ml) gemessen. Die Zytokinexpression unterschied sich zwischen beiden Schwangerschaftsabschnitten nicht signifikant ($p=0,10$) (Abbildung 18).

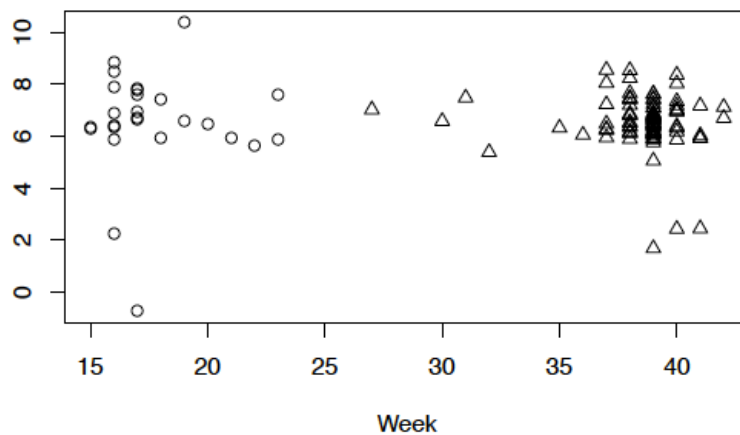


Abbildung 18: Scatterplot IP-10 gegen Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung)

3.4 Korrelation der Zytokinkonzentrationen in Abhängigkeit des fetalen Geschlechts

Zur Klärung der Frage inwiefern das Kindsgeschlecht die Zytokinexpression während der Schwangerschaft beeinflusst, verglichen wir die Konzentrationen im Schwangerschaftsverlauf mit dem Geschlecht des Kindes.

3.4.1 Interleukin-6

Wir korrelierten die Konzentration von IL-6 in Abhängigkeit vom Geschlecht des Kindes. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der IL-6-Konzentration zwischen weiblichen und männlichen Feten in Korrelation zum Gestationsalter ($p=0,19$).

3.4.2 Interleukin-15

Auch für IL-15 zeigten sich statistisch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Geschlechtern im Schwangerschaftsverlauf ($p=0,71$).

3.4.3 Interleukin-1 β

Auch hier konnte kein signifikanter geschlechtsspezifischer Konzentrationsunterschied in Korrelation zum Gestationsalter gezeigt werden ($p=0,093$).

3.4.4 CXCL10/IP-10

Für das Zytokin CXCL10/IP-10 konnten wir ebenfalls keinen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Geschlechtern aufzeigen. Hier ergab sich ein p-Wert von 0,365.

3.5 Korrelation der Zytokinkonzentration in Abhängigkeit des Alters der Mutter

Neben dem Kindsgeschlecht korrelierten wir auch das Alter der Mutter zum Schwangerschaftszeitpunkt mit den Konzentrationen der von uns bestimmten Zytokinen in Relation zum Gestationsalter.

3.5.1 Interleukin-6

Die Korrelation der Zytokinkonzentration von IL-6 mit dem Alter der Mutter ergab keine signifikanten Unterschiede ($p=0,74$).

3.5.2 Interleukin-15

Für IL-15 ergab sich nach unseren Auswertungen kein statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied in Abhängigkeit des Alters der Mutter ($p=0,45$).

3.5.3 IL-1 β

Auch für IL-1 β zeigte sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied für die Korrelation der Zytokinexpression gegen das Alter der Mutter ($p=0,93$).

3.5.4 CXCL10/IP-10

Analog zu den anderen Zytokinen konnten wir für auch CXCL10/IP-10 keinen signifikanten Unterschied der Zytokinkonzentrationen, korreliert mit dem Alter der Mutter, nachweisen ($p=0,59$).

3.6 C-reaktives Protein und Leukozyten

Zusätzlich bestimmten wir CRP und Leukozyten in den Kontrollgruppen und korrelierten die gemessenen Werte gegen die der Patientinnen mit V.a. Amnioninfektionssyndrom. Die Blutabnahme erfolgte hierbei zeitgleich zur Fruchtwasserentnahme, um Werte unter gleichen Bedingungen zu erhalten.

3.6.1 C-reaktives Protein

Hinsichtlich des Vergleiches der CRP-Werte konnten wir signifikant höhere Konzentrationen in der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ gegenüber der Kontrollgruppe zeigen (Abbildung 19). Der p-Wert betrug 0,002.

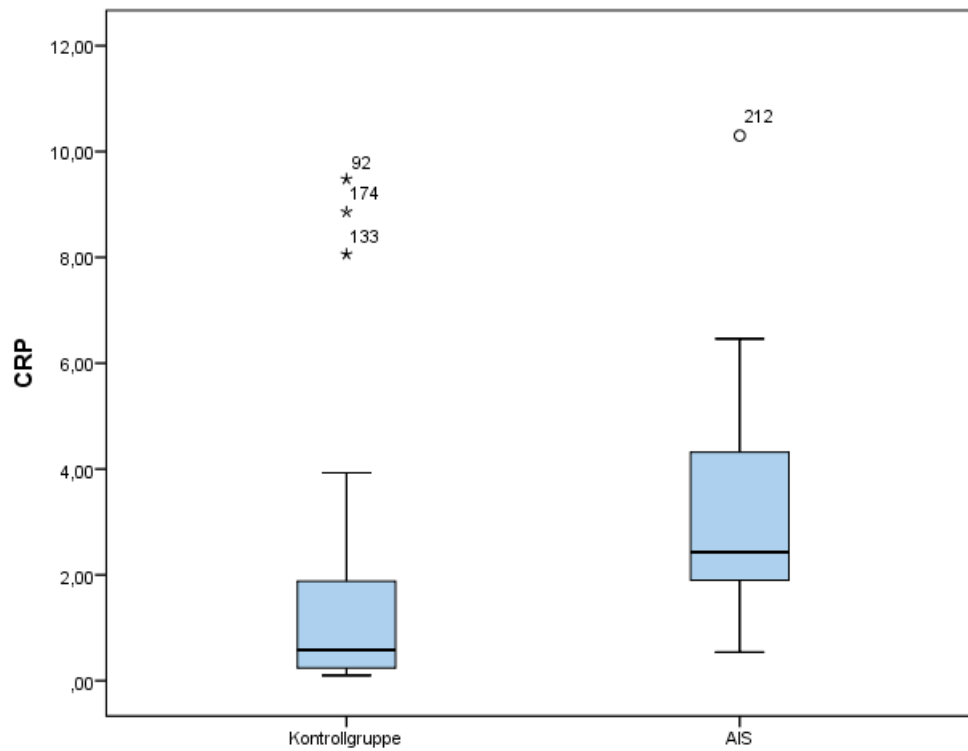


Abbildung 19: Boxplot zum Vergleich der CRP-Werte der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ mit der Kontrollgruppe.

3.6.2 Leukozyten

Analog zum Vergleich der CRP-Werte verglichen wir die Leukozytenzahlen der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ mit der Kontrollgruppe. Auch hier konnten wir signifikant erhöhte Werte für die Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ aufzeigen (Abbildung 20). Der p-Wert betrug 0,001.

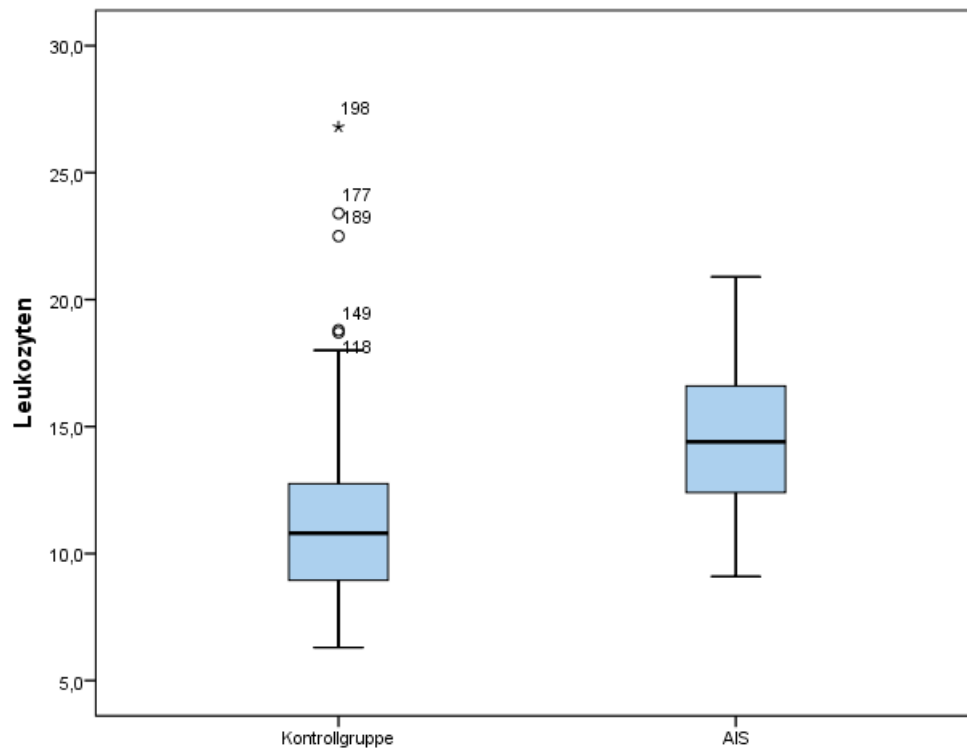


Abbildung 20: Boxplot zum Vergleich der Leukozytenwerte zwischen der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ und der Kontrollgruppe.

