

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(DIREKTOR: PROF. DR. MED. SVEN MAHNER)

Verhalten der Interleukine IL4, IL8 und IL12 aus dem Vaginalsekret von Patientinnen mit symptomatischer Vaginitis

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

Lisa Marie Link
aus München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

1. Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Tina Buchholz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2016

Abkürzungsverzeichnis

APC	antigen-presenting cell
BV	Bakterielle Vaginose
CFU	colony forming units
CTL	Cytotoxische T-Zelle
CXCR	Chemokinrezeptor
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
g	Gramm
h	hour
IFN	Interferon
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HRP	horseradish peroxidase
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
kDa	kiloDalton
KOH	Kaliumhydroxid
L.	Lactobacillus
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	messengerRNA
µg	Mikrogramm
µmol/l	Mikromol/Liter

nm	Nanometer
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
o.A.	ohne Angabe
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
pg	Pikogramm
p.o.	per os
PRR	pathogen-recognition receptor
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
rpm	revolutions per minute
SOCS	suppressor of cytokine signaling protein
spp.	species pluralis
STAT	signal transducers and activators of transcription
VAS	Visuelle Analogskala
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VVC	vulvovaginale Candidiasis

1	EINFÜHRUNG	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Fragestellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Patientinnenkollektiv	15
2.1.1	Studienbeschreibung	15
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	15
2.1.3	Durchführung der Studie	16
2.2	Material	18
2.2.1	Untersuchung	18
2.2.2	ELISA	18
2.3	Methoden	19
2.3.1	Prinzip des ELISA	19
2.3.2	Zytokinbestimmung mittels Sandwich-ELISA	19
2.4	Statistik	21
3	ERGEBNISSE	22
3.1	Deskriptive Analysen	22
3.1.1	Unabhängige Variablen	22
3.1.2	Abhängige Variablen	24
3.2	Explorative Analysen	26
3.2.1	IL4	26
3.2.2	IL8	28
3.2.3	IL12	33
4.	DISKUSSION	41
4.1	IL4	42
4.2	IL8	44
4.3	IL12	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6.	LITERATURVERZEICHNIS	51
7	ANHANG	61

Einführung

7.1 Tabellenverzeichnis	61
7.2 Abbildungsverzeichnis	61
8 DANKSAGUNG	62
9 LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Einführung

1.1 Einleitung

Das Immunsystem des weiblichen Genitaltrakts muss maximal gegensätzlichen Anforderungen gerecht werden: je nach Lokalisation steht im nahezu sterilen oberen Genitaltrakt die Immunmodulation im Vordergrund, die die Einnistung eines semi-allogenen Fetus erlauben soll – im nicht-sterilen unteren Genitaltrakt dagegen muss die Abwehrfunktion gegen eindringende pathogene Keime sicher gestellt sein. Gleichzeitig stellt jede Infektion im oberen Genitaltrakt eine akute systemische Gefährdung dar, die Abwehr muss hier äußerst effektiv sein; im unteren Genitaltrakt darf dagegen bei aller Vermeidung einer drohenden Keimassension die natürliche Vaginalflora mit nützlichen Kommensalen wie den Laktobazillen als wichtiger Teil der unspezifischen Abwehr nicht gestört werden. Sowohl das adaptive wie auch das angeborene Abwehrsystem spiegeln diesen Spagat zwischen Toleranz und Defensive wider.

Die Normalflora der Vagina enthält eine hohe Keimzahl grampositiver Laktobazillen [1, 2]. Bisher konnten mehr als 120 *Lactobacillus*-Spezies identifiziert werden, über 20 von ihnen in der Vagina. Seit der flächendeckenden Einführung molekularbiologischer Techniken zeigt sich, dass die gesunde Vagina meist nur einen oder zwei der vier dominanten Phänotypen beherbergt: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii* und *Lactobacillus gasseri* [3-6]. Darüber hinaus finden sich in der Vagina auch andere Keime wie *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Veillonella*, *Bifidobacterium* und *Candida* in untergeordneter Zahl [7]. Bei der gesunden prämenopausalen Frau finden sich ca. 10^7 bis 10^8 CFU/g im Vaginalsekret, welche durch Aggregation und verschiedene Adhärenzfaktoren einen Biofilm bilden [8].

Die Zusammensetzung der vaginalen Flora ist nicht konstant, sondern unterliegt endogenen und exogenen Einflussfaktoren. Zu diesen zählen die verschiedenen Stadien des Menstruationszyklus, Schwangerschaft, Einnahme von Kontrazeptiva, Häufigkeit des Geschlechtsverkehrs, die Anwendung von Intimpflegeprodukten bzw. Vaginalduschen und die Einnahme von Antibiotika oder Immunsuppressiva [9-13]. So zeigten beispielsweise in einer Studie von Priestley et al. über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen nur 15% der 26 Probandinnen durchgehend eine Normalflora [14]. Während des Zyklus kommt es zu hormonellen Schwankungen, die auf das Substratangebot verschiedener Mikroorganismen Einfluss nehmen. Darüber hinaus wirkt sich auch das Menstruationsblut auf den pH aus. Während die Anzahl der Laktobazillen relativ konstant bleibt, erreicht die Zahl der übrigen Bakterien ihr Maximum während der Menstruation [11, 15]. Dies entsteht unter anderem durch einen temporären Selektionsvorteil: Laktobazillen sind die einzigen Bakterien, die Molybdän statt Eisen als Kofaktor zur Biosynthese benötigen. Diese Besonderheit ist in der normalerweise Eisen-freien Scheide ein Wachstumsvorteil, bei Anwesenheit von Menstrualblut oder Spermazellen jedoch untergeordnet [1].

Eine Störung der Normalflora führt zu einer Überwucherung durch einzelne Keime bis hin zu floriden Infektionen. Unspezifische Symptome wie Ausfluss, Juckreiz, Brennen und Dyspareunie können sowohl durch eine unspezifische Vaginitis, als auch eine bakterielle Vaginose, Candidiasis, Trichomonaden, chemische oder allergische Dermatitiden ausgelöst werden [16].

Einführung

Die unspezifische Vaginitis (zum Teil auch als „Aerobe Vaginitis“ bezeichnet) spiegelt eine gestörte Mikroflora wieder, bei der eine überwiegend aerobe Flora fakultativ pathogener Keime wie Gruppe B Streptokokken, Enterokokken, *Staphylococcus spp.* und *E.coli* die Laktobazillen zahlenmäßig überwuchern und zu einer bakteriellen Dysbiose führen. Die schwerwiegendste Ausprägung ist die desquamative inflammatorische Vaginitis [17, 18]. Klinisch präsentiert sich die unspezifische Vaginitis mit einer geröteten, entzündeten Mukosa, gelblichem Ausfluss, unangenehmen, jedoch nicht fischigem Geruch und einem erhöhten pH >6 [18].

Die Bakterielle Vaginose (BV) ist die häufigste vaginale Infektion weltweit. Sie betrifft jährlich allein drei Millionen Frauen in den USA. Die bakterielle Vaginose ist assoziiert mit schwerwiegenden Komplikationen wie Frühgeburtlichkeit, Spontanabort [19-21], Endometritis bzw. pelvic inflammatory disease [22-24] und einer erhöhten Transmissionsrate sexuell übertragbarer Krankheiten inklusive HIV [25-28]. Sie entsteht, wenn die normale Laktobazillenflora durch Anaerobier wie *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella sp.*, *Bacteroides sp.*, *Mobiluncus sp.* und *Mycoplasma hominis* überwuchert wird [29]. Dank flächendeckender Verfügbarkeit der PCR wurden in den letzten Jahren immer neue Erkenntnisse über die vaginale Flora gewonnen. So fanden z.B. Fredricks et al. 2005 mit *BAVB1*, *BAVB2*, und *BAVB3* drei bis dato völlig unbekannte Bakterien, die in hohem Maße mit dem Auftreten einer BV assoziiert sind [30]. Auch die Rolle von *Atopobium vaginae* war zunächst unklar; diese Milchsäureproduzenten sind vermutlich ebenfalls dem Krankheitsbild der BV zuzuordnen, da sie in 44-77,8 % aller Patientinnen mit BV, aber nur bei 0-19,6 % aller gesunden Frauen zu finden sind [29, 31, 32]. *Atopobium vaginae* scheint in hohem Maße mit rekurrenten Infektionen trotz oraler Metronidazol-Therapie vergesellschaftet zu sein [33]. Nur circa die Hälfte der Patientinnen leidet unter grau-weißlichem wässrigem Ausfluss und fischigem Geruch, ein Großteil bleibt asymptomatisch [30]. Die klinische Diagnose wird anhand der Amsel-Kriterien gestellt:

- (1) wässriger grau-weißlicher Ausfluss
- (2) positiver Whiff-Test (fischiger Geruch nach 10% KOH-Probe)
- (3) pH > 4,5
- (4) > 20 % „clue cells“ im Mikroskop

Eine BV liegt vor, wenn drei der vier Kriterien erfüllt sind [6, 16, 18, 30, 34].

Eine andere Möglichkeit der Diagnostik stellt die Auswertung des Gram-Präparates dar. Im Nugent-Score werden Laktobazillen (große Gram-positive Stäbchen), *Gardnerella* oder *Bacteroides* (kleine Gram-variable oder -negative Stäbchen) und *Mobiluncus* (kleine gram-negative gekrümmte Stäbchen) auf einer Skala von null- bis vierfach positiv ausgezählt und mit maximal 10 Punkten versehen. Ein Score > 7 ist pathognomonisch für eine BV, 0 - 3 gilt als gesunde Normalflora [6, 35]. Als Therapie der Wahl gelten momentan Metronidazol und Clindamycin oral oder topisch [16].

75 % aller Frauen im gebärfähigen Alter erleiden mindestens eine Episode vulvovaginaler Candidiasis (VVC), sie stellt damit nach der Bakteriellen Vaginose die zweithäufigste vaginale Infektion dar [36]. Klinisch präsentiert sich die vulvovaginale Candidiasis mit Juckreiz, Brennen, Dyspareunie, Rötung, Schleimhautödem und weißlich-krümeligem Fluor. Bis zu 20 % aller Frauen sind asymptomatische Trägerinnen von *Candida spp.* 5-8 % aller Frauen leiden an rezidivierender VVC [37]. Immunsuppression, Diabetes mellitus, hormonelle Kontrazeption und die luteale Zyklusphase

Einführung

begünstigen eine Infektion; zugrundeliegende Ursache ist jedoch meist eine Milieuänderung der Standortflora, zum Beispiel durch eine im Rahmen einer antibiotischen Therapie ausgelöste Reduktion der Laktobazillen. Da die Sprosspilze anhand ihrer Größe und typischen Knospung auch im ungefärbten Nativpräparat gut erkennbar sind, ist die Mikroskopie des Abstrichpräparates oft ausreichend. Bei symptomatischen Patientinnen ohne Pilzbefall in der Nativmikroskopie sollte jedoch eine weiterführende Diagnostik durchgeführt werden, da bis zu 50% aller Kultur-positiven Patientinnen negativ in der Mikroskopie ausfallen [38]. Die Therapie der unkomplizierten VVC mit topischen wie oralen Azolen zeigt eine Heilungsrate bis zu 90 %, die orale Therapie scheint dabei der topischen Anwendung nicht überlegen zu sein [1, 37, 39].

Die unspezifische vaginale Abwehr wird maßgeblich von den Laktobazillen unterhalten, die mit verschiedenen Mikrobiziden eine Überwucherung anderer Keime verhindern:

Die Milchsäure spielt eine entscheidende Rolle in der Abwehr pathogener Keime. Sie entsteht durch anaerobe Glykolyse aus dem im Vaginalepithel eingelagerten Glykogen, und wird sowohl von den Epithelzellen selbst als auch den Bakterien der Normalflora produziert. Durch sie liegt der pH in einer gesunden Vagina bei ca. 4,5 [40, 41]. Den Großteil der Milchsäure stellt dabei die intermediäre Schicht der vaginalen Mukosa, deren Glykogen-Metabolismus dem Östrogen-Spiegel unterliegt. So haben selbst unbesiedelte weibliche Neugeborene einen Scheiden-pH von ca. 5, dieser steigt erst mit dem Verlust des mütterlichen Östrogeneinflusses auf neutrale Bereiche und sinkt in der Pubertät wieder auf 4,5 [41].

Ein weiterer Aspekt in der Keimabwehr scheint die Bildung von Wasserstoffperoxid zu sein, welches negativ mit dem Auftreten einer bakteriellen Vaginose korreliert [42]. Während *L. crispatus* und *L. jensenii* typischerweise H₂O₂ produzieren, ist dies bei *L. gasseri* und *L. iners* eher selten der Fall [4]. Diese Tatsache ist vereinbar mit den Zahlen von Verstraelen et al., die im Gegensatz zu stabilen *L. crispatus*-Kulturen auf eine erhöhte Rate von BV bei *L. iners/L. gasseri*-dominierten Kulturen hinweisen [43]. Auch Srinivasan et al. zeigten eine signifikant gegensätzliche Korrelation von *L. crispatus* und *L. jensenii* zu *Gardnerella vaginalis* besonders während der Menstruation [13]. O'Hanlon et al. stellen die Relevanz der H₂O₂-Produktion dagegen grundlegend in Frage; ihre Daten betonen eher die Bedeutung der Milchsäure in der Abwehr pathogener Keime [44].

Vaginale Epithelzellen produzieren zusätzlich die Defensine HBD-1 und HBD-2, positiv geladene Moleküle, die an die negativ-geladene Oberfläche von Bakterien binden und diese über Permeabilitätserhöhung der Membran durch Lyse zerstören [45]. Die Freisetzung von HBD-2 wird durch Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert, die typischerweise auf gramnegativen Bakterien zu finden sind. Kommt es zu einer Infektion, steigert Östrogen die Synthese von HBD-2, Progesteron dagegen senkt sie. So kann es zu einer erhöhten Infektanfälligkeit unter Kontrazeption mit Gestagen-haltigen Präparaten und in der Menopause kommen [46].

Die spezifische vaginale Abwehr unterteilt sich in ein angeborenes und ein erworbenes System. Die angeborene Antwort erfolgt unmittelbar nach Antigenkontakt. Makrophagen, Dendritische Zellen,

Einführung

neutrophile Granulozyten, Natürliche-Killer-Zellen und Epithelzellen verhindern eine Invasion pathogener Erreger über das Erkennen so genannter „PAMPs“, Pathogen-assoziiertes molekulare Muster, die über entsprechende Rezeptoren (PRRs) - zu denen auch die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) gehören - von den genannten Zellen erfasst werden. Haben unreife dendritische Zellen über ihren PRR ein PAMP erkannt und aufgenommen, migrieren sie in den Lymphknoten und differenzieren in Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Über die Präsentation eines MHCII/Peptid-Komplexes und zusätzliche Ko-Stimulation durch CD80 oder CD86 werden CD4⁺-Lymphozyten zu T-Effektorzellen aktiviert. Mit Hilfe der Zytokine wird nun die spezifische Abwehr des adaptiven Systems vermittelt; T- und B-Zellen zerstören den Erreger über zwei verschiedene Wege [47-51]:

Die TH₁-Antwort erfolgt zellulär über Aktivierung der T-Helfer-Zellen und richtet sich hauptsächlich gegen intrazelluläre Bakterien, Pilze und Protozoen; auch bei chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie Arthritis, Colitis und Typ-IV-Allergien spielt sie die Hauptrolle. Sie wird durch IL12 vermittelt, das die Zelle zu IFN γ -Synthese anregt. IFN γ gilt als der potenteste Makrophagen-Aktivator, ferner verstärkt es die zytotoxische Wirkung von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und NK-Zellen [49, 52].

Extrazelluläre Erreger wie Helminthen oder andere Parasiten rufen dagegen die IL4-vermittelte TH₂-gesteuerte humorale Immunantwort hervor, es kommt zum Klassenwechsel der B-Zellen und spezifische IgE-Antikörper werden produziert [52].

Diese beiden Wege regulieren sich gegenseitig herab, so dass die initiale Immunantwort im Verlauf immer stärker polarisiert wird. Dies spielt vor allem bei chronischen Infektionen und Autoimmunerkrankungen eine große Rolle [53].

Maßgeblicher Einfluss auf Qualität und Intensität der Immunantwort kommt hierbei den Zytokinen zu. Zytokine sind lösliche Polypeptide, die von Lymphozyten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen sezerniert werden können und als Botenstoffe dienen. Ihre Synthese erfolgt ausschließlich bei Bedarf – nach Aktivierung der Zelle kommt es zu Transkription, Produktion und unverzüglicher Ausschüttung. Die Sekretion erfolgt lokal; die Wirkung entfaltet sich jedoch autokrin, parakrin und - in größerer Menge - auch endokrin [53]. Die Halbwertszeit beträgt meist nur einige Minuten [49]. Zytokine können vielfältige Effekte vermitteln: hauptsächlich induzieren sie Wachstum, Differenzierung, zytolytische Aktivität, Apoptose und Chemotaxis [52].

Die Komplexität der Immunantwort wird maßgeblich durch folgende Eigenschaften der Zytokine verursacht: Pleiotropismus und Redundanz, Synergismus und Antagonismus [49, 52-54]. Ein einzelnes Zytokin kann also an mehreren Zielzellen wirken; darüber hinaus kann dasselbe Zytokin an unterschiedliche Rezeptorkomplexe einer Zelle binden, und so über den jeweiligen Signalweg divergente Wirkmechanismen entfalten (Pleiotropismus, Antagonismus). Bindet beispielsweise TNF an TNFR1 kommt es über Caspasen zur Apoptose, bindet es dagegen an TNFR2 führt der Signalweg über NF κ B zur spezifischen Aktivierung im Zellkern [49].

Gleichzeitig kommt es zu überlappenden Wirkspektren mehrerer Zytokine, da verschiedene Zytokine gleiche Rezeptor-Komponenten enthalten (Redundanz, Synergismus). So teilen zum Beispiel die Heterodimere IL12 (p35) und IL23 (p19) ihre p40-Komponente, sie stützen die TH₁-Differenzierung; IL4 und IL13 teilen sich dagegen einen Rezeptor und vermitteln beide die TH₂-Differenzierung [54].

Einführung

Die Zytokine lassen sich anhand ihrer molekularen Struktur in verschiedene Klassen aufteilen, maßgeblich hierfür ist die Rezeptorbindung:

Typ-I-Zytokin-Rezeptoren binden vorzugsweise vier- α -helikale Zytokine (Typ-I-Zytokine), zu denen neben IL4 und IL12 unter anderem auch IL6, IL13, IL15, GM-CSF, G-CSF gehören. Eine Kette des Rezeptors ist spezifisch für ein Zytokin, eine oder mehrere weitere Ketten teilt er sich mit anderen Klasse-I-Rezeptoren (γ -Kette, β -Kette oder GP 130). Die Ligandenbindung führt zur Transphosphorylierung rezeptorassoziierter Janus-Kinasen und darauf folgend zur Dimerisierung von STAT-Faktoren, die nun als aktivierter Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren (JAK/STAT-Signaltransduktion) [49, 53, 55].

Chemokin-Rezeptoren bestehen aus sieben α -Helices und vermitteln ihre Wirkung über G-Proteine. Chemokine werden je nach Aminosäuresequenz (CXC, CC, XC, CX₃C) vier verschiedenen Untergruppen von α - δ zugeordnet und wirken chemotaktisch auf Leukozyten. IL8 gehört dabei zu den α -Chemokinen (CXC), die bevorzugt Neutrophile Granulozyten anlocken. Bestimmte Chemokin-Rezeptoren (CCR5, CXCR4) fungieren auch als Korezeptoren für HIV [53, 55].

Weitere Rezeptor-Typen sind Typ-II-Zytokin-Rezeptoren, Rezeptoren der IL1-Familie und TNF-Rezeptoren, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll [53].

Die hier untersuchten Interleukine IL4, IL8 und IL12 weisen verschiedene Wirkspektren auf:

Bei IL4 handelt es sich um ein immunmodulatorisches Zytokin, das zur Gruppe der vier- α -helikalen Zytokine gehört. Es ist 15-19 kDa schwer und wird hauptsächlich von TH₂-Zellen und aktivierten Mastzellen produziert, deren eigene Expression es als autokriner Wachstumsfaktor verstärkt. In geringerem Ausmaß tragen auch CD8⁺-T-Zellen, NK-Zellen und Basophile Granulozyten zur Synthese bei. IL4 aktiviert die TH₂-Differenzierung und bewirkt einen Klassenswitch der B-Zellen zur IgE-Produktion [56, 57]. Die humorale Immunantwort steht im Vordergrund, die TH₁-Differenzierung wird blockiert. In Endothelzellen reguliert IL4 die Expression von VCAM-1 hoch, so dass T-Gedächtniszellen, Eosinophile Granulozyten und Dendritische Zellen vermehrt rekrutiert werden können. Es kommt zu einer Monozyten- und Eosinophilen-dominierten Entzündungsreaktion. IL4 spielt wie schon erwähnt eine maßgebliche Rolle in der Abwehr extrazellulärer Erreger, doch auch Allergien und Asthma werden durch die verstärkte IgE-Produktion und Histaminfreisetzung ausgelöst. So wiesen beispielsweise Robinson et al. 1992 eine deutliche Dominanz der TH₂-Population mit verstärkter IL4-mRNA-Expression in bronchoalveolären Lavagen atopischer Asthmatiker nach [58]. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene mRNA- und Protein-Varianten von IL4, die zum Teil gegensätzlich agieren. Im Verlauf der Immunantwort wechselt die Synthese von IL4 zu IL-4 δ 2. Diese Spleiß-Variante wirkt in vielerlei Hinsicht antagonistisch zur Vollversion und beendet so vermutlich die TH₂-Antwort der klassischen IL4-Variante [53, 59, 60].

IL8 (CXCL8) gehört zu den Chemokinen; seine Hauptaufgabe ist das Anlocken und Aktivieren von Neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich erhöht es die Bindungsfähigkeit von Adhäsionsmolekülen bestimmter β ₂-Integrine. Hauptproduktionsort sind Makrophagen, daneben kommen auch T-Zellen, NK-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Thrombozyten zum Einsatz [53, 55, 60]. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die angiogenetische Potenz von IL8, weshalb Tumorzellen unter hypoxischen

Einführung

Bedingungen massiv IL8 produzieren können [61]. INF γ und Glukokortikoide können die IL8-Synthese durch Inhibierung von NF κ B unterbinden. Gleichzeitig steigern INF γ und TNF α die CXCR1 und CXCR2-Expression auf CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, so dass auch T-Zellen eine verstärkte Antwort auf den chemotaktischen Reiz des IL8 zeigen, während IL4 gegensätzlich agiert [60, 62, 63]. IL8 unterdrückt wiederum die IL4-vermittelte IgE-Produktion in B-Zellen [64]. Der Abfall des IL8 im Verlauf folgt einem Feedbackmechanismus des Hauptinduktors IL1 β und seinem Rezeptorantagonisten IL-1Ra: exzessive IL1 β -Produktion und Leukozytendegranulation führen zu vermehrter IL1ra-Synthese, die IL1 β /IL1ra-Ratio nimmt ab, IL1 β wird gleichsam inaktiviert und die IL8-Produktion lässt nach [65-67].

IL12 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Das 70 kDa schwere Protein ist maßgeblich für den TH₁-Klassenwechsel verantwortlich und regt die IFN γ -Produktion in T- und NK-Zellen an. IFN γ steigert wiederum die phagozytotische Aktivität der Makrophagen. Ein weiterer wichtiger Effekt des IL12 ist die Verstärkung der Zytotoxizität von NK-Zellen und CD8⁺-Zellen. Strukturell ist IL12 den Interleukinen IL6, IL23 und IL27 ähnlich, mit denen es jeweils eine oder sogar beide Untereinheiten gemeinsam hat. APCs sind die einzigen Zellen, die neben der p35 Einheit auch die p40 Einheit synthetisieren können, und somit die einzigen Produzenten eines biologisch aktiven IL12 sind. Dies verhindert eine unkontrollierte IL12-Produktion, da Makrophagen und Dendritische Zellen die p35-Einheit nur unter Stimulation produzieren, während T-Zellen und zahlreiche andere Zelltypen dies auch spontan tun. Auslösender Reiz für die Produktion ist vor allem die Ligandenbindung an TLRs; aktivierte T-Zellen können die IL12-Synthese über CD40-Bindung an NK- und T-Zellen antreiben, und auch Autostimulation durch INF γ fördert die IL12-Produktion. Große Mengen an IL12 finden sich mitunter bei Sepsis mit gramnegativen Erregern – durch Synergien von INF γ und LPS kommt es zu massiver TNF-Ausschüttung und dem schwerwiegenden Krankheitsbild des septischen Schocks [53, 60].

Das Zusammenspiel der Zytokine ist komplex: Die TH₂-Zell-Produktion wird durch IFN γ inhibiert [68, 69], und darüber hinaus sind TH₂-Zellen unempfindlich gegenüber IL12, da IL4 die Expression der entsprechenden Rezeptor-Domäne inhibiert [52]. Die beiden Regelkreise laufen also relativ gesondert ab. Über SOCS-Proteine schalten sich beide Systeme schließlich gleichsam ab: IL4 blockt über STAT6 den IL12-STAT4-Signalweg und umgekehrt [49, 53].

PAMPs wie virale RNA, unmethylierte CpG-DNA-Sequenzen, Lipopolysaccharide und Teichonsäure sowie Mannose-reiche Glykoproteine aus Bakterien werden von den entsprechenden Rezeptoren erkannt. Dazu gehören unter anderem die TLRs und Mannose-bindendes Lektin. Die Interaktion des passenden Liganden mit dem TLR führt zur Dimerisierung seiner zytoplasmatischen Domäne (Toll/IL-R1 bzw. TIR) und löst so eine Kaskade weiterer Signalmoleküle aus (MyD88, IRAKs, TGF β , TAK1, TAB1, TAB2 und TRAF6), die in der Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF κ B mündet. Dieser transloziert in den Nucleus und induziert über spezifische Gen-Aktivierung zunächst die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie INF γ und antimikrobiellen Substanzen. Nach Abtötung des Erregers werden dagegen immunmodulatorische Zytokine wie IL10 ausgeschüttet [49, 70-72]. Bisher wurden elf verschiedene TLRs mit unterschiedlichem Fokus im Menschen identifiziert [73]. TLR2 bindet beispielweise gemeinsam mit TLR6 vornehmlich an Lipoproteine und Teichonsäuren grampositiver Bakterien und Zymosan als Pilzbestandteil, TLR4 dagegen an Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien und Hitzeshockproteine [74]. Während TLR4-Agonisten die IL12- und INF γ -

Einführung

Produktion und damit die TH₁-Antwort induzieren, leitet die Aktivierung von TLR2 zur TH₂-Antwort über und stimuliert zudem die IL8-Synthese [75]. Interessanterweise findet sich TLR4 zwar im Endometrium und der Endozervix, nicht dagegen in der Vagina und Ektozervix [76]. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, weshalb der TH₂-Antwort in der Vagina eine so entscheidende Rolle zukommt.

Ein wichtiger Träger der TLRs sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Sie sind Bestandteil des angeborenen System und sind CD-56 positiv sowie CD3-negativ; circa 10 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten und je nach Lokalisation bis zu 22 % aller Leukozyten im weiblichen Genitaltrakt gehören dieser Klasse an. Die weitere Unterteilung in CD56^{bright}- und CD56^{dim}-Zellen gibt Auskunft über ihre primäre Funktion: während CD56^{bright}-Zellen (>90%) vor allem Zytokine produzieren (INF γ , TNF- β , IL-10, IL-13, und GM-CSF) und erst nach Aktivierung durch IL-2, IL15 oder IL-12 auch zytotoxisch aktiv werden, zeichnen sich CD56^{dim}-Zellen durch ihre unmittelbare und stärkere Zytotoxizität aus [77]. Auch hier unterschieden sich oberer und unterer Genitaltrakt: während im oberen Genitaltrakt CD56^{bright}-ähnliche Zellen vorherrschen, finden sich im unteren vor allem CD56^{dim}-ähnliche Zellen. Die Zahl der endometrialen NK-Zellen nimmt zudem in der sekretorischen Phase des Zyklus zu; Östradiol und Progesteron induzieren die Expression der Chemokine CXCL10 und/oder CXCL11 im menschlichen Endometrium [78]. In den Tubae uterinae ist sie dagegen konstant niedrig. Eine mögliche Erklärung für diese Verteilung gibt die unterschiedliche Anforderung: je nach Lokalisation steht im nahezu sterilen oberen Genitaltrakt die Immunmodulation im Vordergrund, die die Einnistung eines semi-allogenen Fetus erlauben soll – im nicht-sterilen unteren Genitaltrakt dagegen muss die Abwehrfunktion gegen eindringende pathogene Keime sicher gestellt sein [77, 79, 80].

Während viele Studien sich den Erreger-bedingten Erkrankungen der Vagina im Allgemeinen widmen, finden sich nur wenige Arbeiten zum Interleukinprofil, insbesondere im zeitlichen Verlauf. Eine Übertragung der vorliegenden Erkenntnisse aus der Immunologie scheint naheliegend. Die beschriebenen Besonderheiten des Vaginaltraktes mit diffiziler Graduierung zwischen Toleranz und Abwehr lassen von einer simplen Generalisation jedoch Abstand nehmen. Bei hohen Lebenszeit-Prävalenzen der Vaginitiden besteht Bedarf an weiterem Grundlagenwissen, auch in Hinblick auf die anzunehmende Krankheitslast.

1.2 Fragestellung

Ziel dieser experimentellen Studie war es, Erkenntnisse über die Zytokinverläufe als Modulatoren der Entzündungsreaktion bei symptomatischer Vaginitis (unspezifischer Vaginitis, bakterieller Vaginose, vulvovaginaler Candidose und Kultur-negativer Vaginitis) zu erlangen. Dies erfolgte als unabhängige Investigatoren-getragene Substudie im Rahmen der Phase II Pentamycin-Studie (EudraCT-Nr. 2007-007659-15). Dabei wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten die Interleukine 4, 8, und 12 im Vaginalsekret bei 50 Patientinnen mit symptomatischer Vaginitis mittels ELISA ermittelt.

Die Verlaufsbeobachtung von 50 Patientinnen mit symptomatischer Vaginitis sollte Aufschlüsse über die Art der Kommunikation durch die Interleukine geben: In welchem Verhältnis steht das Zytokinprofil zum Entzündungsverlauf?

Des Weiteren verglichen wir verschiedene Gruppen: Unterscheidet sich das Interleukinlevel im Verlauf unter Anbetracht der Parameter Kultur-Ergebnis, Menopause (prä- oder postmenopausal), geografischer Abstammung (türkisch oder europäisch), Chronizität (erste Episode oder rezidivierende Infektion), Zusatzmedikation und Beschwerdezunahme im Verlauf?

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

2.1.1 Studienbeschreibung

Die 50 Probandinnen wurden von April bis Oktober 2009 in der mikrobiologischen Sprechstunde von Herr Prof. Weissenbacher der Frauenklinik Großhadern rekrutiert.

Dabei handelte es sich um eine multizentrische, randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Phase II Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit von 3 Dosierungen (3, 10 und 30 mg) von Pentamycin (SPK 0602)-Vaginaltabletten gegenüber Placebo bei Patientinnen mit symptomatischer Vaginitis (EudraCT-Nr. 2007-007659-15).

Die Altersspanne betrug 20 bis 78 Lebensjahre (23.02.1932 – 29.09.1989).

Besonderes Augenmerk lag auf der bakteriellen Vaginose und Candidiasis; eingeschlossen wurden in unserem Center vorwiegend Patientinnen mit Verdacht auf bakterielle Vaginose.

An der Studie beteiligt waren das Zentrallabor des Klinikum Großhadern, das die Blutproben verarbeitete; das Labor Blenk in Fürth, das die vaginalen Abstriche und Kulturen auswertete; und das infektiologische Labor von Herrn Prof. Weissenbacher, in dem die Interleukin-Proben verarbeitet wurden.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- Volljährigkeit
- Negativer Schwangerschaftstest
- Ausübung einer reliablen Verhütungsmethode
- Patientin mit symptomatischer Vaginitis: Ausfluss, Juckreiz, Brennen, Irritation, Ödem, Erythem oder Exkoriation der Vagina/Vulva, Dyspareunie

Ausschlusskriterien:

- Schwangerschaft, Stillzeit
- GOT/GPT > dreifach erhöht, Serum-Kreatinin >250 µmol/l
- Andere akute gynäkologische Erkrankung, z.B. Salpingitis
- Schwere systemische Erkrankung
- Einführung anderer vaginaler Produkte während der Studienteilnahme wie Duschen, Spermizide, pflanzliche Präparate
- Einnahme oder vaginale Anwendung antibiotischer oder antimykotischer Medikamente in den letzten vier Wochen

- Medizinische, soziale oder psychologische Kondition, die es der Patientin unmöglich macht, dem Studienprotokoll zu folgen.

2.1.3 Durchführung der Studie

2.1.3.1 VISIT 1

Zunächst erfolgte eine allgemeine Anamnese, anschließend wurden die Patientinnen körperlich untersucht. Die nun folgende gynäkologische Anamnese enthielt zur Objektivierung der Beschwerden und um einen Bias seitens des Studienpersonals zu verhindern eine Visuelle Analog-Scala, die von der Patientin eigenständig ausgefüllt wurde. Besonderes Augenmerk lag auch auf vorangegangenen Episoden von Vaginitis als Hinweis auf Chronizität und Einnahme antibiotischer oder antimykotischer Präparate in den vorangegangenen 4 Wochen. Zusätzliche Informationen wurden aus der Patienten-Akte erhoben.

Es folgte eine venöse Blutentnahme (EDTA und Serum-Röhrchen); Blutbild, Kreatinin, GPT/GOT, Gesamtcholesterin und Serum-Glucose wurden auf deutliche Abweichungen der Norm getestet, zudem wurde ein Schwangerschaftstest durchgeführt. Bei auffälligen Ergebnissen wurden die Patientinnen rechtzeitig vor abendlicher Einführung der Studienmedikation telefonisch benachrichtigt.

Eine Urinprobe in Form eines Stix vor der gynäkologischen Untersuchung gab Aufschluss über eine mögliche Harnwegsinfektion.

Nach der Spekulum-Einstellung und der klinischen Beurteilung der Schleimhaut wurden zwei Abstriche mittels Watteträger aus dem hinteren Scheidengewölbe entnommen und auf jeweils einem Objektträger ausgestrichen. Ein Exemplar wurde direkt zur Mikroskopie vorgelegt, das andere mit Alkohol fixiert und zusammen mit dem mikrobiologischen Abstrich per Kurier am selben Tag an das Labor Blenk versandt. Schließlich wurden für die Interleukin-Bestimmung 2 ml NaCl 0,9 % mit einer Spritze in das hintere Scheidengewölbe eingegeben, mit einem weiteren Watteträger wurde Zellmaterial von der Scheidenwand gelöst und durchgemischt. Diese Suspension wurde mit derselben Spritze wieder aufgezogen und bei -20° Celsius bis zur weiteren Untersuchung tief gefroren.

Nach Aushändigung der Medikation an die Patientin und Erläuterung zum Einnahmemodus (dreimalige abendliche Einführung vor dem Zubettgehen), wurde die Patientin an Tag 7 und 21 wieder einbestellt.

2.1.3.2 VISIT 2

Beim zweiten Visit erfolgte eine Reevaluation der gynäkologischen Anamnese inklusive Ausfüllen der visuellen Analogskala durch die Patientin, um einen subjektiven Behandlungserfolg oder -misserfolg abschätzen zu können. Insbesondere wurden eingenommene Medikamente innerhalb der letzten Woche abgefragt (auch Bedarfsmedikation wie Schmerzmittel etc.) und nach sämtlichen neu aufgetretenen Symptomen geforscht.

Material und Methoden

Nach der erneuten gynäkologischen Untersuchung mit Abstrich-Entnahme und vaginaler Spülung zur Gewinnung der Interleukin-Proben wurde entsprechend des mikroskopischen Bildes in Verbindung mit den Beschwerden der Patientin eine Zusatzmedikation (je nach Bild Ciprofloxacin 150 mg mit Nystatin 100.000 I.E. als Vaginaltablette zweimal wöchentlich für vier Wochen, oder Fluconazol 200 mg einmalig p.o., oder Clindamycin-Creme 2 % tägliche Anwendung bis zur Wiedervorstellung) verschrieben. Insgesamt erhielten 65,1% der Frauen eine Studienmedikation.

Blut und Urin wurden analog zum ersten Visit abgenommen und ausgewertet.

2.1.3.3 VISIT 3

Der dritte Visit erfolgte ca. drei Wochen nach dem Einschlussbesuch. Hier wurde die körperliche Untersuchung wiederholt, die gynäkologische Anamnese inklusive VAS reevaluiert und erneut eine gynäkologische Untersuchung mit Abstrichentnahme und mikroskopischer Beurteilung durchgeführt. Des Weiteren wurde nach zusätzlich eingenommenen Medikamenten und potentiellen Nebenwirkungen gefragt und die Einhaltung des Studienprotokolls seitens der Patientin abgeklärt.

Sämtliche Medikamente, die innerhalb 4 Wochen vor und bis zum Ende der Studienteilnahme eingenommen oder eingeführt worden waren, wurden mit Dosierung und Einnahmemodus protokolliert, ebenso alle neu-aufgetretenen Symptome und körperlichen Befindlichkeiten, die auf eine potentielle Medikamenten-Nebenwirkung schließen lassen könnten. Die Gründe für einen Studienausschluss (falls eingetreten) wurden ebenfalls protokolliert.

2.1.3.4 NACHBEREITUNG

Im Labor Blenk wurden die verblindeten Proben mikroskopisch auf Gardnerella/Bacteroides/Mobiluncus-Morphotypen, Lactobacillus-Morphotypen, Hyphen und Clue cells untersucht; des Weiteren erfolgte die Auswertung der Kultur auf Bakterien, Mykoplasmen und Ureaplasmen, Pilze und Trichomonaden.

Im Labor von Prof. Weissenbacher wurden sämtliche Proben jeweils gleichmäßig auf zwei Eppendorfgefäße (1,5 ml) aufgeteilt. Der Inhalt der beiden Gefäße wurde mithilfe des Vortex-Gerätes vermengt und im Anschluss bei 5000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß (1,8 ml) abpipettiert; das Sediment mit 500 µl PBS überschichtet und bei -20° C eingefroren. Nun erfolgte der Sandwich-ELISA zur Quantifizierung der Interleukine 4, 8, und 12 aus den gewonnenen Überständen der Studienproben.