4 Diskussion

4.1 Zytokinexpression im Schwangerschaftsverlauf

Zum sicheren Ausschluss bzw. einer verlässlichen Diagnosestellung eines intrauterinen Inflammationsgeschehen ist die Etablierung eines spezifischen und sensitiven Markers von größter Wichtigkeit. Bisherige klinische Parameter geben nur einen Anhalt, sind aufgrund ihrer begrenzten Sensitivität und Spezifität nur begrenzt einsetzbar. Vielmehr liegt es an einer Zusammenschau der Symptome, Infektparameter und der klinischen Erfahrung des Geburtshelfers im Spannungsfeld zwischen Frühgeburtslichkeit – und damit verbundener Unreife des Kindes – einerseits und der Gefährdung von Mutter und Kind durch eine Infektion andererseits, die richtige Entscheidung über eine vorzeitige Entbindung und dessen Zeitpunkt treffen zu können.

Die Etablierung eines Zytokins, einer Zytokinkombination oder eines anderen spezifischen Parameter ist wichtig, um in solch einer Situation eine sicherere Diagnose stellen zu können, als dies heute mit den verfügbaren Parametern möglich ist.

Einige Arbeitsgruppen haben sich mit unterschiedlichen Einflussfaktoren beschäftigt. Im Rahmen unserer Studie haben wir untersucht, inwiefern Gestationsalter, Geschlecht des Kindes und Alter der Mutter die Zytokinexpression im Fruchtwasser beeinflussen.

Werden Zytokine stetig über die gesamte Schwangerschaft hinweg in gleicher Konzentration in das Fruchtwasser exprimiert oder gibt es unterschiedliche „Expressionsphasen“? Für die Etablierung eines Zytokins zur Diagnostik einer intrauterinen Infektion ist das Wissen um die physiologische Expression eines Markers von großer Bedeutung. Um genaue Erkenntnisse über die physiologische Expression von Zytokinen im Fruchtwasser zu erlangen, wäre eine Zytokinbestimmung über verschiedene Zeitpunkte der Schwangerschaft bei unauffälligen Schwangerschaftsverläufen nötig. Aufgrund der Invasivität einer Amniozentese und die damit verbundenen Risiken und Komplikationen einer potentiellen Infektion gibt es bis heute keine großen Untersuchungen, inwiefern das Gestationsalter die Zytokinexpression im Fruchtwasser beeinflusst. Das „Gestationsalter“ als Einflussfaktor soll - sofern möglich - in den nächsten Abschnitten diskutiert werden.

Die Arbeitsgruppe um Santhanam et al. postulierte eine stetige, aber geringe Expression des Zytokins Interleukin-6 während der normalen Schwangerschaft. Sie bestimmten im Frucht-

wasser Konzentrationen von 60-1600 pg/ml (Median 200 pg/ml) im 2. Trimenon und 150-850 pg/ml (Median 200 pg/ml) im 3. Trimenon (Santhanam et al., 1991). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen. Unsere Ergebnisse lassen ebenfalls auf eine stetige Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 während der Schwangerschaft schließen. Mit 638 pg/ml im 2. und 788 pg/ml im 3. Trimenon sind die von uns gemessenen Werte zwar ein wenig höher als die Werte von Santhanam, zeigen aber, dass sich die Konzentrationen bei Frauen ohne Wehentätigkeit und ohne Infektion über die letzten zwei Schwangerschaftsdrittel nur wenig verändern.

Heikkinen et al. untersuchten die Konzentration von IL-6 im Fruchtwasser im 2. Trimenon. Die in ihrer Publikation gezeigten Zytokinkonzentrationen (64 – 41359; Median 950 pg/ml) stimmen in etwa mit den von uns gemessenen Werten überein (6,45 - 7444,92; Median 638,57 pg/ml) (Heikkinen et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Bamberg et al. veröffentlichte ebenfalls ihre Ergebnisse der gemessenen Interleukin-6-Konzentrationen im 2. Trimenon. Im Median betrug die Konzentration von Interleukin-6 im Fruchtwasser zwischen 150,5 und 339 pg/ml. Zwischen der 15+0 und 20+6. SSW konnte keine signifikante Konzentrationsänderung nachgewiesen werden (Bamberg et al., 2011).

Vergleicht man die veröffentlichten Daten mit unseren, kommt man zu dem Schluss, dass keine Studiengruppe bisher einen Zusammenhang zwischen Interleukin-6-Expression und dem Gestationsalter bei Patientinnen mit normalem Schwangerschaftsverlauf nachweisen konnte. Aufgrund der kleinen Untersuchungszeiträume sind hier aber sicherlich noch weitere Untersuchungen notwendig.

Santhanam et al. konnten in ihren Untersuchungen wie oben gezeigt eine stetige Expression über die Schwangerschaft zeigen. Am Ende der Schwangerschaft zeigte sich, dass Frauen mit aktiver Wehentätigkeit signifikant höhere IL-6-Konzentrationen im Fruchtwasser aufwiesen, als Frauen mit gleichem Gestationsalter ohne Wehentätigkeit (Santhanam et al., 1991). Der Anstieg der IL-6-Expression wird mit der Initiierung der Wehentätigkeit im Rahmen der Geburt in Verbindung gebracht. Opsjln et al. konnten ebenfalls eine stetige IL-6-Expression über die Schwangerschaft mit Anstieg unter Wehentätigkeit zeigen. Sie postulierten für das 1. Trimenon IL-6-Werte <15 pg/ml mit Anstieg auf 487 pg/ml im 2. Trimenon. Frauen im 3. Trimenon ohne Wehentätigkeit zum Geburtstermin zeigten Werte von 399 pg/ml. Die Arbeitsgruppe konnte also ebenfalls keinen Anstieg der Zytokinexpression im 3. Trimenon verglichen mit dem 2. Trimenon nachweisen. Lediglich unter Wehentätigkeit stiegen die Werte auf 4800 pg/ml an (Opsjln et al., 1993).

Wir konnten signifikant höhere Zytokinkonzentrationen in der Gruppe „Spontangeburt“

verglichen mit der Gruppe „Sectiones“ nachweisen. Dies scheint auf den ersten Blick durch die aktive Wehentätigkeit bedingt zu sein. Andrews et al. konnten in ihrer Arbeit bei Frauen mit vorzeitiger Wehentätigkeit vor der abgeschlossenen 34. SSW signifikant höhere Interleukin-6-Konzentrationen im Fruchtwasser nachweisen als bei vorzeitiger Wehentätigkeit nach abgeschlossener 34. SSW. Bei Patientinnen ohne Wehentätigkeit waren diese signifikanten Unterschiede nicht nachweisbar (Andrews et al., 1995). Auch Hillier et al. wiesen bei Patientinnen mit vorzeitiger Wehentätigkeit vor Abschluss der 34. SSW erhöhte Interleukin-6-Konzentrationen verglichen mit Patientinnen mit vorzeitiger Wehentätigkeit nach der 34. SSW nach (Hillier et al., 1993). In Zusammenschau unserer Ergebnisse und verschiedener Studien anderer Autoren lässt sich schließen, dass Wehentätigkeit einen positiven Einfluss auf die Expression von Interleukin-6 im Fruchtwasser hat und die Expression je nach Schwangerschaftsalter unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Neben der Expression von IL-6 hat uns und andere Arbeitsgruppen auch die Frage nach der physiologischen Expression des Zytokins IL-1 β während der Schwangerschaft beschäftigt. Wir konnten eine vermehrte Expression mit größerer Spannweite der Konzentrationen im 3. Trimenon zeigen. Betrachtet man allerdings die dazugehörigen Medianwerte, so zeigt sich mit einer Mediankonzentration von 20,27 pg/ml keine signifikant höhere Expression gegenüber dem Medianwert im 2. Trimenon von 16,51 pg/ml. Der von uns ermittelte Wert im 2. Trimenon deckt sich annähernd mit der Konzentration im Fruchtwasser, die von der Arbeitsgruppe um Perni et al. publiziert wurde. Sie untersuchten Fruchtwasserproben im 2. Trimenon auf deren Zytokingehalt und erhielten für IL-1 β Konzentrationen von <1 pg/ml bis 65,3 pg/ml (Perni et al., 2004). Romero et al. konnten erhöhte IL-1 β Konzentrationen im Fruchtwasser von Frauen im 3. Trimenon verglichen mit gemessenen Konzentrationen von Patientinnen im 2. Trimenon zeigen (Romero et al., 1989). Die steigende Zytokinexpression über die Schwangerschaft konnten wir nur bedingt bestätigen. Fruchtwasserproben des 2. Trimenons zeigten bei uns Werte von 11,56 pg/ml bis 69,54 pg/ml, im 3. Trimenon erhielten wir Messwerte zwischen 2,01 pg/ml und 8048 pg/ml.