2.2 Material

2.2.1 Untersuchung

Für die gynäkologische Untersuchung inklusive Abstrichentnahme für die mikrobiologische Kultur und Spülung zur Gewinnung des Vaginalsekrets wurden benötigt:

- Watteträger (Medical Wire & Equipment Co. LTD.)
- Objektträger (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, 76x26 mm)
- Fixationsspray (Merckofix für die Zytodiagnostik)
- Abstrichträger inklusive Röhrchen (Transwab, M40 compliant, medical wire)
- NaCl (0,9 %, 50 ml, Braun)
- pH-Indicator Stix (Merck)

2.2.2 ELISA

Die Konzentration der Interleukine IL4, IL8, IL12 wurden im Vaginalsekret mit den jeweiligen Human IL Kits der Firma Invitrogen Corporation, 542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA bestimmt:

- Human IL Standard
- Standardverdünnungspuffer
- Human IL Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatten in Haltrahmen
- Human IL Biotin Konjugat
- Streptavidin-Peroxidase (HRP) 100fach konzentriert + Verdünnungslösung
- Waschpuffer 25fach konzentriert (o.A.)
- TMB (Tetramethylbenzidin) – stabilisiertes Chromogen
- Stopplösung (o.A.)
- Abdeckfolie
- Photometer anthos 2001. anthos labtec instruments, Lagerhausstr. 507, 5071 Salzburg, Austria. Softwareversion 1,50

2.3 Methoden

2.3.1 2.3.1 Prinzip des ELISA

Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstests dienen als direkte Bindungstests für Antikörper oder Antigene. Da Zytokine meist in nur sehr geringer Konzentration in der Probe enthalten sind, ist ein Sandwich-ELISA durch seine höhere Sensitivität zu bevorzugen.

Ein bekannter isolierter monoklonaler Antikörper wird mittels Adsorption auf einer Mikrotiterplatte gekoppelt und dient damit als „Andockstelle“ für das gesuchte Antigen. Durch das Abblocken freier Protein-Bindungsstellen durch einen Coating-Puffer verhindert man eine unspezifische Bindung und die Platte ist bereit, mit der zu untersuchenden Probe beschichtet zu werden. In mehreren Arbeitsschritten kommt es zur Bildung eines Vierfach-Komplexes, bestehend aus dem fixierten Antikörper, dem gesuchten Antigen, einem weiteren, mit Biotin konjugierten Antikörper, der im Vergleich zum fixierten Antikörper ein anderes Epitop am gesuchten Antigen erkennt, und einem Enzym. Anschließend wird das Substrat hinzugegeben und der erfolgende Farbumschlag wird mittels Photometer ausgewertet.

2.3.2 Zytokinbestimmung mittels Sandwich-ELISA

2.3.2.1 Vorbereitung

Da die Kits bei 2-8°C im Kühlschrank aufbewahrt werden, müssen sämtliche beteiligte Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Im Anschluss beginnt die Herstellung der **Standardverdünnungsreihen**, sie unterscheidet sich bei den einzelnen Interleukinen folgendermaßen:

- IL4: Der Standard wird mit Standardpuffer auf eine Konzentration von 10000 pg/ml verdünnt. Nach 10 Minuten Ruhezeit zur Lösung des Pulvers werden 0,05 ml des aufgelösten Standards in ein Reaktionsgefäß mit 0,95 ml des Standardpuffers gegeben. So entsteht eine Standardkonzentration von 500 pg/ml. Es erfolgt die weitere Verdünnung von 0,3 ml des Standards in ein Reaktionsgefäß mit 0,3 ml Standardpuffer. Die Verdünnungsreihe wird nun folgendermaßen fortgesetzt: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml und 0 pg/ml.
- IL8: Der Standard wird mit Pufferlösung auf eine Konzentration von 10000 pg/ml verdünnt und gelöst. Anschließend werden 0,1 ml Standard in ein Gefäß mit 0,900 ml Pufferlösung gegeben; es ergibt sich eine Lösung mit 1000 pg/ml. Die Verdünnungsreihe wird nun folgendermaßen fortgesetzt: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml und 0 pg/ml.
- IL12: Der Standard wird mit Puffer auf eine Konzentration von 5000 pg/ml verdünnt und gelöst. Im Anschluss werden 0,1 ml Standard in ein Gefäß mit 0,900 ml Standardpuffer gegeben und so auf 500 pg/ml verdünnt. Die Verdünnungsreihe wird nun ebenfalls fortgesetzt: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml und 0 pg/ml.

Material und Methoden

Die Herstellung der **Streptavidin-Peroxidase-Lösung** (HRP) ist für alle Interleukine gleich: 10 µl der 100fach konzentrierten Streptavidin-Peroxidase-Lösung pro acht Vertiefungen in einer Reihe werden jeweils mit 1 ml der Verdünnungslösung versetzt.

Für den **Waschpuffer** wird der 25fach konzentrierte Puffer mit destilliertem H₂O (Ampullenware für Spülzwecke, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) verdünnt. Für gebrauchsfertige Waschpufferlösung wird nun eine Einheit des konzentrierten Waschpuffer zu 24 Einheiten des H₂O gegeben.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

2.3.2.2 Durchführung

Die Durchführung des ELISA ist im Wesentlichen für alle Interleukine gleich; einzelne Abweichungen werden extra aufgeführt. Alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte werden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Je nach Probenanzahl werden entsprechend viele beschichtete Mikrokuvetten in Halterahmen vorbereitet.

Zunächst erfolgt das Einpipettieren von Standard und Proben, beginnend mit Probe 0 in aufsteigender Reihe. Bei IL4 werden 100 µl, bei IL12 50 µl und bei IL8 50 µl der Standardverdünnungsreihe bzw. 10 µl der Probe mit 40 µl der Pufferlösung eingegeben; hierdurch können zu hohe Konzentration vermieden werden, die durch das Photometer nicht messbar wären. Die zu testenden Proben lagern sich daraufhin an den adsorbierten Fänger-Antikörpern an.

Anschließend wird allen Proben Biotin-Konjugat (entsprechend einem detection-Antikörper) beigegeben (IL4 und IL8 erhalten 50 µl, IL12 100 µl). Im Anschluss erfolgt die Abdeckung mit Folie; die Proben werden nun 2 Stunden (IL4 und IL12) bzw. 1,5 h (IL8) bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation bilden sich haftende Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe, ungebundene Moleküle werden in den folgenden vier Spülvorgängen mit Waschpuffer entfernt.

Nach Ende der Inkubationszeit wird die Lösung abgeschüttet und die Kuvetten jeweils viermal mit je 400 µl Waschpuffer gefüllt, entleert und vorsichtig ausgeklopft, bis die Waschlösung vollständig entfernt ist.

Anschließend werden 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung (das für die spätere Farbreaktion verantwortliche Enzym) zugegeben und die Proben nach Abdecken mit Folie erneut bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. HRP bindet sich an die haftenden Dreifach-Komplexe.

Nach viermaligem Waschen wird nun 100 µl stabilisiertes Chromogen in alle Probengefäße zugegeben; die folgende Inkubation in Dunkelheit erfolgt je nach Photometer und dessen oberer Messgrenze. In unserem Fall wurden die IL4- und IL8-Proben für 15 Minuten; die IL12-Proben für 20 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Stopplösung bricht die Reaktion schließlich ab und ein Farbumschlag von blau nach gelb wird sichtbar. Die optische Dichte von Standard und Proben wird nun innerhalb von zwei Stunden bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzlänge von 492 nm gemessen.

Material und Methoden

Mit Excel (Microsoft) wurde nun aus den Werten der optischen Dichte und der entsprechenden Konzentration der Standardverdünnungsreihe eine Standardkurve erstellt; Verdünnungen (z.B. IL8 1:5) wurden miteingerechnet. Die ermittelte optische Dichte ist direkt proportional zur Farbintensität in der untersuchten Probe und kann unter Bezugnahme der Standardkurve in die tatsächliche Interleukin-Konzentration umgerechnet werden. Mit der optischen Dichte als abhängige Variable und der Konzentration als unabhängige Variable entsteht eine polynomische Funktion – die Standardkurve. Durch die Gleichung der Kurve kann daher die Interleukin-Konzentration in der Patientenprobe anhand der optischen Dichte errechnet werden. [51, 81]

2.4 Statistik

Die im Rahmen der Studie erhobenen Daten wurden zu einer elektronischen Datenbank im Programm Microsoft Excel zusammengefasst und mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 18.0 für das Betriebssystem Windows, ausgewertet. Da es sich zum Teil um Longitudinaldaten handelt, wurden gemischt lineare Modelle zur Auswertung herangezogen, um Populations- und Individueneffekte gleichermaßen abbilden zu können. Darüber hinaus kamen der Wilcoxon-Rangsummen-Test und der Friedmann-Test zum Einsatz, da die Varianz der stetigen Merkmale in den einzelnen Gruppen nicht homogen war bzw. die stetigen Merkmale nicht normalverteilt vorlagen. Für alle Auswertungsergebnisse wurde ein p-Wert von $<0,05$ als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Analysen

3.1.1 Unabhängige Variablen

Tabelle 1 zeigt die Aufstellung der Basisdaten. Die Parameter Menopausenstatus, geografische Abstammung und Chronizität wurden im Rahmen der Anamnese am Zeitpunkt t1 ermittelt; Chronizität wurde dabei definiert als Vorliegen von mehr als drei Episoden behandlungswürdiger Vaginitis innerhalb des letzten Jahres. Die Zuteilung der Studienmedikation erfolgte doppelverblindet und randomisiert am Zeitpunkt t1, die Decodierung fand dementsprechend erst nach Studienende statt.

Eine Zunahme der klinischen Beschwerden nach Anwendung der Studienmedikation wurde in der visuellen Analogskala am Zeitpunkt t2 erhoben. Als Zusatzmedikation wurden zum Zeitpunkt t2 je nach klinischer Symptomatik, mikroskopischem Befund und Kultur unterschiedliche Präparate verabreicht: 17 (39,5 %) Frauen erhielten Ciprofloxacin 150 mg und Nystatin 100000 IE als Ovulum (Anwendung bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an alternierenden Tagen); 4 (9,3 %) Frauen wurde Fluconazol 200 mg p.o. einmalig verschrieben; 4 (9,3%) Frauen wurden mit Clindamycin-Creme (2 %, topische Anwendung einmal täglich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes) behandelt; 3 (7 %) Frauen bekamen Fluconazol und Clindamycin in oben angegebener Dosierung und Anwendungsweise. 15 (34,9 %) Frauen benötigten keine zusätzliche Medikation. Sämtliche Patientinnen mit Zusatzmedikation wurden in eine Gruppe zusammengefasst.

Die Kultur wurde nach jedem der drei Studienzeitpunkte ausgewertet; dadurch ergibt sich n = 150. Die Einteilung erfolgte in die Gruppen „blande Kultur“ (abgesehen von Laktobazillen leeres Bild), Kulturen mit Bakterieller-Vaginose-typischer Keimbesiedelung (*Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spezieis*, *Prevotella*, *Streptococcus viridans*, *Mycoplasma hominis*, *Peptococcus species*), Kulturen mit Candida-Besiedelung, Kulturen mit einem Mischbild aus BV und Candidiasis, und Kulturen mit unspezifischer Keimbesiedelung (*Staphylokokken*, *Streptokokken*, *Enterokokken*, *Corynebakterien*, *E. coli*, *Ureaplasmen*).

Fünf Patientinnen brachen die Studie frühzeitig ab, von diesen sind uns daher nur die erhobenen Parameter von Zeitpunkt t1 bekannt. Die fehlenden Werte im Verlauf wurden als „lost to follow-up“ gekennzeichnet.

Ergebnisse

Tabelle 1: Basisdaten, unabhängig

Parameter	n	%	Gültige %
Menopausenstatus^a			
prämenopausal	36	72,0	72,0
postmenopausal	14	28,0	28,0
Geografische Abstammung^a			
Europäisch	45	90,0	90,0
Türkisch	5	10,0	10,0
Chronizität^a			
Chronisch	23	46,0	46,0
Nicht chronisch	27	54,0	54,0
Dosis Pentamycin^a			
Placebo	13	26,0	26,0
3 mg	12	24,0	24,0
10 mg	12	24,0	24,0
30 mg	13	26,0	26,0
Zusatzmedikation^b			
Nein	15	30,0	34,9
Ja	28	56	65,1
Lost to follow-up	7	14,0	
Beschwerdezunahme^b			
Nein	37	74,0	86,0
Ja	6	12,0	14,0
Lost to follow-up	7	14,0	
Kultur^c			
blande	16	10,7	11,9
BV	38	25,3	28,1
Candida	10	6,7	7,4
BV + Candida	12	8,0	8,9
unspezifisch	59	39,3	43,7
Lost to follow up	5	15	

a. Zeitpunkt = 1 (t1); b. Zeitpunkt = 1 (t2); c. Zeitpunkt = 3 (t1, t2, t3), BV = bakterielle Vaginose.

3.1.2 Abhängige Variablen

3.1.2.1 Übersicht, nicht-transformiert

Tabelle 2 zeigt die Basisdaten der Interleukine 4, 8 und 12:

Tabelle 2: Basisdaten, abhängig

	n	max ^a	min ^a	MW ^a (\bar{x})	SD (σ)	Median gesamt ^a	Median t1 ^a	Median t2 ^a	Median t3 ^a	p- Wert ^b
IL4	123	404.21	.00	25,34	37,38	21,99	21,30	16,89	22,78	0,439
IL8	122	34231,20	.00	4358,04	6271,31	1797,21	2562,18	1932,86	1115,50	0,307
IL12	123	195.26	.00	14,99	29.09	5,29	7,34	3,80	4,24	0,006

a. Einheit = pg/ml b. p-Wert = Gesamtvergleich Studienzeitpunkte

IL4 bleibt in der Gesamtübersicht zu allen drei Beobachtungs-Zeitpunkten stabil, es bestehen keine signifikanten Tendenzen gesamt oder zwischen t1/t2/t3.

IL8 sinkt signifikant von t1 zu t3 ($p\text{-Wert}_{t1-t3} = \mathbf{0.048}$):

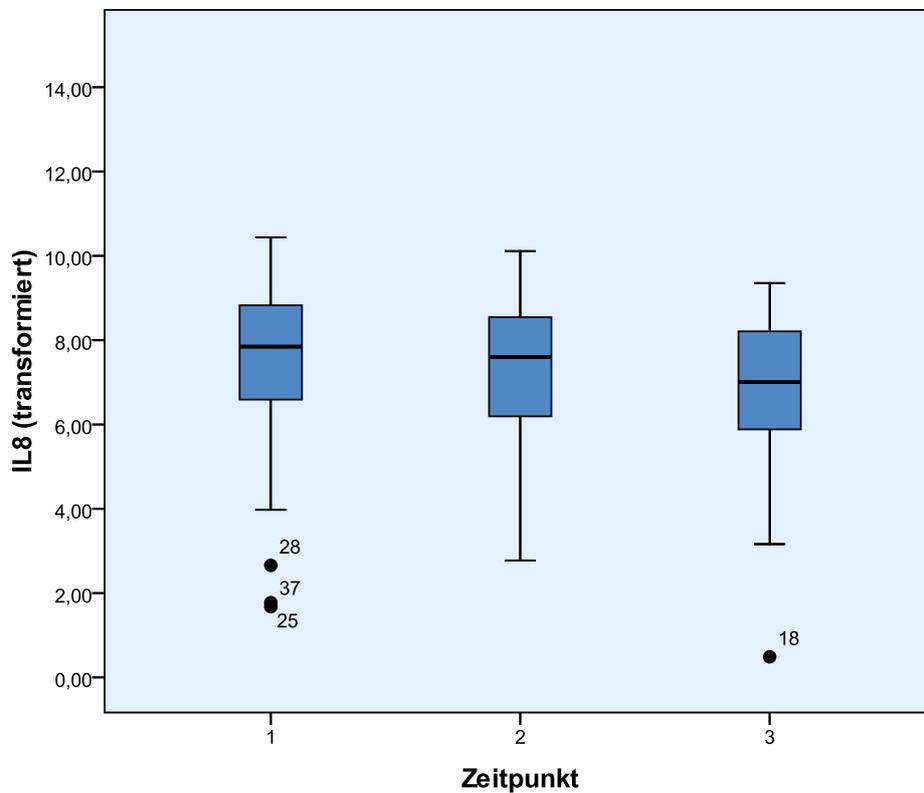


Abbildung 1: IL8 Gesamtübersicht

Ergebnisse

IL12 sinkt ebenfalls in der Gesamtübersicht vom Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2 und 3 ab (p -Wert_{t1/t2}=**0.004**; p -Wert_{t1/t3}=**0.008**)

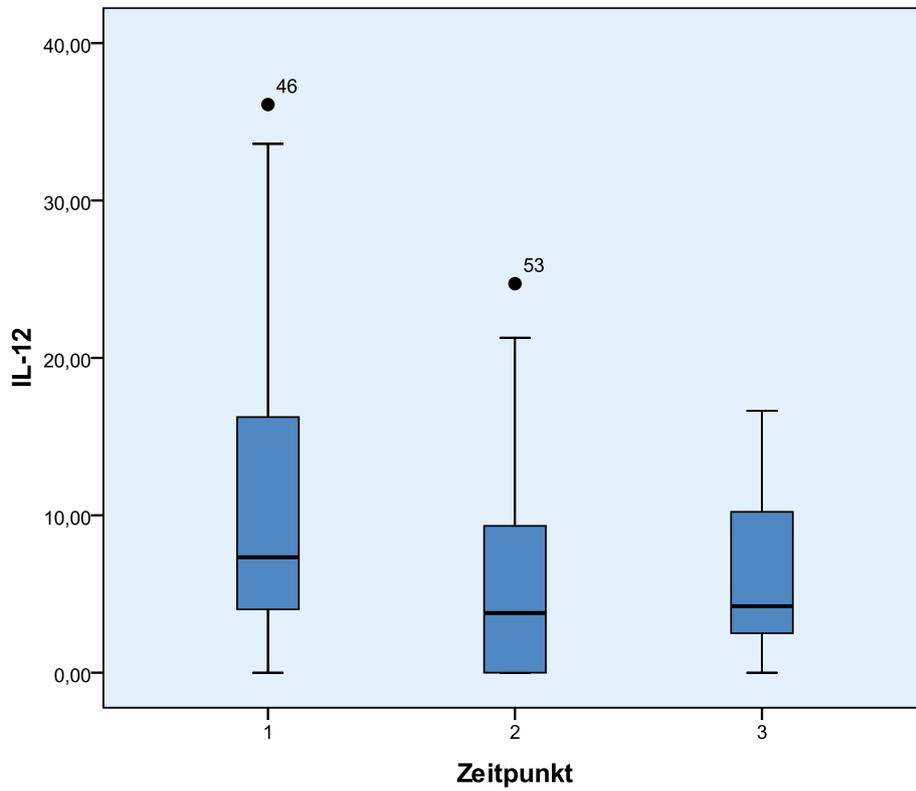


Abbildung 2: IL12 Gesamtübersicht

3.2 Explorative Analysen

3.2.1 IL4

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Auswertung der Mediane von IL4 in Bezug auf den jeweiligen Parameter.

Tabelle 3: Median IL4, Auswertung

Parameter	gesamt	t1	t2	t3	p-Wert ^a
Menopausenstatus					
Prämenopausal	22,27	23,10	16,85	23,67	0.840
postmenopausal	18,92	8,55	21,44	22,78	0.232
p-Wert ^b	0.146				
Geografische Abstammung					
Europäisch	21,44	20,60	16,41	22,78	0.339
Türkisch	24,35	23,67	25,02	25,16	1.000
p-Wert ^b	0.350				
Chronizität					
Chronisch	23,38	23,38	16,85	25,90	0.494
Nicht chronisch	17,29	17,89	16,92	18,95	0.556
p-Wert ^b	0.067				
Zusatzmedikation					
Nein	15,22	9,24	13,03	26,33	0.046
Ja	22,78	23,45	22,27	22,78	0.951
p-Wert ^b	0.101				
Beschwerdezunahme					
Nein	21,02	20,60	16,24	22,78	0.518
Ja	28,23	26,46	26,63	28,41	0.549
p-Wert ^b	0.128				
Kultur					
blande	28,23				
BV	26,10				
Candida	19,78				
BV + Candida	18,08				
unspezifisch	18,26				
p-Wert ^b	0.530				

a. p-Wert bezieht sich auf Gesamtvergleich der Studienzeitpunkte.

b. p-Wert bezieht sich auf Gruppenvergleiche zum jeweiligen Parameter ohne Zeitbezug.

Ergebnisse

3.2.1.1 ZUSATZMEDIKATION

Signifikant fällt dabei nur der Vergleich der Gruppe hinsichtlich benötigter Zusatzmedikation aus: während IL4 bei Patientinnen mit Zusatzmedikation über alle drei Studienzeitpunkte relativ stabil bleibt, startet IL4 bei Patientinnen ohne Zusatzmedikation bei einem mehr als 50% niedrigeren Median und steigt bis zum dritten Untersuchungszeitpunkt über 100% an ($p\text{-Wert}_{t_1/t_2}=0.009$; $p\text{-Wert}_{t_1/t_3}=0.039$).

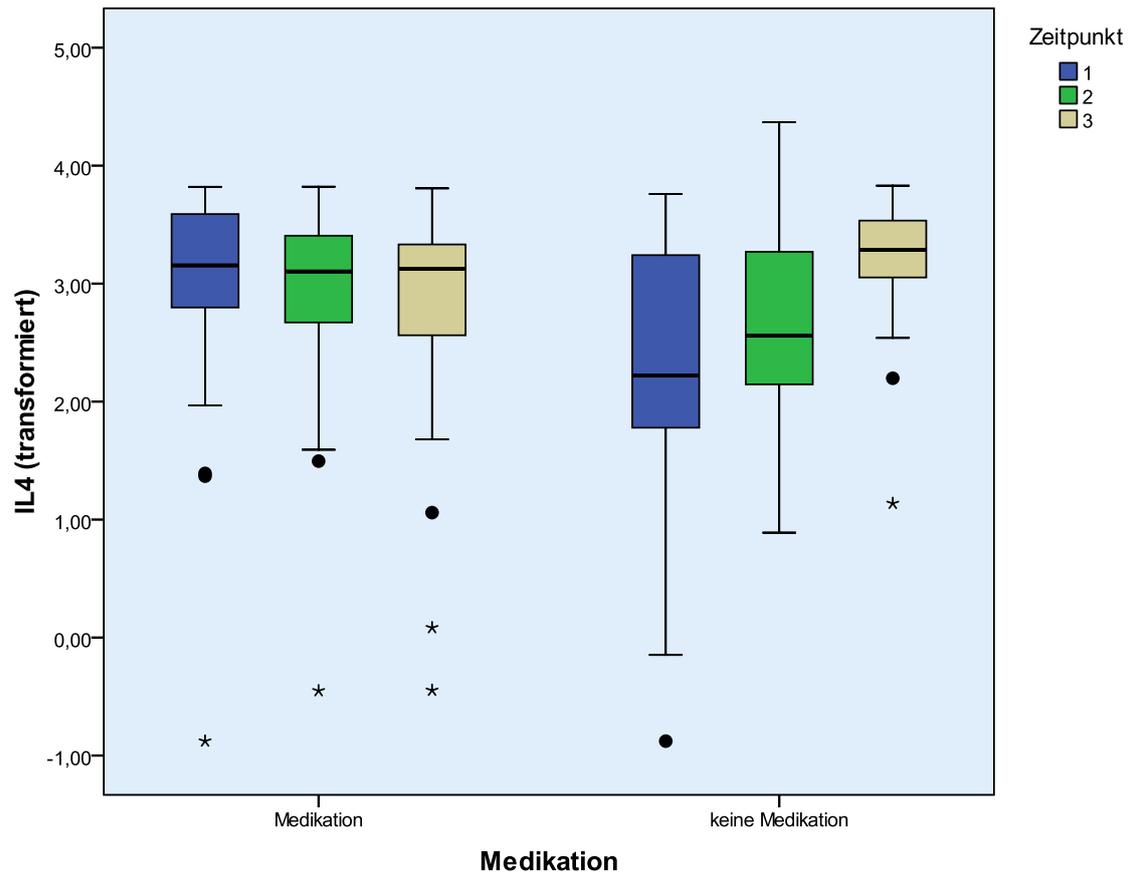


Abbildung 3: IL4-Verlauf in Abhängigkeit von der Einnahme einer Zusatzmedikation

Patientinnen, die eine Zusatzmedikation erhalten, sind hinsichtlich aller anderen Parameter (Menopause, geografische Abstammung, Chronizität und Beschwerdezunahme) unauffällig und entsprechen weitgehend der Verteilung der Gesamtpopulation. Patientinnen mit einer blanden Kultur benötigen am wenigsten Zusatzmedikation. Eine weitere statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Fallzahl nicht sinnvoll.

Ergebnisse

3.2.1.2 KULTUR

Die Mediane unterscheiden sich zwar nicht signifikant ($p\text{-Wert} = 0.530$) in Bezug auf die Kultur. Es lässt sich jedoch eine Tendenz ablesen: den höchsten IL4-Median weist die blande Kultur auf, gefolgt von der Bakteriellen Vaginose. Die Candidiasis, Mischinfektionen aus BV und Candida, und unspezifische Keimbeseidelungen zeigen niedrigere Mediane.

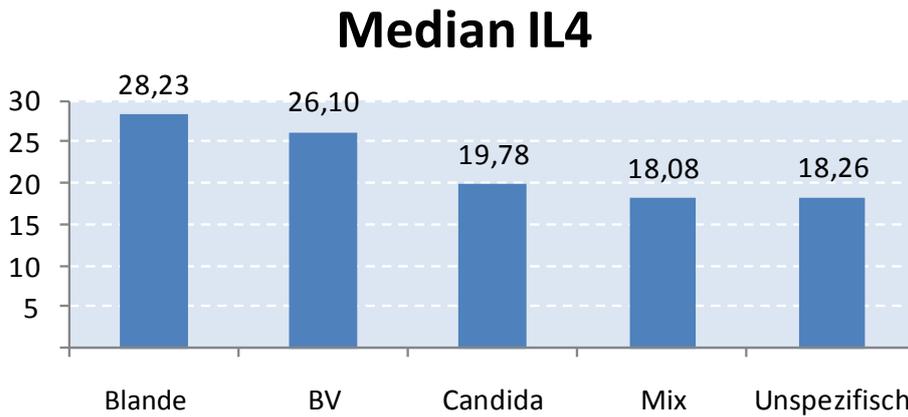


Abbildung 4: IL4 und Kultur

Eine explorative Analyse der Kulturen mit time-effect ist nicht möglich, da die Kultur als instabiler Parameter im Verlauf wechseln kann.

3.2.2 IL8

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Auswertung der Mediane von IL8 in Bezug auf den jeweiligen Parameter:

Tabelle 4: Median IL8, Auswertung

Parameter	gesamt	t1	t2	t3	$p\text{-Wert}^a$
Menopausenstatus					
prämenopausal	1819,69	1819,69	2010,56	1256,66	0.422
postmenopausal	1774,72	3231,81	1683,53	723,71	0.122
$p\text{-Wert}^b$	0.530				
Geografische Abstammung					
Europäisch	1647,92	2389,43	1819,69	1100,98	0.393
Türkisch	4556,40	9292,70	5468,46	1649,03	0.223
$p\text{-Wert}^b$	0.085				

Ergebnisse

Chronizität					
Chronisch	1050,92	1215,42	1159,74	744,66	0.105
Nicht chronisch	1965,41	2794,70	2003,01	1309,62	0.939
<i>p-Wert^b</i>	0.056				
Zusatzmedikation					
Nein	905,30	794,43	702,11	1256,66	0.472
Ja	3033,49	4537,45	2964,38	974,34	0.035
<i>p-Wert^b</i>	0.005				
Beschwerdezunahme					
Nein	2010,56	2854,48	2010,56	1421,42	0.895
Ja	570,34	3954,66	1045,11	107,01	0.007
<i>p-Wert^b</i>	0.051				
Kultur					
blande	538,93				
BV	1681,67				
Candida	8375,48				
BV + Candida	4416,59				
unspezifisch	1647,92				
<i>p-Wert^b</i>	0.007				

a. p-Wert bezieht sich auf Gesamtvergleich der Studienzeitpunkte.

b. p-Wert bezieht sich auf Gruppenvergleiche zum jeweiligen Parameter ohne Zeitbezug

3.2.2.1 ZUSATZMEDIKATION

Patientinnen, die Zusatzmedikation erhalten, zeigen ein signifikant höheres IL8-Gesamtniveau gegenüber den Patientinnen, die keine Zusatzmedikation benötigen (*p-Wert*= **0.005**). Auch im Verlauf unterscheiden sich die beiden Gruppen signifikant: bei Patientinnen mit Zusatzmedikation fällt IL8 im Verlauf von t1 zu t3 (*p-Wert_{t1/t3}*= **0.004**), während die Gruppe ohne Zusatzmedikation keinen signifikante Unterschied im Verlauf bietet.

Ergebnisse

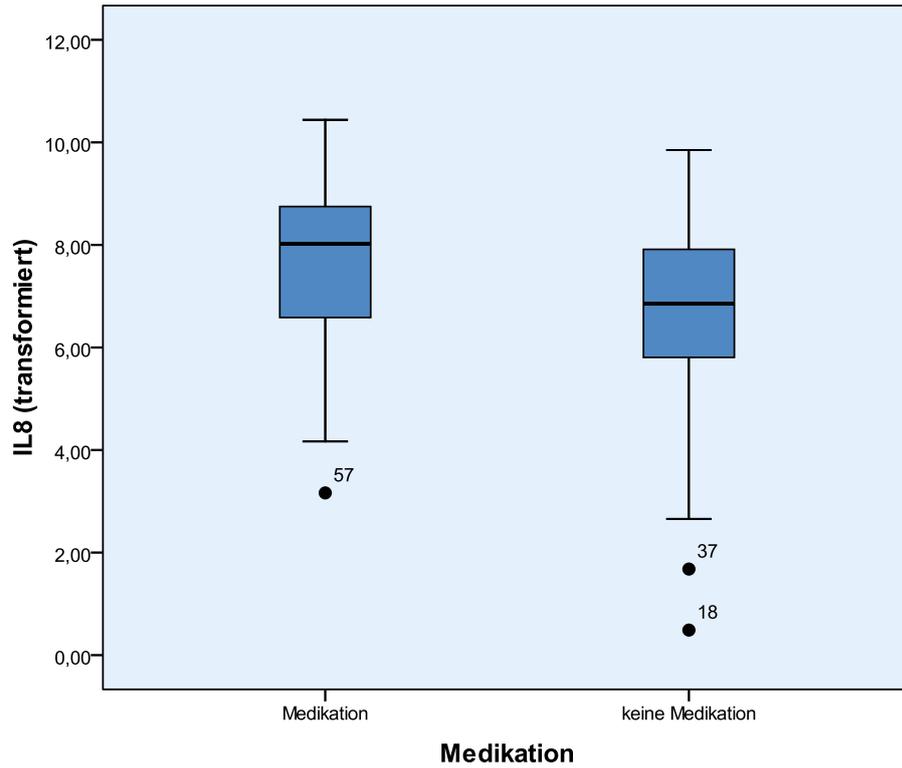


Abbildung 5: IL8 in Abhängigkeit der Einnahme einer Zusatzmedikation, gesamt

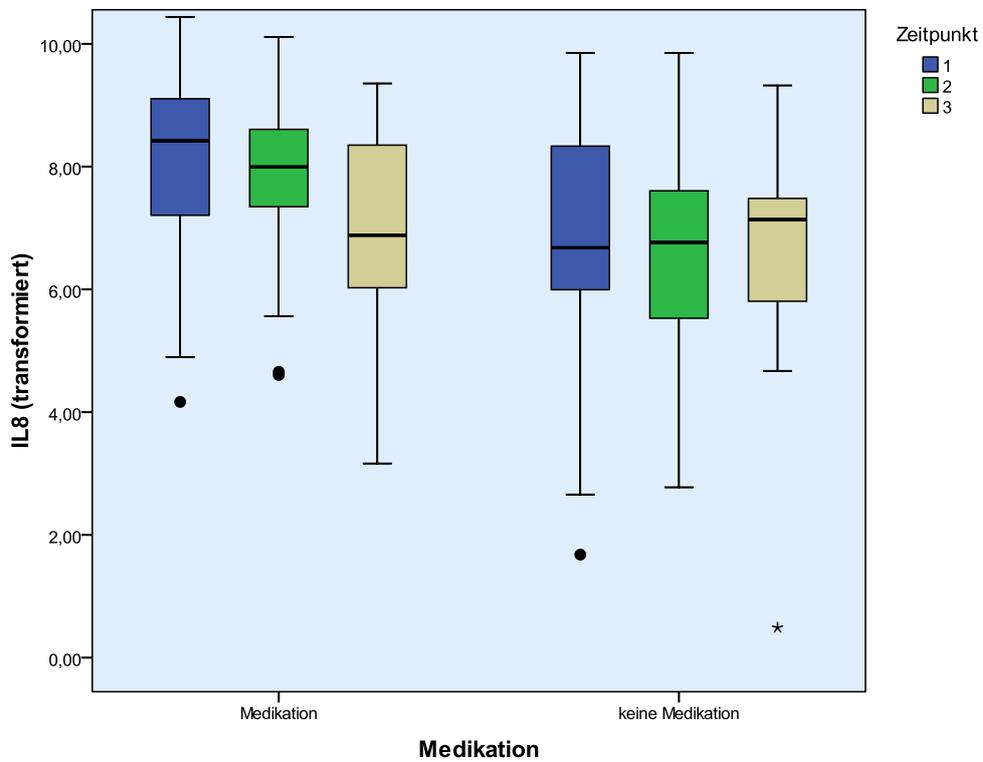


Abbildung 6: IL8 in Abhängigkeit der Einnahme einer Zusatzmedikation, zeitlicher Verlauf

Ergebnisse

Patientinnen, die eine Zusatzmedikation erhalten, unterscheiden sich nicht signifikant in den Basisdaten und entsprechen weitgehend der Verteilung der Gesamtpopulation. Am wenigsten Zusatzmedikation benötigen die Patientinnen mit einer primär blanden Kultur. Eine weitere statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Fallzahl nicht sinnvoll.

3.2.2.2 BESCHWERDEZUNAHME

Der IL8-Gesamtmedian liegt in der Gruppe, deren Beschwerden nach Einnahme der Studienmedikation zunehmen, nahezu signifikant unter dem IL8-Median der Patientinnen mit unauffälligem Verlauf ($p\text{-Wert}=0.051$). Nehmen die klinischen Beschwerden nach Medikamenteneinnahme zu, kommt es zudem zu einem signifikanten Abfall von IL8 im Zeitverlauf (alle paarweisen Vergleiche: $p\text{-Wert}_{t_1/t_2/t_3}=0.043$). Patientinnen mit unproblematischem Verlauf zeigen hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten ($p\text{-Wert}=0.895$)

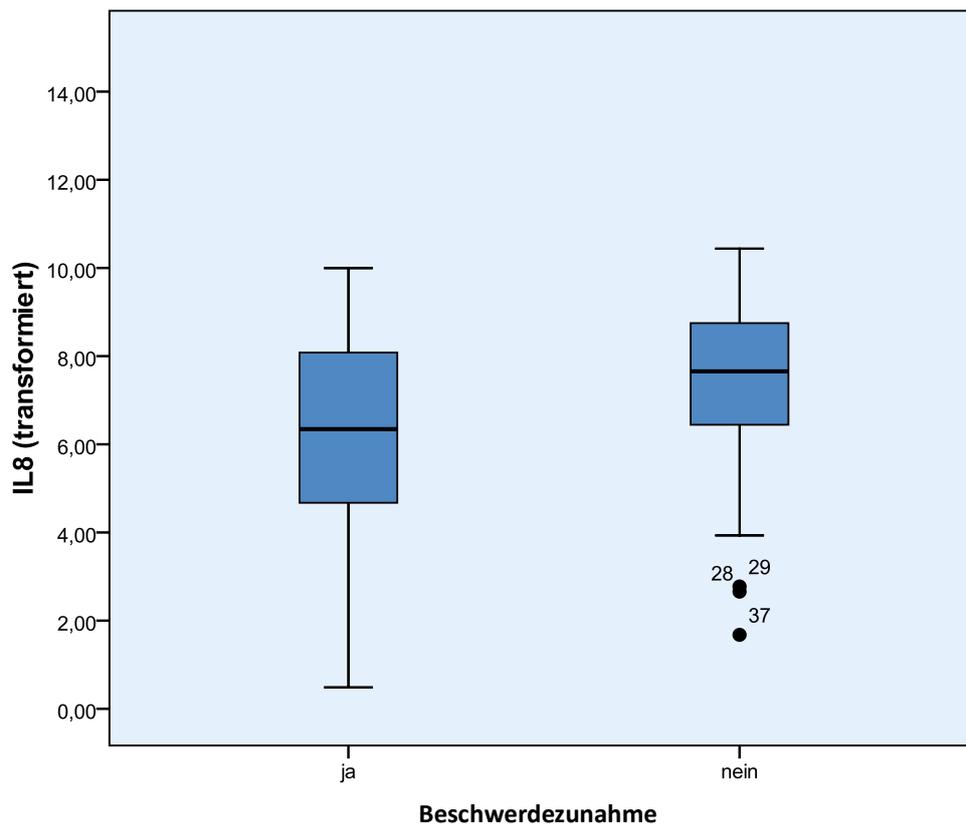


Abbildung 7: IL 8 und Beschwerdezunahme, gesamt

Ergebnisse

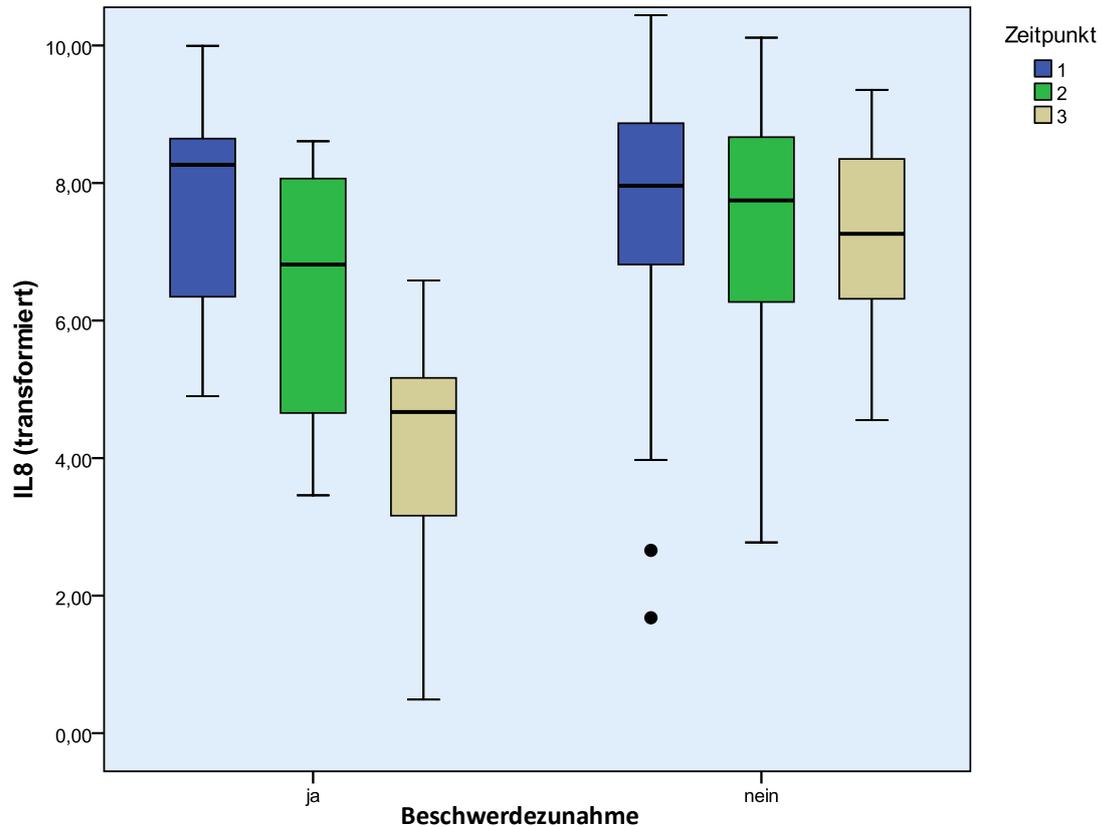


Abbildung 9: IL8 und Beschwerdezunahme, Verlauf

Insgesamt zeigen sechs der 50 Patientinnen eine Zunahme der Beschwerden. Dabei könnte ein Zusammenhang mit Chronizität bestehen: fünf der sechs betroffenen Patientinnen leiden unter chronischen Beschwerden. Die weiteren Parameter ergeben in beiden Gruppen weitgehend keine signifikanten Unterschiede in den Basisdaten.