Neben den bereits erwähnten Zytokinen IL-6 und IL-1 β untersuchten wir auch die Expression von Interleukin-15 während der Schwangerschaft. Im Gegensatz zu beiden anderen Zytokinen ist die Studienlage diesbezüglich allerdings schlecht. Eine Gruppe, die sich u.a. mit Interleukin-15 im Fruchtwasser beschäftigte, war die Arbeitsgruppe um Fortunato et al., die eine Expression von IL-15 im Fruchtwasser bei Patientinnen mit normaler Schwangerschaft nachweisen konnten (Fortunato et al., 1998). Die Arbeitsgruppe um Heikkinen untersuchte

die Konzentration von IL-15 im Fruchtwasser von schwangeren Patientinnen im 2. Trimenon und publizierte eine Mediankonzentration von 47 pg/ml (Heikkinen et al., 2001). Diese Werte konnten auch durch unsere Arbeit bestätigt werden – wir erhielten einen Medianwert von 11,84 pg/ml bei einer Spannweite zwischen 1,33 pg/ml und 92,78 pg/ml. Aufgrund des begrenzten Untersuchungszeitraums ist von Heikkinen allerdings kein Verlauf über die Schwangerschaft abzuleiten.

Chow et al. bestimmten ebenfalls die Konzentrationen verschiedener Zytokine im Fruchtwasser von Frauen im 2. Trimenon. IL-15 war nur in 33% der Fälle nachweisbar, die Arbeitsgruppe publizierte einen Wert von 0,15 pg/ml – 14,73 pg/ml (Median 4,19 pg/ml) – das entspricht in etwa unseren Messwerten (Chow et al., 2008).

Im Gegensatz zu den gerade erwähnten Arbeitsgruppen konnten Searle et al. keine IL-15-Expression in Fruchtwasserproben von Schwangeren im 2. Trimenon zeigen (Searle et al., 2000). Letztlich scheint sowohl aufgrund der Arbeiten um Heikkinen, Fortunato und Chow als auch aufgrund unserer Arbeit eine Expression von Interleukin-15 während der Schwangerschaft physiologisch zu sein.

Es gibt bis dato nur wenige Untersuchungen zur Expression des Zytokins IP-10 im Fruchtwasser. Die Arbeitsgruppe um Chow et al. bestimmte neben IL-15 auch die Fruchtwasserkonzentration von IP-10 im 2. Trimenon. Die gemessenen Konzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 155,21 pg/ml und 3640,33 pg/ml bei einem ermittelten Medianwert von 861,04 pg/ml (Chow et al., 2008). Unsere ermittelten Werte zwischen 0,48 pg/ml und 32366,32 (Median 1042,5 pg/ml) stimmten im Medianwert in etwa mit denen von Chow et al. überein.

Gotsch et al. bestimmten die IP-10-Konzentration von Schwangeren im Serum und ermittelten Werte zwischen 40,7-1314,3 pg/ml (Median: 116,1 pg/ml) (Gotsch et al., 2007). Da Zytokine allerdings nicht plazentagängig sind, können Serum- und Fruchtwasserwerte nicht miteinander verglichen werden. Unter Berücksichtigung der von Chow et al. publizierten Ergebnisse und unseren gemessenen Werten denken wir an eine physiologische Expression von IP-10 während des 2. Trimenons in das Fruchtwasser.

Inwiefern das fetale Geschlecht die Expression eines Zytokins im Fruchtwasser beeinflussen kann, wurde 2004 in einer Arbeit von Poggi et al. gezeigt werden. Neben den Zytokinen IL-6 und IL-10 wurde das Pro-Angiogene-Zytokin Angiogenin im Fruchtwasser im 2. Trimenon bei 78 schwangeren Patientinnen untersucht. Bei Schwangeren mit männlichen Feten zeigten sich signifikant niedrigere Konzentrationen als bei Schwangeren mit weiblichen Feten

($p=0,007$) (Poggi et al., 2004). Hinsichtlich des fetalen Geschlechtes konnten wir zeigen, dass die Expression von Interleukin-6 während der Schwangerschaft unabhängig von diesem Faktor zu sein scheint. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede ($p=0,19$) der Zytokinexpression in Zusammenhang mit dem fetalen Geschlecht nachweisen. Auch Poggi et al. konnten keinen signifikanten Konzentrationsunterschied bei männlichen und weiblichen Feten im Fruchtwasser feststellen ($p=0,4$) (Poggi et al., 2004). Bestätigt werden unsere Ergebnisse auch durch eine aktuelle Studie um die Arbeitsgruppe von Bamberg et al.. Sie konnte keinen signifikanten Konzentrationsunterschied von Interleukin-6, neben den ebenfalls untersuchten Zytokinen IL-8, TNF- α und dem Akute-Phase-Protein Lipopolysaccharid-Binde-Protein LPB bei männlichen und weiblichen Feten im Schwangerschaftsverlauf zeigen (Bamberg et al., 2011).

Laut unseren Ergebnissen scheint das fetale Geschlecht im Schwangerschaftsverlauf ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression der Zytokine IL-15, pro-IL-1 β und IP-10 zu haben. Valide Vergleichsdaten liegen hierzu allerdings bisher nicht vor, so dass hier sicherlich noch weitere Untersuchungen nötig sind.

Neben dem Schwangerschaftsalter und dem fetalen Geschlecht untersuchten wir auch den Einfluss des maternalen Alters auf die Zytokinexpression. Eine Studie von Chow et al. zeigte, dass der Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist mit steigendem maternalen Alter vermehrt exprimiert wird. Aufgrund dieser Beobachtung haben wir die untersuchten Zytokine mit dem mütterlichen Alter korreliert. Anhand unserer Ergebnisse ist anzunehmen, dass das Alter der Mutter keinen Einfluss auf die Expression von IL-6, IL-15, pro-IL-1 β und IP-10 nimmt.

4.2 Interleukine als Infektionsmarker?

Die Frühgeburtsraten konnten in den letzten Jahren weltweit trotz modernerer Medizin und fortschreitender Forschung nicht gesenkt werden. Sie sind sogar leicht gestiegen (Goldenberg et al., 2008).

Eine Ursache der Frühgeburtsrate ist die ärztliche Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung Verdacht auf ein inflammatorisches Geschehen in utero. Die Therapie der Wahl bei Anhalt auf eine intrauterine Infektion ist und bleibt die Entbindung. Einerseits kann hierdurch ein Übergreifen der Infektion auf das Kind in vielen Fällen vermieden werden. Andererseits erkaufte man sich in vielen Fällen die oft weitreichenden Folgen einer Frühgeburtsrate. Aus diesem Grund ist eine sichere Diagnostik einer proinflammatorischen Situation in utero unerlässlich.

Die Möglichkeiten im klinischen Alltag stützen sich bisher auf klinische Parameter wie mütterliches Fieber, Wehentätigkeit, fetale Tachykardie und ansteigende Infektparameter wie Leukozyten und das C-reaktive Protein.

Diese sind aber nur sehr unspezifisch und müssen nicht ausschließlich durch eine intrauterine Infektion bedingt sein - bei einer möglichen asymptomatischen Infektion können diese sogar gänzlich fehlen.

Romero et al. konnten zeigen, dass diese Infektparameter bei Frauen mit bakteriologisch positiven Fruchtwasserkontrollen nur in 12,5% (n=24) der Fälle erhöht waren. Dies zeigt, wie unzureichend klinische Infektionsparameter eine Aussage über eine mögliche Infektion in utero zulassen.

Tests zur frühzeitigen Diagnostik einer intrauterinen Infektion wurden von vielen Gruppen erforscht. Die verschiedenen Untersuchungen konzentrierten sich u.a. auf die Konzentrationsmessung der Leukozytenesterase und (Romero et al., 1988) Glukosekonzentration im Fruchtwasser (Romero et al., 1990) oder Gramfärbung (Romero et al., 1988; Riggs et al., 1998). Nachteilig an diesen diagnostischen Methoden ist die begrenzte Sensitivität und Spezifität.

Diese Problematik macht die Suche nach neuen Methoden zur Infektionsdiagnostik nötig. In der Vergangenheit ist zunehmend das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 in den Vordergrund gerückt.

Aufgrund der Annahme, IL-6 spiele eine wichtige Rolle in der Induktion der CRP-Synthese, untersuchte die Arbeitsgruppe um Romero im Jahre 1990 dessen Konzentration im Frucht-