3.2.2.3 KULTUR

Die IL8-Mediane unterscheiden sich signifikant zwischen den verschiedenen Kulturen (***p-Wert=0.007***). So ist IL8 bei Candidiasis-Patientinnen mit Abstand am höchsten ausgeprägt, folgend kommen Mischinfektionen mit Candida und BV-spezifischen Kulturen, deutlich niedriger liegen BV- und unspezifische Kulturen. Am geringsten ausgeprägt ist IL8 bei blanden Kulturen.

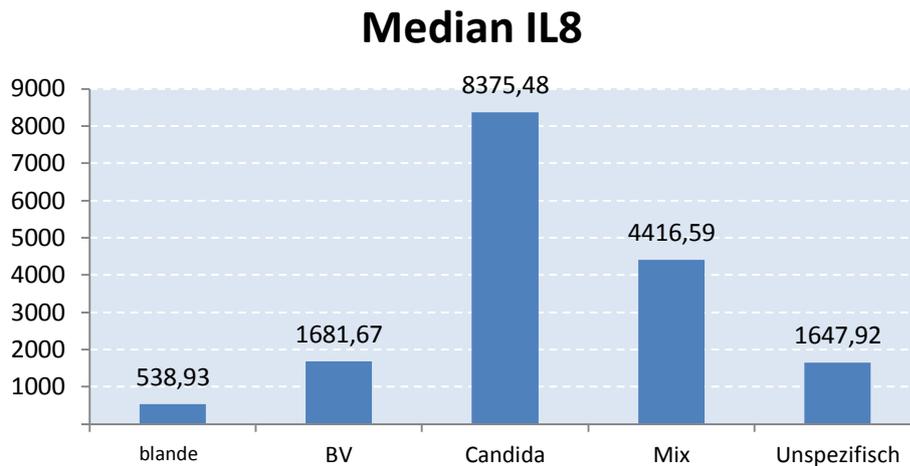


Abbildung 10: IL8 und Kultur

Eine explorative Analyse mit time-effect ist nicht möglich, da die Kultur als instabiler Parameter im Verlauf wechseln kann.

3.2.3 IL12

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Auswertung der Mediane von IL12 in Bezug auf den jeweiligen Parameter:

Tabelle 5: Median IL12, Auswertung

Parameter	gesamt	t1	t2	t3	p-Wert ^a
Menopausenstatus					
prämenopausal	3,51	5,76	2,43	3,11	0.013
postmenopausal	14,28	16,24	14,82	11,97	0.320
p-Wert ^b	< 0.001				
Geografische Abstammung					
Europäisch	5,11	7,82	3,42	4,09	0.009
Türkisch	5,87	5,76	4,53	5,98	0.607
p-Wert ^b	0.534				
Chronizität					
Chronisch	4,67	6,35	4,36	4,09	0.017
Nicht chronisch	5,72	9,00	3,42	5,85	0.230
p-Wert ^b	0.249				

Ergebnisse

Zusatzmedikation					
Nein	6,78	10,82	5,11	3,93	0.155
Ja	4,98	8,68	2,65	4,24	0.036
<i>p-Wert^b</i>	0.332				
Beschwerdezunahme					
Nein	4,98	7,93	2,65	4,16	0.021
Ja	9,89	17,25	6,64	9,98	0.247
<i>p-Wert^b</i>	0.141				
Kultur					
blande	4,24				
BV	5,40				
Candida	26,59				
BV + Candida	9,55				
unspezifisch	5,29				
<i>p-Wert^b</i>	0.360				

a. p-Wert bezieht sich auf Gesamtvergleich der Studienzeitpunkte mittels Friedman-Test.

b. p-Wert bezieht sich auf Gruppenvergleiche zum jeweiligen Parameter ohne Zeitbezug

3.2.3.1 MENOPAUSE

Bei postmenopausale Patientinnen finden sich gegenüber den prämenopausalen Patientinnen erhöhte IL12-Werte ($p\text{-Wert} = <0.001$). Postmenopausale Patientinnen zeigen allerdings keine signifikanten Veränderungen im Verlauf, während bei prämenopausalen Patientinnen IL12 von t1 zu t2 ($p\text{-Wert}_{t1/t2}=0.024$) und t1 zu t3 ($p\text{-Wert}_{t1/t3}=0.005$) signifikant abfällt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf sämtliche anderen Parameter.

Ergebnisse

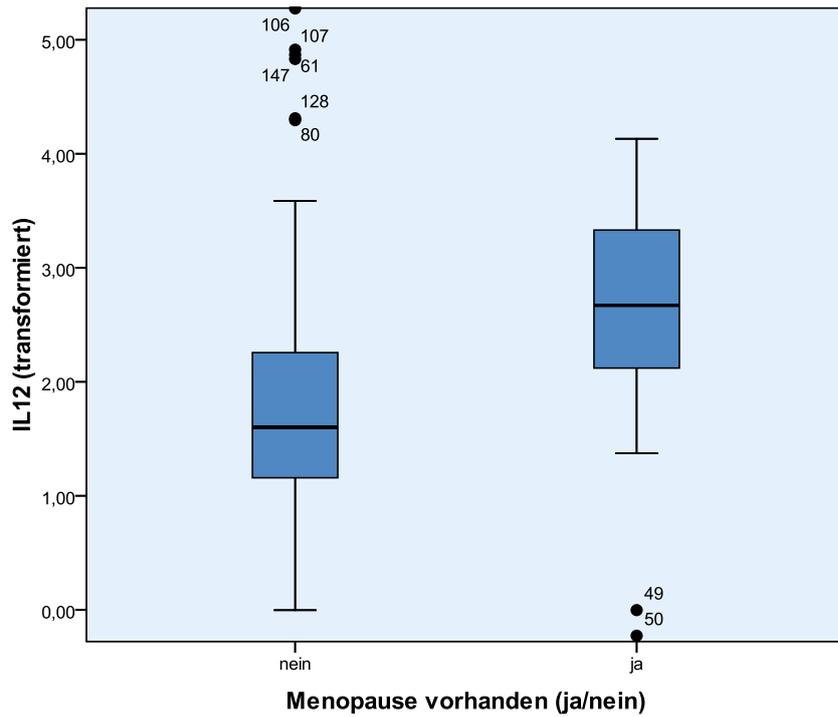


Abbildung 11: IL12 und Menopause, gesamt

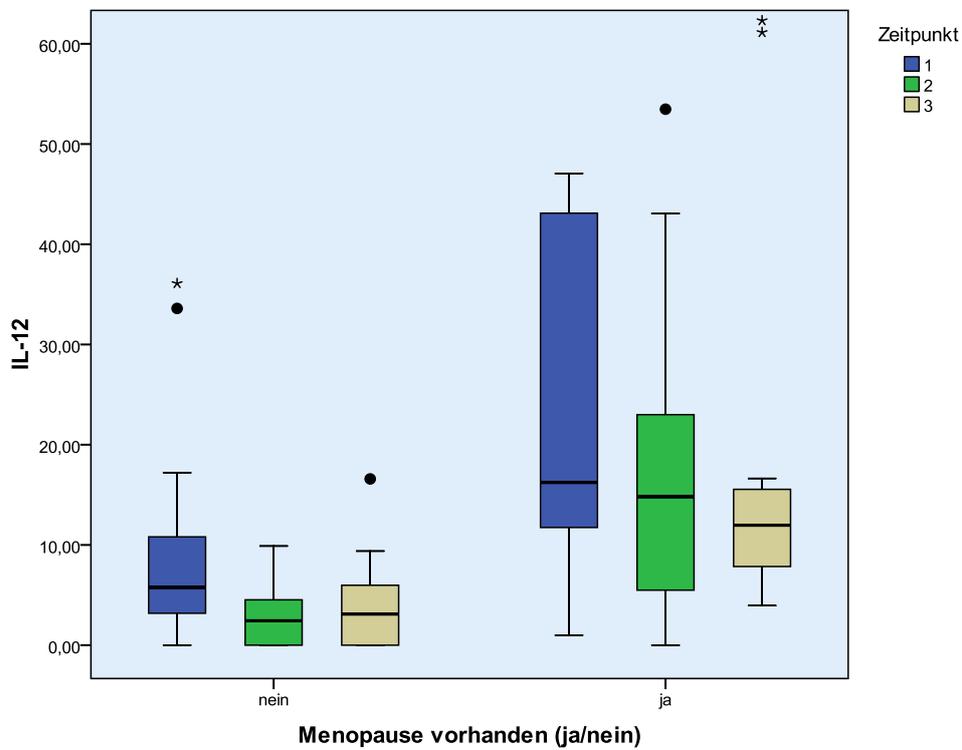


Abbildung 12: IL12 und Menopause, Verlauf

Ergebnisse

3.2.3.2 GEOGRAFISCHE ABSTAMMUNG

Während die Türkinnen keinen IL-12-Abfall zeigen, sinkt bei den Europäerinnen die IL-12-Konzentration zwischen t1 und t2 ($p\text{-Wert}=0.023$) und t1 und t3 ($p\text{-Wert}=0.018$) signifikant ab. Ein Zusammenhang mit anderen Parametern ist so nicht sinnvoll abzuleiten; erwähnenswert ist einzig die Tatsache, dass sämtliche türkischen Patientinnen in die prämenopausale Gruppe fallen und dabei nicht den Abfall zeigen, der bei den anderen Patientinnen dieser Gruppe zu sehen war.

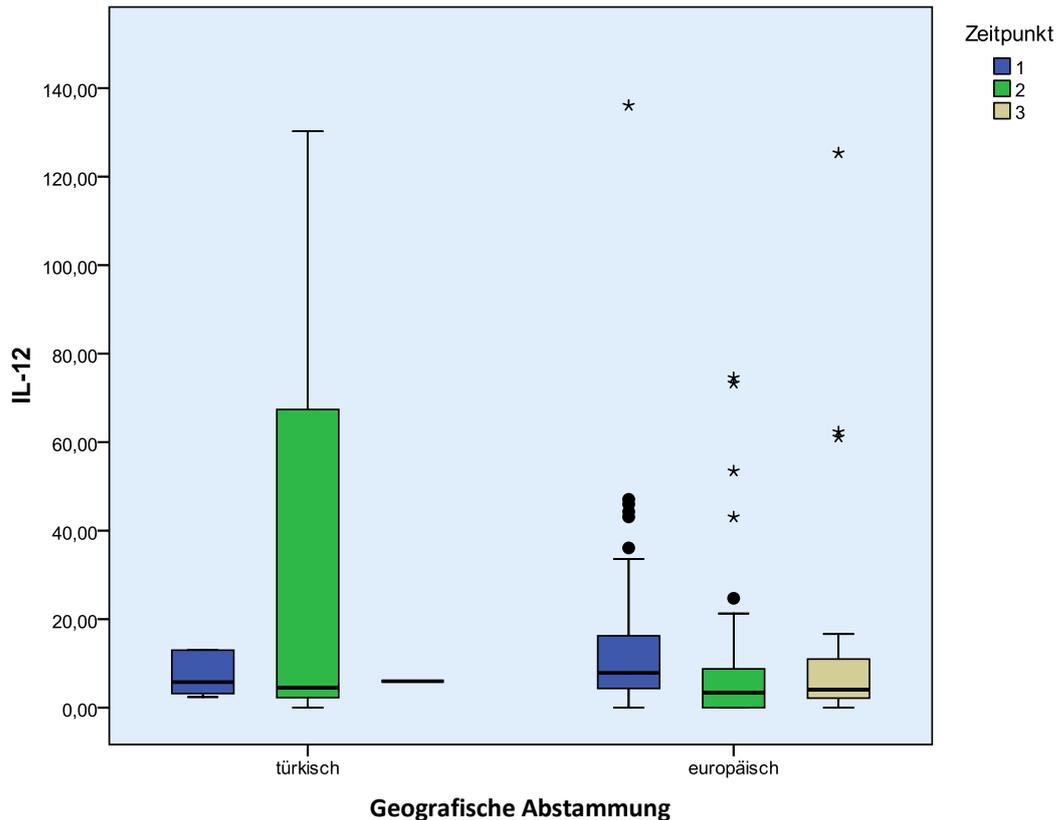


Abbildung 13: IL12 und Geografische Abstammung, Verlauf

3.2.3.3 CHRONIZITÄT

Bei Patientinnen mit chronischen Beschwerden besteht ein signifikanter IL-12-Abfall zwischen t1 und t3 ($p\text{-Wert}_{t1/t3}=\mathbf{0.015}$), während Patientinnen mit erstmaligen Infektionen keine signifikanten Unterschiede aufweisen ($p\text{-Wert}=0.230$).

Fünf der sechs Patientinnen mit Beschwerdezunahme finden sich unter den Patientinnen mit chronischen Beschwerden (83.3 %). Prämenopausale Frauen leiden häufiger an chronischen Vaginalinfektionen als postmenopausale (19 versus 4, 82.6 %). Alle anderen Parameter ergeben keine signifikanten Ergebnisse.

Ergebnisse

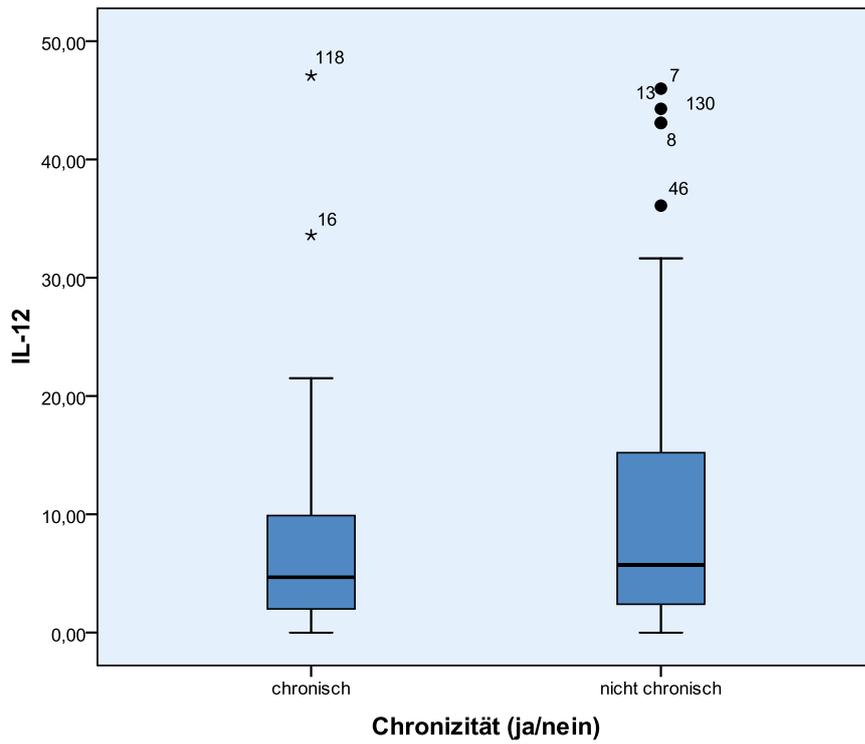


Abbildung 14: IL12 und Chronizität, gesamt

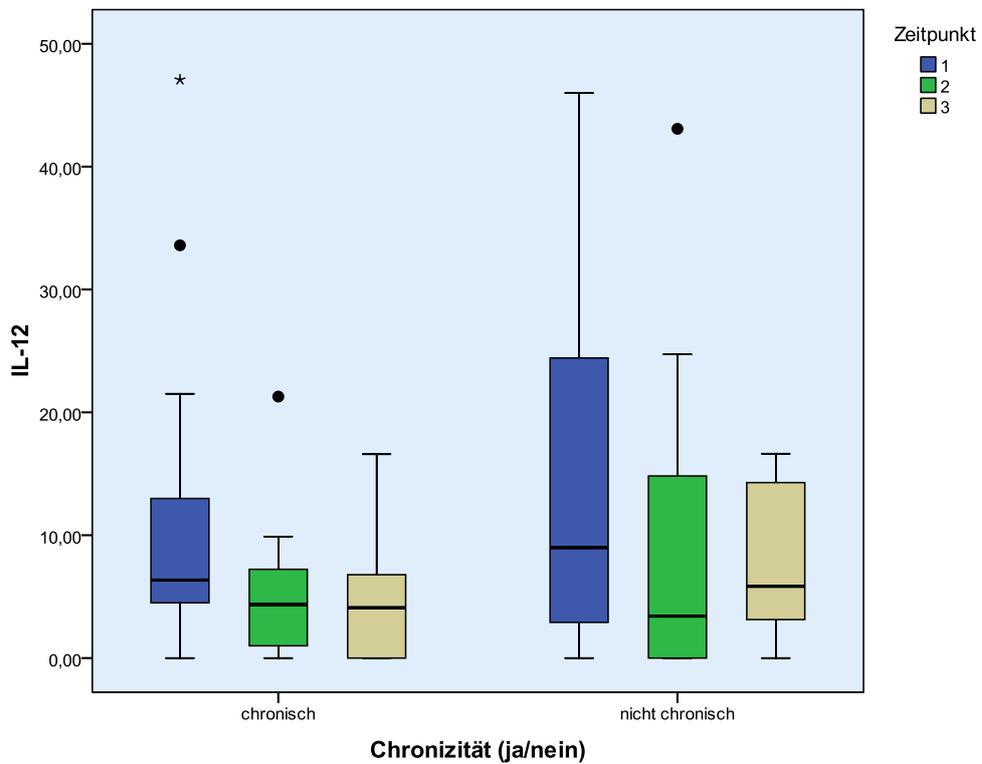


Abbildung 14: IL12 und Chronizität, Verlauf

Ergebnisse

3.2.3.4 MEDIKATION

Wird Zusatzmedikation benötigt, besteht ein signifikanter Abfall zwischen t1 und t2 ($p\text{-Wert}_{t1/t2}=\mathbf{0.03}$) sowie zwischen t1 und t3 ($p\text{-Wert}_{t1/t3}=\mathbf{0.03}$). Keine signifikante Tendenz besteht bei Patientinnen ohne Bedarf an Zusatzmedikation.

Die übrige Parameter-Verteilung in dieser Gruppe ist nicht signifikant. Am wenigsten Zusatzmedikation benötigen die Patientinnen mit einer blanden Kultur. Eine weitere statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Fallzahl nicht sinnvoll.