wasser, u.a. bei Patientinnen mit V.a. eine intrauterine Infektion. Mithilfe der Sandwich-ELISA-Methode wurden die IL-6-Konzentrationen im Fruchtwasser mehrerer Patientengruppen bestimmt. Eine der untersuchten Gruppen bestand aus Patientinnen, bei denen unter Frühgeburt mit noch intakten Membranen eine Amniozentese durchgeführt wurde. Unterteilt wurde diese Gruppe in Patientinnen mit vorzeitiger Wehentätigkeit, negativen Bakterienkulturen und auf Tokolyse ansprechend, Patientinnen mit vorzeitiger Wehentätigkeit, negativen Bakterienkulturen und auf tokolytische Maßnahmen nicht ansprechend sowie Patientinnen mit klinischem V. a. eine intrauterine Infektion mit nachfolgender Frühgeburt. Es zeigten sich ein um ein vielfaches erhöhter IL-6-Spiegel der Patientinnen mit V. a. ein intrauterines Infektionsgeschehen. Diese und weitere in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führten zu der These, Interleukin-6 eigne sich als Marker in der Infektionsdiagnostik (Romero et al., 1990). Greig et al. untersuchten, inwiefern eine intrauterine Infektion mit gesteigerten IL-6-Konzentrationen assoziiert ist. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Konzentrationen von über 600 pg/ml mit einer Sensitivität von 100% und Spezifität von 89% die Diagnose einer intrauterinen Infektion zulassen (Greig et al., 1993). Auch Santhanam et al. kamen zu dem Ergebnis, eine gesteigerte Expression von IL-6 sei im Rahmen einer intrauterinen Infektion nachweisbar (Santhanam et al., 1991). Die These, eine intrauterine Infektion führe zu erhöhter IL-6-Expression, wird gestützt durch die Arbeit von Hilier et al.. Sie konnten signifikant erhöhte Interleukin-6-Konzentrationen bei Patientinnen mit histologisch gesicherter Chorioamnionitis im Vergleich zu Patientinnen ohne intrauterine Infektion nachweisen (Hilier 1993). Laut einer Untersuchung von Romero zeigten Patientinnen mit subklinischer Infektion und positivem mikrobiologischem Befund signifikant erhöhte Interleukin-6-Werte im Fruchtwasser (Romero et al., 1993). Auch die Arbeitsgruppe um Hsu et al. zeigte eine erhöhte IL-6-Expression bei bakterieller Besiedelung des Fruchtwassers. Umgekehrt zeigten Patientinnen mit den klinischen Symptomen eines AIS, aber ohne Nachweis von Bakterien neben anderen untersuchten Zytokinen signifikant niedrigere IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu Patientinnen mit mikrobiologisch bestätigter intrauteriner Infektion (Hsu et al., 1998; Hsu et al., 1998).

Auch die Arbeitsgruppe um Andrews et al. konnte zeigen, dass eine positive Fruchtwasserkultur mit erhöhten IL-6 Werten einhergeht. Sie verweisen aber auf den Punkt, dass eine bakterielle Besiedelung abhängig vom Ort der Infektion ist (Andrews et al., 1995). Dies wird im Verlauf noch genauer betrachtet.

In Zusammenschau der aufgeführten Arbeiten handelt es sich bei dem Zytokin Interleukin-6 um einen Marker, dessen Etablierung für die Diagnostik einer proinflammatorischen Situation in utero sinnvoll erscheint. Trotz signifikant erhöhter Konzentrationen in vorangegangenen

Studien wurden aber auch Ergebnisse veröffentlicht, die den Nutzen dieses Markers relativieren mögen.

So ist die Interleukin-6-Expression laut einigen Autoren abhängig von der Bakteriengattung. Auch wird die These vertreten, nicht jeder Erreger löse eine gesteigerte Expression aus. Während *Ureaplasma urealyticum* zu hoher IL-6-Expression führt (Yoon et al., 1998; Bashiri et al., 1999), zeigt die Besiedlung der Fruchthöhle mit grampositivem *Bacillus* und *Staphylococcus epidermidis* wesentlich niedrigere Konzentrationen dieses Zytokins (Bashiri et al., 1999). Reisenberger et al. stimulierten Amnionzellen in vitro mit verschiedenen Mikroorganismen und verglichen die Zytokinkonzentrationen im Gewebe vor und nach Versuchsdurchführung. Hierfür wurde Amniongewebe von 3 Patientinnen gewonnen, kurz bevor diese per Sectio caesaria entbunden wurden und bevor Anzeichen einer Wehentätigkeit vorlagen, um die gemessenen Zytokinkonzentrationen nicht zu verfälschen. Gewebe, das mit *E.coli* Bakterien stimuliert wurde, zeigte höhere, jedoch nicht statistisch signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu nicht-stimuliertem Kontrollgewebe. Gleichzeitig zeigte sich eine gesteigerte Konzentration des Prostaglandins E2. Auch die Stimulierung mit *B. fragilis* zeigte eine gesteigerte IL-6-Konzentration im Gewebe, zur Erhöhung des Prostaglandin E2-Spiegels kam es hier allerdings nicht. Unter *M. hominis*-Stimulation kam es weder zu einem IL-6-Anstieg noch zu einer Konzentrationserhöhung von Prostaglandin E2. Auch unter *S. aureus* kam es zu keiner Aktivierung von IL-6 (Reisenberger et al., 1998). Eine vorausgegangene Untersuchung von Reisenberger et al. konnte allerdings einen signifikanten Anstieg von Interleukin-6 als Folge einer Stimulation des Amniongewebes mit *S. agalactiae* zeigen (Reisenberger et al., 1997). Dies führt zur Überlegung, dass trotz bakterieller Besiedlung oder intrauteriner Infektion normale Interleukin-6-Werte im Fruchtwasser vorliegen können und deckt sich insofern mit unseren Ergebnissen, als dass unsere bestimmten IL-6-Werte bei Patientinnen mit dem klinischen Verdacht auf eine intrauterine Infektion nicht signifikant erhöht waren.

Können also trotz einer vorhandenen proinflammatorischen Situation normale IL-6-Konzentrationen im Fruchtwasser vorliegen? Betrachtet man die Arbeit von Andrews et al. aus dem Jahre 1995 genauer, muss man diese Frage durchaus mit „Ja“ beantworten. In der von ihm veröffentlichten Arbeit wurde unter sterilen Bedingungen im Rahmen einer Kaiserschnittentbindung Chorioamnion und Fruchtwasser von 269 Patientinnen gewonnen. Es wurden jeweils Chorioamnion und per Amnionzentese gewonnenes Fruchtwasser getrennt kultiviert und mithilfe eines ELISA-Verfahrens die Interleukin-6-Konzentration bestimmt.

Im Vergleich der IL-6-Konzentrationen zeigte sich u.a., dass bei Patientinnen ohne positiven Kulturnachweis im Fruchtwasser, aber positiver Kultur des Chorioamnions die IL-6-Konzentration signifikant erhöht war. Interessanterweise zeigten sich bei den Fällen, bei denen die Kultur des Chorioamnions negativ und die Fruchtwasserkultur positiv war – neben der Gruppe mit sowohl negativem Chorioamnion als auch negativer Fruchtwasserkultur - die niedrigsten IL-6-Konzentrationen. Hieraus lässt sich schließen, dass trotz einer proinflammatorischen Situation im Fruchtwasser nicht unbedingt erhöhte IL-6-Werte zu erwarten sind. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen. Patientinnen aus unserem Kollektiv mit dringendem V.a. eine intrauterine Infektion zeigten keine signifikante IL-6-Erhöhung im Fruchtwasser gegenüber den Kontrollgruppen. Ein sich ergebender Schwachpunkt könnte sein, dass je nach Ort der Infektion unterschiedliche Werte vorliegen und im klinischen Alltag möglicherweise innerhalb eines definierten Referenzbereichs liegen können.

Die Beobachtungen von Hillier und Andrews, IL-6 sei auch bei Patientinnen vor Abschluss der 34. Schwangerschaftswoche ohne Anhalt für eine Infektion erhöht, zeigt, dass nicht zwangsläufig eine intrauterine Infektion vorliegen muss. Es zeigt aber auch, dass Interleukin-6 als Marker für eine drohende Frühgeburtlichkeit – infektionsunabhängig – geeignet zu sein scheint (Hillier et al., 1993; Andrews et al., 1995). Wie aber ist einzuschätzen, ob zeitgleich eine intrauterine Infektion vorliegt, die eine Beendigung der Schwangerschaft als Konsequenz nach sich zieht?

Zusammenfassend wurden einige positive Ergebnisse veröffentlicht, die nahelegen, Interleukin-6 zur Diagnostik einer intrauterinen Infektion im klinischen Alltag als sensitiven und spezifischen Marker zu etablieren. Unsere Untersuchungen konnten dies nicht bestätigen. Als Konsequenz aus einigen Faktoren, die die Interleukin-6-Expression zu beeinflussen scheinen, ist es sinnvoll, in Zukunft auch andere Biomarker auf ihre Aussagekraft bezüglich einer proinflammatorischen Situation in utero zu untersuchen. Die weiteren von uns untersuchten Biomarker sollen im Folgenden mit bereits veröffentlichten Ergebnissen diskutiert werden.

Neben der Konzentrationsbestimmung von Interleukin-6 haben wir auch das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) im Fruchtwasser untersucht.

IL-1 β wurde von vielen Forschungsgruppen hinsichtlich der Beteiligung an der Auslösung der Wehentätigkeit und der Abwehr intrauteriner Infektionen untersucht. Als Subtyp des Zytokins IL-1, dessen Synthese sowohl auf Transkriptions – als auch Translationsebene reguliert wird (Mitchell et al., 1993) spielt es in der feto-maternalen Einheit eine große Rolle als regulierendes Zytokin. Als Hauptbildungsort von IL-1 β werden aktivierte Makrophagen angesehen, die während der Schwangerschaft in die Dezidua einwandern (Nehemiah et al., 1981).

Zusätzlich wird IL-1 β von Stromazellen der Dezidua freigesetzt (Romero et al., 1991; Semer et al., 1991). Versuche zeigten, dass IL-1 β imstande ist, die Cyclooxygenase-2 zu aktivieren, über die es zu einer vermehrten Ausschüttung des wehenauslösenden Prostaglandins E2 kommt (Romero et al., 1989; Cole et al., 1995; Friebe-Hoffmann et al., 2007). Unterstützend wirkt sich die Eigenschaft aus, die Sensibilität des Gewebes hinsichtlich Oxytozin zu erhöhen, wodurch die Wehentätigkeit unterstützt wird (Fuchs, 1987).