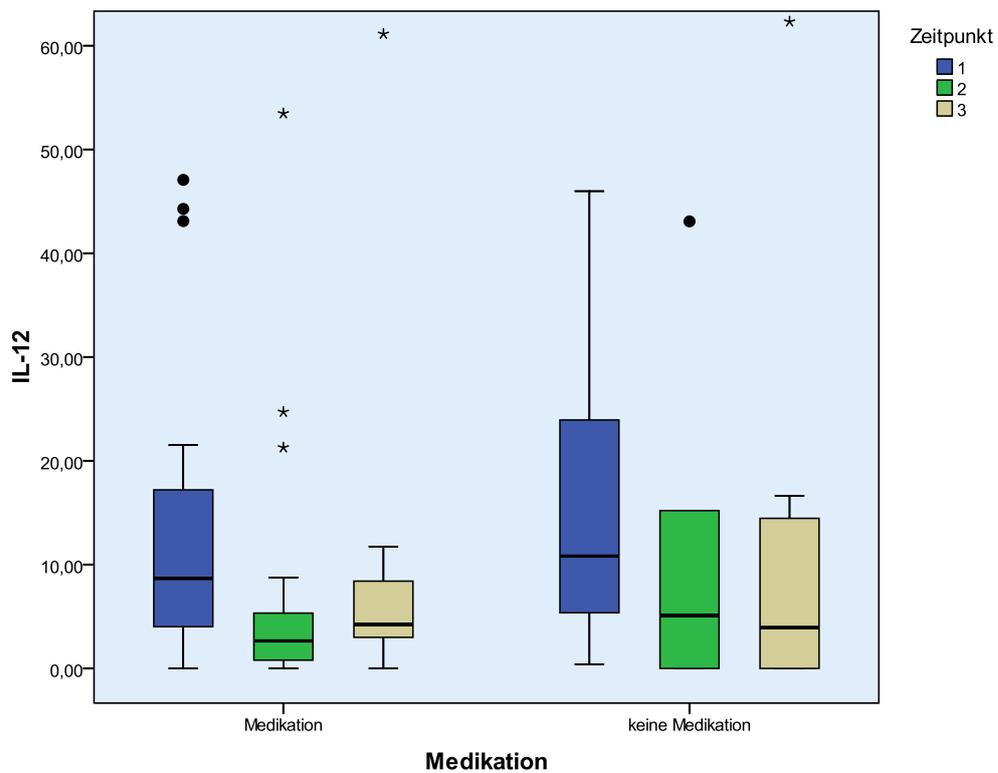


Abbildung 15: IL12 und Zusatzmedikation, gesamt

3.2.3.5 BESCHWERDEZUNAHME

Bei Patientinnen, deren klinische Symptome nach Medikamenteneinnahme zunehmen, bleibt IL12 über alle drei Zeitpunkte stabil. Patientinnen ohne Beschwerdezunahme zeigen dagegen einen signifikanten Abfall des IL12 von t1 zu t2 ($p\text{-Wert}_{t1/t2}=\mathbf{0.021}$), und t1 zu t3 ($p\text{-Wert}_{t1/t3}=\mathbf{0.032}$).

Ergebnisse

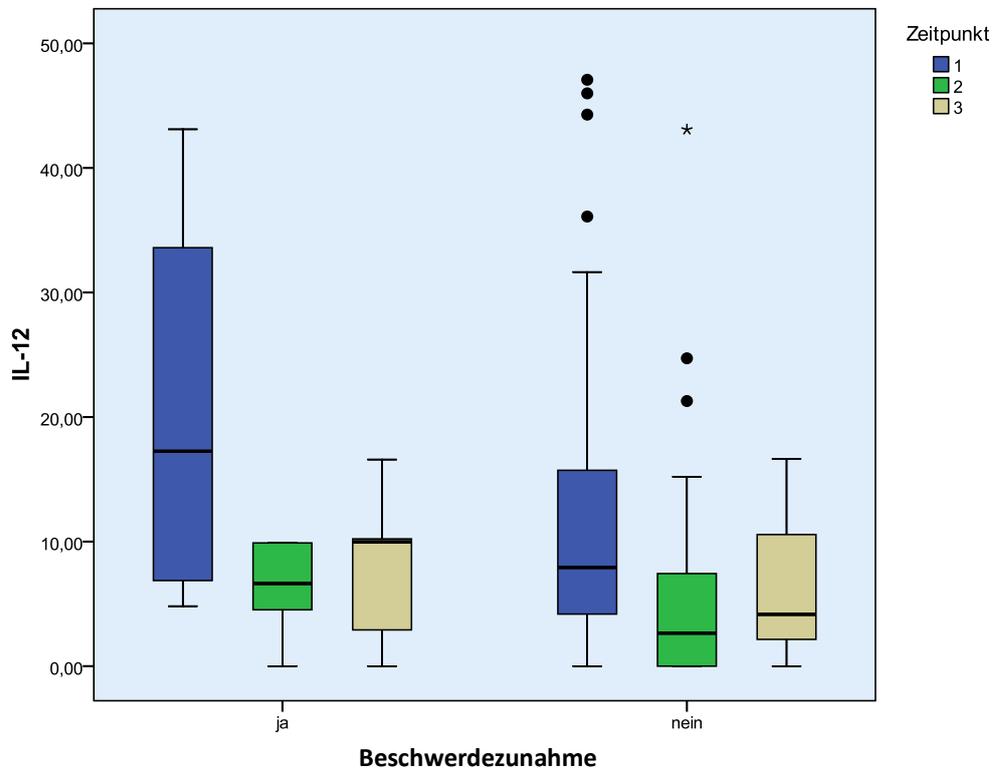


Abbildung 16: IL12 und Beschwerdezunahme, Verlauf

Da nur sechs der 50 Patientinnen an Beschwerdezunahme leiden, ist eine weitere Aufschlüsselung der anderen Parameter in dieser Gruppe nicht aussagekräftig; Patientinnen mit Beschwerdezunahme zeigen jedoch am Zeitpunkt t1 einen mehr als doppelt so hohen IL12-Median als die Patientinnen, die einen unproblematischen Verlauf bieten. Zudem sind überdurchschnittlich mehr chronische Patientinnen betroffen als nicht-chronische (5 vs. 1, 83.3%). Die anderen Parameter erbringen keine signifikanten Ergebnisse.

3.2.3.6 KULTUR

Der höchste IL12-Median entsteht bei Candidiasis (26,59 pg/ml). Die Auswertung von IL12 bezüglich der Kultur ergibt jedoch kein signifikantes Ergebnis ($p\text{-Wert}=0.360$). Eine Auswertung im Verlauf ist wie bereits beschrieben nicht sinnvoll.

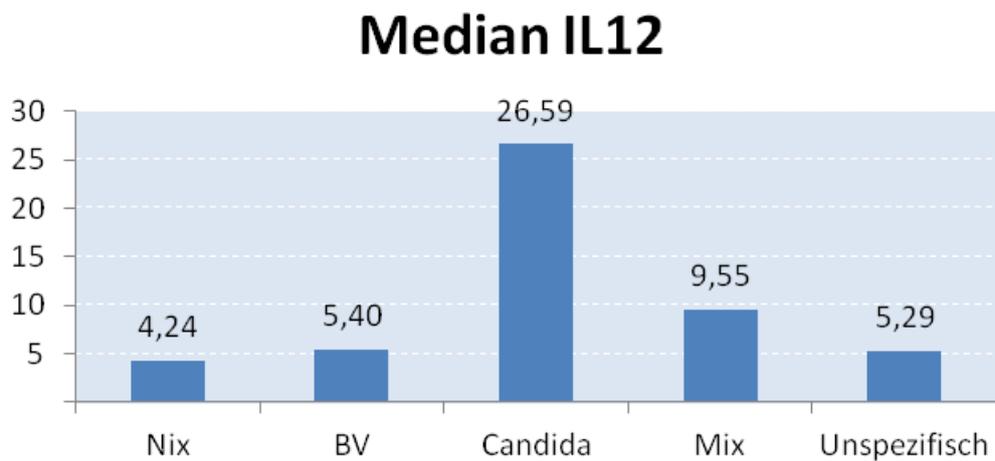


Abbildung 157: IL12 und Kultur

4. Diskussion

Die immunologischen Vorgänge im Genitaltrakt unterliegen vielen verschiedenen Ansprüchen und Einflüssen. Die Zytokine nehmen dabei eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Abläufe während der Entzündungsreaktion ein.

Die bisherigen Erkenntnisse werden im Folgenden kurz zusammengefasst und leiten sich hauptsächlich aus immunologischen Systemerkrankungen, wie zum Beispiel Asthma, ab:

Eine suffiziente Immunantwort gegen Bakterien und Pilze ist TH₁-dominiert. Ein wichtiges Interleukin in diesem Antworttyp ist IL12, das über INF γ Makrophagen zu Phagozytose anregt und die Zytotoxizität von NK- und CD8⁺-Zellen verstärkt [49, 52, 53, 60].

IL4 induziert dagegen den Klassenwechsel zur TH₂-dominierten Immunantwort mit IgE-Produktion, Mastzell- und Eosinophilen-Aktivierung, die sich vor allem gegen extrazelluläre Erreger richtet [53, 56, 57]. IL4 schaltet die IL12-vermittelten Signale über STAT6 ab, die TH₁-Polarisierung wird inhibiert [49]. Dieser Mechanismus leitet unter physiologischen Bedingungen das Ende einer Entzündungsreaktion ein, wenn die Infektion beseitigt ist, und vermeidet eine überschießende Immunantwort. Darüber hinaus vermittelt IL4 die alternative Makrophagenaktivierung (M2), die gegenüber der klassischen, durch INF γ -vermittelten Aktivierung (M1), nicht die Phagozytose, sondern die Kollagensynthese und Fibrose auslöst [59]. Durch hohe IL4-Spiegel wird die TH₁-Antwort also gleichsam unterdrückt wie gestört, so dass Bakterien und Pilze weniger effizient bekämpft werden können [49, 82, 83].

Während IL4 und IL12 in vielfältiger Weise miteinander verwoben sind, läuft die Signalkaskade via IL8 eher separiert ab. IL8 dient als Chemokin in erster Linie der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und wirkt damit proinflammatorisch, auch T-Zellen folgen in gewissem Maß diesem Reiz. IL 12 und IL4 nehmen in gegensätzlicher Weise Einfluss auf die T-Zell-Rekrutierung [64].

Bei den immunologischen Systemerkrankungen handelt es sich jedoch um autoimmune Modellerkrankungen, deren Abläufe nicht zwingend auf Erreger-bedingte Erkrankungen des Genitaltraktes übertragbar sind. Das genaue Zusammenspiel der Zytokine ist dabei hoch komplex und bisher nur ansatzweise verstanden. Die vorliegende Arbeit versucht, diese Lücke zu schließen und weitere, für die Immunologie des Genitaltrakts spezifische Erkenntnisse zu gewinnen.

4. Diskussion

4.1 IL4

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Patientinnen mit unkompliziertem Verlauf, die keine Zusatzmedikation benötigten, ein um 30% niedrigeres IL4-Level als die Gesamtpopulation, und einen signifikant ausgeprägten IL4-Anstieg im Verlauf haben. Patientinnen, die Zusatzmedikation benötigen, bleiben im Verlauf dagegen stabil in der Nähe des Gesamtmedian. Wie eben erläutert, ist dieser Verlauf als physiologisch anzusehen: niedrige IL4-Level zu Beginn einer Entzündung sind im Sinne einer starken TH₁-Reaktion von Vorteil; im Verlauf sollten sie ansteigen um eine Hyperinflammation zu vermeiden und die Entzündungsreaktion nach Abtötung der Erreger zu beenden. Liegt der IL4-Spiegel jedoch bereits zu Beginn einer Abwehrreaktion hoch, wird die suffiziente Immunantwort unterdrückt. Varin et al. zeigten eine signifikant verminderte dosisabhängige Phagozytosefähigkeit IL4-behandelter Makrophagen der Maus bei gleichzeitig gesteigerter Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL12 [83]. Dieser Effekt scheint im Hinblick auf eine erfolgreiche Infektbekämpfung kontraproduktiv: Erregerzahlen wie klinische Beschwerden bleiben auf hohem Niveau. Die betroffene Patientin benötigt in der Folge eine Zusatzmedikation. Dieser Zusammenhang ist auch im Public Health Management wesentlich, da die Unterdrückung der TH₁-Immunreaktion bei überwiegender TH₂-Abwehrsituation zu verminderter Effizienz von Impfungen in Gebieten mit hoher Helminthen-Durchseuchung führt; ebenso stellt er einen wichtigen Aspekt in der Tuberkulose-Therapie wie auch der AIDS-Forschung dar [84-88].

Eine entscheidende Ursache, die den Unterschied der IL4-Werte in den beiden Gruppen erklären könnte, liegt in der unterschiedlich hohen Reizempfindlichkeit der beiden TH-Subtypen. Die Hauptquelle für IL4 sind aktivierte TH₂-Zellen. Diese produzieren vermutlich vom Zeitpunkt ihrer Initiation an kontinuierlich sehr geringe Mengen an IL4. Kommt es erneut zu Stimulation durch das passende Antigen, wird die IL4-Produktion verstärkt. Ein Problem stellen dabei dauerhaft niederschwellige Reize dar: sie induzieren zwar die IL4-Produktion, jedoch keine echte Inflammation mit deutlicher IL12- Synthese, die das natürliche Gegengewicht darstellen würde [53]. In Kenntnis dieser Zusammenhänge kann anhand unserer auf IL4 bezogenen Ergebnisse die Hypothese generiert werden, dass es bei rezidivierender Stimulation mit geringen Erregerzahlen zu einer Störung des TH₁/TH₂-Gefüges kommt, das schließlich in einer TH₂-dominierten Dysbalance mit verminderter Fähigkeit zu TH₁-vermittelter Inflammation endet. Da die Vaginalflora unter physiologischen Bedingungen von vielen verschiedenen Keimen besiedelt ist, ist ein Szenario der dauerhaft niederschweligen Reizung in unserem Fall möglicherweise realistisch.

Unsere Daten ergeben keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Chronizität, wobei hier eingeräumt werden muss, dass in der vorliegenden Studie nur 5 Patientinnen einen chronischen Verlauf aufwiesen. Aus Untersuchungen an größeren Kollektiven von Weissenbacher et al. wurde die Hypothese einer allergischen Immunantwort generiert; hier zeigte sich ein signifikant erhöhtes IL4-Niveau im Vaginalsekret von 104 Patientinnen mit symptomatischer rezidivierender vulvovaginaler Candidiasis bei ebenfalls signifikant erhöhten Candida-spezifischen IgE-Spiegeln. Es wird diskutiert, dass eine sekundär-induzierte PGE₂-Synthese die Zell-vermittelte Immunität unterdrückt, was die Rekurrenz der Infektion erklären könnte. Die Symptomatik wird möglicherweise durch eine allergische Komponente verstärkt, so dass für diese Patientinnengruppe eine supportive Therapie mit einem Antihistaminikum oder einem Prostaglandin-Synthese-Inhibitor erwogen wird [89]. Naderi et al. konnten zudem eine negative Korrelation zwischen Eisenmangelanämie und erhöhten IL4-

4. Diskussion

Spiegeln im Serum bei rezidivierender vulvovaginaler Candidiasis nachweisen. Die Autoren führen die rezidivierenden Infektionen auf einen Shift der TH₁- hin zu einer TH₂-Antwort mit konsekutiver insuffizienter Erregerbekämpfung zurück [90]. Eine Bestimmung von Serumeisen und Hämoglobin war nicht Bestandteil unseres Studienprotokolls, wäre aber ein interessanter Ansatz in weiterführenden Projekten.

Weiterhin auffällig, wenn auch nicht signifikant, sind die hohen IL4-Werte bei Bakterieller Vaginose. Blande und BV-typische Kulturen liegen hinsichtlich ihres IL4-Medians beinahe gleich auf und 20-30 % höher als der Gesamtmedian, während Kulturen mit *Candida* und unspezifischer Besiedelung niedrigere IL4-Werte aufweisen. Die daraus abzuleitende unterdrückte TH₁-Antwort ist im Falle der blanden Kultur als physiologisch anzusehen: eine Inflammation ohne erregerspezifisches Korrelat wird so verhindert. Dass die BV-typische Kultur ebenfalls eine unterdrückte TH₁-Antwort im Sinne einer IL4-vermittelten Immunsuppression präsentiert, zeigt dagegen die für dieses Krankheitsbild kennzeichnende Einschränkung der genitomukosalen Abwehr [1]. Wie es zu dieser mangelnden Immunreaktion kommt, ist noch nicht abschließend geklärt - möglicherweise liegt eine allergische Komponente mit primär höheren IL4-Spiegeln im Sinne einer verminderten TH₁-Antwort vor. In den letzten Jahren wurden diesbezüglich verschiedene Immunescapephänomene aufgedeckt, mit denen die BV aktiv dem angeborenem wie adaptivem Immunsystem entkommt. So produzieren *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* und *Bacteroides* Sialidasen und andere Enzyme, die Glykoproteine spalten und so die schützende Muzinschicht in der Vagina zerstören [91, 92]. Diese Glykosidasen spalten auch den mit dem Fc-Rezeptor auf Makrophagen interagierenden Teil sekretorischen IgAs (SIgA) und tragen so zu einem erheblichen Wirkverlust der unspezifischen humoralen Abwehr bei; laut Cauci et al. besteht eine direkte Korrelation zwischen Sialidase-Konzentration und SIgA-Degradation [93-95]. Darüber hinaus kooperieren Glykosidasen und Proteasen, so dass nicht nur der Wirkverlust, sondern die komplette Hydrolyse des IgA die Folge ist. Warren et al. konnten zudem eine große Substratvarianz für die durch BV-Keime erzeugte Sialidase nachweisen; SIgA ist also vermutlich nicht das einzige mukosale Glykoprotein, das eine Degradation durch diese Sialidase unterläuft [93].

Seit kurzem wird zudem eine unterschiedliche Verteilung der TLRs im Genitaltrakt als mögliche Erklärung für die eingeschränkte Immunantwort bei BV diskutiert. Wie in der Einleitung erläutert, fanden Fazeli et al. bei der Untersuchung von neun Hysterektomiepräparaten (benigne Grunderkrankungen) keine TLR4-Rezeptoren in Vagina und Ektozervix, während sie im oberen Genitaltrakt zahlreich exprimiert wurden [76]. Die Stimulation von TLR4 führt zur Synthese proinflammatorischer Zytokine und wirkt im Wechselspiel mit TLR2, das über Induktion immunmodulatorischer Zytokine eine Hyperinflammation unterbindet. Bei relativem Überwiegen der immunmodulatorischen Komponente von TLR2 – eben durch eine entsprechende lokale Rezeptorverteilung – werden in erster Linie TH₂ Zellen aktiviert. IL4 dominiert und es mangelt an einer effektiven TH₁-Antwort. Da die Fallzahl dieser Studie sehr gering ist, wäre eine weiterführende Untersuchung der TLR-Verteilung aufschlussreich; möglicherweise ist das zugrunde liegende Rezeptor-Profil ausschlaggebend für ein grundlegendes individuelles Interleukin-Niveau.

4. Diskussion

4.2 IL8

In unseren Daten ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kulturen: während die VVC 16fach erhöhte IL8-Werte gegenüber einer blanden Kultur zeigt, liegt die BV nur dreifach über dem „Normwert“ als weiterer Hinweis für die unterschiedliche immunogene Potenz der Erreger. Dies deckt sich mit bisherigen Erkenntnissen, da sowohl *Candida albicans* [96] als auch Gruppe-B-Streptokokken [97] in unterschiedlichem Maße die IL8-Synthese induzieren; darüber hinaus wurden auch *Trichomonas vaginalis* und HIV als potente Induktoren identifiziert [98, 99]. Die BV entzieht sich dagegen über oben genannte Immunescapephänomene der humoralen angeborenen Abwehr und scheint darüber hinaus die IL8-Synthese zu unterdrücken. Folge ist eine verminderte Leukozytenrekrutierung, konsekutiv erlahmt auch die zelluläre Abwehr.