Bezüglich der Beteiligung an der Abwehr intrauteriner Infektionen herrscht ein breiter Konsens über eine wichtige Rolle des Interleukin-1, speziell des von uns untersuchten Untertyps IL-1 β .

Kommt es zur bakteriellen Invasion der Fruchthöhle, wird IL-1 β verstärkt als Antwort auf bakterielle Produkte wie LPS durch Deziduazellen exprimiert (Casey et al., 1989). Die Synthese humaner Betadefensine (human beta defensins, HBD) im Fruchtwasser während der Schwangerschaft (Zhang et al., 2001) wird von IL-1 β beeinflusst. Stock et al. zeigten dies in einer Untersuchung, bei der Amnionzellen kultiviert und anschließend mit rekombinantem humanem IL-1 β inkubiert und als Folge eine verstärkte Expression von HBD-1 und HBD-2 beobachtet wurde (Stock et al., 2007). Zhang et al. zeigten weiterhin, dass die Expression der ebenfalls für die Infektabwehr bedeutende Sekretorische Leukozytenesterase Inhibitor (SLPI) neben IL-1 α und TNF α auch durch IL-1 β reguliert wird (Zhang et al., 2001).

Die Annahme, IL-1 β sei in Fruchtwasserproben von Patienten mit intrauteriner Infektion im Vergleich zu Patientinnen ohne Infektion gesteigert, konnte bei unseren Versuchen bestätigt werden. Es zeigten sich signifikant erhöhte Zytokinkonzentrationen ($p=0,01$).

Dies steht in Einklang mit verschiedenen Untersuchungen, die sich mit IL-1 β -Konzentrationen bei intrauteriner Infektion beschäftigten. In einer Studie von Mitchell et al. konnten im Fruchtwasser signifikant höhere IL-1-Spiegel bei Frauen mit vorzeitiger Wehentätigkeit und intrauteriner Infektion im Vergleich zu Frauen ohne Wehentätigkeit und ohne Infekt gezeigt werden. Auch die Beteiligung an der Auslösung der Wehentätigkeit konnte indirekt gezeigt werden, da bei Frauen mit Wehentätigkeit ohne Infektion ebenfalls erhöhte IL-1-Konzentrationen nachweisbar waren (Mitchell et al., 1993). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Puchner et al. konnte ebenfalls signifikant erhöhte IL-1 β Konzentrationen im Fruchtwasser von Patientinnen mit vorzeitiger Wehentätigkeit nachweisen und schlugen IL-1 β als Marker für ein erhöhtes Risiko einer Frühgeburt vor (Puchner et al., 2011). Romero et. al konnten signifikant erhöhte IL-1 β -Konzentrationen im Fruchtwasser bei Frauen mit intrauteriner Infektion (und positiven mikrobiologischen Kulturen) zeigen (Romero et al., 1989; Romero et al., 1992). Auch Hilier et al. wiesen signifikant erhöhte IL-1 β -Konzentrationen im

Fruchtwasser bei Patientinnen mit Chorioamnionitis nach. Diese und unsere Daten könnten an einen geeigneten Marker in der Diagnostik einer intrauterinen Infektion denken lassen. Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sind diesbezüglich notwendig.

Wie unter Abschnitt 4.1 erläutert, konnten wir eine Expression von Interleukin-15 unter physiologischen Bedingungen – d.h. einer Schwangerschaft ohne Infektionsnachweis und ohne vorliegende Wehentätigkeit – zeigen. Diese Ergebnisse stimmten auch mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Chow überein (Chow et al., 2008). Eine signifikant erhöhte Expression unter Infektionsbedingungen konnten wir in unserer Studie allerdings nicht nachweisen. Bestätigt werden unsere Ergebnisse durch eine Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Fortunato aus dem Jahre 1998, die untersuchten, inwiefern es zu einer gesteigerten Expression von IL-15 in amniochoralem Gewebe nach LPS-Stimulation kommt. Auch sie konnten keine signifikant gesteigerte Zytokinexpression nachweisen. Sowohl unsere Ergebnisse als auch die Arbeit um Fortunato lassen die Überlegung zu, dass Interleukin-15 im klinischen Alltag nicht als Marker einer intrauterinen Infektion geeignet ist (Fortunato et al., 1998).

Hinsichtlich des Zytokins IP-10 zur Diagnostik einer intrauterinen Infektion ist die Studienlage bisher schlecht. Als Mitglied der CXC-Familie (Neville et al., 1997) besitzt IP-10 proinflammatorische Eigenschaften und spielt eine Rolle bei der Angiogenese (Strieter et al., 1995). Weiterhin ist es an der Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse beteiligt (Rosenkilde et al., 2004). In einer Publikation der Arbeitsgruppe um Gomez-Lopez et al. wird ein Modell des inflammatorischen Milieus vorgeschlagen, das zur Auslösung der Wehentätigkeit führt und verschiedene Chemokine berücksichtigt (Gomez-Lopez et al., 2010). Auch sie ordnen CXCL10/IP-10 als wichtigen Mediator zur Anlockung von Leukozyten ein. Dieses Modell zusammen mit der Erkenntnis, die Synthese von CXCL10/IP-10 werde neben IFN-gamma und TNF- α auch von mikrobiologischen Produkten induziert (Gasper et al., 2002), führte uns zur These, eine gesteigerte Expression liege auch im Rahmen einer intrauterinen Infektion vor.

Unsere Arbeitsgruppe ist eine der ersten, die sich mit dem prädiktiven Wert von CXCL10/IP-10 für die Vorhersage eines Amnioninfektionssyndroms befasst hat. Die gewonnenen Ergebnisse konnten unserer Hypothese allerdings nicht bestätigen. Wir konnten keine signifikant gesteigerten Konzentrationen im Fruchtwasser bei Patientinnen mit V.a. Amnioninfektionssyndrom feststellen. Zwar scheint die Expression von CXCL10/IP-10 im Rahmen einer Entzündungsreaktion regelmäßig vorhanden, allerdings reichen die Konzentrationen nicht aus, um sie als Marker einer intrauterinen Infektion zu verwenden.

4.3 Ausblick

Die Suche nach geeigneten Markern zur sicheren und frühzeitigen Diagnose eines Amnioninfektionssyndroms gestaltet sich bis heute schwierig. Sensitive und spezifische Marker einer intrauterinen Infektion sind notwendig, um potenzielle nachfolgende Komplikationen für Mutter und Kind vermeiden zu können. In zahlreichen Studien wurden verschiedenste Ansätze zur Etablierung geeigneter Infektionsmarker untersucht.

Die von uns erzielten Ergebnisse betreffend der Aussagekraft einer intrauterinen Infektion durch die Zytokine IL-6, IL-15, IL-1 β und CXCL10/IP-10 konnten vorher publizierte Arbeiten teilweise bestätigen, teilweise deckten sich unsere Erkenntnisse nicht mit denen anderer Arbeitsgruppen. Viele Untersuchungen zeigten, dass IL-6 im Rahmen eines intrauterinen Infektionsgeschehens signifikant höher exprimiert wird als bei unauffälligen Schwangerschaften zum gleichen Zeitpunkt. Dies konnten wir aufgrund unserer Ergebnisse nicht bestätigen. Die Bestimmung der Fruchtwasserkonzentration des Zytokins IL-1 β als neuer Ansatz in der Infektionsdiagnostik ist laut unserer und anderer aufgezeigter Studien zwar vielversprechend, sollte aber in folgenden Studien weiter untersucht werden, bis eine klare Studienlage verfügbar ist.

Ebenso sollte das Ziel verfolgt werden, in weiteren Studien andere, geeignete Zytokinkombinationen ausfindig zu machen, um sowohl klinisch auffällige als auch subklinische Infektionen frühzeitig diagnostizieren zu können.

Aufgrund der Invasivität der Amniozentese und der verbundenen Risiken sollte der Fokus in Zukunft vermehrt auf verfügbare Marker im Serum gelegt werden. Eine spezifische und sensitive Methode ist allerdings noch nicht etabliert.

5 Zusammenfassung

Infektionen werden als Hauptursache für die Entwicklung vorzeitiger Wehentätigkeit mit nachfolgender Frühgeburtlichkeit angesehen. Durch eine ascendierende Infektion kann sich eine intrauterine Infektion ausbilden, welche einen akuten Gefahrenzustand für Mutter und Kind darstellt. Eine frühzeitige Diagnose ist anhand klinischer Zeichen und laborchemischer Parameter wie CRP nicht immer sicher möglich. Die Parameter sind zu unspezifisch und bei subklinischen Infektionen nicht vorhanden. Durch die vorzeitige Schwangerschaftsbeendigung lassen sich zwar mögliche infektionsbedingte Gefahren für Mutter und Kind reduzieren, doch sind die Patienten häufig mit den Folgen einer Frühgeburt konfrontiert. Eine möglichst spezifische und sensitive Diagnostik hätte also den Vorteil, die Rate an durch den Geburtshelfer verursachten Frühgeburtlichkeit und die Morbidität für Mutter und Kind zu senken.

In dieser Arbeit wurden die Zytokine IL-6, IL-15, Pro-IL1 β und CXCL10/IP-10 auf ihre Konzentration im Fruchtwasser bei Patientinnen mit Anhalt auf eine intrauterine Infektion und bei Patientinnen ohne Infektionsanhalt untersucht.

Hierfür schlossen wir insgesamt 215 Patientinnen ein und unterteilten diese in folgende Gruppen: Fruchtwasser, das im Rahmen einer Amniozentese gewonnen wurde, teilten wir der Gruppe „Amniozentesen“ (n=81) zu. Während der Geburt entnommene Fruchtwasserproben teilten wir je nach Geburtsmodus den Gruppen „Spontangeburt“ (n=20) – im Rahmen einer Spontangeburt durch Amniotomie - oder „Sectiones“ (n=101) – im Rahmen einer operativen Entbindung - zu. Die vierte Gruppe wurde gebildet aus Fruchtwasserproben, die wir im Rahmen einer Amniozentese bei Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom erhielten (n=13). Bezüglich der Konzentrationen im Fruchtwasser konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit Infektionsverdacht und den Kontrollgruppen für die Zytokine IL-6, IL-15 und CXCL10/IP-10 nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied ergab sich lediglich für das Zytokin Pro-IL-1 β . Auch konnten unsere Untersuchungen zeigen, dass die Zytokinexpression von den Faktoren „maternales Alter“, „Gestationsalter“ und „fetales Geschlecht“ unabhängig ist.

Zusammenfassend könnte sich Pro-IL-1 β als Infektionsmarker eignen. Hierzu sollten in Zukunft aber noch weitere Studien mit größerem Patientenkollektiv durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Andrews, W. W., J. C. Hauth, R. L. Goldenberg, R. Gomez, R. Romero and G. H. Cassell (1995). "Amniotic fluid interleukin-6: correlation with upper genital tract microbial colonization and gestational age in women delivered after spontaneous labor versus indicated delivery." Am J Obstet Gynecol **173**: 606-612.
2. Bamberg, C., C. Fotopoulou, M. Linder, C. C. Roehr, J. W. Dudenhausen, W. Henrich and K. Kalache (2011). "Mid-trimester amniotic fluid concentrations of the proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, TNF-alpha, and lipopolysaccharide binding protein in normal pregnancies: a prospective evaluation according to parity, gestational age, and fetal gender." J Perinat Med **39**: 403-409.
3. Bashiri, A., S. Horowitz, M. Huleihel, R. Hackmon, D. Dukler and M. Mazor (1999). "Elevated concentrations of interleukin-6 in intra-amniotic infection with *Ureaplasma urealyticum* in asymptomatic women during genetic amniocentesis." Acta Obstet Gynecol Scand **78**: 379-382.
4. Belardelli, F. (1995). "Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response." APMIS **103**: 161-179.
5. Berger, R. and Y. Garnier (1999). "Pathophysiology of perinatal brain damage." Brain Res Brain Res Rev **30**: 107-134.
6. Berkowitz, G. S., C. Blackmore-Prince, R. H. Lapinski and D. A. Savitz (1998). "Risk factors for preterm birth subtypes." Epidemiology **9**: 279-285.
7. Bratlid, D. and T. Lindback (1978). "Bacteriolytic activity of amniotic fluid." Obstet Gynecol **51**: 63-66.
8. Briese, V. (1999). "Chorioamnionitis." 507-511.
9. Briese, V. (1999). "Amnioninfektionssyndrom." Gynäkologe **32**: 507-511.
10. Brown, N. L., S. A. Alvi, M. G. Elder, P. R. Bennett and M. H. Sullivan (1998). "Interleukin-1beta and bacterial endotoxin change the metabolism of prostaglandins E2 and F2alpha in intact term fetal membranes." Placenta **19**: 625-630.
11. Büscher, U. (2000) "Möglichkeiten der Infektabwehr des Neugeborenen und des Feten Evaluierung der diagnostischen Mittel." 78.

12. Carson, W. E., J. G. Giri, M. J. Lindemann, M. L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenmann, K. Grabstein and M. A. Caligiuri (1994). "Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor." J Exp Med **180**: 1395-1403.
13. Casey, M. L., S. M. Cox, B. Beutler, L. Milewich and P. C. MacDonald (1989). "Cachectin/tumor necrosis factor-alpha formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor." J Clin Invest **83**: 430-436.
14. Chow, S. S., M. E. Craig, C. A. Jones, B. Hall, J. Catteau, A. R. Lloyd and W. D. Rawlinson (2008). "Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection." Cytokine **44**: 78-84.
15. Cole, O. F., H. Seki, M. G. Elder and M. H. Sullivan (1995). "Interleukin-1 beta independently stimulates production of prostaglandin E2 and cyclic AMP from human decidual cells." Biochim Biophys Acta **1269**: 139-144.
16. Dammann, O., K. C. Kuban and A. Leviton (2002). "Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **8**: 46-50.
17. Dewald, B., B. Moser, L. Barella, C. Schumacher, M. Baggiolini and I. Clark-Lewis (1992). "IP-10, a gamma-interferon-inducible protein related to interleukin-8, lacks neutrophil activating properties." Immunol Lett **32**: 81-84.
18. Dildy, G. A., M. D. Pearlman, L. G. Smith, G. Tortolero-Luna, S. Faro and D. B. Cotton (1994). "Amniotic fluid glucose concentration: a marker for infection in preterm labor and preterm premature rupture of membranes." Infect Dis Obstet Gynecol **1**: 166-172.
19. Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." Chest **118**: 503-508.
20. Driggers, D. A., F. Deiss, J. Swedberg, R. B. Johnson and J. F. Steiner (1985). "Neonatal sepsis." Am Fam Physician **32**: 129-134.
21. Dudley, D. J., M. S. Trautman, B. A. Araneo, S. S. Edwin and M. D. Mitchell (1992). "Decidual cell biosynthesis of interleukin-6: regulation by inflammatory cytokines." J Clin Endocrinol Metab **74**: 884-889.
22. Eklind, S., C. Mallard, A. L. Leverin, E. Gilland, K. Blomgren, I. Mattsby-Baltzer and H. Hagberg (2001). "Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury." Eur J Neurosci **13**: 1101-1106.

23. El-Bastawissi, A. Y., M. A. Williams, D. E. Riley, J. Hitti and J. N. Krieger (2000). "Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review." Obstet Gynecol **95**: 1056-1064.
24. Esplin, M. S., E. O'Brien, A. Fraser, R. A. Kerber, E. Clark, S. E. Simonsen, C. Holmgren, G. P. Mineau and M. W. Varner (2008). "Estimating recurrence of spontaneous preterm delivery." Obstet Gynecol **112**: 516-523.
25. EU_Benchmarking_report (2010). "EU Benchmarking report 2009/2010."
26. Figueroa-Damian, R., J. L. Arredondo-Garcia and J. Mancilla-Ramirez (1999). "Amniotic fluid interleukin-6 and the risk of early-onset sepsis among preterm infants." Arch Med Res **30**: 198-202.
27. Fortunato, S. J., R. Menon and S. J. Lombardi (1998). "IL-15, a novel cytokine produced by human fetal membranes, is elevated in preterm labor." Am J Reprod Immunol **39**: 16-23.
28. Fortunato, S. J., R. P. Menon, K. F. Swan and R. Menon (1996). "Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 and 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations." Am J Obstet Gynecol **174**: 1855-1861; discussion 1861-1852.
29. Friebe-Hoffmann, U., D. M. Baston, T. K. Hoffmann, J. P. Chiao and P. N. Rauk (2007). "The influence of interleukin-1beta on oxytocin signalling in primary cells of human decidua." Regul Pept **142**: 78-85.
30. Friese, K. (2003). "The role of infection in preterm labour." BJOG **110 Suppl 20**: 52-54.
31. Fuchs, A. R. (1987). "Prostaglandin F2 alpha and oxytocin interactions in ovarian and uterine function." J Steroid Biochem **27**: 1073-1080.
32. Garnier, G., Berger (2004). "Perinatale Hirnschädigung: Bedeutung der intrauterinen Infektion." Geburtshilfe und Frauenheilkunde **64**: 464-472.
33. Gasper, N. A., C. C. Petty, L. W. Schrum, I. Marriott and K. L. Bost (2002). "Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4." Infect Immun **70**: 4075-4082.
34. Goldenberg, R. L. and D. J. Rouse (1998). "Prevention of premature birth." N Engl J Med **339**: 313-320.