Unsere Werte zu IL8 bei gesunden und BV-positiven Frauen decken sich nahezu mit den Zahlen von Cauci et al. aus dem Jahr 2003 [100]. Diese Studie zeigte einen inadäquat geringen IL8-Anstieg trotz gleichzeitig massiv erhöhten IL1 β -Werten; da IL1 β neben TNF einer der potentesten Induktoren der IL8-Synthese ist, scheint eine spezifische IL8-Unterdrückung durch BV wahrscheinlich [53, 100-102]. Möglicherweise liegt die Störung aber in manchen Fällen bereits in einer verminderten IL1 β -Ausschüttung: so präsentierten in einer Studie von Genc et al. 10% von 238 schwangeren Frauen eine TLR4-Rezeptor-Variante, die mit deutlich verminderten IL1 β -Werten bei BV einhergeht, während der Wildtyp bereits signifikant erhöhte Spiegel bei Besiedelung mit zehnfach geringeren Erregerzahlen zeigt [103]. Ein hohes Verhältnis von IL1 β zu seinem Antagonisten IL1ra steht in Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen und konnte auch bei Frauen mit gestörter Vaginalflora nachgewiesen werden [66, 104]. Patientinnen, die eine IL1RN*2-Variante des IL1ra-Gens tragen, zeigen ebenfalls eine insuffiziente IL1 β -Antwort auf BV-typische Keime [105]. Insgesamt ergeben sich somit mehrfache mögliche Bruchstellen in der Zytokinkette bis zur Leukozytenrekrutierung, die sich direkt oder indirekt über IL8 auswirken.

Cauci et al. differenzierten die IL8-Spiegel von BV-positiven Patientinnen in ihrer Studie von 2002 gegenüber einem Marker für das adaptive Immunsystem (spezifisches IgA gegen *Gardnerella vaginalis*-Haemolysin (anti-Gvh IgA)) und einem Marker für die enzymatische Aktivität der BV (Prolidase bzw. Sialidase) mit interessanten Ergebnissen: hohe spezifische IgA-Spiegel gehen mit vierfach höheren IL8-Werten und Leukozytenzahlen gegenüber gesunden Patientinnen einher. Anti-Gvh-IgA-negative Patientinnen zeigten dagegen vier- bis 13fach verminderte Werte für IL8 und Leukozytenzahl und erhöhte Prolidase- und Sialidase-Spiegel [106, 107]. Eine direkte Kausalität beweist die Studie jedoch nicht; ob IL8-Induktion bzw. IL8-Synthese primär gestört sind und zu einer besonders ausgeprägten BV mit hohen Enzym-Spiegeln führen, oder ob aggressive BV-Untergruppen über hohe Enzymproduktion die IL8-Antwort unterbinden, bleibt zu klären.

Ein primär erhöhter IL8-Spiegel scheint dagegen in jedem Fall protektiv gegen die BV zu wirken. So fanden Goepfert et al. ein vermindertes Risiko für BV bei schwangeren Frauen mit aufgrund eines Genpolymorphismus (IL8-845 C- und IL1 β Exon 5 +3954 T –Variante) gesteigerter IL8-Expression, der beispielsweise auch das Risiko für schwere Entzündungsreaktionen wie die Lupus-erythematodes-Nephritis erhöht [108]. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da auch andere, nicht untersuchte Gene eine maßgebliche Rolle spielen könnten.

4. Diskussion

IL8 liegt in der Gruppe der Patientinnen, die eine Zusatzmedikation benötigten, dreifach über dem Gesamtmedian der Gruppe ohne Zusatzmedikation und fällt im Verlauf signifikant ab. In der Gruppe mit Zusatzmedikation befinden sich auch sämtliche sechs Patientinnen, deren Beschwerden zunahmen. Diese zeigen am Zeitpunkt t1 einen mehr als 30 % höheren IL8-Median als die Patientinnen mit unproblematischem Verlauf; auch hier fällt IL8 signifikant ab. Erhöhte IL8-Spiegel zu Beginn lassen also vermutlich auf die Ausprägung der Entzündung rückschließen, der Abfall wäre dann als physiologisch im Sinne eines stark induzierten negativen Feedbacks durch IL1ra zu werten. Diese These wird unterstützt von Donders et al., die eine quantitative Korrelation zwischen IL8-Spiegel und Laktobazillengrad nach Schröder zeigen konnten. Je weniger Laktobazillen, desto höher ist die Besiedelung mit anderen Keimen (aerob wie anaerob) und desto höher ist auch IL8 [66]. IL8 korreliert in jedem Fall direkt mit der Leukozytenzahl [107] – hohe IL8-Spiegel verheißen eine große Anzahl an Neutrophilen Granulozyten im betroffenen Gewebe. Kritisch zu diskutieren ist die Tatsache, dass der Parameter „Zusatzmedikation“ indirekt aus „Beschwerdezunahme“ und mikroskopischer Bewertung des Vaginalabstriches am Zeitpunkt t2 hervorgeht. Patientinnen mit hohen IL8-Werten und ausgeprägteren Beschwerden bei stärkerer Inflammation erhielten möglicherweise bei nicht eindeutigen mikroskopischen Befund unnötigerweise eine Zusatzmedikation, obwohl – in Anbetracht ihres retrospektiv ausgewerteten IL8-Profiles – ein physiologischer Abfall auf eine effiziente Erregerbekämpfung hinweist. Rückblickend stellt sich somit die Frage der Wertigkeit der Mikroskopie bei antibiotisch anbehandelten Patientinnen, und ob möglicherweise die Zytokinbestimmung hinsichtlich der weiteren Therapieentscheidung überlegen sein könnte.

4.3 IL12

Die IL12-vermittelte TH₁-Antwort spielt eine maßgebliche Rolle in der Abwehr von Pilzen [109]. Unsere Daten ergeben im Kulturen-Vergleich zwar keine signifikanten Unterschiede, die Candidiasis scheint IL12 jedoch am stärksten zu induzieren. Dies entspricht der Tatsache, dass die Pilzabwehr über den TH₁-Subtyp vermittelt wird [109], Hauptakteure sind neben INF γ -stimulierten Makrophagen die Neutrophilen Granulozyten [37, 110]. Obwohl INF γ als Effektorzytokin der TH₁-Antwort Candida erfolgreich bekämpft und INF γ -Knockout-Mäuse eine verstärkte Candida-Rate zeigen, scheint es – in hohen Dosen exogen zugeführt – jedoch auch eine erhöhte Mortalität der Mäuse zu verursachen [111]. Eine mögliche Erklärung ist die vermehrte bzw. überschießende Freisetzung von Elastasen, Defensinen und lysosomalen Enzymen. Diese führen neben der Zerstörung der Pilze auch zu Gewebeschäden des Wirtes – so lassen sich die zum Teil sehr ausgeprägten Symptome der Patientinnen erklären. Eine große Anzahl an Hyphen, extrazelluläre Proteasen und Phospholipasen aktivieren als Virulenzfaktoren die lokale Abwehr; Allergikerinnen scheinen überdurchschnittlich häufig betroffen [1, 37]. Es gibt deutliche Hinweise, dass Inflammation, Erregerbekämpfung und klinische Symptomatik bei der vulvovaginalen Candidiasis nicht direkt korrelieren. Die Inokulation lebender Candida-Kulturen in die Vagina gesunder Frauen ohne Candida-Infektionen in der Vorgeschichte führte in einer Studie von Fidel et al. in nur 15 % der Fälle zu symptomatischer Vaginitis, während mehr als 55 % der Frauen mit vorangegangenen symptomatischer Candida-Infektionen eine symptomatische Candidiasis entwickelten. Eine Erklärung für inadäquat überschießende Symptomatik bei geringer Erregerzahl könnte eine allergische Sensibilisierung sein, wie in den oben erwähnten Daten zu VVC und IL4 von Weissenbacher et al. herausgearbeitet wurde [89]. Fidel et al. sehen die Begründung für eine vermehrte Symptomatik eher in der ausgeprägten vaginalen Infiltration mit Neutrophilen Granulozyten der betroffenen Frauen, die eine überschießende Antwort der angeborenen vs. ein Defizit der adaptiven Immunabwehr postuliert [112].

Sowohl die humorale als auch die zelluläre Abwehr wird durch Hormone beeinflusst. Allgemein gesprochen wirken sich Östrogene verstärkend auf die Abwehr aus, während Androgene und Progesteron eher immunsuppressiv wirken [113]. Angepasst an den Zyklus überwiegt somit während der lutealen Phase des weiblichen Zyklus die Immunsuppression - um die Einnistung des semiallogenen Fetus nicht zu gefährden - während in der Östradiol-dominierten Follikelphase das Abwehrsystem auf Hochtouren arbeitet. Faas et al. konnten in einer Studie einen TH₂-Shift während der lutealen Phase des Zyklus nachweisen, der primär durch eine verstärkte IL4-Produktion ausgelöst wird [114]. Krishnan et al. konnten zudem am Mausmodell zeigen, dass eine TH₂-dominierte Umgebung eine erhöhte Rate an erfolgreichen Schwangerschaften bei gleichzeitig gesteigerter Suszeptibilität für eine Leishmanien-Infektion erbringt, während eine TH₁-dominierte Umgebung zu Infertilität und verminderter Leishmanien-Infektion führt [115]. Die zytolytische Aktivität endometrialer CD8⁺-Zellen wird von den hohen Progesteronspiegeln in der lutealen Zyklusphase ebenfalls vermindert, während sie in der proliferativen Phase sowie in der Postmenopause ansteigt [116]. Nach Abfall des Östradiol- und Progesteronspiegeln in der Menopause scheint der Mangel an immunsuppressiv wirkendem Progesteron zu überwiegen: epidemiologische Daten geben Hinweise auf eine generalisierte chronische Inflammation in der Menopause - schlagkräftig als „inflamm-aging“ [117] bezeichnet. Diese spiegelt sich auch signifikant in unseren Daten wider: postmenopausale

4. Diskussion

Patientinnen verfügen gegenüber den prämenopausalen Patientinnen über vierfach erhöhte IL12-Werte. Postmenopausale Patientinnen zeigen zudem keine signifikanten Veränderungen im Verlauf, während prämenopausale Patientinnen einen signifikanten Abfall vorweisen. Interessanterweise scheint das erhöhte Level an proinflammatorischen Interleukinen wie IL12 jedoch nicht in Zusammenhang mit den häufig in der Menopause anzutreffenden irritativen Beschwerden zu stehen, so konnten Kollmann et al. keine signifikanten Unterschiede in den vaginalen Interleukinlevels bei symptomatischen und beschwerdefreien Patientinnen finden [118]. Neben den in unseren Daten ersichtlichen humoralen Veränderungen ergeben sich auch Anpassungen in der zellulären Abwehr. Die absolute Zahl der Leukozyten im weiblichen Genitaltrakt bleibt auch im Alter stabil; der Anteil an NK-Zellen steigt jedoch in der Zervix und Ektozervix etwas an, während er im Endometrium eher abnimmt [79]. Diese Tatsache passt zu den Daten von Sentman et al., die – wie in der Einleitung bereits erläutert – eine zunehmende Zahl von NKs im Endometrium unter dem Einfluss von Östradiol und Progesteron in der sekretorischen Phase sahen. Dieser Trigger fällt in der Postmenopause weg, es werden weniger NK-Zellen in das Endometrium gelockt [78]. Interessanterweise finden sich in unseren Daten mehr als doppelt so viele prä- als postmenopausale Patientinnen (34 vs. 16), so dass das Infektionsrisiko in der Postmenopause durch die von einem spezifischen Erreger entkoppelte und dauerhaft erhöhte IL12-Synthese möglicherweise relevant gesenkt wird. Da dies auch als therapeutischer Ansatz insbesondere für rezidivierende Infekte genutzt werden könnte, wären weitere spezifische Studienansätze wünschenswert.

Ein Versuch, das Interleukinprofil nach geografischer Abstammung zu differenzieren, ergab in unseren Daten nur ein signifikantes Ergebnis: Während türkische Patientinnen keinen IL-12-Abfall zeigen, sinkt bei Europäerinnen die IL12-Konzentration im Verlauf signifikant ab. Ein Zusammenhang mit den anderen Parametern konnte nicht herausgearbeitet werden; sämtliche türkische Patientinnen finden sich jedoch in der prämenopausalen Gruppe. Einige Untersuchungen beschäftigten sich mit der Frage nach Unterschieden in der Vaginalflora und der Prävalenz vaginaler Infektion je nach Bevölkerungsgruppe, meist in Hinblick auf Afroamerikanerinnen und Hispanics, für die beispielsweise ein generell erhöhter vaginaler pH nachgewiesen werden konnte [119]. Bei einem Routine-Screening an 58.904 Immigranten ergab sich eine signifikant höhere Prävalenz von *Gardnerella vaginalis* und Trichomonaden bei türkischen Patientinnen gegenüber Holländerinnen [120]. Insgesamt ist die Gruppenstärke von 5 betroffenen Patientinnen in unserem Fall zu gering für eine nachhaltige Interpretation.

Patientinnen mit chronischen Beschwerden wie auch Patientinnen mit Bedarf an Zusatzmedikation zeigen einen signifikanten IL12-Abfall gegenüber ihren Vergleichsgruppen. Dies scheint auf den ersten Blick irritierend, da der IL12-Abfall im Verlauf als physiologisch einzustufen ist. Zudem besteht bei Patientinnen, deren klinische Symptome im Verlauf nicht adäquat nachließen, bereits am Zeitpunkt t1 ein mehr als doppelt so hoher IL12-Median als bei Patientinnen mit unproblematischem Verlauf. In dieser Gruppe finden sich auch fünf der sechs Chronikerinnen. Diese Daten könnten einen komplexeren Zusammenhang zwischen IL4 und IL12 andeuten. So existieren Studien, die neben der bekannten Inhibition auch eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine nach IL4-Stimulation zeigen. Während IL10 und TGF β die phagozytotische Zellfunktionen in jedem Fall herunter regulieren, scheint die Rolle von IL4 komplexer zu sein und Zeit-abhängig gegensätzliche Effekte zu vermitteln. So konnten D'Andrea et al. nachweisen, dass die IL12- und TNF α -Synthese bei

4. Diskussion

gleichzeitiger Inkubation mit IL4 inhibiert wurde, jedoch bei langfristiger Vorbehandlung (über 20 h) sogar eine signifikant verstärkte IL12-Produktion nach Stimulation mit LPS oder Staph. aureus ausgelöst wurde [121]. Im Falle der Chronikerinnen scheint dieser Zusammenhang schlüssig: persistierende unterschwellige Reize führen zum TH₂-Shift mit Überwiegen von IL4, im Verlauf steigt nach langer Inkubation mit IL4 auch der IL12-Spiegel, der zu vermehrten Beschwerden durch stärkere Inflammation führt. Bei Beschwerdepersistenz und nicht eindeutigem mikroskopischem Befund wird in der Folge Zusatzmedikation verordnet.

5 Zusammenfassung

Die vorgelegten Daten ergeben interessante Erkenntnisse über mögliche Einflussfaktoren auf die lokale Immunität der Vagina. Dabei ermittelten wir zu drei verschiedenen Zeitpunkten die Interleukine 4, 8, und 12 im Vaginalsekret bei 50 Patientinnen mit symptomatischer Vaginitis mittels ELISA.

Die Verlaufsbeobachtung von 50 Patientinnen sollte Aufschlüsse über die Art der Kommunikation durch Interleukine liefern: in welchem Verhältnis steht das Zytokinprofil zum Entzündungsverlauf? Unsere Daten untermauern hier die Kernthese der Auftrennung in eine TH₁- und TH₂-gerichtete Immunantwort. Wir können bestätigen, dass ein initial niedriger IL4-Spiegel mit Anstieg im Verlauf zu unkompliziertem raschem Heilungsverlauf im Sinne einer suffizienten TH₁-gerichteten Immunantwort führt.

Des Weiteren verglichen wir verschiedene Gruppen: unterscheidet sich das Verhalten der Interleukine in Anbetracht der Parameter Kultur-Ergebnis, Menopause (prä- oder postmenopausal), geografischer Abstammung (türkisch oder europäisch), Chronizität (erste Episode oder rezidivierende Infektion), Zusatzmedikation und Beschwerdezunahme im Verlauf? Hier konnten verschiedene Zusammenhänge aufgezeigt werden:

Die Auswertung der Interleukine in Bezug auf die Kulturergebnisse ergibt ein Profil der unterschiedlichen immunogenen Potenz der Erreger. Die Candidiasis wird vom Körper zuverlässig als Infektion erkannt und übt einen deutlichen Reiz aus, während die bakterielle Vaginose über nicht vollständig geklärte Mechanismen häufig vom Abwehrsystem übersehen wird und auf Zytokinebene weitgehend inert bleibt. Für IL8 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kulturen beobachtet werden; die Candidiasis erreicht hier mit Abstand die höchsten Werte gegenüber BV, unspezifischen Kulturen und blande Kulturen (in absteigender Reihenfolge). Auch IL12 erreicht seinen höchsten Median bei der Candidiasis und zeigt eine ähnliche Abstufung, auch wenn dieses Ergebnis nicht signifikant ist. Beide proinflammatorischen Zytokine präsentieren damit ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die Kulturen – und ergeben mit den im Trend gegenläufigen IL4-Spiegeln ein homogenes Bild der gerichteten Abwehrreaktion. Das erhöhte IL4-Niveau und inadäquat niedrige IL8- und IL12-Spiegel bei Patientinnen mit BV in unserer Studie bestätigt hingegen die mangelnde Aktivierung des Abwehrsystems bei dieser Erkrankung und steht im Konsens mit der aktuellen Literatur. Ob Immunescapephänomene mit konsekutivem TH₂-Shift hier eine Rolle spielen, bleibt zu klären.

In der Postmenopause besteht ein signifikant erhöhtes IL12-Level; bei prämenopausalen Patientinnen fällt IL12 signifikant ab. Diese Daten bestätigen die gängige These des „inflamm-aging“ mit Ausbildung einer chronischen generalisierten Entzündungsreaktion nach Wegfall des immunsuppressiv wirkenden Progesterons. Erhöhte IL12-Werte bei postmenopausalen Frauen sind somit nicht unbedingt als Ausdruck einer akuten Reaktion zu werten und als diagnostischer Marker in dieser Patientinnen-Gruppe nicht verlässlich. Prämenopausale Frauen dagegen zeigen einen adäquaten Anstieg bei Infekt und physiologischen Abfall bei suffizienter Abwehrreaktion; der Infektverlauf kann somit auf Zytokinebene abgebildet werden. Möglicherweise sinkt das generelle

5 Zusammenfassung

Infektionsrisiko in der Menopause durch die von einem spezifischen Erreger entkoppelte und dauerhaft erhöhte IL12-Synthese.

Beschwerdezunahme und Zusatzmedikation sind aufgrund der subjektiven Einschätzung neben dem objektiven Abstrich kritisch zu betrachtende Parameter. Bei Patientinnen mit Beschwerdezunahme ergibt sich für IL4 ein fehlender Anstieg im Verlauf als Ausdruck einer insuffizienten Beendigung der Inflammation. Gleichzeitig zeigt sich ein erhöhter Ausgangswert als Hinweis für eine primär inadäquate, jedoch prolongierte Inflammation. Die Beschwerdepersistenz wäre so durch eine ungenügende Entzündungsreaktion zu erklären. IL8 zeigt dagegen deutlich erhöhte Ausgangswerte und einen signifikanten Abfall bei Patientinnen mit Beschwerdezunahme und Zusatzmedikation; möglicherweise handelt es sich hier jedoch um einen physiologischen Abfall bei stärkerer Inflammation und fehlerhafter Indikation zur Zusatzmedikation. Die Auswertung der Kulturen der betroffenen Patientinnen ergibt das vermutete Ergebnis: am wenigsten Zusatzmedikation benötigten die Patientinnen mit einer blanden Kultur.