35. Goldenberg, R. L., J. F. Culhane, J. D. Iams and R. Romero (2008). "Epidemiology and causes of preterm birth." Lancet **371**: 75-84.
36. Gomez, R., R. Romero, F. Ghezzi, B. H. Yoon, M. Mazon and S. M. Berry (1998). "The fetal inflammatory response syndrome." Am J Obstet Gynecol **179**: 194-202.
37. Gomez-Lopez, N., E. Laresgoiti-Servitje, D. M. Olson, G. Estrada-Gutierrez and F. Vellido-Ortega (2010). "The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: a review." Biol Reprod **82**: 809-814.
38. Gotsch, F., R. Romero, J. Espinoza, J. P. Kusanovic, S. Mazaki-Tovi, O. Erez, N. G. Than, S. Edwin, M. Mazon, B. H. Yoon and S. S. Hassan (2007). "Maternal serum concentrations of the chemokine CXCL10/IP-10 are elevated in acute pyelonephritis during pregnancy." J Matern Fetal Neonatal Med **20**: 735-744.
39. Greig, P. C., J. M. Ernest, L. Teot, M. Erikson and R. Talley (1993). "Amniotic fluid interleukin-6 levels correlate with histologic chorioamnionitis and amniotic fluid cultures in patients in premature labor with intact membranes." Am J Obstet Gynecol **169**: 1035-1044.
40. Heikkinen, J., M. Mottonen, K. Pulkki, O. Lassila and A. Alanen (2001). "Cytokine levels in midtrimester amniotic fluid in normal pregnancy and in the prediction of pre-eclampsia." Scand J Immunol **53**: 310-314.
41. Hillier, S. L., S. S. Witkin, M. A. Krohn, D. H. Watts, N. B. Kiviat and D. A. Eschenbach (1993). "The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection." Obstet Gynecol **81**: 941-948.
42. Holst, D. and Y. Garnier (2008). "Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **141**: 3-9.
43. Hsu, C. D., E. Meaddough, S. F. Hong, K. Aversa, L. C. Lu and J. A. Copel (1998). "Elevated amniotic fluid nitric oxide metabolites and interleukin-6 in intra-amniotic infection." J Soc Gynecol Investig **5**: 21-24.
44. Hsu, C. D., E. Meaddough, K. Aversa, S. F. Hong, L. C. Lu, D. C. Jones and J. A. Copel (1998). "Elevated amniotic fluid levels of leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and interleukin 8 in intra-amniotic infection." Am J Obstet Gynecol **179**: 1267-1270.
45. Kauma, S., D. Matt, S. Strom, D. Eierman and T. Turner (1990). "Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta

- expression in endometrium, placenta, and placental membranes." Am J Obstet Gynecol **163**: 1430-1437.
46. Kiely, J. L. (1998). "What is the population-based risk of preterm birth among twins and other multiples?" Clin Obstet Gynecol **41**: 3-11.
 47. Kimberlin, D. F. and W. W. Andrews (1998). "Bacterial vaginosis: association with adverse pregnancy outcome." Semin Perinatol **22**: 242-250.
 48. Leviton, A., N. Paneth, M. L. Reuss, M. Susser, E. N. Allred, O. Dammann, K. Kuban, L. J. Van Marter, M. Pagano, T. Hegyi, M. Hiatt, U. Sanocka, F. Shahrivar, M. Abiri, D. Disalvo, P. Doubilet, R. Kairam, E. Kazam, M. Kirpekar, D. Rosenfeld, S. Schonfeld, J. Share, M. Collins, D. Genest, S. Shen-Schwarz and et al. (1999). "Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. Developmental Epidemiology Network Investigators." Pediatr Res **46**: 566-575.
 49. Martin, J. A., B. E. Hamilton, P. D. Sutton, S. J. Ventura, F. Menacker, S. Kirmeyer and M. L. Munson (2007). "Births: final data for 2005." Natl Vital Stat Rep **56**: 1-103.
 50. Marwaha, A. K., N. J. Leung, A. N. McMurchy and M. K. Levings (2012). "TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic?" Front Immunol **3**: 129.
 51. Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli and D. F. Tough (2001). "IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation." J Immunol **167**: 1179-1187.
 52. Mitchell, M. D., M. S. Trautman and D. J. Dudley (1993). "Cytokine networking in the placenta." Placenta **14**: 249-275.
 53. Monga, M. and J. D. Blanco (1995). "Intrauterine infection and preterm labor." Infect Dis Obstet Gynecol **3**: 37-44.
 54. Nehemiah, J. L., J. A. Schnitzer, H. Schulman and A. B. Novikoff (1981). "Human chorionic trophoblasts, decidual cells, and macrophages: a histochemical and electron microscopic study." Am J Obstet Gynecol **140**: 261-268.
 55. Neville, L. F., G. Mathiak and O. Bagasra (1997). "The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily." Cytokine Growth Factor Rev **8**: 207-219.

56. Opsjln, S. L., N. C. Wathen, S. Tingulstad, G. Wiedswang, A. Sundan, A. Waage and R. Austgulen (1993). "Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy." Am J Obstet Gynecol **169**: 397-404.
57. Perni, S. C., S. Vardhana, I. Korneeva, S. L. Tuttle, L. R. Paraskevas, S. T. Chasen, R. B. Kalish and S. S. Witkin (2004). "Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome." Am J Obstet Gynecol **191**: 1382-1386.
58. Petrou, S. (2005). "The economic consequences of preterm birth during the first 10 years of life." BJOG **112 Suppl 1**: 10-15.
59. Poggi, S. H., C. Y. Spong, A. Ghidini and M. Ossandon (2004). "Gender differences in amniotic fluid cytokine levels." J Matern Fetal Neonatal Med **15**: 367-371.
60. Puchner, K., C. Iavazzo, D. Gourgiotis, M. Boutsikou, S. Baka, D. Hassiakos, E. Kouskouni, E. Economou, A. Malamitsi-Puchner and G. Creatsas (2011). "Mid-trimester amniotic fluid interleukins (IL-1beta, IL-10 and IL-18) as possible predictors of preterm delivery." In Vivo **25**: 141-148.
61. R&D (2011). Quantikine ELISA Human IL-6 Immunoassay. R. D. Systems.
62. Raghupathy, R. (1997). "Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy." Immunol Today **18**: 478-482.
63. Reisenberger, K., C. Egarter, I. Schiebel, A. Obermair, H. Kiss and R. Lehner (1997). "In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cells in the presence of bacteria." Am J Obstet Gynecol **176**: 981-984.
64. Reisenberger, K., C. Egarter, M. Knofler, I. Schiebel, H. Gregor, A. M. Hirschl, G. Heinze and P. Husslein (1998). "Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria." Am J Obstet Gynecol **178**: 50-53.
65. Riggs, J. W. and J. D. Blanco (1998). "Pathophysiology, diagnosis, and management of intraamniotic infection." Semin Perinatol **22**: 251-259.
66. Roche (2006). Roche Lexikon Medizin, Urban & Fischer/Elsevier GmbH.
67. Romero, R. and M. Mazor (1988). "Infection and preterm labor." Clin Obstet Gynecol **31**: 553-584.

68. Romero, R., T. Chaiworapongsa and J. Espinoza (2003). "Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome." J Nutr **133**: 1668S-1673S.
69. Romero, R., C. Avila, U. Santhanam and P. B. Sehgal (1990). "Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection." J Clin Invest **85**: 1392-1400.
70. Romero, R., T. Chaiworapongsa, H. Kuivaniemi and G. Tromp (2004). "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 **190**: 1509-1519.
71. Romero, R., F. Gotsch, B. Pineles and J. P. Kusanovic (2007). "Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury." Nutr Rev **65**: S194-202.
72. Romero, R., M. Mazor, K. Manogue, E. Oyarzun and A. Cerami (1991). "Human decidua: a source of cachectin-tumor necrosis factor." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **41**: 123-127.
73. Romero, R., S. Durum, C. A. Dinarello, E. Oyarzun, J. C. Hobbins and M. D. Mitchell (1989). "Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion." Prostaglandins **37**: 13-22.
74. Romero, R., M. Mazor, Y. K. Wu, C. Avila, E. Oyarzun and M. D. Mitchell (1989). "Bacterial endotoxin and tumor necrosis factor stimulate prostaglandin production by human decidua." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **37**: 183-186.
75. Romero, R., Y. K. Wu, D. T. Brody, E. Oyarzun, G. W. Duff and S. K. Durum (1989). "Human decidua: a source of interleukin-1." Obstet Gynecol **73**: 31-34.
76. Romero, R., B. H. Yoon, J. S. Kenney, R. Gomez, A. C. Allison and P. B. Sehgal (1993). "Amniotic fluid interleukin-6 determinations are of diagnostic and prognostic value in preterm labor." Am J Reprod Immunol **30**: 167-183.
77. Romero, R., J. Espinoza, L. F. Goncalves, J. P. Kusanovic, L. A. Friel and J. K. Nien (2006). "Inflammation in preterm and term labour and delivery." Semin Fetal Neonatal Med **11**: 317-326.
78. Romero, R., M. Emamian, R. Quintero, M. Wan, J. C. Hobbins, M. Mazor and S. Edberg (1988). "The value and limitations of the Gram stain examination in the diagnosis of intraamniotic infection." Am J Obstet Gynecol **159**: 114-119.

79. Romero, R., M. Emamian, M. Wan, S. Yarkoni, W. McCormack, M. Mazor and J. C. Hobbins (1988). "The value of the leukocyte esterase test in diagnosing intra-amniotic infection." Am J Perinatol **5**: 64-69.
80. Romero, R., D. T. Brody, E. Oyarzun, M. Mazor, Y. K. Wu, J. C. Hobbins and S. K. Durum (1989). "Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition." Am J Obstet Gynecol **160**: 1117-1123.
81. Romero, R., M. Mazor, F. Brandt, W. Sepulveda, C. Avila, D. B. Cotton and C. A. Dinarello (1992). "Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta in preterm and term human parturition." Am J Reprod Immunol **27**: 117-123.
82. Romero, R., C. Jimenez, A. K. Lohda, J. Nores, S. Hanaoka, C. Avila, R. Callahan, M. Mazor, J. C. Hobbins and M. P. Diamond (1990). "Amniotic fluid glucose concentration: a rapid and simple method for the detection of intraamniotic infection in preterm labor." Am J Obstet Gynecol **163**: 968-974.
83. Rosenkilde, M. M. and T. W. Schwartz (2004). "The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease." APMIS **112**: 481-495.
84. Russell, R. B., N. S. Green, C. A. Steiner, S. Meikle, J. L. Howse, K. Poschman, T. Dias, L. Potetz, M. J. Davidoff, K. Damus and J. R. Petrini (2007). "Cost of hospitalization for preterm and low birth weight infants in the United States." Pediatrics **120**: e1-9.
85. Santhanam, U., C. Avila, R. Romero, H. Viguet, N. Ida, S. Sakurai and P. B. Sehgal (1991). "Cytokines in normal and abnormal parturition: elevated amniotic fluid interleukin-6 levels in women with premature rupture of membranes associated with intrauterine infection." Cytokine **3**: 155-163.
86. Sauty, A., M. Dziejman, R. A. Taha, A. S. Iarossi, K. Neote, E. A. Garcia-Zepeda, Q. Hamid and A. D. Luster (1999). "The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells." J Immunol **162**: 3549-3558.
87. Searle, R. F., S. J. Bromage, J. Palmer, J. E. Curry and A. K. Lang (2000). "Human amniotic fluid lacks interleukin-2 and interleukin-15 but can interact with the beta-chain of the interleukin-2 receptor." Immunology **99**: 411-417.
88. Semer, D., K. Reisler, P. C. MacDonald and M. L. Casey (1991). "Responsiveness of human endometrial stromal cells to cytokines." Ann N Y Acad Sci **622**: 99-110.

89. Silver, H. M. (1998). "Listeriosis during pregnancy." Obstet Gynecol Surv **53**: 737-740.
90. Smith, L. K., E. S. Draper, B. N. Manktelow, J. S. Dorling and D. J. Field (2007). "Socioeconomic inequalities in very preterm birth rates." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **92**: F11-14.
91. Stock, S. J., R. W. Kelly, S. C. Riley and A. A. Calder (2007). "Natural antimicrobial production by the amnion." Am J Obstet Gynecol **196**: 255 e251-256.
92. Strieter, R. M., P. J. Polverini, D. A. Arenberg and S. L. Kunkel (1995). "The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis." Shock **4**: 155-160.
93. Swamy, G. K., T. Ostbye and R. Skjaerven (2008). "Association of preterm birth with long-term survival, reproduction, and next-generation preterm birth." JAMA **299**: 1429-1436.
94. Tita, A. T. and W. W. Andrews (2010). "Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis." Clin Perinatol **37**: 339-354.
95. Vinocur, J. M. (2008). A sandwich ELISA. ELISA-sandwich.svg: (1) Plate is coated with a capture antibody; (2) sample is added, and any antigen present binds to capture antibody; (3) detecting antibody is added, and binds to antigen; (4) enzyme-linked secondary antibody is added, and binds to detecting antibody; (5) substrate is added, and is converted by enzyme to detectable form.
96. Xue, S., D. E. Brockman, D. M. Slater and L. Myatt (1995). "Interleukin-1 beta induces the synthesis and activity of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human amnion-derived WISH cells." Prostaglandins **49**: 351-369.
97. Yoon, B. H., R. Romero, J. S. Park, J. W. Chang, Y. A. Kim, J. C. Kim and K. S. Kim (1998). "Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments." Am J Obstet Gynecol **179**: 1254-1260.
98. Yoshikai, Y. and H. Nishimura (2000). "The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections." Microbes Infect **2**: 381-389.
99. Zhang, Q., K. Shimoya, A. Moriyama, K. Yamanaka, A. Nakajima, T. Nobunaga, M. Koyama, C. Azuma and Y. Murata (2001). "Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid." Mol Hum Reprod **7**: 573-579.

100. Zupan, V., P. Gonzalez, T. Lacaze-Masmonteil, C. Boithias, A. M. d'Allest, M. Dehan and J. C. Gabilan (1996). "Periventricular leukomalacia: risk factors revisited." Dev Med Child Neurol **38**: 1061-1067.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
BEL	Beckenendlage
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CRP	C-reaktives Protein
CTG	Kardiotokographie
EP1-Rezeptor	Prostaglandin E Rezeptor 1
FIRS	Fetal inflammatory response syndrome
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HBD	Humane Betadefensine
IFN- γ	Interferon- γ
IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding Protein 1
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
IL-15	Interleukin-15
IL-18	Interleukin-18
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
ml	Milliliter
PCR	Polymerasekettenreaktion

pg	Pikogramm
Pro-IL1 β	Pro-Interleukin-1 β
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
Spp.	Species pluralis
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Z.n.	Zustand nach

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 4-Stadien-Modell der intrauterinen Infektion nach Romero et. al (Romero et al., 2003)	9
Abbildung 2 Zeitpunkt der Fruchtwasserentnahme per Amniozentese (Häufigkeit in Prozent)	23
Abbildung 3 Zeitpunkt der Fruchtwasserentnahme per Sectio caesaria.....	25
Abbildung 4 Zeitpunkte der Spontangeburt.....	26
Abbildung 5 Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISAs, nach Jeffrey M. Vinocur (Vinocur, 2008)	29
Abbildung 6 Beispiel: Herstellung der Standardverdünnungsreihe für die Bestimmung von IL-6 (R&D, 2011)	31
Abbildung 7: Boxplot zum Vergleich von IL-6 der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrome“ (AIS). Konzentration in pg/ml	37
Abbildung 8: Boxplot zum Vergleich von IL-15 der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrome“ (AIS).	38
Abbildung 9: Boxplot zum Vergleich von pro-IL-1 β der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrome“ (AIS).	39
Abbildung 10: Boxplot zum Vergleich von CXCL10/IP-10 der Kontrollgruppe gegen „Amnioninfektionssyndrome“ (AIS); Konzentrationsangaben in pg/ml	40
Abbildung 11: ROC für Interleukin-6	41
Abbildung 12: ROC für Interleukin-15	42
Abbildung 13: ROC für pro-IL-1 β	42
Abbildung 14: ROC für CXCL10/IP-10.....	43
Abbildung 15: Scatterplot IL-6 gegen die Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung).....	45
Abbildung 16: Scatterplot der IL-15-Konzentration gegen die Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung).....	46
Abbildung 17: Scatterplot IL-1 β gegen Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung).....	47
Abbildung 18: Scatterplot IP-10 gegen Schwangerschaftswoche (y-Achse: logarithmische Skalierung).....	48
Abbildung 19: Boxplot zum Vergleich der CRP-Werte der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ mit der Kontrollgruppe.	52

Abbildung 20: Boxplot zum Vergleich der Leukozytenwerte zwischen der Gruppe „Amnioninfektionssyndrome“ und der Kontrollgruppe.	53
--	----

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die Patientenzahlen im Gesamten und innerhalb der einzelnen Gruppen	22
Tabelle 2 Übersicht über Gravidität und Parität innerhalb der einzelnen Gruppen.....	22
Tabelle 3 Indikationen zur Durchführung einer Amniozentese	24
Tabelle 4 Reagenzien	30
Tabelle 5 Bezeichnung des Ansatzpuffers und geforderte Titrationsmenge	33
Tabelle 6 Mengenangaben der titrierten Standard-bzw. Probenlösung.....	34
Tabelle 7 Inkubationszeiten	34
Tabelle 8 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von IL-6 in den verschiedenen Gruppen. Konzentrationsangaben in pg/ml	37
Tabelle 9 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von IL-15 in den verschiedenen Gruppen.	38
Tabelle 10 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von pro-IL-1 β in den verschiedenen Gruppen.	39
Tabelle 11 Minimum, Maximum, Mittelwert und Median von CXCL10/IP-10 in den verschiedenen Gruppen	40
Tabelle 12: Zeitpunkte der Fruchtwassergewinnung während der Schwangerschaft [SSW] ..	44

7.4 Danksagung

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Udo Jeschke, Leiter des wissenschaftlichen Labors der I. Frauenklinik der LMU München – Campus Innenstadt. Ich bedanke mich für die Überlassung der Fragestellung und für seine Unterstützung bei Fragen rund um diese Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch meinem Betreuer PD Dr. med. Tobias Weissenbacher aussprechen. Die unendliche Geduld, die er mir bei vielen Telefonaten und Treffen entgegengebracht hat sowie die Freude an der Betreuung von Doktoranden, findet man nur sehr selten.

Ganz besonders danke ich auch den Medizinisch-technischen Assistentinnen Christina Kuhn, Sabine Hofmann und Susi Kunze, die mich stets unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Meinen Eltern Dorothea und Dr. Manfred Stumpfe und Geschwistern Katharina, Christian und Maximilian danke ich herzlich für Ihre Unterstützung und die vielen offenen Worte. Ihr Antreiben und viele Gespräche haben mich oftmals schneller vorangebracht.

7.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Kassel, 12. November 2013

Florian Matthias Maximilian Stumpfe

7.6 Eidesstaatliche Versicherung

Stumpfe, Florian Matthias Maximilian

Ich erkläre hiermit Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Zytokinbestimmung im Verlauf der Schwangerschaft und deren Bedeutung bei intrauterinen Infektionen - Konzentrationsbestimmung der Zytokine Interleukin-6, Interleukin-15, pro-Interleukin-1 β und CXCL10/IP-10 im Fruchtwasser

Selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Kassel, den 12.11.2013