Hinsichtlich der Ursache rekurrenter Infektionen, wie auch mögliche Unterschiede je nach geographischer Herkunft bringen unsere Daten leider keine hinreichenden Aufschluss, da die Studie auch aufgrund fehlender Vordaten für diese Fragestellung nicht hinreichend gepowert war.

Die hier vorgestellten Erkenntnisse zum Interleukinprofil bei symptomatischer Vaginitis dienen als Grundlage zum besseren Verständnis der Immunmodulation auf Zytokinebene im Genitaltrakt und ermöglichen die zielgerichtete Planung weiterführender Studien.

6. Literaturverzeichnis

1. Friese, K., A. Schäfer, and H. Hof, *Infektionskrankheiten in Gynäkologie und Geburtshilfe mit 71 Tabellen*. 2003, Berlin [u.a.]: Springer. XII, 703 S. : Ill., graph. Darst.
2. Zhou, X., et al., *Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods*. *Microbiology*, 2004. 150(Pt 8): p. 2565-73.
3. Lamont, R.F., et al., *The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques*. *BJOG*, 2011. 118(5): p. 533-49.
4. Antonio, M.A., S.E. Hawes, and S.L. Hillier, *The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species*. *J Infect Dis*, 1999. 180(6): p. 1950-6.
5. Vasquez, A., et al., *Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women*. *J Clin Microbiol*, 2002. 40(8): p. 2746-9.
6. Donders, G.G., *Definition and classification of abnormal vaginal flora*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007. 21(3): p. 355-73.
7. Larsen, B. and G.R. Monif, *Understanding the bacterial flora of the female genital tract*. *Clin Infect Dis*, 2001. 32(4): p. e69-77.
8. Boris, S., et al., *Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens*. *Infect Immun*, 1998. 66(5): p. 1985-9.
9. Linhares, I.M., P.C. Giraldo, and E.C. Baracat, *[New findings about vaginal bacterial flora]*. *Rev Assoc Med Bras*, 2010. 56(3): p. 370-4.
10. Santiago, G.L., et al., *Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles*. *PLoS ONE*, 2011. 6(11): p. e28180.
11. Eschenbach, D.A., et al., *Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora*. *Clin Infect Dis*, 2000. 30(6): p. 901-7.
12. Hawes, S.E., et al., *Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections*. *J Infect Dis*, 1996. 174(5): p. 1058-63.
13. Srinivasan, S., et al., *Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis*. *PLoS ONE*, 2010. 5(4): p. e10197.

6. Literaturverzeichnis

14. Priestley, C.J., et al., *What is normal vaginal flora?* Genitourin Med, 1997. 73(1): p. 23-8.
15. Witkin, S.S., I.M. Linhares, and P. Giraldo, *Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2007. 21(3): p. 347-54.
16. Wang, J., *Bacterial vaginosis.* Prim Care Update Ob Gyns, 2000. 7(5): p. 181-185.
17. Juarez Tomas, M.S., et al., *Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal Lactobacillus strains to be considered as probiotic candidates.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011.
18. Donders, G.G., et al., *Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy.* BJOG, 2009. 116(10): p. 1315-24.
19. Leitich, H., et al., *Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis.* Am J Obstet Gynecol, 2003. 189(1): p. 139-47.
20. Ugwumadu, A., et al., *Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial.* Lancet, 2003. 361(9362): p. 983-8.
21. Hillier, S.L., et al., *Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group.* N Engl J Med, 1995. 333(26): p. 1737-42.
22. Peipert, J.F., et al., *Clinical predictors of endometritis in women with symptoms and signs of pelvic inflammatory disease.* Am J Obstet Gynecol, 2001. 184(5): p. 856-63; discussion 863-4.
23. Haggerty, C.L., et al., *Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis.* Clin Infect Dis, 2004. 39(7): p. 990-5.
24. Hillier, S.L., et al., *Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis.* Am J Obstet Gynecol, 1996. 175(2): p. 435-41.
25. Schwebke, J.R., *New concepts in the etiology of bacterial vaginosis.* Curr Infect Dis Rep, 2009. 11(2): p. 143-7.
26. Sewankambo, N., et al., *HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis.* Lancet, 1997. 350(9077): p. 546-50.

6. Literaturverzeichnis

27. Moodley, P., C. Connolly, and A.W. Sturm, *Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts*. J Infect Dis, 2002. 185(1): p. 69-73.
28. van de Wijgert, J.H., et al., *The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?* PLoS ONE, 2014. 9(8): p. e105998.
29. Verhelst, R., et al., *Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis and bacterial vaginosis*. BMC Microbiol, 2004. 4: p. 16.
30. Fredricks, D.N., T.L. Fiedler, and J.M. Marrazzo, *Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis*. N Engl J Med, 2005. 353(18): p. 1899-911.
31. Ferris, M.J., et al., *Association of Atopobium vaginae, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis*. BMC Infect Dis, 2004. 4: p. 5.
32. Burton, J.P., et al., *Detection of Atopobium vaginae in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation*. J Clin Microbiol, 2004. 42(4): p. 1829-31.
33. Bradshaw, C.S., et al., *The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy*. J Infect Dis, 2006. 194(6): p. 828-36.
34. Amsel, R., et al., *Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations*. Am J Med, 1983. 74(1): p. 14-22.
35. Nugent, R.P., M.A. Krohn, and S.L. Hillier, *Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation*. J Clin Microbiol, 1991. 29(2): p. 297-301.
36. Sobel, J.D., et al., *Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations*. Am J Obstet Gynecol, 1998. 178(2): p. 203-11.
37. Sobel, J.D., G. Muller, and H.R. Buckley, *Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis*. Infect Immun, 1984. 44(3): p. 576-80.
38. Sobel, J.D., *Vulvovaginal candidosis*. Lancet, 2007. 369(9577): p. 1961-71.
39. Eckert, L.O., et al., *Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm*. Obstet Gynecol, 1998. 92(5): p. 757-65.

6. Literaturverzeichnis

40. Watson, M.C., et al., *Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal agents for the treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush): a systematic review*. BJOG, 2002. 109(1): p. 85-95.
41. Mossop, H., et al., *Influence of lactic acid on endogenous and viral RNA-induced immune mediator production by vaginal epithelial cells*. Obstet Gynecol, 2011. 118(4): p. 840-6.
42. Linhares, I.M., et al., *Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli*. Am J Obstet Gynecol, 2011. 204(2): p. 120 e1-5.
43. Eschenbach, D.A., et al., *Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis*. J Clin Microbiol, 1989. 27(2): p. 251-6.
44. Verstraelen, H., et al., *Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that L. crispatus promotes the stability of the normal vaginal microflora and that L. gasseri and/or L. iners are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora*. BMC Microbiol, 2009. 9: p. 116.
45. O'Hanlon, D.E., T.R. Moench, and R.A. Cone, *In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide*. BMC Infect Dis, 2011. 11: p. 200.
46. Hancock, R.E., *Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials*. Lancet Infect Dis, 2001. 1(3): p. 156-64.
47. Han, J.H., et al., *Modulation of human beta-defensin-2 expression by 17beta-estradiol and progesterone in vaginal epithelial cells*. Cytokine, 2010. 49(2): p. 209-14.
48. Wira, C.R., et al., *Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions*. Immunol Rev, 2005. 206: p. 306-35.
49. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. 136(7): p. 2348-57.
50. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. 3. Aufl. ed. 2011, Heidelberg: Spektrum. XVI, 268 S.
51. Mirmonsef, P., et al., *The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract*. Am J Reprod Immunol, 2011. 65(3): p. 190-5.

6. Literaturverzeichnis

52. Murphy, K.P., *Janeway Immunologie, Janeway's Immunobiology* <dt.>. 7. Aufl., [1. dt. Aufl.] ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. XXVI, 1093 S.
53. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 2008, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. XXI, 1701 S. : Ill. u. graph. Darst.
54. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6. ed. ed. 2007, Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier. VIII, 566 S.
55. Ozaki, K. and W.J. Leonard, *Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy*. J Biol Chem, 2002. 277(33): p. 29355-8.
56. Speckmann, E.-J., *Physiologie mit 92 Tabellen*. 5. Aufl., [gründliche Überarb.] ed. 2008, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. XIX, 795, 106 S.
57. Del Prete, G., et al., *IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants*. J Immunol, 1988. 140(12): p. 4193-8.
58. Swain, S.L., et al., *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. J Immunol, 1990. 145(11): p. 3796-806.
59. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. 326(5): p. 298-304.
60. Luzina, I.G., et al., *Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives"*. J Leukoc Biol, 2012. 92(4): p. 753-64.
61. Thomson, A.W., *The cytokine handbook*. 4. ed. 3. ed. ed. 2003, San Diego [u.a.]: Acad. Press. 638, LXVII S.
62. Strieter, R.M., et al., *CXC chemokines in angiogenesis of cancer*. Semin Cancer Biol, 2004. 14(3): p. 195-200.
63. Jinquan, T., et al., *Recombinant human growth-regulated oncogene-alpha induces T lymphocyte chemotaxis. A process regulated via IL-8 receptors by IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-10, and IL-13*. J Immunol, 1995. 155(11): p. 5359-68.
64. Larsen, C.G., et al., *The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes*. Science, 1989. 243(4897): p. 1464-6.
65. Kimata, H., et al., *Interleukin 8 (IL-8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL-4 in human B cells*. J Exp Med, 1992. 176(4): p. 1227-31.
66. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. 87(6): p. 2095-147.

6. Literaturverzeichnis

67. Donders, G.G., et al., *Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora*. Am J Obstet Gynecol, 2000. 182(4): p. 872-8.
68. Arend, W.P., *Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family*. J Clin Invest, 1991. 88(5): p. 1445-51.
69. Gajewski, T.F. and F.W. Fitch, *Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones*. J Immunol, 1988. 140(12): p. 4245-52.
70. Manetti, R., et al., *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells*. J Exp Med, 1993. 177(4): p. 1199-204.
71. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. 174(5): p. 1209-20.
72. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.
73. Witkin, S.S., et al., *An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis*. Clin Infect Dis, 2007. 44(4): p. 554-7.
74. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 335-76.
75. Netea, M.G., J.W. Van der Meer, and B.J. Kullberg, *Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense*. Trends Microbiol, 2004. 12(11): p. 484-8.
76. Re, F. and J.L. Strominger, *Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells*. J Biol Chem, 2001. 276(40): p. 37692-9.
77. Fazeli, A., C. Bruce, and D.O. Anumba, *Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans*. Hum Reprod, 2005. 20(5): p. 1372-8.
78. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. 97(10): p. 3146-51.
79. Sentman, C.L., et al., *Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone*. J Immunol, 2004. 173(11): p. 6760-6.
80. Mselle, T.F., et al., *Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract*. Clin Immunol, 2007. 124(1): p. 69-76.

6. Literaturverzeichnis

81. Wira, C.R., et al., *Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens*. Am J Reprod Immunol, 2010. 63(6): p. 544-65.
82. Luttmann, W., *-Der Experimentator: Immunologie*. 3. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. XIV, 309 S.
83. Weng, M., et al., *Alternatively activated macrophages in intestinal helminth infection: effects on concurrent bacterial colitis*. J Immunol, 2007. 179(7): p. 4721-31.
84. Varin, A., et al., *Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion*. Blood, 2010. 115(2): p. 353-62.
85. Sabin, E.A., et al., *Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with Schistosoma mansoni*. J Infect Dis, 1996. 173(1): p. 269-72.
86. Urban, J.F., Jr., et al., *Infection with parasitic nematodes confounds vaccination efficacy*. Vet Parasitol, 2007. 148(1): p. 14-20.
87. Cooper, P.J., et al., *Human infection with Ascaris lumbricoides is associated with a polarized cytokine response*. J Infect Dis, 2000. 182(4): p. 1207-13.
88. Elias, D., et al., *Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination*. Clin Exp Immunol, 2001. 123(2): p. 219-25.
89. Borkow, G. and Z. Bentwich, *Eradication of helminthic infections may be essential for successful vaccination against HIV and tuberculosis*. Bull World Health Organ, 2000. 78(11): p. 1368-9.
90. Weissenbacher, T.M., et al., *Relationship between recurrent vulvovaginal candidosis and immune mediators in vaginal fluid*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009. 144(1): p. 59-63.
91. Naderi, N., et al., *Immune deviation in recurrent vulvovaginal candidiasis: correlation with iron deficiency anemia*. Iran J Immunol, 2013. 10(2): p. 118-26.
92. Briselden, A.M., et al., *Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora*. J Clin Microbiol, 1992. 30(3): p. 663-6.

6. Literaturverzeichnis

93. Olmsted, S.S., et al., *Glycosidase and proteinase activity of anaerobic gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis*. Sex Transm Dis, 2003. 30(3): p. 257-61.
94. Lewis, W.G., et al., *Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis*. J Biol Chem, 2012. 287(3): p. 2079-89.
95. Cauci, S., et al., *Immunoglobulin A response against Gardnerella vaginalis hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis*. Am J Obstet Gynecol, 1998. 178(3): p. 511-5.
96. Cauci, S., et al., *Impairment of the mucosal immune system: IgA and IgM cleavage detected in vaginal washings of a subgroup of patients with bacterial vaginosis*. J Infect Dis, 1998. 178(6): p. 1698-706.
97. Filler, S.G., et al., *Candida albicans stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells*. Infect Immun, 1996. 64(7): p. 2609-17.
98. Dudley, D.J., et al., *Regulation of cultured human chorion cell chemokine production by group B streptococci and purified bacterial products*. Am J Reprod Immunol, 1996. 36(5): p. 264-8.
99. Shaio, M.F., et al., *Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to Trichomonas vaginalis stimulation*. Infect Immun, 1995. 63(10): p. 3864-70.
100. Lane, B.R., et al., *Interleukin-8 stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication and is a potential new target for antiretroviral therapy*. J Virol, 2001. 75(17): p. 8195-202.
101. Cauci, S., et al., *Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women*. Mol Hum Reprod, 2003. 9(1): p. 53-8.
102. Elliott, C.L., et al., *Nuclear factor-kappa B is essential for up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells*. Mol Hum Reprod, 2001. 7(8): p. 787-90.
103. Wickremasinghe, M.I., L.H. Thomas, and J.S. Friedland, *Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to Mycobacterium tuberculosis: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network*. J Immunol, 1999. 163(7): p. 3936-47.
104. Genc, M.R., et al., *Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. 116(2): p. 152-6.

6. Literaturverzeichnis

105. Genc, M.R., et al., *A disproportionate increase in IL-1beta over IL-1ra in the cervicovaginal secretions of pregnant women with altered vaginal microflora correlates with preterm birth*. Am J Obstet Gynecol, 2004. 190(5): p. 1191-7.
106. Genc, M.R., et al., *Polymorphism in intron 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene, local midtrimester cytokine response to vaginal flora, and subsequent preterm birth*. Am J Obstet Gynecol, 2004. 191(4): p. 1324-30.
107. Cauci, S., *Vaginal Immunity in Bacterial Vaginosis*. Curr Infect Dis Rep, 2004. 6(6): p. 450-456.
108. Cauci, S., et al., *Correlation of local interleukin-8 with immunoglobulin A against Gardnerella vaginalis hemolysin and with prolidase and sialidase levels in women with bacterial vaginosis*. J Infect Dis, 2002. 185(11): p. 1614-20.
109. Goepfert, A.R., et al., *Differences in inflammatory cytokine and Toll-like receptor genes and bacterial vaginosis in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2005. 193(4): p. 1478-85.
110. Genc, M.R. and A. Onderdonk, *Endogenous bacterial flora in pregnant women and the influence of maternal genetic variation*. BJOG, 2011. 118(2): p. 154-63.
111. Rovin, B.H., L. Lu, and X. Zhang, *A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis*. Kidney Int, 2002. 62(1): p. 261-5.
112. Romani, L., *Immunity to Candida albicans: Th1, Th2 cells and beyond*. Curr Opin Microbiol, 1999. 2(4): p. 363-7.
113. Ashman, R.B., D. Vijayan, and C.A. Wells, *IL-12 and related cytokines: function and regulatory implications in Candida albicans infection*. Clin Dev Immunol, 2011. 2011: p. 686597.
114. Lavigne, L.M., et al., *The role of recombinant murine IL-12 and IFN-gamma in the pathogenesis of a murine systemic Candida albicans infection*. J Immunol, 1998. 160(1): p. 284-92.
115. Fidel, P.L., Jr., et al., *An intravaginal live Candida challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis*. Infect Immun, 2004. 72(5): p. 2939-46.
116. Gameiro, C. and F. Romao, *Changes in the immune system during menopause and aging*. Front Biosci (Elite Ed), 2010. 2: p. 1299-303.
117. Faas, M., et al., *The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response?* Fertil Steril, 2000. 74(5): p. 1008-13.

6. Literaturverzeichnis

118. Krishnan, L., et al., *T helper 1 response against Leishmania major in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells.* J Immunol, 1996. 156(2): p. 653-62.
119. White, H.D., et al., *CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause.* J Immunol, 1997. 158(6): p. 3017-27.
120. Grolleau-Julius, A., D. Ray, and R.L. Yung, *The role of epigenetics in aging and autoimmunity.* Clin Rev Allergy Immunol, 2010. 39(1): p. 42-50.
121. Kollmann, Z., et al., *Vaginal cytokines do not correlate with postmenopausal vulvovaginal symptoms.* Gynecol Endocrinol, 2015: p. 1-5.
122. Ravel, J., et al., *Vaginal microbiome of reproductive-age women.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108 Suppl 1: p. 4680-7.
123. Boon, M.E., et al., *Gardnerella, Trichomonas and Candida in cervical smears of 58,904 immigrants participating in the Dutch national cervical screening program.* Acta Cytol, 2012. 56(3): p. 242-6.
124. D'Andrea, A., et al., *Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production.* J Exp Med, 1995. 181(2): p. 537-46.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Basisdaten, unabhängig.....	23
Tabelle 2: Basisdaten, abhängig.....	24
Tabelle 3: Median IL4, Auswertung.....	26
Tabelle 4: Median IL8, Auswertung.....	28
Tabelle 5: Median IL12, Auswertung.....	33

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IL8 Gesamtübersicht	24
Abbildung 2: IL12 Gesamtübersicht	25
Abbildung 3: IL4-Verlauf in Abhängigkeit von der Einnahme einer Zusatzmedikation	27
Abbildung 4: IL4 und Kultur	28
Abbildung 5: IL8 in Abhängigkeit der Einnahme einer Zusatzmedikation, gesamt	30
Abbildung 6: IL8 in Abhängigkeit der Einnahme einer Zusatzmedikation, zeitlicher Verlauf	30
Abbildung 7: IL8 und Beschwerdezunahme, gesamt	31
Abbildung 8: IL8 und Beschwerdezunahme, Verlauf	32
Abbildung 9: IL8 und Kultur	33
Abbildung 10: IL12 und Menopause, gesamt	35
Abbildung 11: IL12 und Menopause, Verlauf	35
Abbildung 12: IL12 und Geografische Abstammung, Verlauf	36
Abbildung 13: IL12 und Chronizität, gesamt	37
Abbildung 14: IL12 und Chronizität, Verlauf	37
Abbildung 15: IL12 und Zusatzmedikation, gesamt	38
Abbildung 16: IL12 und Kultur	40
Abbildung 17: IL12 und Beschwerdezunahme, Verlauf	39

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Weissenbacher, der mir als Doktorvater stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir mit dieser Arbeit ermöglichte, nicht nur die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens, sondern auch die praktische Durchführung einer klinischen Studie zu erlernen.

Frau Susanne Hoffmann für die Unterstützung im experimentellen Teil der Studie.

Allen Mitarbeitern der gynäkologischen Ambulanz des Klinikums Großhadern, auf die ich mich bei der Organisation und Umsetzung des klinischen Teils stets verlassen konnte.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig 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.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand