

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

**Die Bestimmung der Zytokine
Interleukin-23, Interleukin-17a, Interleukin-12, Interleukin-10, Interleukin-6,
Tumor-Nekrose-Faktor- α und MIP-1 β im Vaginalsekret
und deren Bedeutung im Rahmen der Frühgeburtlichkeit**

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

Vorgelegt von
Julia Maria Isabella Bauer

aus
München

2016

**Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Tobias Weissenbacher
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Matthias Gries
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	22. Dezember 2016

Meinen Eltern
in größter Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
----------------------------	-----

1	Einleitung.....	1
1.1	Frühgeburt.....	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie.....	2
1.1.4	Diagnostik	6
1.1.5	Therapie und Prävention	7
1.2	Zytokine	8
1.2.1	Funktion und Bedeutung	8
1.2.2	Einteilung der Zytokine.....	10
1.2.2.1	Interleukin-23	10
1.2.2.2	Interleukin-17a	11
1.2.2.3	Interleukin-12	11
1.2.2.4	Interleukin-10	11
1.2.2.5	Interleukin-6	12
1.2.2.6	Tumornekrosefaktor – α	13
1.2.2.7	Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1 β	13
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	14
2	Material und Methodik.....	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Patientinnen	16
2.1.2.1	Fallgruppe	16
2.1.2.2	Kontrollgruppe	16
2.1.3	Vaginalabstriche	17
2.1.4	Untersuchte Parameter	17
2.2	Methodik	18
2.2.1	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (Elisa).....	18
2.2.1.1	Interleukin-23	18
2.2.1.1.1	Reagenzien.....	18
2.2.1.1.2	Reagenzienvorbereitung	19
2.2.1.1.3	Durchführung	20
2.2.1.2	Interleukin-6 und Interleukin-12	21
2.2.1.2.1	Reagenzien.....	21
2.2.1.2.2	Reagenzienvorbereitung	21
2.2.1.2.3	Durchführung	22
2.2.1.3	Interleukin-10	23
2.2.1.3.1	Reagenzien.....	23

2.2.1.3.2	Reagenzienvorbereitung	24
2.2.1.3.3	Durchführung	24
2.2.1.4	Interleukin-17A	25
2.2.1.4.1	Reagenzien.....	25
2.2.1.4.2	Reagenzienvorbereitung	26
2.2.1.4.3	Durchführung	27
2.2.1.5	TNF- α und MIP-1 β	28
2.2.1.5.1	Reagenzien.....	28
2.2.1.5.2	Reagenzienvorbereitung	28
2.2.1.5.3	Durchführung	29
2.3	Bakteriologischer Abstrich	31
2.4	Auswertung der Messergebnisse.....	31
2.5	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	35
3.1	Gravidität und Parität	35
3.2	Entbindungszeitpunkt.....	36
3.3	Entbindungsmodus.....	37
3.4	Schwangerschaftsanamnese	38
3.5	Entzündungsparameter.....	39
3.6	Zytokinkonzentrationen	41
3.6.1	ROC-Kurven	45
3.6.1.1	Interleukin-23.....	46
3.6.1.2	Interleukin-17.....	46
3.6.1.3	Interleukin-12.....	47
3.6.1.4	Interleukin-10.....	47
3.6.1.5	Interleukin-6.....	48
3.6.1.6	TNF- α	48
3.6.1.7	MIP-1 β	49
3.6.2	Assoziation zwischen Zytokinen und Frühgeburtlichkeit.....	49
3.7	Fruchtblasenprolaps	54
3.8	Assoziation zwischen Muttermundsbefunden und einer Schwangerschaftsverlängerung.....	55
3.9	Bakteriologie	56
4	Diskussion	59
4.1	Zytokinexpression bei Frühgebärenden	59
4.2	Infektparameter und Bakteriologie	64
4.3	Muttermundsbefunde und Fruchtblasenprolaps	66
4.4	Mütterliche Anamnese	68
4.5	Entbindungsmodus.....	69
5	Zusammenfassung.....	72

Literaturverzeichnis.....	73
Anhang	81
Abbildungsverzeichnis	81
Tabellenverzeichnis.....	84
Danksagung	86
Eidesstattliche Versicherung	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AUC	Area under the curve
BS	Blasensprung
BV	Bakterielle Vaginose
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
CRH	Kortikotropes Releasing Hormon
CSF	Koloniestimulierende Faktoren
CTG	Kardiotokogramm
Elisa	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FBP	Fruchtblasenprolaps
FG	Frühgeburt
FW	Fruchtwasser
GA	Gestationsalter
GGW	Geburtsgewicht
IFN	Interferone
IL	Interleukin
h	Stunde
h-IL	humanes Interleukin
HRP	<i>horseradish</i> -Peroxidase (Marker-Enzym)
L	Liter
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1 β
ml	Milliliter
MM	Muttermund
μ l	Mikroliter
n	Anzahl
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
pg	Pikogramm
ROC	receiver operating characteristics
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute/ UpM)

SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
V.a.	Verdacht auf
WHO	World Health Organization
ZI	Zervixinsuffizienz
Z.n.	Zustand nach

1 Einleitung

1.1 Frühgeburt

1.1.1 Definition

Die Frühgeburt wird durch die WHO definiert als eine Entbindung vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (SSW) bzw. nach weniger als 259 Tagen (1). Dabei werden vier Untergruppen unterschieden, die gemeinsam mit der Häufigkeit ihres Auftretens in Tabelle 1 dargestellt sind:

Tabelle 1: Einteilung der Frühgeburt (2,5)

Schweregrad der Frühgeburt	Schwangerschaftswochen	Häufigkeit
extrem frühe Frühgeburt	< 28 SSW	5%
sehr frühe Frühgeburt	28 – 31 SSW	15%
mäßig frühe Frühgeburt	32 – 33 SSW	20%
frühe Geburt	34 – 36 SSW	60-70%

1.1.2 Epidemiologie

Weltweit ist die Frühgeburtenrate in den letzten zehn Jahren stetig gestiegen und stellt somit nach wie vor ein großes Problem in der heutigen Geburtshilfe dar (2,3). Sie zählt mit 75% zu den Hauptursachen der perinatalen Mortalität und ist zu über 50% für die Morbidität von Kindern verantwortlich (4,5). Besonders Frühgeborene mit extrem niedrigen Geburtsgewicht (<1000g) und solche, die vor der 28. SSW geboren wurden, zeigen vermehrt medizinische Komplikationen, die besonders die Lungenfunktion, das Immunsystem sowie die zerebrale Entwicklung des Kindes betreffen (6). Zudem finden sich bei zu früh geborenen Kindern im Laufe ihres Lebens vermehrt Verhaltens- und Aufmerksamkeitsstörungen und folglich Schulprobleme (7,8).

Im Jahr 2010 lag die Frühgeborenenrate weltweit bei 11,1%, wobei die Tendenz steigend ist. Dies liegt nicht zuletzt an den verbesserten medizinischen Standards und Versorgungsmöglichkeiten der Frühgeborenen, welche eine großzügigere Indikation zur einer immer frühzeiti-

geren Entbindung ermöglichen (9,10). Einzig die USA, bisher unter den Spitzenreitern der Frühgeburt, konnten im Jahr 2013 einen Rückgang verzeichnen. Mit 11,4%, dem niedrigsten Stand seit 1997, liegen sie jedoch immer noch deutlich über dem Durchschnitt (11). In Europa werden je nach Region zwischen 6,3% (Schweden, Frankreich) und 11,4% (Österreich) der Kinder vor der vollendeten 37. SSW geboren (2). Je nach Quelle variieren die Daten für Deutschland zwischen 7,1% und 9,2% und sind damit in jedem Fall höher als in vielen anderen, besonders nord-europäischen Ländern (2,12).

Dass die Zahl der Frühgeburten nach wie vor zunimmt, ist auf verschiedene Faktoren zurückzuführen wie etwa das steigende Alter der Erstgebärenden oder die Zunahme von Fertilitätsbehandlungen mit konsekutiven Mehrlingsschwangerschaften (5). Zudem sind bis zu 35% der Frühgeburten im Rahmen einer vorzeitigen Schwangerschaftsbeendigung induziert, etwa wegen einer bestehenden Präeklampsie oder einer fetalen Wachstumsretardierung (5,13).

Als Konsequenz aus der sinkenden perinatalen und intrauterinen Mortalitätsrate ergibt sich eine steigende Morbiditätsrate, die hohe Kosten verursacht (14). Pro Jahr muss hierbei mit über 0,8 Milliarden Euro gerechnet werden, wobei entsprechend der Häufigkeitsverteilung (s. Tabelle 1) die höchsten Kosten bei den Frühgeburten nach der 32.SSW entstehen. Hinzu kommen weitere hohe Kosten für die perinatale Intensivbehandlung sowie die in Langzeitfolge häufig entstehenden chronischen Krankheiten (14,15). Obgleich die Datenlage/ -erhebung nicht befriedigend ist, kann also davon ausgegangen werden, dass die steigende Anzahl an Frühgeburten eine enorme Belastung nicht nur für die betroffenen Familien, sondern auch für die Gesundheits- und Sozialsysteme der entsprechenden Länder darstellt (2,16).

1.1.3 Ätiologie

Die Frühgeburt stellt ein Symptom dar, dessen Ursachen vielfältig sind und dessen Pathophysiologie noch nicht endgültig verstanden ist (13,17). Zudem ist die Genese meist multifaktoriell, so dass nur selten ein einzelner, auslösender Faktor ausgemacht werden kann (5). Einen Überblick über die vier wichtigsten Einflussgrößen gibt die folgende Tabelle.

Tabelle 2: Ursachen für eine Frühgeburt (5,10,15,18,19)

Gynäkologische Ursachen	Mütterliche Ursachen	Fetale Ursachen	Sozio-ökonomische Ursachen
<ul style="list-style-type: none"> ■ Infektionen ■ Z.n. Frühgeburt ■ Z.n. Konisation ■ Präeklampsie ■ Zervixinsuffizienz ■ Fruchtblasen-prolaps ■ Plazentastörungen 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Diabetes mellitus ■ Hoher/ niedriger BMI ■ Hohes/ niedriges Alter ■ Art. Hypertonie ■ Gerinnungsstörungen 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Polyhydramnion ■ Mehrlings-SS ■ Fehlbildungen ■ Chromosomen-anomalien ■ Alloimmunopathien 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Nikotin ■ Alkohol ■ Drogen ■ Ernährung ■ Stress ■ ethnische Herkunft ■ Bildungsstand

Die verschiedenen Risikofaktoren führen zu drei klinischen Erscheinungsbildern, die sich gegenseitig beeinflussen und letztlich das Eintreten einer Frühgeburt beschleunigen (3):

Den Hauptanteil macht dabei mit ca. 40% die (1) spontane Frühgeburt mit vorzeitiger Wehentätigkeit aus. An zweiter Stelle stehen (2) mütterliche oder kindliche Infektionen, die für ca. 30% der Frühgeburten verantwortlich sind und zu einer medizinisch induzierten vorzeitigen Beendigung der Schwangerschaft führen. Der (3) (frühe) vorzeitige Blasensprung verursacht 20% aller Frühgeburten, sowie 20% aller perinatalen Todesfälle und ist meist Folge von Infektionen. Die (4) Zervixinsuffizienz schließlich ist für 10-25% aller vorzeitigen Schwangerschaftsbeendigungen verantwortlich (5,20,21).

Vorzeitige Wehentätigkeit

Als „vorzeitige Wehentätigkeit“ bezeichnet man regelmäßige Kontraktionen vor der 37.SSW, die zu einer Verkürzung der Zervix führen. Da es sich meist um eine unkoordinierte Wehentätigkeit handelt, die in vielen Fällen spontan sistiert, kommt es nicht zwangsläufig zur Entbindung. Allerdings können pathologische Prozesse, sowie eine zu frühzeitige Aktivierung der physiologischen Geburtsmechanismen eine zu frühe Geburt herbeiführen (19,22).

(Früher) Vorzeitiger Blasensprung

Der „vorzeitige Blasensprung“ (PROM = Preterm Rupture of the Membranes) bezeichnet allgemein das Einreißen der fetalen Membranen vor dem Einsetzen muttermundswirksamer Wehen, unabhängig von der SSW. Ein „früher vorzeitiger Blasensprung“ (PPROM = Preterm Premature Rupture of the Membranes) dagegen beinhaltet eine zeitliche Komponente, in dem er per definitionem vor der vollendeten 37. SSW und mindestens eine Stunde vor dem Einsetzen der regelmäßigen Wehentätigkeit stattfindet (5,20). Die Unterscheidung dessen, was zuerst stattfand (Wehen vs. Blasensprung) weist gewisse Schwierigkeiten auf. Die Vorstellung in der Klinik erfolgt häufig wegen vorzeitiger Wehentätigkeit und bereits stattgehabtem BS. Den Frauen fällt es dann schwer die zeitliche Abfolge anzugeben, nicht zuletzt da die Klassifizierung der Wehen nicht immer eindeutig ist (3). Zudem gibt es zervixwirksame Wehen, die von der Mutter jedoch nicht wahrgenommen werden (19). Dennoch wurde festgestellt, dass ein früher vorzeitiger Blasensprung (PPROM) meist infektiöser Genese ist. (23).

Infektionen

Infektionen des Urogenitaltrakts und das Amnioninfektionssyndrom (im Falle der aufsteigenden Infektion) sowie die dadurch ausgelösten Immunprozesse (vgl. Abschnitt 1.3.1.) spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Frühgeburt, da sie sowohl zu einer vorzeitigen Wehentätigkeit, als auch zu einem vorzeitigen Blasensprung führen können (19). Nach einem BS können Mikroorganismen leichter aufsteigen, als dies bei intakten Eihäuten der Fall ist. Der Blasensprung per se stellt also ein deutlich erhöhtes Risiko für intrauterine Infektionen dar (5). Besonders häufig finden sich dabei *Gardnella vaginalis*, *Bacteroides Spezies*, *Mycoplasma hominus* und *Ureaplasma urealyticum*. Beim Nachweis einer Infektion bereits vor der 20.SSW mit einem dieser Organismen, endet die Schwangerschaft erfahrungsgemäß ca. 4-8 Wochen später (15). Bei einem vorzeitigen Blasensprung gilt es daher, unmittelbar einen bakteriellen Zervixabstrich zu entnehmen und eine entsprechende antibiotische Therapie (z.B. mit einem Penicillin oder Cephalosporin) einzuleiten (20). Zeigt sich neben einem positiven Keimnachweis auch noch ein erhöhtes CRP im mütterlichen Blut, ein Anstieg der mütterlichen Körpertemperatur und eine fetale Tachykardie, so kann es sich um eine akute intrauterine Infektion handeln, welche eine Indikation zur elektiven Schwangerschaftsbeendigung darstellen kann (19). Allerdings sind laborchemisch auffällige Entzündungswerte, sowie mütterlicher Temperaturanstieg sehr unspezifische Marker, die auch anderer Genese sein können. Daher, und das ist Ziel dieser Arbeit, bedarf es eines anderen Indikators mit hoher

Sensitivität und Spezifität (wie etwa der Nachweis bestimmter Zytokine) für das Vorliegen einer intrauterinen Infektion.

Zervixinsuffizienz und Fruchtblasenprolaps

10-25% aller vorzeitigen Schwangerschaftsbeendigungen im zweiten Trimester können auf eine Zervixinsuffizienz zurückgeführt werden. Für ihre Definition liegen allerdings keine eindeutigen Kriterien vor, weshalb die tatsächliche Inzidenz schwer einzuschätzen ist (21). Physiologisch dient die ca. 2cm lange Zervix der Schwangerschaftserhaltung, in dem sie das distale Ende des Uterus bildet, diesen somit abschließt und so den Fetus in situ hält (24). Während der SS durchläuft sie zwei Phasen: zunächst die Zervixreifung und anschließend die – verkürzung. Die Zervixreifung verläuft über mehrere Wochen und ist durch einen hohen Progesteron- und niedrigen Östrogen-Spiegel in dem sie umgebenden Gewebe charakterisiert. Das Progesteron erhöht das Ruhepotenzial der Muskelzelle und bewirkt eine lokale Prostaglandin-Blockade (25). Auf diese Weise behält das Gewebe seine Widerstandsfähigkeit. Die Zervixverkürzung vollzieht sich dagegen wesentlich rascher und geht den Wehen voraus. Sie ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Dehnbarkeit, vermindertes und durch Wassereinlagerungen aufgelockertes Kollagen und eine Umkehrung des Progesteron-Östrogen-Verhältnisses (24-26).

Den Hauptrisikofaktor für die **Zervixinsuffizienz** (ZI) stellen Infektionen dar. Diese können sowohl eine ZI verursachen, als auch bei einer anderweitig (kongenital, iatrogen) bedingten ZI aufsteigen und einen vorzeitigen BS auslösen (24,26). Pathophysiologisch kommt es bei der Zervixinsuffizienz zur Dissoziation der Kollagenstruktur, so dass die Zervix dem erhöhten intrauterinen Druck nicht mehr stand hält (27). Weitere Risikofaktoren sind angeborene Anomalien oder vorausgegangene Eingriffe wie eine Konisation oder Zervixkürretage.

Eine schwerwiegende Komplikation der ZI ist der **Fruchtblasenprolaps** (FBP): durch den dilatierten Zervikalkanal, kann die noch intakte Fruchtblase vor den äußeren Muttermund und im Extremfall bis in die Scheide hervor treten. Dadurch steigt die Gefahr eines Spätaborts oder einer extremen Frühgeburt besonders dann, wenn es z.B. durch vaginal aufsteigende Infektionen zusätzlich zu einem vorzeitigen Blasensprung kommt. Zu den bekannten Risikofaktoren für einen FBP zählen eine diesbezüglich positive Anamnese, Mehrlingsschwangerschaften, Infektionen mit der Gefahr der Aszendierung sowie operative Zervixeingriffe (28).

1.1.4 Diagnostik

Je früher in der Schwangerschaft die Anzeichen einer drohenden Frühgeburt auftreten, desto größer ist das Risiko für das Neugeborene und um so wichtiger ist die Diagnostik. Hierfür dienen zum einen klinische Marker, wie das Auftreten vorzeitiger Wehentätigkeit, der vorzeitige Blasensprung sowie die vorzeitige Zervixreifung. Die Wehentätigkeit lässt sich durch das CTG feststellen, sowie durch subjektive Angaben der Patientin. Um die Relevanz der Wehen einschätzen zu können, kann ein Test auf fetales Fibronectin gemacht werden. Dieses Glykoprotein lässt sich physiologisch im Vaginalsekret bis zur 24.SSW nachweisen. Als negativ prädiktiver Marker kann bei Abwesenheit des Fibronektins nach der 24.SSW eine zeitnahe FG zu 99% ausgeschlossen werden (5,29).

Zur weiteren Diagnostik dient die Zervixlänge, welche vaginal-sonographisch ausgemessen werden kann (s. Abbildung). Erst kürzlich konnten Hirsch et al. nachweisen, dass mit jedem zusätzlichen Millimeter, den der Zervikalkanal an Länge misst, das FG-Risiko unabhängig vom Gestationsalter, um 5-10% sinkt (30). Allerdings hängt die sonographische Messung der Zervixlänge von der Erfahrung des Untersuchers ab und kann demnach individuell variieren.

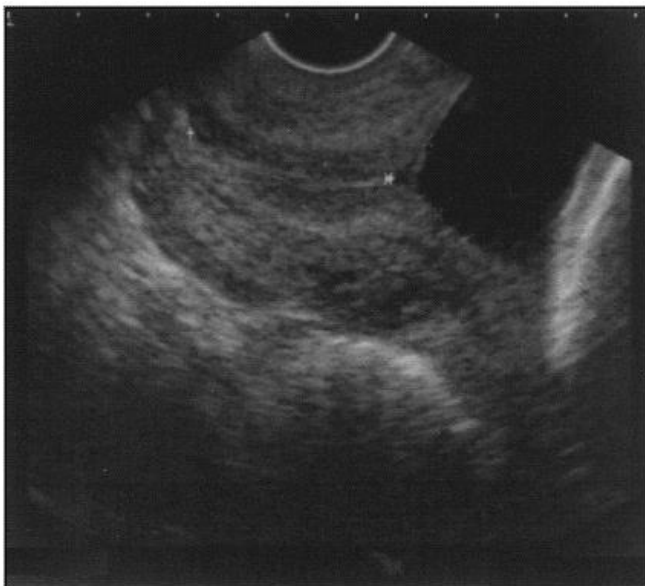


Abbildung 1: Transvaginaler US einer normalen Zervix; Markierungen am inneren und äußeren MM (31)



Abbildung 2: Transvaginaler US mit verkürzter Zervix, Trichterbildung und prolabierender Fruchtblase

blase (31)

Ein stattgehabter Blasensprung ist eine primär klinische Diagnose und lässt sich mittels Spiegeleinstellung detektieren. Außerdem wird, besonders bei klinisch nicht eindeutigen Befunden, noch ein Amnicheck[®]-Test durchgeführt. Dieser kann einen Fruchtwasserabgang nachweisen, indem er das Protein IGFBP-1 (Insulin-like-growth-factor-binding-protein-1) misst, welches in der fetalen Leber sowie in der mütterlichen Dezidua produziert wird (20).

Zur weiteren Diagnostik bei Frühgeburtsbestrebungen gehört aufgrund der Infektion als Hauptrisikofaktor immer auch ein bakterieller Vaginalabstrich. Mit diesem können Erreger nachgewiesen und eine entsprechende antibiotische Therapie eingeleitet werden.

Einen spezifischen Marker für eine drohende Frühgeburtlichkeit zu finden, wie etwa bestimmte Zytokine im Vaginalsekret, ist Ziel dieser Arbeit.

1.1.5 Therapie und Prävention

Die Therapiemöglichkeiten werden hier nicht detailliert geschildert, da sie für die vorliegende Arbeit keine wesentliche Rolle spielen.

Die Indikation für den Beginn einer Therapie stellen ein auffälliger Zervixbefund, ein früher vorzeitiger Blasensprung und durch das CTG aufgezeichnete vorzeitige Wehen dar. Die Wahl der Therapie richtet sich nach der jeweiligen Klinik sowie nach der SSW. Droht die FG vor der 32.SSW einzutreten, ist der Patientin die Überweisung in ein Perinatalzentrum anzuraten. Überlebensfähig gelten Neugeborene heute ab der 23+3.SSW, wobei das Überleben dieser Kinder äußerst kritisch zu bewerten ist, da schwerwiegende bleibende Gesundheitsschäden auftreten können (20). Therapeutisch stehen heute primär die Wehenhemmung mittels eines Betasympathomimetikums oder eines Oxytocinrezeptorantagonisten (Atosiban) zur Verfügung (15). Andere Tokolytika wie Magnesium oder Kalziumantagonisten sind aufgrund mangelnder Datenlage in Deutschland offiziell nicht zugelassen und werden nur supportiv eingesetzt (32). Jedoch hat gerade der Kalziumantagonist Nifedipin als einziges Tokolytikum eine nachgewiesene mortalitäts-senkende Wirkung und verbessert so das kindliche Outcome, weshalb es derzeit bevorzugt verwendet wird (33). Eine drohende FG, ein vorzeitiger BS sowie eine intrauterine Wachstumsverzögerung stellen ab der 23+0 SSW bis zur 34+0 SSW zudem eine Indikation für eine Lungenreifeinduktion mittels Betamethason dar (34). Im Falle einer nachgewiesenen bakteriellen Infektion ist entsprechend des Antibiotogramms eine antibiotische

Therapie einzuleiten, z.B. mit Metronidazol oder Clindamycin. Bei anamnestisch auffälligen Frauen mit Risikofaktoren kann zudem eine regelmäßige pH-Bestimmung vorgenommen werden um eine bakterielle Vaginose oder andere Infektionen auszuschließen (15).

Kommt es zu einem Prolaps der Fruchtblase so besteht die Therapie neben einem möglichen konservativen Vorgehen (Bettruhe, Antibiose, Tokolyse), in operativen Verfahren mit Reposition der prolabierte Fruchtblase und einem operativen Verschluss der dilatierten Zervix (35).

Als mögliche **Prävention** der Frühgeburt gilt neben konservativem Vorgehen (Bettruhe) die Zervixcerclage (36). Diese wird Patientinnen mit einer Zervixlänge <25mm oder Trichterbildung > 25% im zweiten Trimenon empfohlen und reduziert das Risiko einer Frühgeburt um 25% (16,24,37,38). Eine Notfall-Cerclage hat dabei eine wesentlich schlechtere Prognose, als die prophylaktische Cerclage bei Zervixinsuffizienz (28,39). Es gilt also schon frühzeitig anhand der Anamnese und der klinischen Untersuchungsbefunde, risikobehaftete Frauen zu detektieren und ggf. frühzeitig operativ zu behandeln.

Schließlich gibt es noch die Möglichkeit einer vaginalen Progesteron-Applikation in der 24. – 34.SSW oder einer wöchentlichen intramuskulären Gabe von 17 α -Hydroxy-Progesteroncaproat zwischen der 20. – 36.SSW (16).

1.2 Zytokine

1.2.1 Funktion und Bedeutung

Zytokine sind lösliche Glykoproteine, die als hochkomplexes Netzwerk bei der Regulation von Immunantworten eine zentrale Rolle spielen. Als Immunbotenstoffe werden sie von Zellen des natürlichen und erworbenen Immunsystems produziert (Makrophagen, NK-Zellen, T-Lymphozyten) und sind an der interzellulären Signalübermittlung beteiligt (40).

Zu den wichtigsten Zytokinklassen zählen die Interleukine (IL), die Interferone (IFN), der Tumornekrosefaktor (TNF) und die Koloniestimulierenden Faktoren (CSF). Diese können synergistisch oder antagonistisch agieren und die Proliferation oder Apoptose von Zellen dirigieren, indem sie die Expression anderer pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine regulieren und so dem Immunsystem ermöglichen, adäquat zu reagieren (40). Je nach Sezernierungsort, werden die Zytokine in die Untergruppen vom Th-1-, TH-2- oder TH-17-Typ unterteilt. Die TH-1-Zellen (IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TNF- α) stimulieren die zelluläre Immu-

nität, wohingegen die TH-2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13m CSF) die humorale Immunität fördern. Zu den TH-17-Zellen zählen IL-17 und IL-22, welche bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (41). Weitere TH-Zelllinien wie TH-9-Zellen, Treg-Zellen sind Gegenstand der Forschung. Die von den TH-Zellen produzierten Zytokine selbst wiederum haben Einfluss auf die weitere Differenzierung der naiven T-Zelle in Richtung TH-1- oder TH-2-Zelle, wodurch eine adaptive Immunantwort ermöglicht wird.

Die Schwangerschaft stellt aufgrund des semi-allogenen Feten für das Immunsystem der Mutter eine besondere Herausforderung dar. Dabei können sowohl bei der rechtzeitigen als auch bei der zu frühen Geburt pro-inflammatorische Veränderungen festgestellt werden (42, 43). Bei der rechtzeitigen Geburt ist das Ausmaß der inflammatorischen Prozesse jedoch wesentlich geringer, als bei einer Frühgeburt (18,22). Bei der FG konnte als Immunantwort auf eine z.B. bakterielle Infektion, eine signifikante Steigerung von Interleukinen (v.a. IL-6, IL-8), TNF- α und IL-1 β sowohl in den Eihäuten, als auch in der Zervix, der Plazenta und dem Fruchtwasser nachgewiesen werden. Diese Zytokine führen einerseits zu einer gesteigerten Freisetzung von Prostaglandinen, welche die Uteruskontraktilität fördern. Andererseits induzieren sie die Aktivierung von Proteasen, welche die zervikale Kollagenmatrix spalten und die Kollagenstruktur auflockern. Durch die Kraft der Wehen kommt es schließlich zur Dilatation der Zervix, welche ihrer Haltefunktion nicht mehr gerecht werden kann (19,27,42). Diese weitreichenden Wirkungen der Zytokine im Rahmen der Frühgeburtlichkeit machen ihre zentrale Rolle sowohl als Mediatoren als auch als diagnostische Marker deutlich.

Zudem wirken Zytokine nicht nur auf den mütterlichen, sondern auch auf den kindlichen Organismus. Dort begünstigen sie intraventrikuläre Blutungen, bronchopulmonale Dysplasien und die periventrikuläre Leukomalazie (15). Eine Übersicht über die unterschiedlichen Wirkungen der Zytokine sowohl im mütterlichen als auch im kindlichen Organismus gibt die folgende Abbildung.

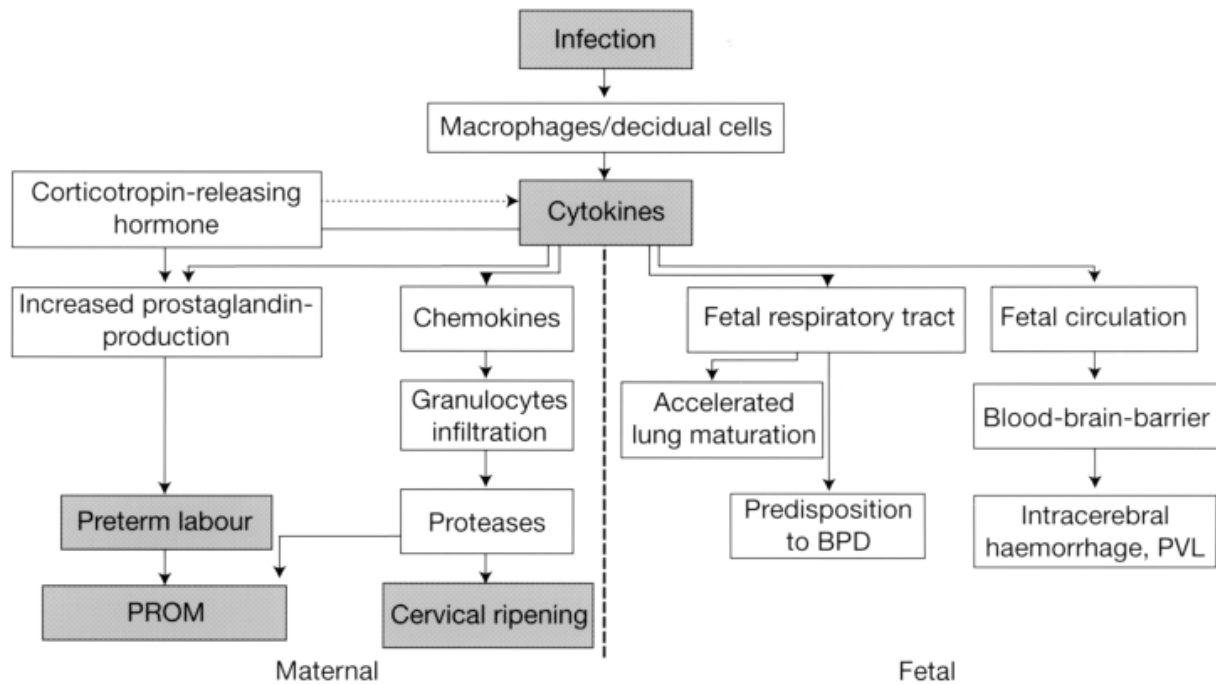


Abbildung 3: Assoziation zwischen Infektion, Zytokinen und Frühgeburt (15)

1.2.2 Einteilung der Zytokine

Die Zytokine haben je nach Gruppe pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören drei Gruppen: (1) Die Alarmzytokine TNF und IL-1. Sie lösen die akute Entzündungsreaktion aus. (2) Endogene Pyrogene wie TNF- α , IL-1, IL-6 und MIP-1 β , welche Fieber auslösen. (3) Andere Zytokine wie IL-20, IL-8, Interferone und Chemokine.

Zu den antiinflammatorischen Zytokinen gehören IL-4, IL-10, IL-13 und IL-19 (44).

1.2.2.1 Interleukin-23

IL-23 fördert die Typ-1-Polarisierung von T-Zellen, welches ein wichtiges immunologisches Prinzip darstellt, da Typ-1-T-Zellen hauptsächlich eine zellvermittelte Immunantwort induzieren. Dadurch kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion, zur möglichen Eradikation von Viren und anderen intrazellulären Erregern und über die Initiierung einer Immunantwort vom Spättyp zur gezielten Auslösung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort. Zudem fördert IL-23 die Produktion von IFN- γ , wobei es hier weniger potent ist als das IL-12 mit gleicher Funktion. Außerdem sorgt IL-23 für die Proliferation von T-Gedächtniszellen (40).

1.2.2.2 Interleukin-17a

IL-17a zählt zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und wird ausschließlich von aktivierten T-Zellen gebildet. Es fördert die Proliferation und Reifung neutrophiler Granulozyten sowie die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren. Erhöhte Konzentrationen von IL-17a wurden bei Entzündungen der Atemwege und des Magen-Darm-Trakts, sowie bei Psoriasis, rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose und anderen Pathologien beobachtet (40).

1.2.2.3 Interleukin-12

IL-12 wird nur von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen sezerniert. Es wird als Reaktion auf bakterielle und parasitäre Infekte gebildet, spielt bei der antiviralen Immunantwort aber eine untergeordnete Rolle. Das biologische Leistungsspektrum von IL-12 umfasst u.a. die Sezernierung von IFN- γ sowie die Stimulation der T-Zell- und NK-Zell-Proliferation und regt diese zur Produktion von TNF- α an, was wiederum zur Aktivierung von Makrophagen führt (40). Charakteristisch für IL-12 ist weiterhin, dass es im Infektionsverlauf frühzeitig erscheint. Es fördert durch Induktion von IFN- γ die T_H1-Immunantwort und steigert die Toxizität von natürlichen Killer-Zellen (45).

1.2.2.4 Interleukin-10

IL-10 zählt zu den immunsupprimierenden, anti-inflammatorischen Zytokinen. Es wird vor allem von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen gebildet, aber auch dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen können dieses Zytokin bilden. Durch noch nicht vollständig verstandene Mechanismen kann das IL-10 die T-Zell-Aktivierung und Zytokinrezeptoren hemmen. Außerdem fördert es die humorale Immunreaktion und beeinflusst verschiedene immunmodulierende Zellen in ihrer Funktion (z.B.: NK-Zellen, T-Zellen). Auch hat dieses Zytokin eine stimulierende Wirkung auf primitive hämatopoetische Stammzellen, auf die Thrombozytopoese und auf die Bildung von Erythrozyten. Die suppressive Wirkung von IL-10 besteht aber vor allem in der Fähigkeit, die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine zu hemmen (v.a. IL-6, IL-8, TNF- α). Da IL-10 das Ausmaß der durch Bakterien, Pilze und Protozoen generierten Immunantwort hemmt, schützt es das Gewebe vor einer überschießenden Entzündungsreaktion, sofern das Pathogen nicht persistiert. Außerdem schützt das IL-10 vor vaskulärer Dysfunktion, weshalb es auch hinsichtlich eines Einsatzes im Rahmen einer Immuntherapie in Zusammenhang mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen diskutiert wird. Aufgrund

seines breiten Wirkspektrums spielt dieses Zytokin also eine wichtige Rolle in der natürlichen und erworbenen Immunantwort (40,46). Liegt ein Mangel an Interleukin-10 vor, so führt dies zu einer Störung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischer Aktivität: es kommt zu einem Überwiegen der pro-inflammatorischen Immunantwort, welche zu zahlreichen Komplikationen und letztlich zur Frühgeburt führen kann (s. Abbildung 31).

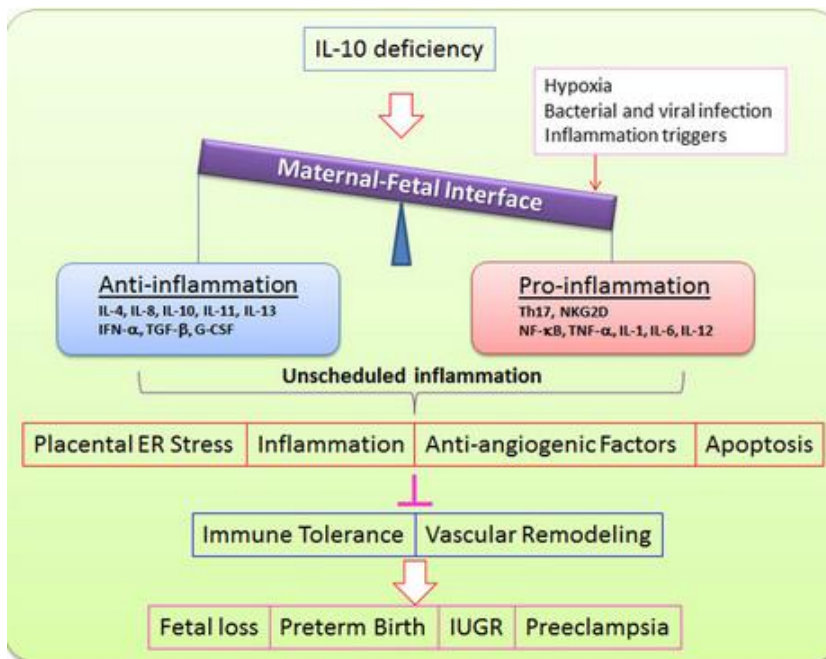


Abbildung 4: Einfluss von IL-10 auf das Immunsystem (46)

1.2.2.5 Interleukin-6

IL-6 gehört zur Gruppe der pro-inflammatorischen Proteine und wird u.a. von T_H2 -Zellen, Phagozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie von Makrophagen produziert. Außerdem regulieren bakterielle Endotoxine sowie proinflammatorische Zytokine die Transkription des IL-6-Gens (40). Die biologischen Funktionen von IL-6 sind sehr vielfältig und zahlreich. Zu den Hauptwirkungen gehören die Induktion und Inhibition der Zellproliferation, die Induktion der hepatischen Akute-Phase-Produktion, das Entstehen von Fieber, sowie die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen. Gemeinsam mit IL-3 wirkt es zudem auf die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen (47). Eine besondere Rolle spielt das IL-6 bei extrem frühgeborenen Kindern (< 28.SSW), da bei diesen stark erhöhte Konzentrationen sowohl des Zytokins selbst, als auch seines Rezeptors nachgewiesen werden konnten. Dies führt über eine gesteigerte Proteaseaktivität zu einer erhöhten Gefahr für zerebrale und vaskuläre Folgeschäden (15).

1.2.2.6 Tumornekrosefaktor – α

Der TNF- α (auch: „Kachektin“) hat inflammatorische, immunmodulierende, antivirale und zytotoxische Eigenschaften. Als Stimulus für die TNF- α -Produktion durch Makrophagen gelten bakterielle oder virale Produkte wie z.B. Lipopolysaccharide oder Virus-RNA. Daneben produzieren u.a. auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Granulozyten und Mastzellen das TNF- α . Die Funktionen dieses Zytokins sind so vielfältig, dass im Folgenden stichpunktartig die relevantesten aufgeführt werden:

- Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten
- Induktion der hepatischen Akute-Phase-Antwort
- Induktion von Schock, Hypotension und Gewebeschaden
- Regulation der Apoptose
- Steigerung der Produktion von Prostaglandin E2
- Bereitstellung von Zytokinen und Chemokinen, Entzündung
- Antivirale, antibakterielle, antimykotische Eigenschaften

Zu den weniger erwünschten Wirkungen des TNF- α zählen u.a. die Förderung der Kachexie über Stimulation der Lipolyse, die Förderung der intravaskulären Thrombusbildung als auch die Induktion eines Tonusverlusts in den glatten Muskelzellen.

Aufgrund der vielfältigen, starken Einflüsse von TNF- α bedarf es einer strikten Regulation seiner biologischen Aktivität, was physiologisch über die Genexpression und posttranskriptionelle Regulation geschieht. Iatrogen vermindern aber auch Steroide die Signaltransduktion von TNF- α . Erhöhte Serumspiegel von TNF- α finden sich bei zahlreichen Krankheiten und haben auch unerwünschte Wirkungen (z.B.: Kachexie). Daher wird eine Anti-TNF- α -Therapie heutzutage zunehmend etabliert (40,48,49).

1.2.2.7 Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1 β

MIP-1 β (CCL 4) gehört zu den Chemokinen, einer Gruppe von pro-inflammatorischen Zytokinen. Nach Stimulation durch bakterielle Toxine, Viren, TNF- α , IFN- γ , und IL-1 wird MIP-1 β überwiegend von Makrophagen und Phagozyten produziert. IL-4, IL-10, Dexamethason und Proteasen dagegen hemmen die Produktion des Chemokins. Die biologische Aktivität von MIP-1 β besteht u.a. in der chemotaktischen Anlockung von T-Zellen, in der Induktion der Phagozytose und der Signaltransduktion; außerdem vermittelt es die transendotheliale

Migration von Monozyten, dendritischen Zellen und NK-Zellen sowie die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie etwa Histamin. MIP-1 β spielt somit eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen wie Arthritis, Multiple Sklerose, Psoriasis, Lungenentzündung, Sepsis, Wundheilung und allergischem Asthma (50).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die Zytokine IL-23, IL-17a, IL-12, IL-10, IL-6, TNF- α und MIP-1 β bei Frauen mit Frühgeburtsbestrebungen im Vergleich zu gesunden Schwangeren verhalten. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Frühgebo-
renenrate weltweit immer noch sehr hoch ist und wenn überhaupt nur eine geringe Tendenz zu einer sinkenden Zahl an Frühgeburten beobachtet werden kann. Problematisch ist dabei der Mangel an zuverlässigen diagnostischen Markern, die jenseits der klinischen Parameter (Fieber, CRP-Anstieg, Tachykardie) spezifisch genug sind, ein intrauterines Infektionsgeschehen rechtzeitig vorhersagen und abschätzen zu können. Bei den Studien, die bisher zu Biomarkern in Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit durchgeführt wurden, erwiesen sich nur wenige als aussagekräftig genug um im Sinne einer Sekundärprävention eine drohende Frühgeburt vorauszusagen (5,51). Diese Arbeit soll die Funktion von Zytokinen und besonders von bestimmten Zytokinkombinationen als diagnostische Parameter im Rahmen der Frühgeburtlichkeit hinterfragen.

Bei unserer Studie handelt sich um eine prospektive Fall-/ Kontrollstudie mit 43 Frühgeburtsfällen und 32 Fällen ohne Frühgeburt. Folgende Fragestellungen wurden dabei untersucht:

Primäre Endpunkte:

- Unterschiede in den erhobenen Parametern zwischen Fall- und Kontrollgruppe?
- Gibt es Zytokine, die auf eine drohende Frühgeburt hinweisen könnten bzw. dafür charakteristisch sind?

Sekundäre Endpunkte:

- Wie ist der Schwangerschaftsverlauf nach Fruchtblasenprolaps?
- Hat die Muttermundweite Einfluss auf die Schwangerschaftsverlängerung?
- Welche Rolle spielen Bakterien und Infektionen für das Auftreten einer Frühgeburt?
- Welche Rolle spielt die mütterliche Anamnese für den Schwangerschaftsverlauf?

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Produkt	Firma
Abnehmbesteck Vaginaltupfer	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Agarplatten	Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Einkanal-Pipette „Research“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eisschrank (-32°) „Premium NoFrost“	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Eisschrank (-80°) „Forma 900 Series“	Thermo Fisher Scientific, 81 Wyman Street, Waltham, MA 02454, USW
ELISA-Reader „Microplate Reader MRX II“	Dynex Technologies, Chantilly, USA
ELISA-Auswertungsprogramm „Revelation“, Version 4.22	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Glasbehälter 500ml	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Kühlkammer (7°)	Kajetan Hierhammer, München, Deutschland
Kühlschrank „Cooler“	Siemens AG, München, Deutschland
Mehrkanal-Pipette „Research“, 30-300µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanal-Pipettier-Reservoir	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroküvetten „Safe Lock Tubes“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PHOENIX™-System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen „epT.I.P.S. Filter“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe „Easypet“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen „Blue Max Conical Tube“	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Reaktionsgefäßständer „Tube Rack“	Microtest Laboratories, Agawam, USA
Schüttelgerät „Thermomixer comfort“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
VITEK®-System	bioMérieux
Vortexgerät „Genie II“	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge „MiniSpin“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Patientinnen

Die Vaginallavagen wurden bei der Kontrollgruppe im Rahmen der regulären Schwangerschafts-Sprechstunde in der gynäkologischen Praxis Dr. Christoph Bauer in Wolfratshausen entnommen. Die Proben der Fallgruppen wurde bei solchen Patientinnen entnommen, welche mit einem Fruchtblasen-Prolaps oder anderen Symptomen, die auf eine vorzeitige Geburt hinweisen (vorzeitige Wehentätigkeit, vorzeitiger Blasensprung) in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München vorstellig wurden.

Alle Patientinnen gaben ihr Einverständnis, ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München liegt vor.

Anhand der Krankenakten wurden für die Studie entscheidende Daten mittels Aufnahmebögen, Untersuchungsbefunden und Arztbriefen erhoben. Diese wurden in einer SPSS Datenbank anonymisiert gelistet und gespeichert.

Insgesamt ergab sich ein Patientenkollektiv aus 75 Patientinnen, zwischen 20 und 44 Jahren, mit einem durchschnittlichen Alter von 32,20 Jahren. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen von Fehlbildungen, Uterusanomalien und Medikamenteneinnahme.

2.1.2.1 Fallgruppe

Das Patientengut der Fallgruppe umfasst 43 Patientinnen. Das durchschnittliche Alter der Fallgruppe betrug 32,16 Jahre (20 – 44 Jahre). Die Schwangerschaftswoche, in welcher es zur Entnahme der Vaginallavagen kam war im Mittel die 23,9 (+4,7) SSW (Median 24,0). 6,9% der Schwangeren waren dabei Erstgebärende, 44% von ihnen wiesen einen Fruchtblasenprolaps auf.

2.1.2.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasst 32 Patientinnen mit einem durchschnittlichen Alter von 32,25 Jahren (20 – 44 Jahre). Die Entnahme erfolgte im Mittel in der 22,7 (+3,1) SSW (Median 22,0). Hierbei waren 46% der Patientinnen Erstgebärende und 100% Einlingsschwangerschaften.

2.1.3 Vaginallavage

Bei jeder Patientin wurde mit Hilfe einer Spritze 5-10ml Scheidensekret gewonnen. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer Spritze 0,9%ige Kochsalzlösung in das hintere Scheidengewölbe gespritzt. Dann wurde es mit dem dortigen Sekret vermengt und anschließend mit derselben Spritze wieder aspiriert. Die in der Praxis sowie die in der Frauenklinik auf diese Art gewonnenen Vaginallavagen wurden identisch weiterverarbeitet, in 2ml - Eppendorfgefäße pipettiert, beschriftet und anschließend bei -80° Celsius tief gefroren.

2.1.4 Untersuchte Parameter

Folgende Parameter wurden erhoben, um diese dann später auszuwerten:

Tabelle 4: Untersuchte Parameter bei beiden Gruppen

Allgemeine Patientendaten	■ Alter
	■ Anzahl der Schwangerschaften
	■ SSW bei Entnahme
	■ Komplikationen vorheriger SS
Maternale Infektparameter	■ CRP
	■ Leukozyten
	■ Bakterieller Vaginalabstrich
	■ Zytokine in der Vaginallavage
Muttermundsbefunde	■ Zervixlänge
	■ MM-Weite
	■ Fruchtblaseprolaps
Geburtsparameter	■ Geburtsmodus
	■ SSW bei Geburt

2.2 Methodik

2.2.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (Elisa)

Um die Zytokinkonzentrationen für diese Studie zu ermitteln wurde mit der ELISA-Methode bzw. dem Sandwich-ELISA gearbeitet. Der Ablauf dieser quantitativ analytischen Methode ist in Teilschritten festgelegt und funktioniert nach dem folgenden Prinzip: die dem Assay beiliegende Mikrotiterplatte ist mit einem bestimmten Antikörper beschichtet (Coating). Es folgt die Hinzugabe eines Inkubationspuffers. Anschließend wird die antigenhaltige Probenlösung auf die Platte gegeben, so dass während der folgenden Inkubationszeit eine Antikörper-Antigen-Bindung erfolgen kann (Applikation). Ein darauf folgender Waschvorgang beseitigt ungebundene Antigene. Dem so entstandenen Antikörper-Antigen-Komplex wird nun ein weiterer, ein enzymmarkierter Sekundärantikörper hinzugefügt (Detektion). Um überschüssige Moleküle zu entfernen wird die Platte erneut gewaschen. Es verbleibt ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nun wird ein chromogenes Substrat hinzugefügt, wodurch es zum Farbumschlag kommt (Enzymreaktion). Die Konzentration des Antigens wird mithilfe eines Photometers bei 450 nm bestimmt (Entwicklung). Eine im Versuch erstellte Standardreihe mit bekannten Konzentrationen liefert Vergleichswerte.

2.2.1.1 Interleukin-23

Die Bestimmung dieses Zytokins musste zwei Mal erfolgen, da die erste Messung zu keinen (messbaren) Ergebnissen führte. Um einen Versuchsfehler auszuschließen wurde der Versuch wiederholt, wobei beim zweiten Mal auf die Verdünnung der Proben mit dem Inkubationspuffer verzichtet wurde.

2.2.1.1.1 Reagenzien

Das verwendete Elisa-Set stammt von der Firma R&D-Systems aus Minneapolis 55413/ USA (Catalog #D2300B) und beinhaltet folgende, gebrauchsfertige für diesen Versuch notwendigen Bestandteile:

- mit Anti-IL-23-p19-beschichtete Reaktionsgefäße auf Mikrotiterplatten
- Anti-IL-23-Konjugat (zur Detektion)
- IL-23 Standard

- Assay-Diluent RD1-22, Inkubationspuffer
- Calibrator-Diluent RD5-16, welcher als Puffer zur Verdünnung des Standards dient
- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25x)
- Color Reagent A (chromogenes Substrat aus Wasserstoffperoxid)
- Color Reagent B (chromogenes Substrat aus Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen

Ehe begonnen werden kann, müssen die Proben sowohl der Kontroll- als auch der Fallgruppe zunächst in eine herkömmliche Platte mit Mikroküvetten (ohne Antigen) hinein pipetiert werden. Die erste Spalte der Platte wird frei gelassen um das Übertragen auf die beschichtete Mikrotiterplatte später zu erleichtern und Fehler zu vermeiden. Sie dient später der Standardreihe. Dann wird jede Mikroküvette mit jeweils 350µl der entsprechenden Kontroll- bzw. Fallgruppenprobe gefüllt. Dies erfolgt bei allen Zytokinbestimmungen nach dem gleichen Muster: die Spalten zwei bis sechs werden von der Fallgruppe belegt, die Spalten sieben bis zehn von der Kontrollgruppe.

2.2.1.1.2 Reagenzienvorbereitung

Gepufferte Waschlösung

Als erstes wird die Pufferlösung hergestellt, die im Verlauf des Versuchs immer wieder zum Einsatz kommt. Hierfür werden zu den 20ml des Pufferkonzentrats 480ml destilliertes Wasser der Firma Aqua ad injectabilia hinzugefügt, so dass letztlich ein Waschpuffer von 500ml für die Bestimmung der Interleukine 23, 6, 10 und 12 zur Verfügung steht.

Humanes IL-23-Standard

Im nächsten Schritt wird der Standard hergestellt. Hierfür werden mit Hilfe einer 1000er Pipette 1300µl destilliertes Wasser in das Gefäß des noch kristallographischen IL-23-Standards gegeben und sogleich für 20 Minuten leicht geschüttelt. Dadurch entsteht eine Lösung mit der Konzentration von 10000pg/ml mit welcher anschließend die Verdünnungsreihe hergestellt wird. Dies geschieht nach folgendem Schema: in das erste Eppendorfgefäß werden 750µl des Calibrator-Diluent RD5-16 pipettiert, in alle weiteren 500µL. Anschliessend wird in das erste Gefäß 250µL der Standardlösung hinzugefügt. Dann werden jeweils 500µL der vorangegan-

genen Standardkonzentration mit den 500µl des Standardverdünnungspuffers mit Hilfe des Vortex-Gerätes gemischt, so dass letztlich eine Verdünnungsreihe mit den folgenden, absteigenden Konzentrationen erreicht wird: 2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml, 313pg/ml, 156pg/ml, 78,1pg/ml, 39,0pg/ml.

Alle weiteren Bestandteile für die Durchführung liegen bereits gebrauchsfertig geliefert vor.

2.2.1.1.3 Durchführung

Zunächst wird mit Hilfe einer Acht-Kanal-Pipette in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 100µl des Inkubationspuffers gegeben. Anschließend wird die für den quantitativen Nachweis notwendige Standardverdünnungsreihe hergestellt, und zwar in aufsteigender Konzentration. Das heißt, die erste Vertiefung erlangt die Konzentration von 0pg/ml indem dort zu den 100µl Inkubationspuffer lediglich 100µl des Standard-Verdünnungspuffers (Calibrator-Diluent) hinzugefügt werden.

Danach werden jeweils 100µL der bereits vorgelegten Platte mit den enthaltenen Proben der Kontroll- und Fallgruppe mit Hilfe einer Acht-Kanal-Pipette auf die Mikrotiterplatte übertragen, so dass sich nun in jeder Vertiefung 200µl befinden.

Die Platte wird mit einer Klebfolie abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Hierzu wird die Platte auf ein Schüttelgerät eingespannt und mit 500UpM fortwährend horizontal bewegt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte ein vier-maliger Waschvorgang, der dazu dient, nicht gebundenes, überschüssiges Antigen zu entfernen. Hierzu werden 400µl des Waschpuffers mit Hilfe einer Acht-Kanal-Pipette in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben, diese anschließend wieder abpipettiert und die Platte auf saugfähigem Fließpapier sanft ausgeklopft, so dass keine Rückstände des Waschpuffers zurückbleiben.

Anschließend werden in jede Vertiefung der Platte 200µl des Konjugats hinzugegeben. Dieses besteht aus einem IL-23-Antikörper, welcher an ein Reporterenzym gebunden ist und für die spätere Farbreaktion verantwortlich ist. Die Platte wird dann erneut mit einer Folie abgeklebt und für eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur auf das Schüttelgerät gespannt.

Im nächsten Schritt wird nun der viermalige Waschvorgang wie zuvor beschrieben wiederholt. Dann werden in jede Vertiefung 200µl Substratlösung pipettiert. Diese besteht aus Tet-

ramethylbenzidin und dem kurz zuvor hinzugefügten Wasserstoffperoxid. Die Lösung führt rasch zu dem erwarteten Farbumschlag in Richtung blau. Nun wird die Platte für 30min bei Raumtemperatur in Dunkelheit gestellt um den lichtempfindlichen Farbstoff zu schützen und keine verfälschten Farbumschläge zu provozieren. Nach Ablauf dieser Zeit werden je 50µl Stopplösung hinzugefügt, welche dazu dient die Farbreaktion zu beenden. Anschließend wird die Platte möglichst schnell (binnen einer Stunde) in das Spektralphotometer eingelegt. Dieses misst bei einer Wellenlänge von 450nm die optische Extinktion.

2.2.1.2 Interleukin-6 und Interleukin-12

2.2.1.2.1 Reagenzien

Die beiden Elisa-Sets stammen von der Firma R&D-Systems aus Minneapolis 55413/ USA (Catalog #D6050 und #D1200) und beinhaltet folgende, gebrauchsfertige für diesen Versuch notwendigen Bestandteile:

- Humanes Interleukin-6 (h-IL-6) bzw. h-IL-12 Standard
- mit Anti-h-IL-6 bzw. Anti-h-IL-12 beschichtete Reaktionsgefäße auf einer Mikrotiterplatte
- Anti-h-IL-6 bzw. Anti-h-IL-12-Konjugat
- Calibrator-Diluent RD5D (5x), Standardverdünnungslösung
- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25x)
- Color Reagent A (chromogenes Substrat aus Wasserstoffperoxid)
- Color Reagent B (chromogenes Substrat aus Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen

2.2.1.2.2 Reagenzienvorbereitung

Humanes IL-6 Standard

Zunächst wird der IL-6 Standard mit 5ml der Standardverdünnungslösung versehen und 15 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Auf diese Weise zersetzt sich der anfangs kristallographische Standard in der Lösung. Hierdurch entsteht schließlich eine Standardlösung mit einer Konzentration von 300pg/ml, welche der Herstellung der Standardreihe dient.

Für diese werden zunächst zu 667µl der Pufferlösung 333µl der Standardlösung gegeben, so dass eine Konzentration von 100pg/ml erreicht wird. In den folgenden Schritten werden dann 500µL der Pufferlösung mit jeweils 500µl der vorhergehenden Standardkonzentration vermischt. Auf diese Weise entsteht eine Standardreihe mit folgenden, absteigenden Konzentrationen. 100pg/ml, 50pg/ml, 25pg/ml, 12,5pg/ml, 6,25pg/ml, 3,12pg/ml.

Standardverdünnungspuffer (Calibrator Diluent RD5C)

20ml des Puffers (5x) werden mit 80ml destilliertem Wasser verdünnt, so dass schließlich 100ml des Verdünnungspuffers Calibrator Diluent RD5C (1x) entstehen.

Humanes IL-12 Standard

Um den IL-12-Standard herzustellen, werden 5ml des zuvor hergestellten Verdünnungspuffers zu dem Standard hinzugefügt und für 15 Minuten leicht geschüttelt. Dadurch entsteht eine Standardlösung mit einer Konzentration von 500pg/ml.

Zur Herstellung der Standardverdünnungsreihe werden 500µl des Verdünnungspuffers mit 500µl der Standardlösung versehen, wodurch sich eine Konzentration von 250pg/ml ergibt. Um nun die Konzentrationen zu diminuieren, werden jeweils 500µl der vorherigen Standardverdünnungslösung mit 500µl des Puffers vermischt, so dass letztlich folgende Standardreihe entsteht: 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml.

Alle weiteren benötigten Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert oder sind bereits in vorherigen Schritten hergestellt worden (Waschpuffer).

2.2.1.2.3 Durchführung

Nachdem alle Reagenzien vorbereitet wurden, wird die vorgelegte Platte mit einer Acht-Kanal-Pipette auf die mit monoklonalen Anti-h-IL-6- bzw. Anti-h-IL-12 beschichteten Mikroküvetten übertragen. Dabei werden diese mit jeweils 150µl (IL-6) bzw. 200µl (IL-12) der Kontroll- und der Fallgruppe befüllt. Entgegen der Anweisungen wird an dieser Stelle bewusst auf die Verwendung des Inkubationspuffers verzichtet, um somit eine zusätzliche Verdünnung zu vermeiden. In der ersten Spalte der Mikrotiterplatte wird die Standardreihe erstellt, welche in aufsteigender Konzentration angeordnet wird. Die Anfangskonzentration von 0pg/ml wird erreicht, indem dort lediglich Standardverdünnungspuffer ohne h-IL-6- bzw. h-IL-12-Standard hinein pipettiert wird. Nun wird die Platte abgeklebt und für zwei Stunden

bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Die Inkubationszeit dient dazu, dass die Antikörper an das IL-6-Antigen binden können. Anschließend erfolgt ein viermaliger (IL-6) bzw. dreimaliger (IL-12) Waschvorgang, welcher die nicht-gebundenen Antikörper entfernen soll. Hierzu werden in jede Vertiefung 400µl des Waschpuffers gegeben und die Platte anschließend auf Fließpapier ausgeklopft, so dass sich in den Mikroküvetten keine Rückstände mehr befinden.

Im folgenden Schritt werden in jede Vertiefung 200µl des polyklonalen Anti-h-IL-6- bzw. Anti-h-IL-12-Konjugats gegeben. Dieses enthält die *horseradish-Peroxidase* (HRP), welche als Marker-Enzym dient und das bereits gebundenen IL-6 bzw. IL-12 nachweist („detection antibody“). Für eine Inkubationszeit von zwei Stunden wird die Platte mit einer Klebefolie abgedeckt und bei Raumtemperatur ruhig stehen gelassen. Anschließend erfolgt ein erneuter vier- bzw. dreimaliger (IL-12) Waschvorgang, wie zuvor beschrieben.

Im letzten Schritt werden jeweils 200µl der Substratlösung (bestehend aus Tetramethybenzidin und dem kurz zuvor hinzugefügten Wasserstoffperoxid) in jede Vertiefung pipettiert, wodurch sich bereits eine mehr oder minder stark ausgeprägte Blaufärbung zeigt. Um diese Farbentwicklung weiter zu fördern, wird die Platte abgedeckt und bei Dunkelheit 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zum Beenden der Farbreaktion werden anschließend 50µl Stopplösung hinzugegeben, wodurch sich die Farbe von blau zu gelb ändert. Binnen der nächsten Stunde nach Zugabe der Stopplösung wird die optische Dichte des Standards, der Fall- und der Kontrollgruppe gegen das TMB und die Stopplösung bei 450 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt.

2.2.1.3 Interleukin-10

2.2.1.3.1 Reagenzien

Auch dieses Elisa-Set stammt von der Firma R&D-Systems aus Minneapolis 55413/ USA (Catalog #D1000B) und beinhaltet folgende, gebrauchsfertige für diesen Versuch notwendigen Bestandteile:

- Humanes Interleukin-10 (h-IL-10) Standard
- mit h-IL-10 Antikörper beschichtete Reaktionsgefäße auf einer Mikrotiterplatte
- Anti-IL-10-Konjugat (zur Detektion)
- Calibrator-Diluent RD5C (5x), welcher als Puffer zur Verdünnung des Standards dient

- Gepuffertes Waschlösungskonzentrat (25x)
- Color Reagent A (chromogenes Substrat aus Wasserstoffperoxid)
- Color Reagent B (chromogenes Substrat aus Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen

2.2.1.3.2 Reagenzienvorbereitung

Standardverdünnungspuffer (Calibrator Diluent RD5C)

20ml des Puffers (5x) werden mit 80ml destilliertem Wasser verdünnt, so dass schließlich 100ml Calibrator Diluent RD5C (1x) entstehen.

Humanes IL-10 Standard

Zuerst wird der Standard hergestellt. Hierfür werden 1000µl destilliertes Wasser in das Gefäß des noch kristallographischen IL-10-Standards gegeben und dieses sogleich für 10 Minuten leicht geschüttelt, um eine vollkommene Auflösung zu erreichen. Es entsteht dann eine Lösung mit der Konzentration von 5000pg/ml mit welcher anschließend die Verdünnungsreihe hergestellt wird. Hierfür werden zunächst 900µl des Calibrator Diuent RD5C (1x) in das erste, und jeweils 500µl in alle weiteren Eppendorfgefäße pipettiert. Anschließend werden in das erste Gefäß 100µl der Standardlösung hinzugefügt. Dann werden jeweils 500µl der vorangegangenen Standardkonzentration mit den 500µl des Standardverdünnungspuffers mit Hilfe des Vortex-Gerätes gemischt, so dass letztlich eine Verdünnungsreihe mit den folgenden, absteigenden Konzentrationen erreicht wird: 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml.

Der Waschpuffer wird aus der zuvor erfolgten Bestimmung von IL-23 verwendet. Alle weiteren Reagenzien liegen gebrauchsfertig vor.

2.2.1.3.3 Durchführung

Anhand einer Mikroküvette werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 200µl der Proben (Kontroll/ Fall) gegeben. Dabei wird nach einem festen Muster vorgegangen, das für alle folgenden Analysen beibehalten wird. Anschließend wird die Standardverdünnungsreihe in aufsteigender Konzentration übertragen, beginnend mit einer Konzentration von 0pg/ml (aus-

schließlich Standardverdünnungslösung) und endend mit der Maximalkonzentration von 500pg/ml. Da es sich nicht um Serum oder Plasma, sondern um eine Zellkultur handelt, wird bewusst kein Inkubationspuffer hinzugefügt. Die so befüllte und dann mit einer Deckfolie abgeklebte Platte wird dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte ein vier-maliger Waschvorgang, der dazu dient, nicht gebundenes, überschüssiges Antigen zu entfernen. Hierzu werden 400µl des Waschpuffers mit Hilfe einer Acht-Kanal-Pipette in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben, diese anschließend wieder abpipettiert und die Platte auf saugfähigem Fließpapier sanft ausgeklopft, so dass keine Rückstände des Waschpuffers zurückbleiben.

Anschließend werden in jede Vertiefung der Platte 200µl des Konjugats hinzugegeben, welches aus einem monoklonalen IL-10-Antikörper besteht. Die Platte wird dann erneut mit einer Folie abgeklebt und für eine Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur ruhen gelassen.

Im nächsten Schritt wird der viermalige Waschvorgang wie zuvor beschrieben wiederholt. Dann werden in jede Vertiefung 200µl Substratlösung pipettiert. Diese besteht auch hier aus Tetramethylbenzidin (TMB) und dem kurz zuvor hinzugefügten Wasserstoffperoxid. Die Lösung führt rasch zu dem erwarteten Farbumschlag in Richtung blau. Dieser ist am anschaulichsten in der Standardreihe zu beobachten; in den anderen Vertiefungen hat der Farbumschlag dagegen meist nur eine sehr schwache Ausprägung. Nun wird die Platte für 20min bei Raumtemperatur in Dunkelheit gestellt um den lichtempfindlichen Farbstoff zu schützen und keine verfälschten Farbumschläge zu provozieren. Nach Ablauf dieser Zeit werden je 50µl Stopplösung hinzugefügt, welche dazu dient die Farbreaktion zu beenden und den Farbumschlag nach Gelb herbeizuführen. Anschließend wird die Platte möglichst schnell (binnen einer Stunde) in das Spektralphotometer eingelegt. Dieses misst bei einer Wellenlänge von 450nm die optische Extinktion.

2.2.1.4 Interleukin-17A

2.2.1.4.1 Reagenzien

Das Elisa-Set stammt von der Firma Bender MedSystems® aus 1030 Wien/ Österreich (Catalog #BMS 2017) und beinhaltet folgende, für diesen Versuch notwendigen Bestandteile:

- mit Anti-h-IL-17A beschichtete Reaktionsgefäße auf einer Mikrotiterplatte
- Anti-h-IL-17A-Biotin Konjugat
- Streptavidin-Peroxidase (HRP)
- h-IL-17A-Standard
- Verdünnungslösung
- Assaypuffer-Konzentrat (20x)
- Tetramethylbenzidin-Substratlösung (TMB)
- Waschpufferkonzentrat (20x)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen

2.2.1.4.2 Reagenzienvorbereitung

Gepufferte Waschlösung

50ml des gelieferten Waschpufferkonzentrats (20x) werden mit 950ml destilliertem Wasser zu 1000ml Pufferlösung (1x) verdünnt und in einer Glasflasche aufbewahrt.

Assaypufferlösung

Für die Herstellung des Puffers werden 5ml des Pufferkonzentrats (20x) mit 95ml destilliertem Wasser zu 100ml Assaypufferlösung (1x) verdünnt.

Anti-h-IL-17A-Biotin-Konjugat

Um aus dem vorliegenden konzentrierten Biotin-Konjugat eine 1:100 Verdünnung zu erreichen, wird das Konzentrat, je nach Anzahl der benötigten Streifen auf der Platte, mit der Pufferlösung verdünnt. Da 11 Streifen benötigt werden, werden 60µl des Konzentrats mit 6 ml Puffer ergänzt.

Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung

Die Herstellung der Verdünnungslösung ist abhängig von der Anzahl der verwendeten Streifen. Im vorliegenden Fall handelt es sich um 11 Streifen mit jeweils acht Vertiefungen. Somit werden 60µl konzentrierte Streptavidin-Peroxidase mit 12ml des Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung vermengt.

Humanes-IL-17a-Standard

Hierfür wird der Standard in einer Standardverdünnungslösung zu 200pg/ml aufgelöst. Um Rückstände zu vermeiden wird die Lösung für 20 Minuten leicht geschüttelt. Anschließend wird die Verdünnungsreihe hergestellt: hierfür werden jeweils 225µl Verdünnungslösung in sieben Eppendorf-Hütchen gegeben. In den ersten werden dann 225µl des rekonstituierten Standards gegeben und auf einem Vortex-Gerät vermischt. Um die restlichen Konzentrationen in absteigender Reihenfolge zu erreichen, werden jeweils 225µl aus dem vorherigen Hütchen in das nächste gegeben und vermischt. Das letzte enthält lediglich die Verdünnungslösung, wodurch ein folgendes Konzentrationsgefälle entsteht: 100pg/ml, 50 pg/ml, 25pg/ml, 12,5pg/ml, 6,3pg/ml, 3,1pg/ml, 1,6pg/ml, 0pg/ml

Alle weiteren Reagenzien liegen gebrauchsfertig geliefert vor.

2.2.1.4.3 Durchführung

Ehe begonnen werden kann, müssen die Mikroküvetten einen zweimaligen Waschvorgang durchlaufen. Hierfür werden 400µl Waschpuffer in jede Vertiefung gegeben, nach einer Einwirkzeit von circa 15 Sekunden abgesaugt und die Platte ausgeklopft, um Rückstände des Puffers zu vermeiden. Anschließend wird die Standardverdünnungsreihe in den ersten Streifen pipettiert und in alle übrigen Mikroküvetten jeweils 50µl der Verdünnungslösung. Danach werden die restlichen Vertiefungen der Platte mit jeweils 100µl der Kontroll- und Fallproben befüllt. Um einen Nachweis zu ermöglichen werden sodann 50µl des Anti-h-IL-17A-Biotinkonjugats hinzugefügt. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wird die Platte abgeklebt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt ein viermaliger Waschvorgang, indem jeweils 400µl Waschpuffer zunächst hineinpipettiert und dann wieder abgesaugt bzw. herausgeklopft werden, bis keine Rückstände mehr vorhanden sind. Im folgenden Schritt werden in jede Vertiefung 100µl der Streptavidin-HRP-Verdünnungslösung gegeben. Die darin enthaltene Peroxidase dient als Markerenzym und ist ursächlich für die Farbreaktion. Die Platte wird erneut abgeklebt und bei Raumtemperatur für eine Stunde auf ein Schüttelgerät gespannt und bei 100 rpm fortwährend bewegt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgen erneut vier Waschvorgänge nach zuvor beschriebem Schema. Danach werden jeweils 100µl der TMB-Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert. Dieses Chromogen wird von der zuvor hinzugefügten Peroxidase aktiviert, so dass

sich nun eine blaue Färbung bildet. Da TMB lichtempfindlich ist, wird es bei Raumtemperatur und in Dunkelheit für 10 Minuten inkubiert. Um eine überschießende und damit unlesbare Farbreaktion zu vermeiden wird nach Ablauf der zehn Minuten eine Stopplösung hinzugefügt, welche die Peroxidase inaktiviert und somit die Farbreaktion unterbricht.

Innerhalb der darauf folgenden Stunde wird die optische Dichte von einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.2.1.5 TNF- α und MIP-1 β

2.2.1.5.1 Reagenzien

Das verwendete Elisa-Set stammt von der Firma R&D-Systems aus Minneapolis 55413/ USA (Catalog #DTA00C/ TNF α und #DMB00/ MIP-1 β) und beinhaltet folgende, gebrauchsfertige Bestandteile:

- mit Anti-TNF- α bzw. MIP-1 β beschichtete Reaktionsgefäße auf Mikrotiterplatten
- Anti-TNF- α - bzw. Anti-MIP-1 β -Konjugat
- TNF- α - bzw. MIP-1 β -Standard
- Calibrator-Diluent RD6-35 bzw. Calibrator-Diluent RD5K
- Gepuffertes Washlösungskonzentrat (25x)
- Color Reagent A (chromogenes Substrat aus Wasserstoffperoxid)
- Color Reagent B (chromogenes Substrat aus Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung
- Abdeckstreifen

2.2.1.5.2 Reagenzienvorbereitung

Waschpuffer

20ml des Pufferkonzentrats werden in 480 ml destilliertem Wasser aufgelöst, so dass sich 500ml Waschpufferlösung ergeben, die für beide ELISA-Sets verwendet wird.

Verdünnungslösung (Calibrator Diluent RD6-35, 1x)

10ml des Verdünnungskonzentrats werden mit 40ml destilliertem Wasser zu 50ml Verdünnungslösung aufgefüllt.

TNF- α -Standard

Der kristallographische Standard wird in einer Standardverdünnungslösung zu 10000pg/ml aufgelöst und hierfür 15 Minuten leicht geschüttelt. Um die Verdünnungsreihe zu erstellen, werden in das erste Eppendorfgefäß 1000 μ l und in alle weiteren 500 μ l der Verdünnungslösung pipettiert. Anschließend werden 100 μ l des Standards in das erste Gefäß gegeben und dieses auf dem Vortexgerät vermischt. Dann werden jeweils 500 μ l von einem Gefäß zum anderen übertragen, so dass sich die Konzentration stets halbiert. Letztlich entsteht folgende Standardverdünnungsreihe: 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15, 6pg/ml.

MIP-1 β -Standard

Hier wird der Standard mit 5 ml der Verdünnungslösung zu 2000pg/ml aufgelöst. Nach 15 Minuten werden 500 μ l der entstandenen Standardlösung 500 μ l der Verdünnungslösung hinzugefügt, wodurch die höchste Standardkonzentration von 1000pg/ml erreicht wird. Anschließend werden jeweils 500 μ l in das nächste Eppendorfgefäß übertragen und mit jeweils 500 μ l der Verdünnungslösung vermischt. So entsteht folgende Standardverdünnungsreihe: 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml.

Alle anderen Reagenzien liegen gebrauchsfertig geliefert vor.

2.2.1.5.3 Durchführung

Zu Beginn werden in jede Vertiefung jeweils 250 μ l (TNF- α) bzw. 150 μ l (MIP-1 β) der Fall- und der Kontrollgruppe hinzugefügt. In der ersten Spalte wird in aufsteigender Konzentration die Standardreihe angelegt, wobei die Konzentration von 0pg/ml erreicht wird, indem ausschließlich Verdünnungslösung (ohne Standard darin) verwendet wird. Auf die Verwendung des Inkubationspuffers wird bewusst verzichtet um eine zu starke Verdünnung zu vermeiden. Anschließend wird die Platte abgedeckt und zwei (TNF- α) bzw. eineinhalb (MIP-1 β) Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit binden die monoklonalen Antikörper, mit welchen die Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschichtet sind, an die TNF- α - bzw. MIP-1 β -

Moleküle. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgen vier (TNF- α) bzw. drei (MIP-1 β) Waschvorgänge. Dabei werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 400 μ l der Waschlösung gefüllt und diese nach etwa einer halben Minute wieder entleert und ausgeklopft. Auf diese Weise wird der nicht gebundene Antikörper herausgespült und Rückstände der Waschlösung werden entfernt.

Im folgenden Schritt werden in jede Vertiefung 200 μ l Anti-TNF- α - bzw. Anti-MIP-1 β -Konjugat pipettiert. Dieser polyklonale Antikörper ist an ein Enzym gebunden, welches später für die Farbreaktion verantwortlich ist. Die Stärke der Farbreaktion entspricht der Menge des gebundenen Moleküls. Zum Schutz wird die Platte wieder mit einer Folie abgeklebt und bei Raumtemperatur eine (TNF- α) bzw. eineinhalb (MIP-1 β) Stunden inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt ein erneuter vier- bzw. dreimaliger Waschvorgang. Dann werden jeweils 200 μ l der Substratlösung hinzugefügt. Diese besteht aus dem kurz zuvor vermischten TMB und dem Wasserstoffperoxid. Da diese Lösung lichtempfindlich ist, wird sie nun bei Dunkelheit 20 Minuten inkubiert. Um die Farbreaktion dann zu beenden werden 50 μ l Stopplösung hinzugefügt, wodurch ein Farbumschlag von blau zu gelb erfolgt. Innerhalb einer halben Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung wird die optische Dichte des Standards, der Fall- und der Kontrollgruppe bei einer Wellenlänge von 450 nm im Spektralphotometer gegen die Stopplösung gemessen.

2.3 Bakteriologischer Abstrich

Zur Feststellung des bakteriologischen Vaginalstatus (β -Streptokokken, Staphylokokken, Enterokokken, E.coli, Klebsiellen, Candida albicans, Chlamydien) werden mit einem sterilen Baumwoll-Wattestäbchen Abstriche aus dem oberen Scheidendrittel sowie der seitlichen Scheidenwnde entnommen. Hiermit sollen aerobe und anaerobe Bakterien nachgewiesen werden. Der Nachweis von Chlamydien erfolgt mittels Zervixabstrich. Für alle Abstriche wird ein standardisiertes Entnahmeset mit einem entsprechenden Abstrichbesteck von der Firma Sarstedt verwendet und anschließend an das Labor Amedes MVZ für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie GmbH (Praxis Dr. Bauer) bzw. an das Max-von-Pettenkofer-Institut, München (Frauenklinik Maistrasse) gesendet.

Der Materialupfer wird im jeweiligen Labor aus dem entsprechenden Transportmedium (Amiesmedium oder E-Swab) entnommen und unter Drehen nach dem Drei-sen-Ausstrich auf Blutagar, Kochblutagar, McConkey-Agar und CNA-Agar aufgetragen um eine Kultur anzulegen. Zusätzlich wird ein Grampräparat angefertigt. Für Pilze wird zusätzlich ein Sabouraud-Agar angelegt. Der Test auf Chlamydien wird mittels PCR-Verfahren bearbeitet. Die Kulturen werden anschließend unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen bei 36°C \pm 1°C für zwei Tage kultiviert. Eine erste Ablesung erfolgt nach 24h, dabei werden die gewachsenen Bakterien auf ihre Morphologie hin untersucht, mittels VITEK®-System (Amedes) bzw. MALDI-TOF-Verfahren (Pettenkofer-Institut) identifiziert und über das PHOENIX-System oder ggf. Agardiffusionsverfahren resistent.

2.4 Auswertung der Messergebnisse

Die hergestellten Standardverdünnungsreihen und die entsprechenden Konzentrationen der Verdünnungsstufen werden in der Auswertungssoftware „Revelation“ als Referenzwerte manuell eingegeben. Anhand der optischen Extinktion der Verdünnungsstufen und der optischen Dichte berechnet das Programm dann die Zytokinkonzentration in pg/ml und erstellt aus den gewonnenen Werten eine Kalibrierungskurve. ber die Messung des optischen Wertes („OD-Wert“) bei jeweils 450nm im Verhältnis zur Standardkurve ergab sich die genaue Zytokinkonzentration in pg/ml.

Beispiel für eine Standardkurve, erstellt von der Software „Revelation“ für das untersuchte Zytokin IL-23:

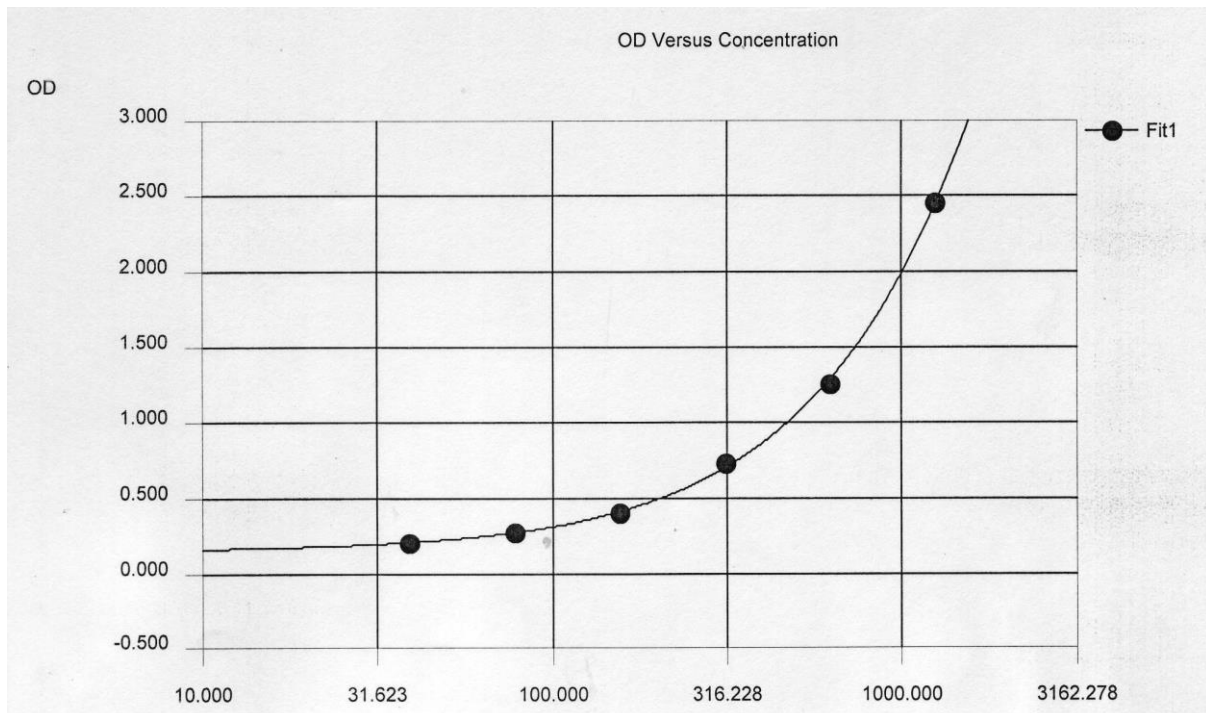


Abbildung 5: Beispiel für eine Standardkurve (hier von IL-23). Ordinate: optische Dichte, Abszisse: Konzentrationen der Standardlösung

2.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen der Zytokinkonzentration zwischen Patienten- und Kontrollgruppe wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 22.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Um die Normalverteilung zu überprüfen wurden die metrischen Variablen mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests getestet. Waren bei den Vergleichen der Stichproben nicht normalverteilte Stichproben, so wurden für diese nichtparametrische Verfahren (Mann-Whitney-U-Test) herangezogen. Bei mehr als zwei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis zur Berechnung des p-Wertes eingesetzt. Bei normalverteilten Stichproben (Alter der Patienten) wurde der t-Test verwendet. Die kategorisierten Daten dagegen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests, bzw. des exakten Tests nach Fisher ausgewertet. Für alle statistischen Tests gilt ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant.

Zur Veranschaulichung der Mediane und Quartilsabstände bei nicht normalverteilten Stichproben wurden Boxplots verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Gravidität und Parität

Zu den erhobenen Parametern zählte unter anderem auch die Anzahl der Schwangerschaften. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientinnen- und der Kontrollgruppe ($p < 0,001$): die Patientengruppe hatten anamnestisch im Durchschnitt mehr Schwangerschaften als die Kontrollgruppe.

Tabelle 5: Gravidität bei der Patientengruppe vs. der Kontrollgruppe

	Patientengruppe (n = 43)	Kontrollgruppe (n = 32)
Mittelwert	3,0	2,1
Standardabweichung	1,9	1,6
Median	3,0	2,0
Minimum	1	1
Maximum	13	9

Auch hinsichtlich der Parität zeigt sich ein signifikanter Unterschied von $p = 0,009$: die Patientengruppe hat durchschnittlich 0,6 Kinder mehr geboren, als die Kontrollgruppe.

Tabelle 6: Parität bei der Patientengruppe vs. der Kontrollgruppe

	Patientengruppe (n = 43)	Kontrollgruppe (n = 32)
Mittelwert	1,3	0,7
Standardabweichung	1,3	0,7
Median	1,0	1,0
Minimum	0	0
Maximum	8	2

3.2 Entbindungszeitpunkt

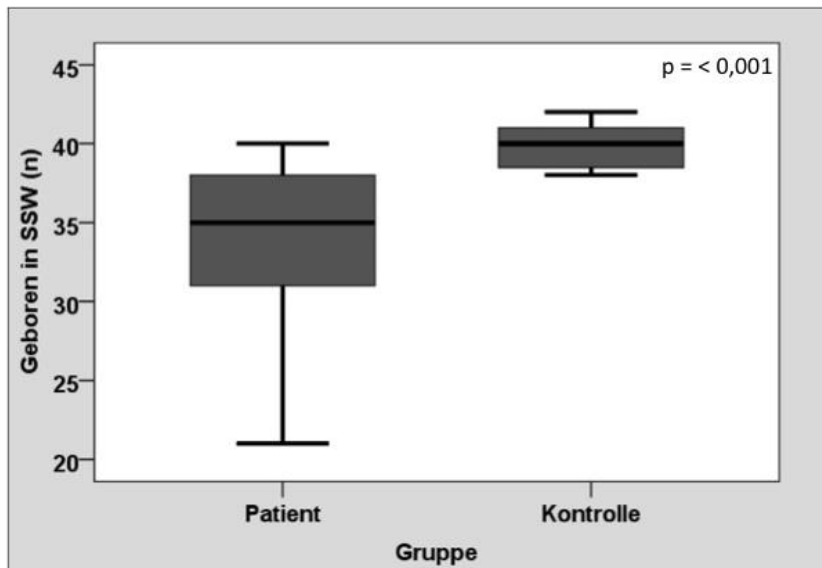


Abbildung 6: Boxplot zum Vergleich der Entbindungszeitpunkte von Fall- und Kontrollgruppe

Die Abbildung spiegelt den Geburtszeitpunkt der beiden Gruppen wieder. Bei der Patientengruppe fand sie im Mittel in der 33,8 (+4,7) SSW (Median 35,0) statt, während bei der Kontrollgruppe signifikant spätere Geburten erfolgten, nämlich in der 39,7 (+1,3) SSW (Median 40,0). Bezüglich dieses zeitlichen Unterschied von im Median 5 Wochen, ließ sich eine für diese Studie notwendige und charakteristische Signifikanz berechnen (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,001$).

3.3 Entbindungsmodus

Stellt man die Fall- und Kontrollgruppe hinsichtlich der Entbindungsart gegenüber, so zeigt sich, dass die Kontrollgruppe überwiegend spontan entbunden hat, wohingegen bei der Patientinnengruppe meist primäre Sectiones durchgeführt wurden. Die Gegenüberstellung ergibt eine statistische Signifikanz von $p = 0,005$.

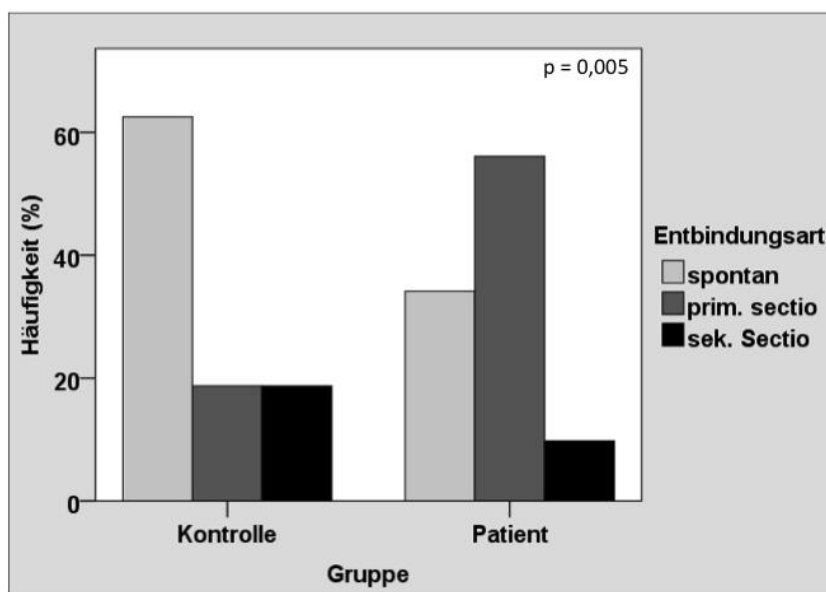


Abbildung 7: Entbindungsmodus von Fall- und Kontrollgruppe

3.4 Schwangerschaftsanamnese

Zu den untersuchten Parametern zählten auch Komplikationen (Frühgeburten, Aborte) in früheren Schwangerschaften. Dabei zeigte sich, dass diese in der Patientengruppe signifikant, nämlich 30% häufiger auftraten, als in der gesunden Vergleichsgruppe (p-Wert = 0,010).

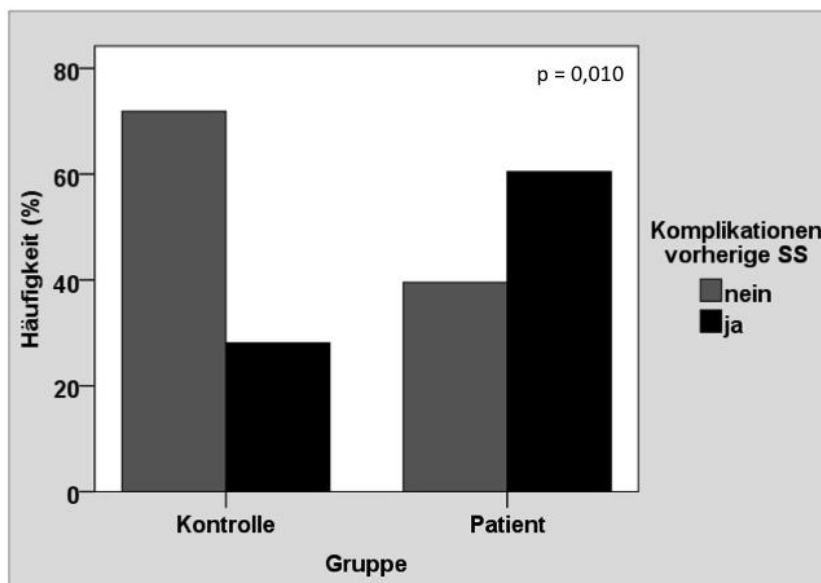


Abbildung 8: Boxplot zum Vergleich der Komplikationen in vorherigen Schwangerschaften bei der Kontroll- und bei der Fallgruppe

3.5 Entzündungsparameter

Hinsichtlich der Entzündungsparameter wurden bei beiden Gruppen sowohl die Leukozyten als auch der CRP-Wert untersucht. Die Blutentnahme erfolgte dabei zeitgleich zur Entnahme der Vaginallavagen. Es zeigte sich, dass bei den symptomatischen Patientinnen 65% erhöhte Leukozytenwerte (p-Wert <0,001) und 30,2% ein erhöhtes CRP (p-Wert <0,001) aufwiesen.

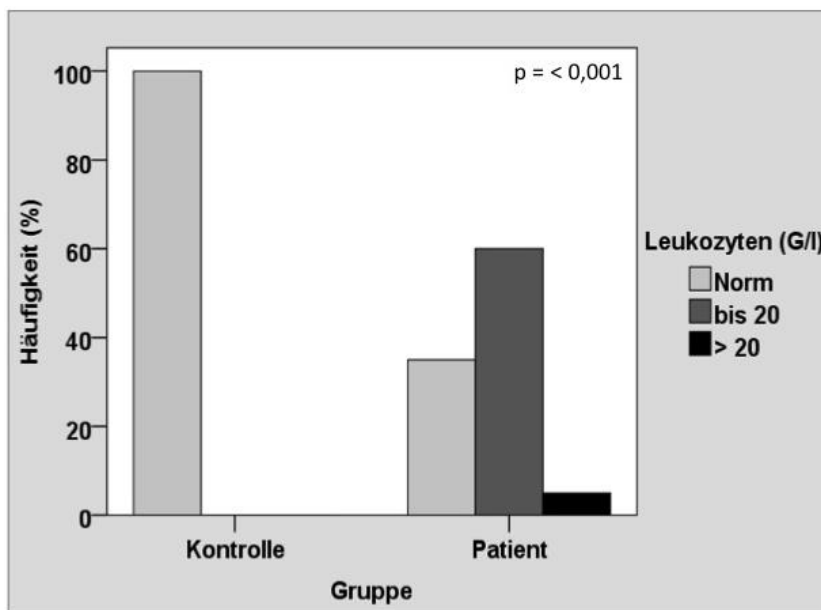


Abbildung 9: Boxplot zum Vergleich der Leukozytenwerte in der Fall- und Kontrollgruppe

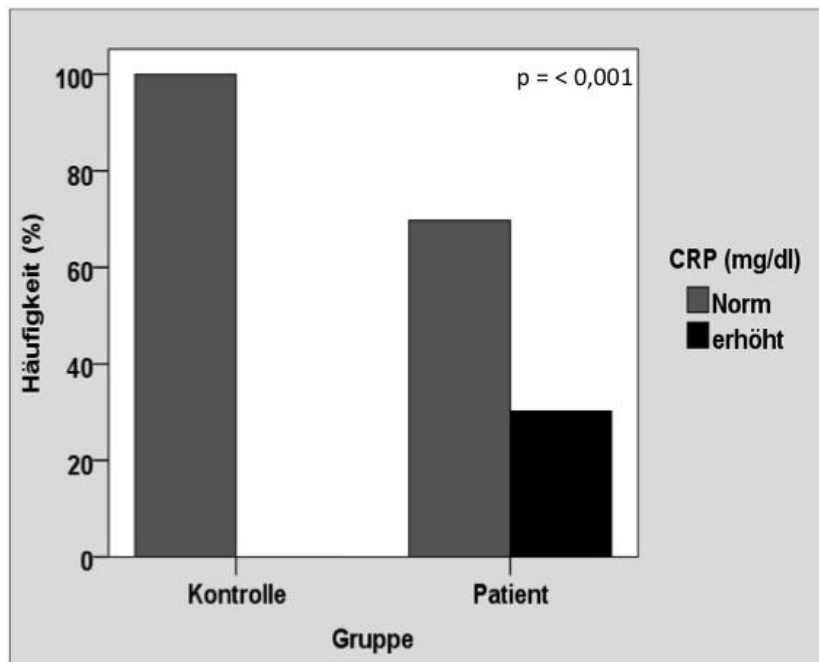


Abbildung 10: Boxplot zum Vergleich der CRP-Werte in der Fall- und Kontrollgruppe

3.6 Zytokinkonzentrationen

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der Zusammenhang zwischen einer drohenden Frühgeburt und der Expression von Zytokinen im Vaginalsekret der Frauen. Es wurde untersucht, ob bei Patientinnen mit Beschwerden, die auf vorzeitige Geburtsbestrebungen hinweisen, die Zytokine IL-23, IL-12, IL-10, IL-6, IL-17a, TNF- α und MIP-1 β vermehrt produziert werden. Ein Sonderposition beziehen hierbei das IL-10, welches ein protektives oder anti-inflammatorisches Zytokin ist, sowie IL-12, welches durch Mikroorganismen wie z.B. *Candida albicans* gehemmt werden kann (52). Die anderen Zytokine spielen bei allergischen und entzündlichen Prozessen eine wesentliche Rolle und werden mit Hilfe von T-Helferzellen als Reaktion auf eine Infektion in der Scheide lokal gebildet.

Die statistische Auswertung der Messergebnisse wurde wie bereits geschildert durchgeführt. Eine signifikante Konzentrationserhöhung ergab sich in der Patientengruppe im Falle von IL-6, IL-23 und TNF- α . Auch bei IL-10 und IL-12 ergab sich ein signifikanter Unterschied, wobei hier die Kontrollgruppe signifikant höhere Konzentrationen aufwies. Bei dem Wert von IL-17a ist ein grenzwertig signifikanter Unterschied bzw. ein „Trend“ erkennbar, welcher sich möglicherweise in einer größeren Studiengruppe bestätigen ließe (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der Zytokine IL-23, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17a, TNF- α und MIP-1 β im Vaginalsekret zwischen Patientinnen mit FG-Bestrebungen und der Kontrollgruppe mittels ELISA.

	Patientengruppe (n = 43) Median pg/ml	Kontrollgruppe (n = 32) Median pg/ml	p-Wert
Interleukin-23	12,6	10,0	<0,001
Interleukin-6	36,3	8,7	0,001
Interleukin-10	2,3	4,8	0,002
Interleukin-12	1,0	2,3	0,007
Interleukin-17a	0,1	0,1	0,080
TNF-α	34,0	36,6	0,463
MIP-1β	0,7	0,5	< 0,001

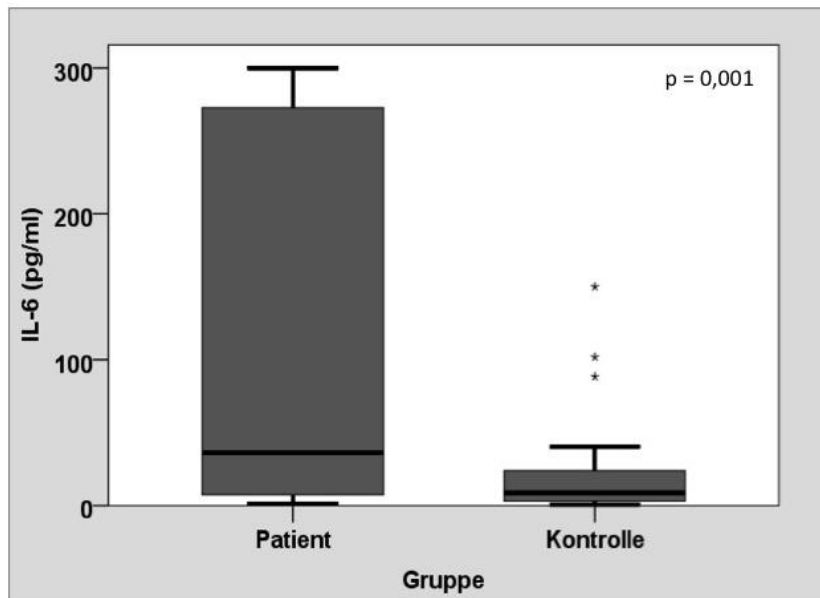


Abbildung 11: Boxplot zum Vergleich der IL-6-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe

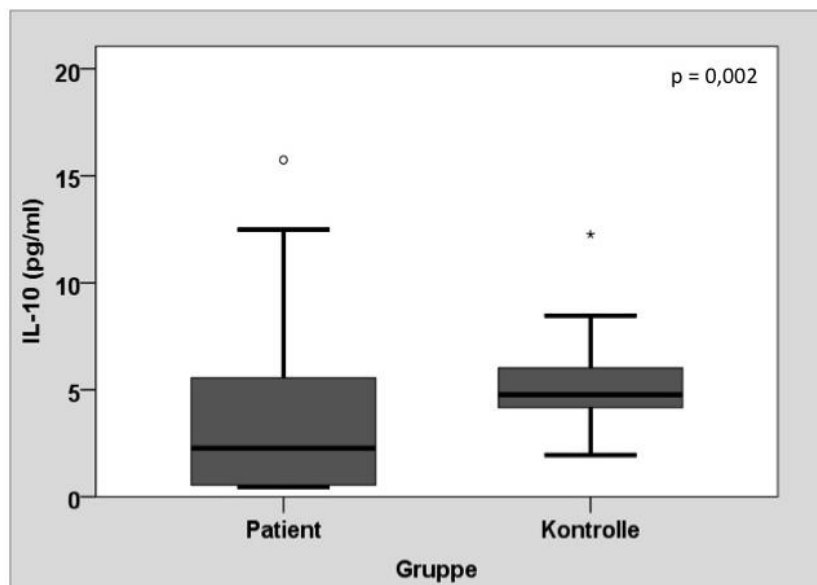


Abbildung 12: Boxplot zum Vergleich der IL-10-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe

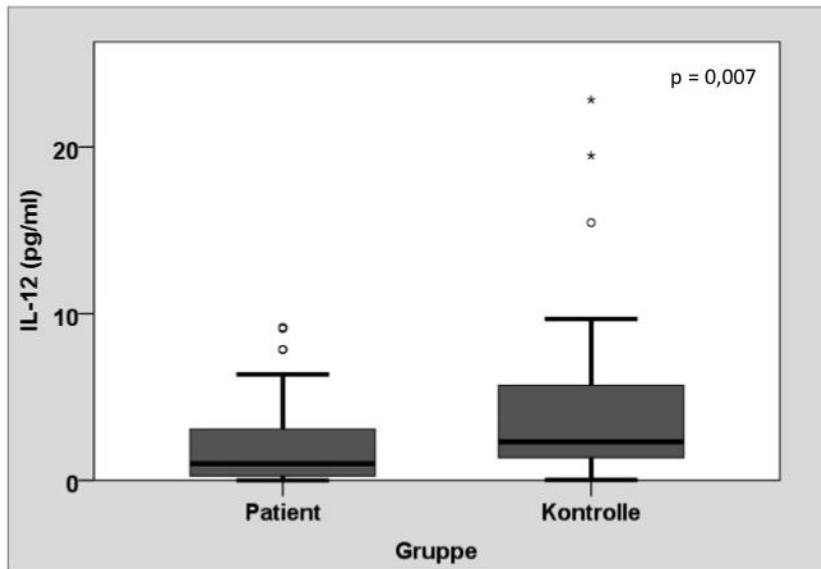


Abbildung 13: Boxplot zum Vergleich der IL-12-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe

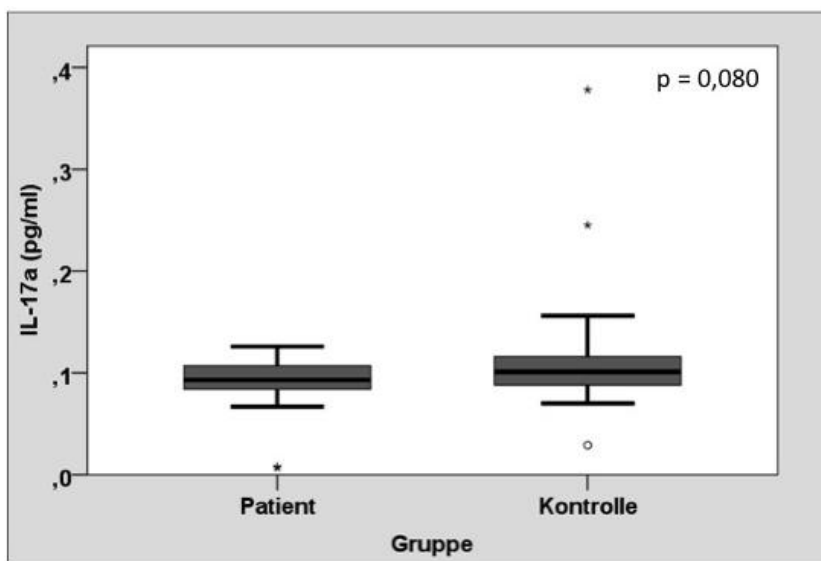


Abbildung 14: Boxplot zum Vergleich der IL-17a-Konzentraion in der Fall- und in der Kontrollgruppe

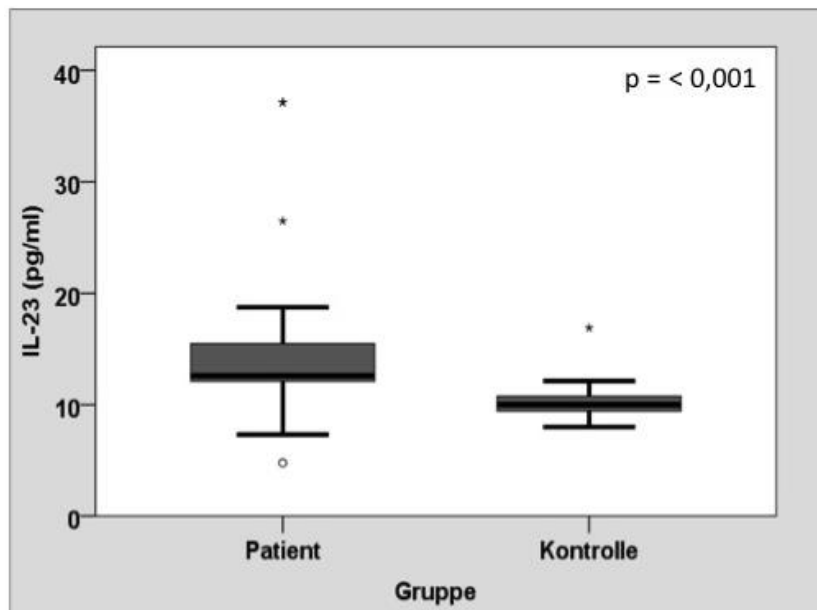


Abbildung 15: Boxplot zum Vergleich der IL-23-Konzentraion in der Fall- und in der Kontrollgruppe

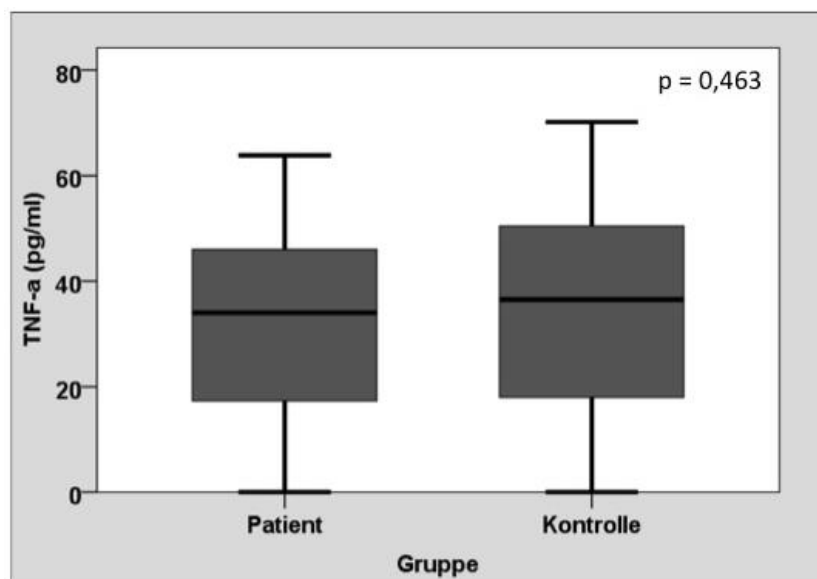


Abbildung 16: Boxplot zum Vergleich der TNF- α -Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe

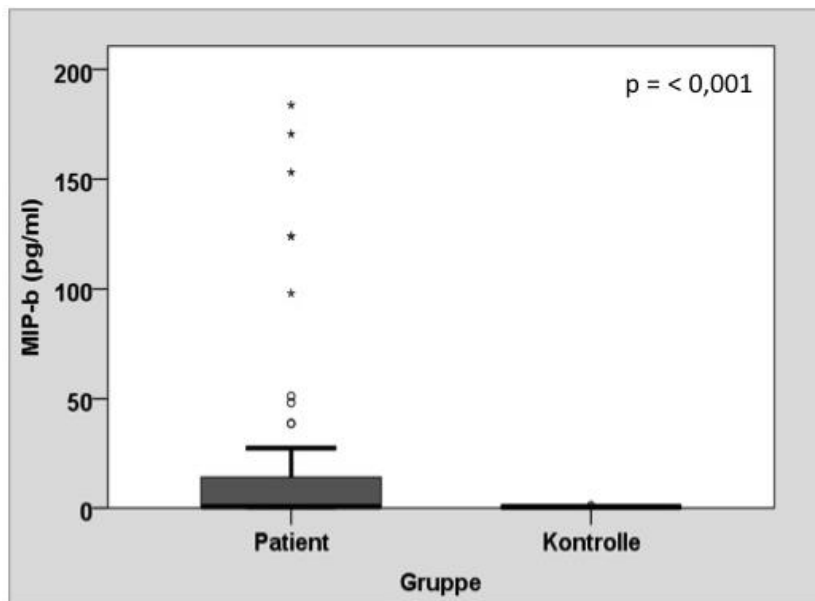


Abbildung 17: Boxplot zum Vergleich der MIP-1β-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe

3.6.1 ROC-Kurven

Die Bestimmung der ROC-Kurven (receiver operating characteristics) dient dazu, eine Aussage über den prädiktiven Wert der untersuchten Zytokine treffen zu können. Hierzu werden die Sensitivität (richtig Positive) an der Ordinate und die Spezifität (richtig Negative) an der Abszisse aufgetragen. Die Fläche unterhalb der ROC-Kurve („Area under the curve“/ AUC) ist Maß für den Vorhersagewert des entsprechenden Tests. Bei maximalem prädiktiven Wert liegt die AUC bei 1.

3.6.1.1 Interleukin-23

Die ROC-Analyse ergab für dieses Zytokin einen AUC-Wert von 0,740. Es zeigt sich also eine mäßige Diskriminierung zwischen richtig und falsch positivem Ergebnis.

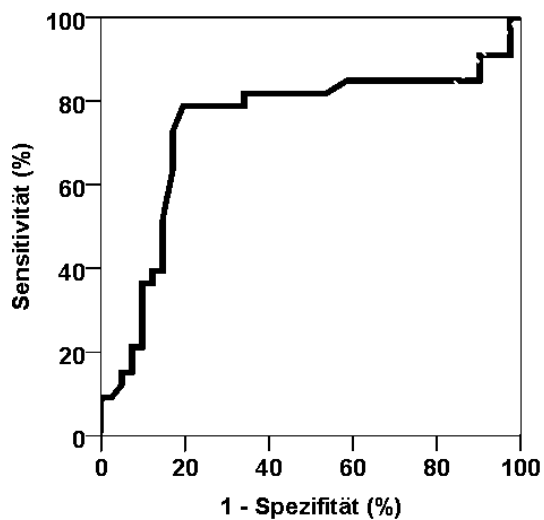


Abbildung 18: ROC-Kurve für Interleukin-23

3.6.1.2 Interleukin-17

Die ROC-Analyse für IL-17 ergab einen AUC-Wert von 0,591. Somit liegt keine Diskriminierung vor.

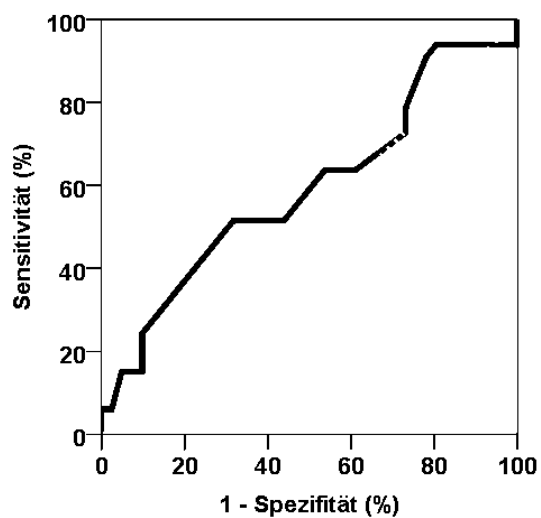


Abbildung 19: ROC-Kurve für Interleukin-17

3.6.1.3 Interleukin-12

Der AUC-Wert dieses Interleukins liegt bei 0,567. Es konnte keine Diskriminierung gezeigt werden.

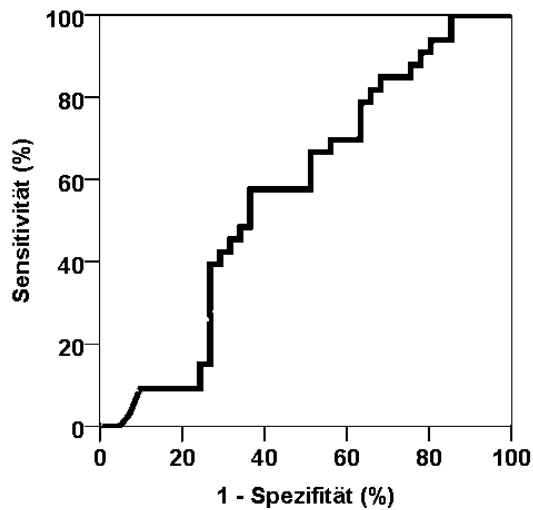


Abbildung 20: ROC-Kurve für Interleukin-12

3.6.1.4 Interleukin-10

Die ROC-Analyse von IL-10 ergab einen AUC-Wert von 0,698. Damit liegt eine mäßige Diskriminierung vor.

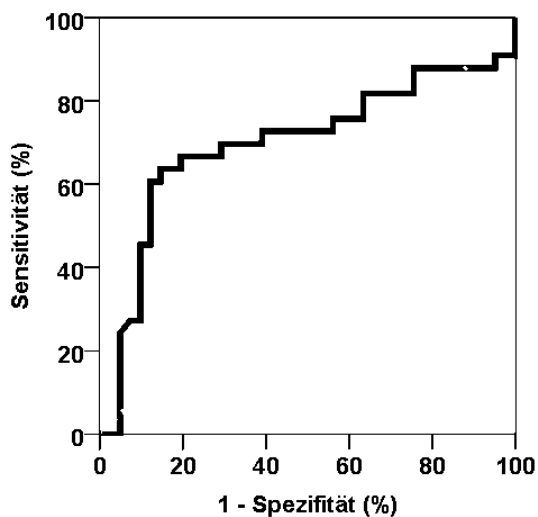


Abbildung 21: ROC-Kurve für Interleukin-10

3.6.1.5 Interleukin-6

Der AUC-Wert dieses Zytokins lag bei 0,729. Es kann also von einer mäßigen Diskriminierung gesprochen werden.

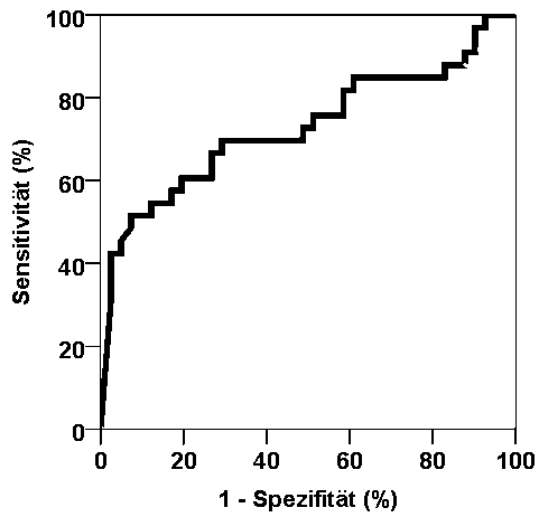


Abbildung 22: ROC-Kurve für Interleukin-6

3.6.1.6 TNF- α

Die ROC-Analyse zeigte hier einen AUC-Wert von 0,538. Es liegt keine Diskriminierung vor.

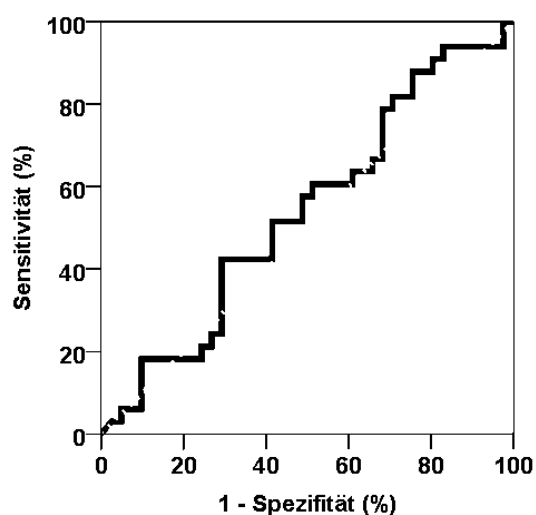


Abbildung 23: ROC-Kurve für TNF- α

3.6.1.7 MIP-1 β

Der AUC-Wert von MIP-1 β beträgt 0,632. Es liegt somit keine Diskriminierung vor.

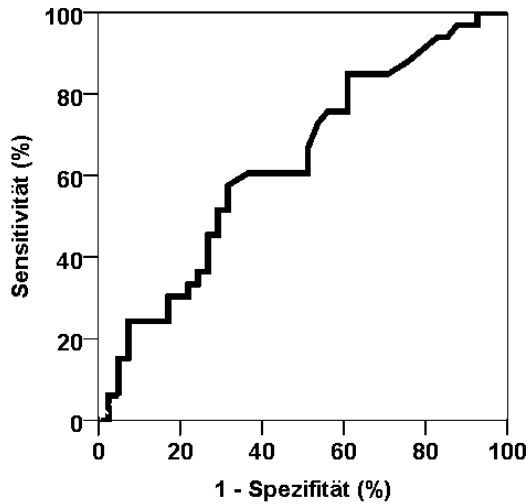


Abbildung 24: ROC-Kurve für MIP-1 β

3.6.2 Assoziation zwischen Zytokinen und Frühgeburtslichkeit

Die Daten zur stattgehabten Frühgeburt wurden retrospektiv aus den Akten entnommen. Es zeigt sich, dass bei den symptomatischen Patientinnen mit Frühgeburt (Patientinnengruppe) die Zytokine IL-6 und IL-23 zum Zeitpunkt der Entnahme gegenüber jenen ohne Frühgeburt (Kontrollgruppe) deutlich erhöht waren. Bei IL-12, IL-17a, MIP-1 β und TNF- α trat hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf. IL-10 war bei der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Tabelle 8: Medianwerte der Konzentrationen von IL-23, IL-17a, IL-12, IL-10, IL-6, MIP-1 β und TNF- α bei Patientinnen mit und ohne Frühgeburt

	Fallgruppe (n = 41) Median	Kontrollgruppe (n = 32) Median	p-Wert
Interleukin-23	12,6	10,1	<0,001
Interleukin-17a	0,1	0,1	0,181
Interleukin-12	1,3	1,9	0,328
Interleukin-10	2,2	4,7	0,004
Interleukin-6	94,1	9,6	0,001
MIP-1β	0,7	0,6	0,052
TNF-α	34,0	36,0	0,579

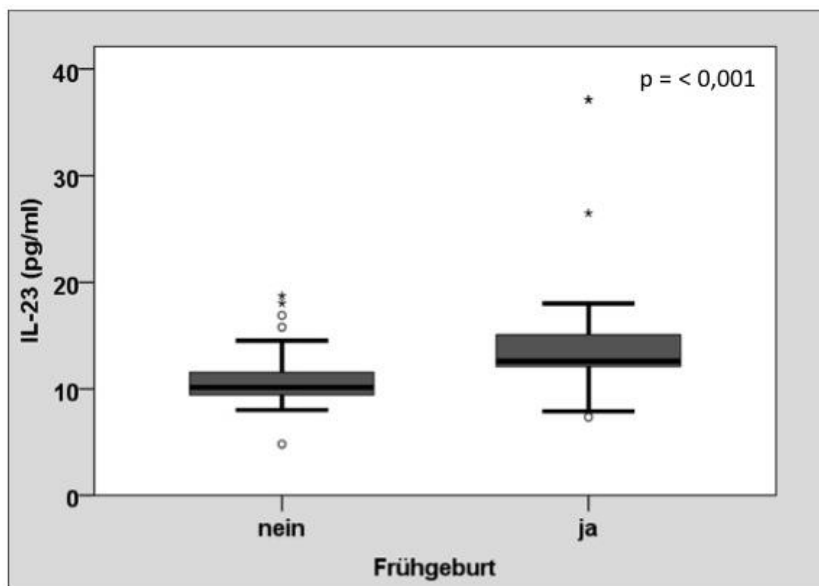


Abbildung 25: Boxplot zum Vergleich der IL-23-Konzentration in der Fall- und der Kontrollgruppe

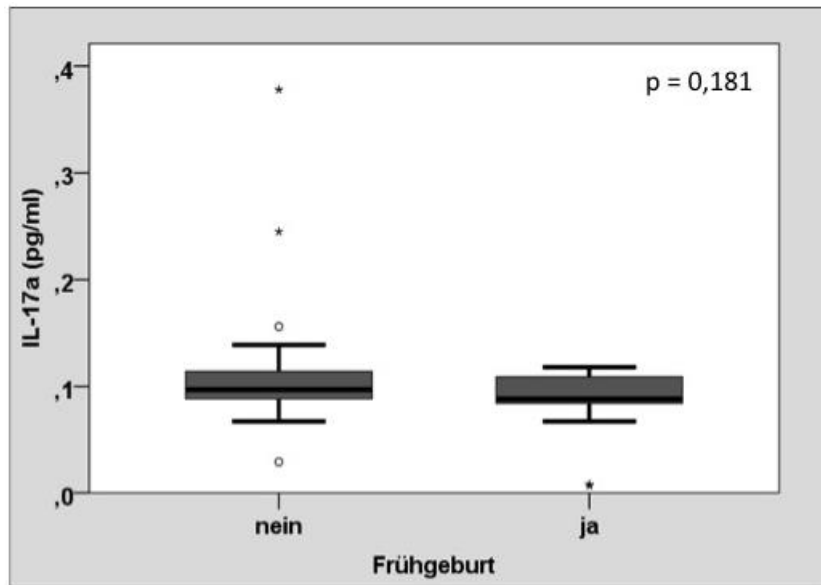


Abbildung 26: Boxplot zum Vergleich der IL-17a-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe

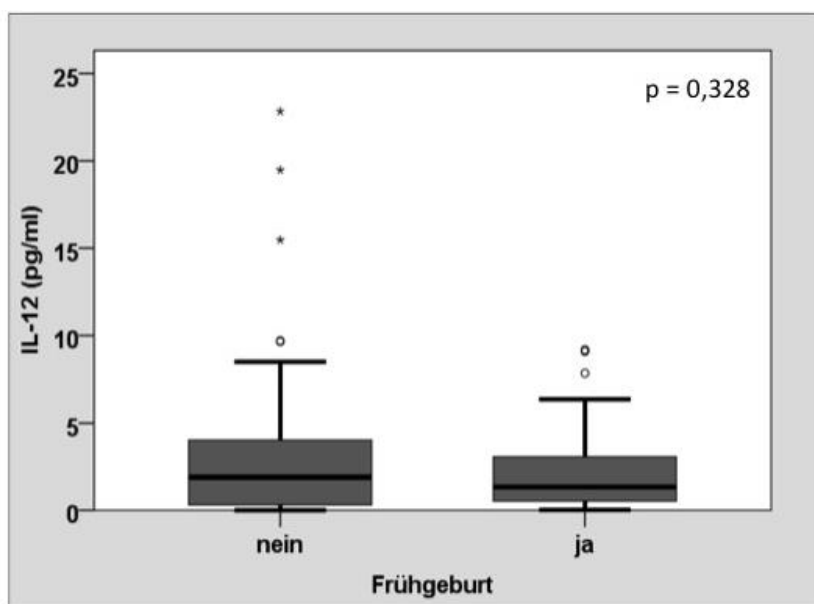


Abbildung 27: Boxplot zum Vergleich der IL-12-Konzentration in der Fall- und der Kontrollgruppe

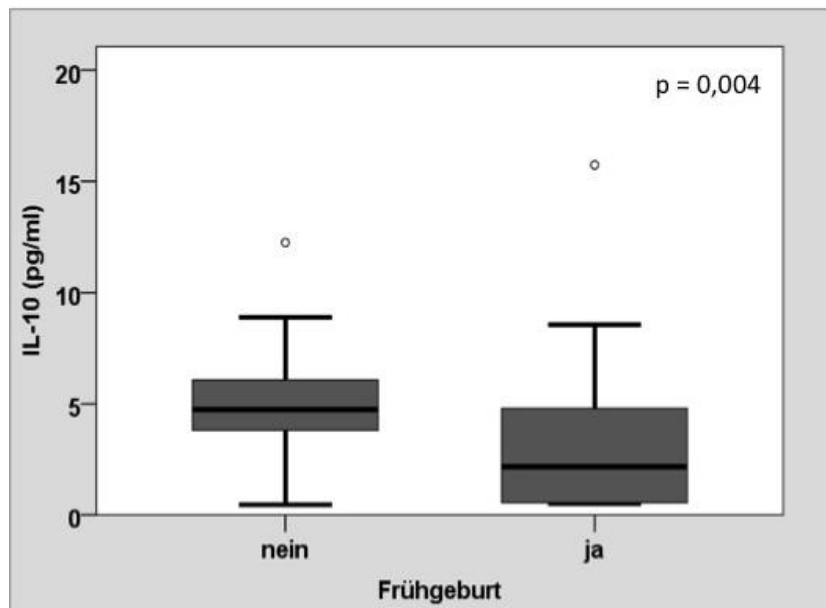


Abbildung 28: Boxplot zum Vergleich der IL-10-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe

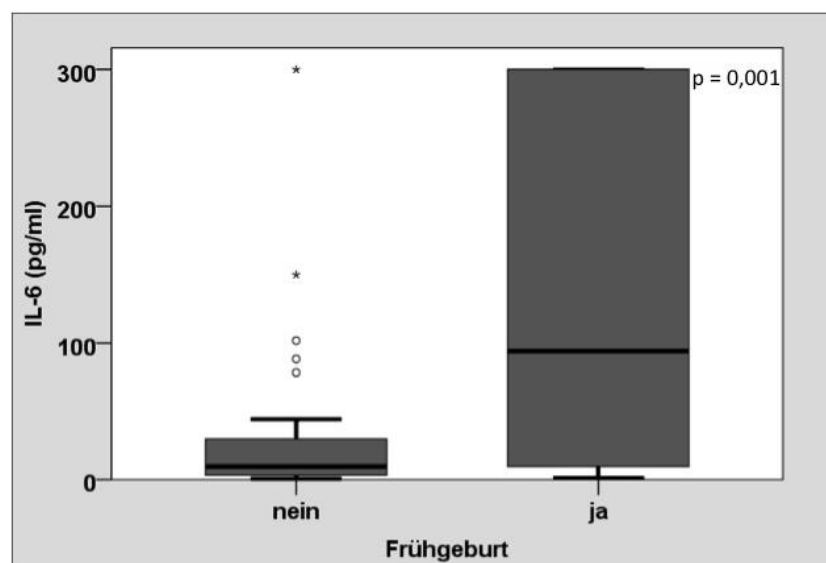
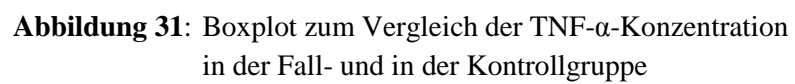
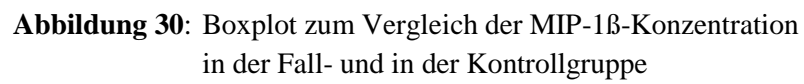


Abbildung 29: Boxplot zum Vergleich der IL-6-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe



3.7 Fruchtblasenprolaps

Um die Bedeutung des Fruchtblasenprolapses für die Frühgeburt zu beurteilen wurde das Kollektiv in zwei Gruppen unterteilt: jene mit und jene ohne Frühgeburt. Im Vergleich ergab sich ein hoch signifikantes Ergebnis ($p = 0,002$). Von jenen Patientinnen mit Frühgeburt hatten über die Hälfte, nämlich 54,5% eine Frühgeburt ohne Fruchtblasenprolaps; bei 33,3% prolabierte die Fruchtblase bis zum äußeren MM und bei 12,1% bis in die Scheide ($p=0.002$).

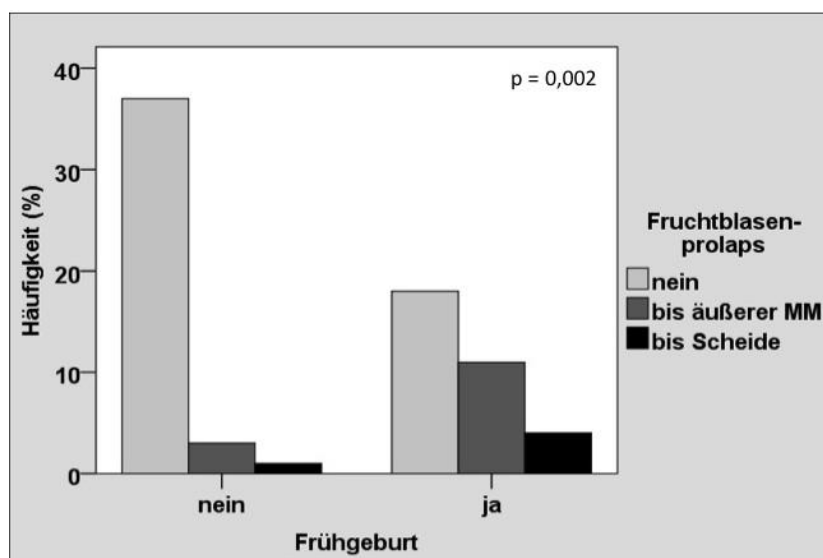


Abbildung 32: Balkendiagramm zum Vergleich der Häufigkeit des Vorkommens von Fruchtblasenprolaps bei Patientinnen mit vs. ohne Frühgeburt

3.8 Assoziation zwischen Muttermundsbefunden und einer Schwangerschaftsverlängerung

Der Muttermundsbefund wurde palpatorisch durch klinische Untersuchung mittels Bishop-Score (Beurteilung Portiollänge/ - konsistenz/ -lage, MM-Weite, Höhenstand vorangehendes Teil) ermittelt sowie sonographisch ausgemessen und in cm angegeben. Im Vergleich der SS-Verlängerung und der Muttermundweite ergab sich ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,001$): jene Patientinnen mit einer SS-Verlängerung < 14 Wochen ($n = 36$) wiesen bei Vorstellung einen wesentlich weiteren Muttermund (Median 2,0) auf als solche, deren Schwangerschaft noch über 15 Wochen andauerte (Median 0,0; $n = 35$).

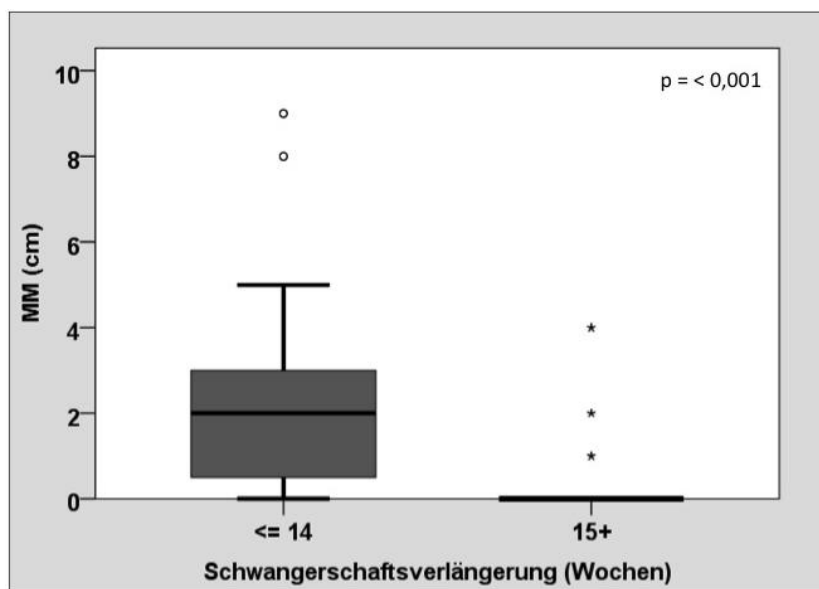


Abbildung 33: Boxplot zum Vergleich der Muttermundweite bei Schwangerschaftsverlängerung ≤ 14 vs. ≥ 15 Wochen

Tabelle 9: Muttermundweite bei Schwangerschaftsverlängerung ≤ 14 vs. ≥ 15 Wochen

	SS-Verlängerung ≤ 14 SSW MM (cm)	SS-Verlängerung ≥ 15 SSW MM (cm)
Mittelwert	2,4	0,4
Minimum	0	0
Maximum	9	4

3.9 Bakteriologie

Hinsichtlich der Mikrobiologie wurden die Patienten auf β -Streptokokken, koagulase-negative Staphylokokken, Enterokokken, E. coli, Klebsiellen und Chlamydien und Candida albicans mittels eines bakteriellen Abstrichs untersucht. Es hat sich gezeigt, dass bei der Gruppe mit anschließender Frühgeburt fast zehn Mal so häufig Streptokokken auftraten, wie bei der Gruppe ohne FG (21,2% vs. 2,3%). Das Ergebnis erwies sich also als hoch signifikant ($p = 0,019$).

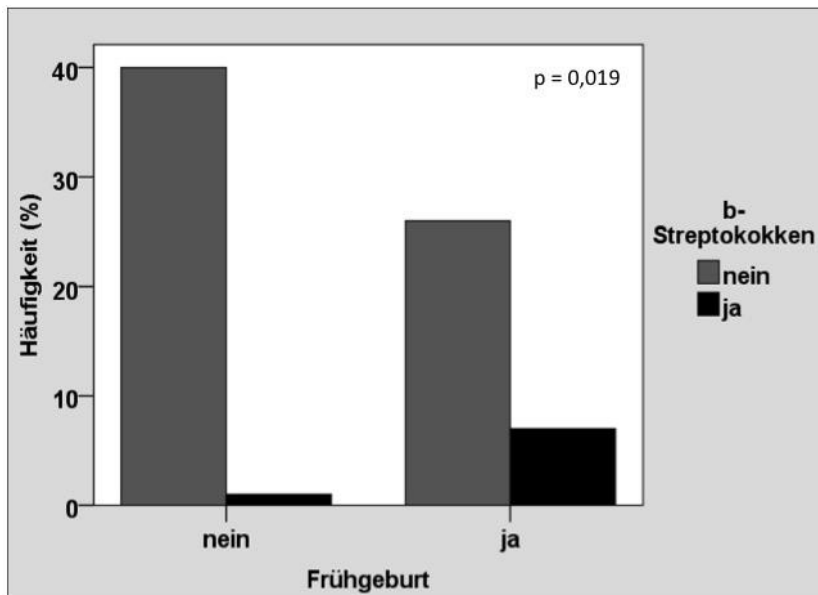


Abbildung 34: Balkendiagramm zur Häufigkeit des Auftretens von β -Streptokokken bei Patientinnen mit vs. Ohne Frühgeburt

Auch bei dem Auftreten von Enterokokken zeigte sich eine klare Signifikanz ($p = 0,009$).

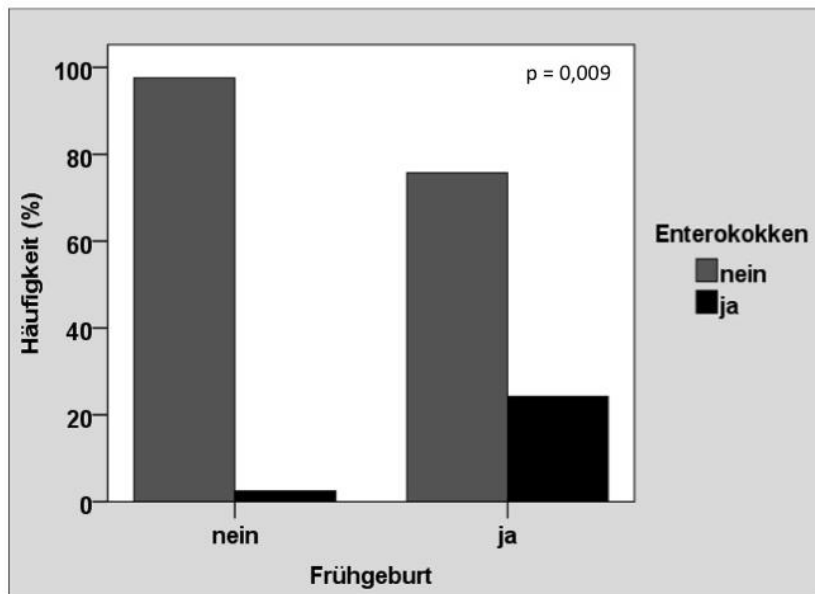


Abbildung 35: Balkendiagramm zur Häufigkeit des Auftretens von Enterokokken bei Patientinnen mit vs. ohne Frühgeburt

Bei den koagulase-negativen Staphylokokken, E.coli- Bakterien, Klebsiellen und Chlamydien sowie bei Candida albicans ergaben sich in unserer Studiengruppe dagegen keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 10: p-Werte nach Durchführung des Fisher-Tests für verschiedene Bakterien

	p-Wert
B-Streptokokken	0,019
Koag.neg. Staphylokokken	1,0
Enterokokken	0,009
E.coli	0,126
Klebsiellen	0,084
Chlamydien	0,446
Candida albicans	0,385

4 Diskussion

4.1 Zytokinexpression bei Frühgebärenden

Seit den 1990er Jahren haben zahlreiche Studien die Funktion der Zytokine im Rahmen der Frühgeburtlichkeit und auch hinsichtlich ihres prädiktiven Wertes für eine solche untersucht (53–60). In unserer Studie wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-23, IL-17a, IL-12, IL-10, IL-6, TNF- α und MIP-1 β mittels Vaginallavage ermittelt. Ziel war es zu untersuchen, ob in unserem Patientenkollektiv den genannten Zytokinen eine diagnostische und/ oder prädiktive Funktion zugesprochen werden kann und ob darüber hinaus noch über die anderen untersuchten Parameter wie Mikrobiologie, Muttermundsweite und Parität eine Aussage hinsichtlich eines erhöhten Frühgeburtsrisikos zu treffen ist.

Zu den am besten untersuchten Zytokinen hinsichtlich einer Frühgeburt gehört das Interleukin-6. Goepfert et al. untersuchten knapp 3000 asymptomatische Frauen, von welchen 125 Frauen eine Frühgeburt (FG) erlitten (61). Diese wiesen allesamt ein im Vergleich zu den zeitgerecht stattgehabten Geburten deutlich erhöhtes IL-6 (212 ± 339 pg/ml) im Zervikalsekret auf. Außerdem fanden sie, dass mit den erhöhten IL-6-Konzentrationen ein erhöhtes fetales Fibronectin assoziiert war. Pathophysiologisch wird angenommen, dass es durch eine Infektion der Amnionhöhle oder Dezidua zu einem Riss in der extrazellulären Matrix kommt, so dass fetales Fibronectin austreten und folglich im Zervikovaginalsekret der Mutter detektiert werden kann.

Auch Charles J. Lockwood et al. untersuchten, inwiefern ein erhöhtes Interleukin-6 mit einer FG assoziiert ist (62). Hierfür analysierte seine Arbeitsgruppe das Vaginalsekret von 161 Frauen in vierwöchigen Abständen zwischen der 24. und 36. SSW. Dabei kam er zu dem Ergebnis, dass Frauen mit FG ein vielfach erhöhtes IL-6 im zervikovaginalen Sekret aufweisen. Dies ist auch mit unseren Ergebnissen vereinbar, die zeigten, dass Frauen mit Frühgeburtlichkeit ein bis zu zehnfach erhöhtes IL-6 aufwiesen (Median: 9,6pg/ml vs. 94,1pg/ml). Allerdings liegen diese Werte noch deutlich unter jenen, die Lockwood beobachtete: er zeigte, dass ein Wert von >205 pg/ml mit einer Spezifität von 85,0% und einer Sensitivität von 50,0% mit einer Frühgeburt assoziiert ist.

Die Arbeitsgruppe um González-Bosquet et al. untersuchte in einer prospektiven Studie ebenfalls die Bedeutung von IL-6 als prädiktiven Marker einer Frühgeburt (63). Die Fallgruppe

umfasste dabei 200 Patientinnen und somit ein Vielfaches unserer Studiengruppe. Auch hier wurde festgestellt, dass Schwangere mit frühzeitigen Geburtsbestrebungen ein deutlich erhöhtes IL-6 aufweisen. Allerdings reichte die Sensitivität und Spezifität hier nicht aus, um eine prädiktive Aussage zu gestatten. Eine Ergänzung hierzu lieferten Taylor et al. Sie konnten zeigen, dass die zusätzliche Bestimmung von IL-1 β , IL-6, TNF- α oder des Granulozyten-Kolonie-Stimulierende Faktors (G-CSF) die Spezifität des IL-6 hinsichtlich einer spontanen FG steigert (64).

Auch Lange et al. konnten in ihrer Studie deutliche erhöhte IL-6-Konzentrationen bei Frauen mit drohender Frühgeburt nachweisen (65). Hier lag der Median bei 104pg/ml in der Fallgruppe und war damit gegenüber der Kontrollgruppe (Median = 8,5pg/ml) signifikant erhöht. Zudem integrierte diese Studie auch eine histologische Untersuchung der Plazenta, wobei vier von neun Fällen mit einem IL-6-Spiegel >20pg/ml das Vollbild einer Chorioamnionitis zeigten. Eine Schwäche dieser Studie ist allerdings die vergleichsweise geringe Zahl an Studienteilnehmern, so dass diese Ergebnisse in größeren Populationen noch zu bestätigen wären.

Rizzo et al. konnten des weiteren zeigen, dass eine Korrelation zwischen der zervikovaginalen IL-6-Konzentration und einer intraamniotischen Infektion vorliegt, so dass sie schlussfolgerten, dass IL-6 auch als diagnostischer Marker für eine bakterielle Infektion der Amnionhöhle bei Frauen mit Wehentätigkeit aber intakter Fruchtblase dienen könnte (66).

Betrachtet man unsere und andere der zahlreichen Studien zu diesem Thema, so lässt sich schlussfolgern, dass ein im 2. Trimenon im zervicovaginalen Sekret gemessenes erhöhtes IL-6 mit dem Eintreten einer Frühgeburt assoziiert ist.

Ein weiteres Zytokin, welches in unserer Studie untersucht wurde, ist das Interleukin 10. Dieses spielt eine wesentliche Rolle im Rahmen der Schwangerschaftserhaltung. Es entfaltet seine anti-inflammatorische Wirkung hauptsächlich durch Hemmung pro-inflammatorischer Zytokine. Diese Regulation und vor allem Suppression des mütterlichen Immunsystem ist für das Überleben des allogenetischen Feten im Uterus von entscheidender Bedeutung, da es sonst durch eine überschießende Immunantwort zu einer Abstoßung kommen kann (46). Dabei ist zu betonen, dass auch bei der termingerechten Geburt ein deutlicher Abfall von IL-10 zu beobachten ist (67). Die Entnahme der Proben für unsere Studie fand jedoch in der durchschnittlich 24. (Patienten) bzw. 23. (Kontrolle) SSW statt, so dass hier physiologischerweise (noch) hohe IL-10-Konzentrationen zu erwarten sind. Ein Mangel an IL-10 führt dazu, dass

die Hemmung der pro-inflammatorischen Immunantwort entfällt, wodurch eine Frühgeburt begünstigt wird.

Diesem Pathomechanismus entsprechend, haben auch wir in unserer Studie bei den Patientinnen mit späterer Frühgeburt eine signifikant verminderte IL-10-Konzentration (Median = 2,2 pg/ml) gefunden. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien, die zeigen konnten, dass verminderte IL-10-Konzentrationen über das pro-inflammatorische Zytokinnetzwerk zu einer gesteigerten Cyclooxygenase-2-Synthese sowie zu einer vermehrten Prostaglandin-E₂-Produktion im plazentaren Gewebe führen und so die Wehen einleiten (68,69). Hanna et al. postulierten, dass im zweiten Trimester die IL-10-Konzentration im plazentaren Gewebe besonders hoch sei und konnten dabei Werte von bis zu 600pg/ml nachweisen (67). Die von uns gefundenen Werte innerhalb der Kontrollgruppe liegen weit darunter, wurden jedoch auch im Vaginalsekret bestimmt und nicht direkt im histologischen Präparat.

Kongruent zu den erhöhten IL-10-Konzentrationen in der Kontrollgruppe wären verminderte TNF- α -Werte zu erwarten, was sich in unserer Studie allerdings nicht bestätigte. Bei der Fallgruppe wäre im Sinne einer pro-inflammatorischen Immunreaktion z.B. auf eine Entzündung eine hohe Konzentration von TNF- α zu erwarten. Die Werte lagen in unserer Studie im Median bei 36,0 pg/ml bei den Patientinnen ohne Frühgeburt und 34,0pg/ml bei Patientinnen mit Frühgeburt. Somit liegt kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,579$). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Taylor et al., die in ihrer POUCH-Studie (The Pregnancy Outcomes and Community Health) nach verschiedenen Zytokinen im Vaginalsekret von 1115 schwangere Frauen zwischen der 16. Und 27.SSW suchten (64). 335 von ihnen erlitten im Verlauf der über sechs Jahre laufenden Studie einen FG. Bei diesen fanden sich signifikant erhöhte Werte an IL-6 und IL-1 β . TNF- α dagegen war nur in knapp 50% der Fälle erhöht, jedoch – wie auch in unserer Studie - ohne statistische Signifikanz zu erlangen. Weitere Studien, die TNF- α in Assoziation zur FG im Vaginalsekret untersuchten gibt es wenige. Allerdings finden sich zahlreiche Untersuchungen über die Konzentration dieses Zytokins im Fruchtwasser, sowie im mütterlichen Blut. Laham et al. verglichen eben diese beiden Werte bei Schwangeren mit und ohne FG (70). Sie konnten feststellen, dass sich die TNF- α -Konzentrationen im mütterlichen Blut im Verlauf der Schwangerschaft nicht veränderten, wohingegen sie im Fruchtwasser (FW) kontinuierlich stiegen. Dies lässt vermuten, dass die Zytokinbestimmung im FW hinsichtlich der Prädiktion einer Frühgeburt geeigneter, jedoch auch risikoreicher ist. Der Unterschied Plasma vs. FW kann dadurch erklärt werden, dass TNF- α im Fruchtwasser selbst als Reaktion auf eine Entzündung, z.B. bei Chorioamnionitis, aber auch während der Wehen gebildet wird.

Anders als die genannte und anders als unsere Studie, konnte die Arbeitsgruppe um Holst et al. zeigen, dass eine erhöhte TNF- α -Konzentration im zervikovaginalen Sekret eine hochsignifikante Assoziation mit einer Frühgeburt innerhalb von sieben Tagen hat (71). Allerdings wird betont, dass die Aussagekraft dieses Zytokins allein begrenzt ist, verglichen mit einer kombinierten Betrachtung von verschiedenen Markern.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass TNF- α allein nicht als ausreichender Marker für eine Frühgeburt fungieren kann. Über den Einsatz im Rahmen eines multivariablen Modells sind noch weitere Untersuchungen nötig.

Zusätzlich zu den bereits besprochenen Zytokinen, untersuchten wir auch die Expression von IL-12, welches im Zusammenhang mit einer Frühgeburt zu den weniger erforschten Interleukinen zählt. Dies mag daran liegen, dass dieses Zytokin im v.a. bakteriellen Infektionsverlauf sehr früh in Erscheinung tritt und dann eher eine vermittelnde Funktion hat, indem es durch Induktion von IFN- γ die T_h1-Immunantwort anstößt. Die Rolle von IL-12 als proinflammatorisches Zytokin wird allerdings zunehmend herabgewertet (72). In unserer Studie konnte kein signifikanter Unterschied in der IL-12-Konzentration zwischen den Frauen mit und jenen ohne Frühgeburt festgestellt werden. Auch Holst et al. konnten keinen signifikanten Unterschiede in der IL-12-Konzentration im Vaginalsekret der beiden Gruppen feststellen (71). Ebenso haben Cift et al. in ihrer Studie von 2013 weder im Plasma noch im Fruchtwasser von Risikopatientinnen ein erhöhtes IL-12 festgestellt (73). Es kann also davon ausgegangen werden, dass IL-12 hinsichtlich einer drohenden FG keine hohe Aussagekraft besitzt.

Zunehmend in den Fokus zahlreicher Studien zum Thema Frühgeburtslichkeit rückt das auch von uns untersuchte IL-17. In vitro stimuliert IL-17 Fibroblasten, regt epitheliale und endotheliale Zellen zur Produktion von Zytokinen an und aktiviert die Matrix-Metalloprotease-9 sowie Prostaglandin E₂ (74,75). Durch diese Stoffe wird die Uteruskontraktilität sowie die Zervixreifung stimuliert und so die Frühgeburt wahrscheinlicher. Hee et al. haben allerdings gezeigt, dass der IL-17-Serumspiegel bei Risikofrauen bzw. solchen mit Anzeichen einer drohenden FG signifikant niedriger ist, als bei gesunden oder nur gering risikobehafteten Schwangeren (76). Selbst bei Chorioamnionitis war der Serum-IL-17-Spiegel nur leicht erhöht. Allerdings war er auch bei termingerechten Geburten erniedrigt, so dass eine prädiktive Aussage nur für Hochrisiko-Patientinnen gelten kann.

In unserer Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p = 0,181$). Insgesamt waren die Werte im zervikovaginalen Sekret

sehr gering (Spannweite 0,1 – 5,3pg/ml), im Median 0,1 pg/ml für beide Gruppen. Da Zytokine nicht plazentagängig sind, können die Werte von Serum und Vaginallavage nicht miteinander verglichen werden (77). Es kann aber festgehalten werden, dass laut unseren Ergebnissen und denen von Hee et al. weder im Serum noch im zervikovaginalen Sekret bei Frauen mit Frühgeburtlichkeit eine erhöhte IL-17-Konzentration zu erwarten ist. Anders verhält es sich dagegen bei Frauen mit Chorioamnionitis: Ito et al. untersuchten die IL-17-Konzentration im Fruchtwasser symptomatischer Frauen zwischen der 22. Und 34. SSW und konnten feststellen, dass diese stark erhöht waren (78). Allerdings trifft dies nur auf Frauen mit fortgeschrittener Chorioamnionitis zu. Bei FG ohne Chorioamnionitis wurden nur sehr geringe Werte von IL-17 gefunden (Median 1,3pg/ml). In der Zusammenschau entspricht diese geringe Konzentration des Zytokins im Fruchtwasser den von uns im zervikovaginalen Sekret sehr gering gemessenen Werten.

Das noch relativ neu entdeckte IL-23 gehört zu den in unserem Zusammenhang bisher wenig untersuchten Zytokinen. Es ist Teil der IL-12-Familie und ist für die Produktion von IL-17 und TNF- γ durch CD4⁺-Zellen zuständig (75). In unsere Studie konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe feststellen. Jene Patientinnen mit FG wiesen einen höheren IL-23-Spiegel (Median 12,6pg/ml) im zervikovaginalen Sekret auf, als solche ohne (Median 10,1pg/ml). Diverse Studien haben zudem festgestellt, dass es eine Divergenz im Zusammenspiel von IL-12 und IL-23 gibt: während IL-23 die Entzündungsreaktion beschleunigt, wirkt IL-12 dem entgegen und reguliert, ähnlich wie IL-10 die Immunantwort herab, um eine überschießende Reaktion zu vermeiden. (72,79). Uz et al. untersuchten die Expression von IL-23 in der Dezidua im ersten Trimenon (80). Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration von IL-23 mit Werten zwischen 150 und 200pg/ml. Sie vermuten, dass nicht nur mütterliche, sondern auch plazentare Zellen IL-23 produzieren und so die Immunreaktion während der Frühschwangerschaft anregen. Daten zu späteren Zeitpunkten liegen allerdings nicht vor, jedoch scheint dieses Zytokin im Immungeschehen um die Schwangerschaft und Infektionen eine noch weiter zu untersuchende Rolle zu spielen.

Weiterhin untersuchten wir in unserer Studie auch das MIP-1 β . Dieses Zytokin stimuliert die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α . Dem entsprechend würden wir also bei den hohen IL-6-Konzentrationen in der Fallgruppe auch hohe MIP-1 β -Werte erwarten. Dies hat sich allerdings nicht bestätigt. Mit einer grenzwertigen Signifikanz von $p = 0,052$ lässt sich höchstens von einem Trend sprechen, der in einer größeren Population noch zu bestätigen wäre. In beiden Gruppen zeigten die Werte eine sehr hohe Streuung von 0,395 – 183,673pg/ml (Median

0,5pg/ml) bei der Gruppe ohne FG und 0,446 – 170,520pg/ml (Median 0,6pg/ml) in der Gruppe mit FG. Holst et al. konnten dies nicht bestätigen (71). Sie entdeckten in ihrer sehr breit angelegten Studie, die 27 Proteine sowohl im Fruchtwasser als auch im zervikovaginalen Sekret untersuchte, dass bei Frauen mit Frühgeburt binnen sieben Tagen nach Probenentnahme u.a. auch MIP-1 α und MIP-1 β im zervikovaginalen Sekret signifikant erhöht waren. Auch hier gilt jedoch, dass die Aussagekraft durch die Kombination mit anderen Faktoren (verkürzte Zervix, MIP-1 β im Fruchtwasser sowie im zervikovaginalen Sekret, MCP-1 im zervikovaginalen Sekret) deutlich höher ist, als wenn das Zytokin isoliert betrachtet wird.

4.2 Infektparameter und Bakteriologie

(Aszendierende) Infektionen gelten als Hauptrisikofaktor für die Frühgeburtlichkeit (13,15). Als Reaktion auf die Infektion, bildet das Immunsystem Entzündungsmediatoren in Form von Zytokinen. Diese führen, wie bereits geschildert, über die Freisetzung von Prostaglandinen und Metalloproteasen zur Zervixreifung, erhöhter Uteruskontraktilität und zum Blasensprung. Problematisch in der Detektion solcher Infektionen ist, dass sie häufig von den Patientinnen kaum bemerkt werden, so dass auch eine mögliche Therapie in den meisten Fällen ausbleibt oder mit großer Verzögerung zum Infektionsgeschehen initiiert wird (81).

Unsere Studie konnte zeigen, dass bei Patientinnen mit Symptomen einer Frühgeburt sowohl die Leukozyten als auch das CRP im Blut erhöht waren (CRP >1,0 mg/dl) und sich so ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab. Dennoch war das CRP nur bei weniger als der Hälfte der symptomatischen Patientinnen erhöht (30,2%), die Leukozyten bei etwas mehr als der Hälfte (65%); dies nährt die Annahme, dass die Entzündungsparameter im mütterlichen Blut keine geeigneten Parameter sind und doch sehr unspezifisch bezüglich der Diagnostik im Rahmen der Frühgeburtlichkeit. Dies wurde auch von Yoon et al. und anderen Arbeitsgruppen so bestätigt (82). Die Arbeitsgruppe von Yoon et al. untersuchte 102 Frauen, entnahm sowohl Blutproben als auch Fruchtwasser und untersuchte beides auf CRP und Leukozyten. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Messung im FW wesentlich sensibler war als jene im Blut. Dies erklären sie dadurch, dass die Infektion zunächst in der Amnionhöhle stattfindet und dementsprechend dort auch die Zytokine gebildet werden. Erst in einem etwas weiter fortgeschrittenen Stadium erreicht die Entzündungsreaktion auch das mütterliche Blut, woraufhin zunächst die Leukozytenzahl zunimmt und erst verzögert das in der Leber gebildete C-reaktive Protein (83,84).

Dies entspricht auch den Ergebnissen von Cohen et al., die zeigen konnten, dass zwischen dem CRP-Wert und der Dauer der Schwangerschaft keine verlässliche Aussage getroffen werden kann (85). Allerdings beobachteten sie, dass das CRP bei gesunden Schwangeren im ersten Trimester auf >2 mg/l steigt, wohingegen es z.B. im Rahmen eines frühen Aborts zu einer vergleichsweise niedrigen Konzentration im Blut kommt. Der Anstieg des CRPs zu Beginn der SS lässt sich durch die pro-inflammatorische Immunreaktion des mütterlichen Organismus zurückführen. Im weiteren Verlauf scheint er dann eher mit einem Infektionsgeschehen assoziiert zu sein und für einen pathologischen Vorgang zu sprechen.

In der Zusammenschau der genannten und weiterer Studien (86,87), ergibt sich der Schluss, dass die Leukozytenbestimmung der Bestimmung des CRP-Werts, wie auch unsere Studie zeigt, überlegen ist. Andererseits unterliegen die Leukozytenspiegel physiologischen Schwankungen in der Schwangerschaft und werden vor allem durch medikamentöse Therapie, wie z.B. der Lungenreifebehandlung mit Cortison beeinflusst. So ist bekannt, dass die Leukozytenzahl nach Cortisongabe ansteigt und somit nicht mehr aussagekräftig genug ist. Da es aber auch andere, nicht mit der Amnionhöhle assoziierte Infektionen im mütterlichen Organismus geben kann, sollte die Bestimmung im Fruchtwasser und nicht im Blut stattfinden. (82).

In unserer Studie fanden sich außerdem bei der Fallgruppe gehäuft B-Streptokokken (20,2% d.F.) und Enterokokken (24,2%) im bakteriellen Abstrich. Dies entspricht den Ergebnissen einer großen Studie von Feikin et al mit 2846 Frauen (88). Davon fanden sich bei 14,3% der Frauen mit anschließender Frühgeburt B-Streptokokken, wobei eine positive Assoziation bei Frauen mit FG in der Anamnese nachgewiesen werden konnte. Dem entsprechend konnte eine negative Korrelation zwischen Nullipara und der Besiedlung durch B-Streptokokken gezeigt werden, so dass hier zwischen Erst- und Mehrfachgebärenden unterschieden werden muss. Außerdem scheint eine Besiedelung bis zur ≤ 24 .SSW keinen Einfluss auf eine mögliche FG zu haben. Danach allerdings steigt das Risiko eine Frühgeburt zu erleiden bei Streptokokken-positiven Frauen um das dreifache an.

Die Assoziation zwischen B-Streptokokken im Vaginalabstrich und einer FG konnte auch durch Regan et al. nachgewiesen werden (89). Sie zeigten zudem, dass eine Besiedelung mit Streptokokken im Laufe der Schwangerschaft auch wieder verschwinden kann: 1/3 der Frauen mit positivem Abstrich im 2. Trimenon, waren zum Zeitpunkt der Geburt negativ. Umgekehrt hatten 5-15% zum Entbindungszeitpunkt eine Infektion die zuvor nicht nachgewiesen werden konnte. Es zeigt sich also, dass der Nachweis von B-Streptokokken kein verlässlicher Prädik-

tor für eine Frühgeburt ist. Und so fanden auch Gomez et al. bei 401 Patientinnen mit vorzeitiger Wehentätigkeit nur eine 7%-ige Prävalenz von Bakterien im Fruchtwasser (90).

Unsere Studie untersuchte auch die Rolle anderer Bakterien wie Staphylokokken, *E. coli* – Bakterien, Klebsiellen, Chlamydien und *Candida albicans*. Hier konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe nachweisen. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen von Carroll et al. (91). Sie untersuchten 97 Frauen mit PROM und fanden keinen spezifischen prädiktiven Wert für die genannten Bakterien. Bei 7% fanden sie z.B. *E.coli*-Bakterien gegenüber 18% in unserem Kollektiv. Diese finden sich allerdings auch im Vaginalabstrich von gesunden Schwangeren, so dass hier keine Signifikanz besteht. Ähnlich verhält es sich mit *Candida albicans*, der in unserer Studie bei 2,3% der Patientinnen mit FG gefunden wurde und bei 8% bei den symptomatischen Frauen in der Studie der Arbeitsgruppe Carroll et al. Als bisher gesichert galt dagegen die Rolle der bakteriellen Vaginose (BV) für das Eintreten einer Frühgeburt. Dabei werden vor allem *Gardnella vaginalis* und *Mycoplasma hominis* als pathogenetische Ursache genannt, da sie die gesunde, von Lactobazillen oder Döderlein-Bakterien dominierte Vaginalflora zerstören (15,29,87,92,93). In den letzten Jahren allerdings, haben einige Studien der Assoziation zwischen BV und FG bzw. zwischen BV und Zervixlänge widersprochen (92,94), so dass die bakterielle Vaginose als alleiniger Risikofaktor für eine Frühgeburt weiter untersucht werden muss.

4.3 Muttermundsbefunde und Fruchtblasenprolaps

In unserer Studie wurde auch die Weite des Muttermundes (MM) erfasst und in Relation zum weiteren Verlauf der SS gestellt. Dabei konnten wir erwartungsgemäß zeigen, dass sich die Schwangerschaftsdauer bei zunehmender Muttermundseröffnung verkürzt: ist der $MM \geq 2\text{cm}$, so scheint eine Entbindung binnen ≤ 14 SSW wahrscheinlich. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen von Guinn et al. (95). In ihrer Fallstudie mit 950 Frauen stellten sie den engen Zusammenhang zwischen Entbindungszeitpunkt, Muttermundsweite und Gestationsalter (GA) dar: mit fortgeschrittener MM-Eröffnung stieg auch die Anzahl der Frauen, die binnen 48 Stunden und 14 Tagen (trotz tokolytischer Therapie) entbunden haben. Auch sie stellten den Schwellenwert von 2cm fest: für Patientinnen mit $\leq 2\text{cm}$ konnte unabhängig vom GA kein erhöhtes Risiko festgestellt werden binnen der nächsten 2 Wochen zu entbinden. Bei einem $MM \geq 2\text{cm}$, besonders in der ≤ 25 . SSW stieg die Wahrscheinlichkeit einer vorzeitigen Entbindung deutlich an. Ab der ≥ 25 . SSW korrelierte die Wahrscheinlichkeit einer vorzeitigen Geburt mit der Muttermundsweite, aber nicht mit dem Gestationsalter.

Diese strenge Korrelation zwischen der Weite des Muttermunds und einer Frühgeburt hinterfragt die Studie von Jain et al. (96). Sie untersuchten Frauen zwischen der 32. und 36+6. SSW mit regelmäßiger Wehentätigkeit und einer MM-Weite $\geq 3\text{cm}$. Trotz dieser gemeinhin als Frühgeburts-Parameter geltenden Werte fand die Arbeitsgruppe heraus, dass die Entbindung bei 68% der Patientinnen (ohne tokolytischer Therapie) für mindestens eine Woche ausblieb. Jain et al. schließen daraus, dass die Parameter „Wehentätigkeit/ Muttermundsweite“ als Indikator einer Frühgeburt hinterfragt werden müssen. Allerdings gilt es hier kritisch zu bemerken, dass eine Schwangerschafts-Verlängerung um eine Woche in der Studie von Jain et al. in den aller meisten Fällen noch immer zu einer mäßig frühen oder frühen Geburt führen dürfte, so dass diese Ergebnisse, verglichen mit einer Studienpopulation von Frauen in einer früheren Schwangerschaftswoche nicht befriedigend sind. Pathophysiologisch scheint ein dilatierter Muttermund die Integrität der Zervix empfindlich zu stören und so den Weg zu einer Frühgeburt zu bahnen. Der Grenzwert kann nach Zusammenschau diverser Studien bei $\geq 2\text{cm}$ festgelegt werden.

Je weiter besonders der innere MM dilatiert, desto wahrscheinlicher erfolgt ein Fruchtblasenprolaps (FBP), desto wahrscheinlicher eine Frühgeburt (97). Dies spiegelte sich auch in unserer Studie wieder, bei der 45,5% einen FBP und folglich eine Frühgeburt erlitten. Auf der anderen Seite haben 54,5% der Patientinnen zu früh entbunden, ohne einen FBP aufzuweisen, so dass dieser für eine Frühgeburt nicht obligat ist. Iams et al. unterscheiden diesbezüglich eine *kompetente* von einer *inkompetenten* Zervix (98). Eine Frühgeburt aufgrund einer (schmerzlosen) passiven Dilatation des MM charakterisiert die inkompetente Zervix, wohingegen bei Infektionen, PROM, Blutungen und vorzeitige Wehen die Zervix als kompetent gilt. Patientinnen mit inkompetenter Zervix haben ein 20-29% erhöhtes Risiko eine FG zu erleiden (99). Benham et al. untersuchten in ihrer Studie 37 Patientinnen mit einer Dilatation des inneren Muttermunds, bis in den Zervikalkanal prolabierte Eihäuten und einer verkürzten Zervix hinsichtlich der Frühgeburtslichkeit (97). 51% dieser Frauen haben trotz Therapieversuchen mittels Cerclage oder Tokolyse vor der 34.SSW entbunden. Eine direkte Korrelation zwischen den einzelnen Risikofaktoren (Dilatation innerer Muttermund/ Fruchtblasenprolaps/ Zervixverkürzung) und einer Frühgeburt konnte allerdings nicht festgestellt werden. Knapp die Hälfte schaffte es trotz Zervixdilatation bis zum termingerechten Geburtszeitpunkt. Festgestellt wurde zudem, dass die Anwesenheit eines Fruchtblasenprolaps' indirekt mit der Länge der Zervix korreliert: je weiter der Prolaps in den Zervikalkanal ragt, desto stärker verkürzt sich die Zervix. Aufgrund dieser Beobachtung plädieren Benham et al. für eine umfassende Berücksichtigung aller drei Faktoren, um eine prädiktive Aussage hinsichtlich einer

Frühgeburt treffen zu können. Dem entgegen zeigen Hartmann et al. eine direkte Korrelation zwischen der Dilatation des inneren Muttermunds und dem Gestationsalter bei Geburt (99). Sie stellten fest, dass eine MM-Dilatation $\geq 1\text{cm}$ mit einer Sensitivität von 8%, einer Spezifität von 99% und einem positiven prädiktiven Wert von 38% auf eine Frühgeburt hinweisen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein Risikofaktor allein noch keine zuverlässige Aussage hinsichtlich einer Frühgeburt zulässt. Selbst ein Fruchtblasenprolaps über den äußeren Muttermund hinaus hat nicht zwingend eine Frühgeburt zur Folge. Daher wurden in den letzten Jahren immer wieder Entwürfe für eine Punkteskala gemacht, die mehrere Aspekte berücksichtigt und zur Entscheidung über einen Therapieeinsatz (Cerclage) helfen soll. Eine der aktuellsten Vorschläge hierzu kommt von Fuchs et al. aus Frankreich (84). Die Skala beinhaltet die geburtshilfliche Anamnese (s.u.), die Zervixdilatation, den Fruchtblasenprolaps und Infektionen. Mit Hilfe dieses Punktesystems lassen sich Hochrisikopatientinnen identifizieren, beobachten und ggf. eine entsprechende Therapie einleiten.

4.4 Mütterliche Anamnese

In unserer Studie berücksichtigten wir sowohl die Anzahl der vorangegangenen Schwangerschaften und Geburten, als auch die Komplikationen in vorherigen Schwangerschaften. Dabei zeigte sich, dass die Patientinnen der Fallgruppe im Schnitt eine Schwangerschaft mehr sowie eine höhere Parität aufwiesen als die Kontrollgruppe. Die Parität allein scheint dabei kein ausreichender Risikofaktor für eine Frühgeburt zu sein, wie Cnattingius et al. postulieren (100). Vielmehr ist er ein Kofaktor, dessen Rolle durch andere Risiken, wie z.B. durch Rauchen relevant wird. So war die Rate an Frühgeburten bei Mehrgebärenden mit Nikotinabusus signifikant höher als bei rauchenden Erstgebärenden. Der Risikofaktor „Höheres Alter der Mutter“ dagegen, wirkte sich laut dieser Arbeitsgruppe bei Erstgebärenden signifikant stärker aus, als bei Mehrgebärenden. Dem widerspricht Bobrowski et al., der vor einer Unterschätzung älterer Mehrgebärenden warnt (101). Laut seinen Ergebnissen hatte diese Patientengruppe ein dreifach erhöhtes Risiko für Schwangerschaftskomplikationen (v.a. Präeklampsie) und eine dadurch induzierte frühzeitige Geburt. Auch Mercer et al. konnten im Rahmen der „Pre-term Prediction Study“ zeigen, dass beim Vorliegen mindestens eines weiteren Risikofaktors (verkürzte Zervix, fetales Fibronektin, positive Anamnese) Frühgeburten deutlich häufiger bei Mehrgebärenden auftreten (102). Eine Studie von Bai et al. aus dem Jahr 2002 wiederum zeigte, dass Mütter mit gar keiner oder mit mehrfachen Geburten (>4 Geburten) ein höheres Risiko haben als einfache Mehrgebärende (1-3 Geburten) (103). Betrachtet man noch weitere

Studien, so finden sich immer wieder gegensätzliche Ergebnisse bzgl. der Multiparität und dem damit einhergehenden Schwangerschaftsrisiko. Unsere Studie lässt keine Aussage bzgl. des Alters zu, da es im Median in beiden Gruppen nahezu gleich ist (32,16 vs. 32,25 Jahre). Jedoch bleibt ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl Gravität und Parität bestehen.

Unsere Studie zeigte auch, dass die Fallgruppe fast 30 mal häufiger Komplikationen in den vorausgegangenen Schwangerschaft hatte, als die Kontrollgruppe. Dies entspricht der gemeinhin geltenden Annahme, dass eine geburtshilflich auffällige Anamnese ein erhöhtes Risiko für erneute Komplikationen (Aborte, Frühgeburt) darstellt (10,13,93). Für Frauen, die bereits eine Frühgeburt in der Anamnese haben, verdoppelt sich das Risiko für eine erneute Frühgeburt (61). Bloom et al. fanden in ihrer Langzeitstudie heraus, dass besonders dann ein hohes Wiederholungsrisiko besteht, wenn die Frühgeburt vor der 35.SSW stattfand (104). Bei einer solchen Frühgeburt in der Anamnese beträgt das Wiederholungsrisiko 16%. Wenn bereits zwei frühe Geburten (< 35.SSW) erlebt wurden, so beträgt die Wahrscheinlichkeit einer erneuten frühen Geburt sogar 41%. Zudem ist das Gestationsalter bei Wiederholungen meist sehr ähnlich. Es wird dann der zweite Fötus in einer vergleichbaren SSW geboren, wie jener aus der vorherigen Schwangerschaft.

4.5 Entbindungsmodus

Die Sectiozahlen sind weltweit sehr hoch und liegen bei bis zu 30% (105). In diesen Trend passen auch unsere Zahlen beider Gruppen, besonders aber jene der Fallgruppe: sie weist deutlich häufiger Sectiones auf (56% primäre Sectio, 9,8% sekundäre Sectio) als die Kontrollgruppe (62,5% spontan, je 18,8% primäre bzw. sekundäre Sectio). Nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand, finden sich kontroverse Meinungen darüber, ob bei drohender Frühgeburt ein Kaiserschnitt indiziert ist oder nicht. Malloy et al. konnten keinen protektiven Effekt daran finden, wenn Neugeborene per Sectionem geboren werden (106). Im Gegenteil konnte er zeigen, dass Kinder, die zwischen der 32. und der 36. SSW per (primärer) Sectio geboren wurden, sogar ein erhöhtes Risiko für perinatale Komplikationen wie eine pulmonale Hypoplasie oder eine nekrotisierende Enterokolitis aufweisen (107). Bei besonders früh geborenen Feten besteht außerdem das Problem, dass das untere Uterinsegment noch nicht sehr entwickelt ist, so dass die Inzision folglich im oberen Teil der Uterus stattfindet. Dies birgt ein erhöhtes Komplikations- und Blutungsrisiko (108). Die trotz allem sehr hohe Rate an Sectiones, die unsere Fallgruppe aufweist, kann darauf zurückgeführt werden, dass sie indiziert werden,

um eine Notfall-Section und den damit einhergehenden Komplikationen vorzubeugen. Allerdings spiegelt sich in dem Problem der Indikationsstellung auch das Definitionsproblem: es ist längst nicht möglich, eine Frühgeburt sicher vorherzusagen; zahlreiche Frauen gebären trotz vorhandener Symptome einer Frühgeburt dennoch termingerecht. Es gilt daher die Section-Indikationen besonders angesichts drohender Komplikationen bei einer Frühgeburt sorgfältig zu stellen.

5 Zusammenfassung

Trotz steigender medizinischer und hygienischer Standards ist die Rate an Frühgeborenen noch immer sehr hoch. Eine der Hauptverursacher sind dabei Infektionen, die über eine Kaskade immunologischer Vorgänge zu einer erhöhten perinatalen Morbidität und Mortalität führen. Daher ist die Etablierung eines spezifischen diagnostischen Standards für die frühzeitige Erkennung einer Infektion jenseits der unspezifischen klinischen Symptome unerlässlich. Die Infektparameter wie Leukozyten oder CRP müssen ebenfalls als unspezifisch angesehen werden und lassen keine Aussage über eine vaginale Infektion oder gar eine intrauterine Aszension zu. Aus diesem Grunde untersuchten wir prospektiv die Zytokine IL-23, IL-17a, IL-12, IL-10, IL-6, MIP-1 β und TNF- α und ihre Konzentration im zervikovaginalen Sekret von Patientinnen mit drohender Frühgeburt und verglichen diese mit einer asymptomatischen Kontrollgruppe.

Hierfür wurden insgesamt 75 Patientinnen untersucht und in folgende zwei Gruppen unterteilt: in die Kontrollgruppe ohne Frühgeburt ($n = 32$) und in die Fallgruppe ($n = 43$) mit drohender Frühgeburt. Von letzterer Gruppe hatten 60% bereits in der Anamnese eine Früh- oder Fehlgeburt ($p = 0,010$). Zum Zeitpunkt der Entnahme lag bezüglich des Gestationsalters sowie des mütterlichen Alters kein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe vor ($p = 0,132$ bzw. $p = 0,950$). Ziel war es herauszufinden, ob sich eines oder mehrere der untersuchten Zytokine als Biomarker eignen, um das Risiko einer Frühgeburt zukünftig für die Patientinnen besser einschätzen zu können. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden bei den Zytokinen IL-6 ($p = 0,001$), IL-10 ($p = 0,004$) und IL-23 ($p = <0,001$) beobachtet. Signifikanz erlangte weiterhin der Entbindungsmodus: so wurden symptomatische Patientinnen deutlich häufiger per Sectio caesarea entbunden ($p = 0,005$).

Aufgrund unserer Ergebnisse scheinen die Zytokine IL-6, IL-10 und IL-23 geeignete Biomarker, um das Risiko einer Frühgeburt besser einschätzen zu können. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen sind hierfür wünschenswert. Langfristiges Ziel ist es, zuverlässige Tests zu entwickeln, mit welchen das Eintreten einer zu frühen Geburt mittels Zytokinbestimmung aus dem Vaginalsekret erfolgen und so die Einleitung einer entsprechenden Therapie, wie etwa eine IL-10-vermittelte Kontrolle der Prostaglandinsynthese frühzeitig begonnen werden kann.

Literaturverzeichnis

1. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ. World Health Organization*; 2010 Jan 1;88(1):31–8.
2. European Foundation for the Care of Newborn Infants. European Foundation for the Care of Newborn Infants, efcni (2009). report 2009/2010. http://www.efcni.org/fileadmin/Daten/Web/Brochures_Reports_Factsheets_Position_Papers/benchmarking_report/german_translation_of_benchmarking_report.pdf 2009.
3. Kramer MS, Papageorghiou A, Culhane J, Bhutta Z, Goldenberg RL, Gravett M, et al. Challenges in defining and classifying the preterm birth syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Feb;206(2):108–12.
4. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *The Lancet*; 2012 Jun 9;379(9832):2162–72.
5. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet*; 2008 Jan 5;371(9606):75–84.
6. Edwards D. New approaches to brain injury in preterm infants. *Dev Neurosci.* Karger Publishers; 2002 Jan;24(5):352–4.
7. Moddemann D, Shea S. The developmental paediatrician and neonatal follow-up. *Paediatr Child Health.* 2006 May;11(5):295.
8. Katz KS, Dubowitz LMS, Henderson S, Jongmans M, Kay GG, Nolte CA, et al. Effect of Cerebral Lesions on Continuous Performance Test Responses of School Age Children Born Prematurely. *J Pediatr Psychol.* 1996 Dec 1;21(6):841–55.
9. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller A-B, et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health.* 2013 Jan;10 Suppl 1:S2.
10. Spong CY. Spong CY. Prediction and prevention of recurrent spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2007 Aug; 110(2 Pt 1):405–15. 2007.
11. Schoen CN, Tabbah S, Iams JD, Caughey AB, Berghella V. Why the United States preterm birth rate is declining. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Dec 12; A
12. Chang HH, Larson J, Blencowe H, Spong CY, Howson CP, Cairns-Smith S, et al. Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *The Lancet.* 2013 Jan 19;381(9862):223–34.
13. Goldenberg RL, Iams JD, Mercer BM, Meis PJ, Moawad AH, Miodovnik M, et al. The preterm prediction study: Risk factors for indicated preterm births. *Am J Obstet Gynecol.* Elsevier; 1998 Mar 3;178(3):562–7.

14. Euro-Peristat. Euro-Peristat Project (2008). European Perinatal Health Report 2008. www.europeristat.com/our-publications/european-perinatal-health-report.html. 2008;
15. Friese K. The role of infection in preterm labour. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2003 Apr 22;110:52–4.
16. Rath W, Pecks U. Management der drohenden Frühgeburt ohne vorzeitigen Blasensprung. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York; 2008 Nov 6; 68(11):1061–8.
17. Mailath-Pokorny M, Polterauer S, Kohl M, Kueronyai V, Worda K, Heinze G, et al. Individualized assessment of preterm birth risk using two modified prediction models. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015 Jan;
18. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG*. 2006 Dec;113 Suppl :17–42.
19. Wolff F. Prävention der Frühgeburt. *Gynäkologe*. 1997 Sep 29;30(9):726–36.
20. Caughey AB, Robinson JN, Norwitz ER. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol*. 2008 Jan;1(1):11–22.
21. Daskalakis G, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Management of cervical insufficiency and bulging fetal membranes. *Obstet Gynecol*. 2006 Feb; 107(2 Pt 1): 221–6.
22. Gotsch F, Romero R, Erez O, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, et al. The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. Informa UK Ltd UK; 2009 Jan 21;22 Suppl 2:5–23.
23. Furman B, Shoham-Vardi I, Bashiri A, Erez O, Mazor M. Clinical significance and outcome of preterm prelabor rupture of membranes: population-based study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000 Oct;92(2):209–16.
24. Norman JE. Preterm labour. Cervical function and prematurity. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007 Oct;21(5):791–806.
25. Bastert D., Dudenhausen J.W., Schneider H.P.G.: *Frauenheilkunde und Geburtshilfe*. Berlin 2003, 136-137
26. Shennan A, Jones B. The cervix and prematurity: aetiology, prediction and prevention. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2004 Dec;9(6):471–9.
27. Lengyel E, Pildner von Steinburg S. Physiology of cervical ripening and dilatation. *Gynäkologe*. 2001 Aug;34(8):708–14.
28. Siedentopf J. Therapie des Fruchtblasenprolaps im zweiten Trimenon. *Speculum - Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2005. 23(1):27–33.
29. Stevens AO, Chauhan SP, Magann EF, Martin RW, Bofill JA, Cushman JL, et al. Fetal fibronectin and bacterial vaginosis are associated with preterm birth in women who are symptomatic for preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. Elsevier; 2004 Jun ;190(6):1582–7; discussion 1587–9.

30. Hirsch L, Yogev Y, Domniz N, Meizner I, Bardin R, Melamed N. The role of cervical length in women with threatened preterm labor: is it a valid predictor at any gestational age? *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Nov;211(5):532.e1–9.
31. Iams JD, Goldenberg R, Meis P, Mercer P, Moawad A, Das A, et al. The Length of the Cervix and the Risk of Spontaneous Premature Delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N Engl J Med.* 1996. p. 567–73.
32. Hackelöer, B., Beinder, E., Dudenhausen, J., Feige, A., Hecher, K., Rath, W., Schleußner, E., Schneider, H., Spätling, L., Vetter K. Leitlinie: Medikamentöse Wehenhemmung bei drohender Frühgeburt. *DGGG: Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V.* 2006.
33. King JF, Flenady V, Papatsonis D, Dekker G, Carbonne B. Calcium channel blockers for inhibiting preterm labour; a systematic review of the evidence and a protocol for administration of nifedipine. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2003 Jun;43(3):192–8.
34. Berger R, Dudenhausen J, Gortner L, Hackelöer B, Schneider K, Vetter K. Leitlinie: Antenatale Kortikosteroide zur Lungenreifung. *DGGG: Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V.* 2010.
35. Stupin JH, David M, Siedentopf J-P, Dudenhausen JW. Emergency cerclage versus bed rest for amniotic sac prolapse before 27 gestational weeks. A retrospective, comparative study of 161 women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 Jul;139(1):32–7.
36. Berghella V, Ludmir J, Simonazzi G, Owen J. Transvaginal cervical cerclage: evidence for perioperative management strategies. *Am J Obstet Gynecol.* 2013 Sep;209(3):181–92.
37. Conde-Agudelo A, Romero R, Nicolaides K, Chaiworapongsa T, O’Brien JM, Cetingoz E, et al. Vaginal progesterone vs. cervical cerclage for the prevention of preterm birth in women with a sonographic short cervix, previous preterm birth, and singleton gestation: a systematic review and indirect comparison metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2013 Jan;208(1):42.e1–42.e18.
38. Berghella V, Odibo A, MS T, Rust O, Althuisius S. Cerclage for Short Cervix on Ultrasonography: Meta-Analysis of Trials Using Individual Patient-Level Data. *Obs Gynecol* 2005 Jul; 106(1) 181-9.
39. Caruso A, Trivellini C, De Carolis S, Paradisi G, Mancuso S, Ferrazzani S. Emergency cerclage in the presence of protruding membranes: is pregnancy outcome predictable? *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000 Apr;79(4):265–8.
40. Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L. *Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis.* München: Holländer, Georg A.; 2006.
41. Yamagata T, Skepner J, Yang J. Targeting Th17 Effector Cytokines for the Treatment of Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015 Dec;63(6):405-14. doi: 10.1007/s00005-015-0362-x. Epub 2015 Sep 10

42. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*. 2009 Feb 1;16(2):206–15.
43. Bollapragada S, Bollopragada S, Youssef R, Jordan F, Greer I, Norman J, et al. Term labor is associated with a core inflammatory response in human fetal membranes, myometrium, and cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Jan;200(1):104.e1–11.
44. Ferencik M, Rovensky J, Mat'ha V, Herold M. *Kompendium der Immunologie. Grundlagen und Klinik*. Wien; 2006: 79-80
45. Gemsa D, Kalden J, Resch K. *Immunologie: Grundlagen -Klinik - Praxis*. Stuttgart; 1997: 46,56
46. Cheng S-B, Sharma S. Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2014 Oct 1; 2015 Jun;73(6):487-500.
47. Aggarwal B, Gutterman J. Human Cytokines. *Handbook for basic and clinical research*. Texas, USA; 1992.
48. Sprang SR, Fernando Bazan J. Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr Opin Struct Biol*. 1993 Jan;3(6):815–27.
49. Beutler B, Cerami A. Cachectin: More Than a Tumor Necrosis Factor — *NEJM*. 1987 Feb. 316 :379-385
50. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1882–6.
51. TU FF, GOLDENBERG RLM, TAMURA TM, DREWS M, ZUCKER SJM, VOSS HFP. Prenatal Plasma Matrix Metalloproteinase-9 Levels to Predict Spontaneous Preterm Birth. *Obstet Gynecol*. 1998;92(3):446–9.
52. Tang N, Liu L, Kang K, Mukherjee PK, Takahara M, Chen G, et al. Inhibition of Monocytic Interleukin-12 Production by *Candida albicans* via Selective Activation of ERK Mitogen-Activated Protein Kinase. *Infect Immun*. 2004 Apr 21;72(5):2513–20.
53. Casey ML, Cox SM, Beutler B, Milewich L, MacDonald PC. Cachectin/tumor necrosis factor- α formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 1989 Feb 1;83(2):430–6.
54. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynecol Obstet*. Elsevier; 2002 Dec 12;79(3):209–15.
55. Santhanam U, Avila C, Romero R, Viguet H, Ida N, Sakurai S, et al. Cytokines in normal and abnormal parturition: Elevated amniotic fluid interleukin-6 levels in women with premature rupture of membranes associated with intrauterine infection. *Cytokine*. 1991 Mar;3(2):155–63.
56. Chow SSW, Craig ME, Jones CA, Hall B, Catteau J, Lloyd AR, et al. Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. *Cytokine*. 2008 Oct;44(1):78–84.

57. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem. Annual Reviews*; 1990 Jan 28;59:783–836.
58. Menon R, Camargo MC, Thorsen P, Lombardi SJ, Fortunato SJ. Amniotic fluid interleukin-6 increase is an indicator of spontaneous preterm birth in white but not black Americans. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Jan;198(1):77.e1–7.
59. Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, Mazor M, Yoon BH, Gomez R, et al. The tumor necrosis factor α and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Nov;181(5):1142–8.
60. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Diamond MP, Kenney JS, et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and Gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 Oct;169(4):805–16.
61. Goepfert AR, Goldenberg RL, Andrews WW, Hauth JC, Mercer B, Iams J, et al. The Preterm Prediction Study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Feb;184(3):483–8.
62. Lockwood CJ, Ghidini lessandro, Wein R, Lapinski R, Casal D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Oct;171(4):1097–102.
63. González Bosquet E, Ferrer I, Valls C, Borrás M, Lailla JM. The value of interleukin-8, interleukin-6 and interleukin-1 β in vaginal wash as predictors of preterm delivery. *Gynecol Obstet Invest.* Karger Publishers; 2005 Jan;59(3):175–8.
64. Taylor BD, Holzman CB, Fichorova RN, Tian Y, Jones NM, Fu W, et al. Inflammation biomarkers in vaginal fluid and preterm delivery. *Hum Reprod.* 2013 Apr ;28(4): 942–52.
65. Lange M, Chen FK, Wessel J, Buscher U, Dudenhausen JW. Elevation of interleukin-6 levels in cervical secretions as a predictor of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003 Apr;82(4):326–9.
66. Rizzo G, Capponi A, Rinaldo D, Tedeschi D, Arduini D, Romanini C. Interleukin-6 concentrations in cervical secretions identify microbial invasion of the amniotic cavity in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* Elsevier; 1996 Oct 10;175(4):812–7.
67. Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R, et al. Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo- oxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta. *Am J Reprod Immunol.* 2006 Jan;55(1):19–27.
68. Taniguchi T, Matsuzaki N, Kameda T, Shimoya K, Jo T, Saji F, et al. The enhanced production of placental interleukin-1 during labor and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Jul;165(1):131–7.

69. Pomini F, Caruso A, Challis JR. Interleukin-10 modifies the effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on the activity and expression of prostaglandin H synthase-2 and the NAD $^{+}$ -dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in cultured term human villous trophoblast a. *J Clin Endocrinol Metab*. Endocrine Society; 1999 Dec 1;84(12):4645–51.
70. Laham N, Brennecke SP, Bendtzen K, Rice GE. Tumour necrosis factor α during human pregnancy and labour: maternal plasma and amniotic fluid concentrations and release from intrauterine tissues. *Eur J Endocrinol*. 1994 Dec 1;131(6):607–14.
71. Holst R, Hagberg H, Wennerholm U, Skogstrand K, Thorsen P, Jacobsson B. Prediction of Spontaneous Preterm Delivery in Women With Preterm Labor: Analysis of Multiple Proteins in Amniotic and Cervical Fluids. *Obstet Gynecol*. 2009;(114):268–77.
72. Kreymborg K, Böhlmann U, Becher B. IL-23: changing the verdict on IL-12 function in inflammation and autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets*. Ashley Publications London, UK; 2005 Dec 21;9(6):1123–36.
73. Cift T, Uludag S, Aydin Y, Benian A. Effects of amniotic and maternal CD-146, TGF- β 1, IL-12, IL-18 and IFN- γ , on adverse pregnancy outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med*. Informa Healthcare London; 2013 Jan 27;26(1):21–5.
74. Fossiez F, Banchereau J, Murray R, Kooten C Van, Garrone P, Lebecque S. Interleukin-17. *Informa UK Ltd UK*; 2009 Jul 10;
75. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2006 Apr 17;6(4):329–33.
76. Hee L, Kirkegaard I, Vogel I, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, et al. Low serum interleukin-17 is associated with preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011 Jan;90(1):92–6.
77. Kent ASH, Sullivan MHF, Elder MG. Transfer of cytokines through human fetal membranes. *Reproduction*. 1994 Jan 1;100(1):81–4.
78. Ito M, Nakashima A, Hidaka T, Okabe M, Bac ND, Ina S, et al. A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. *J Reprod Immunol*. 2010 Jan;84(1):75–85.
79. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1951–7.
80. Uz YH, Murk W, Yetkin CE, Kayisli UA, Arici A. Expression and role of interleukin-23 in human endometrium throughout the menstrual cycle and early pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2010 Dec;87(1-2):21–7.
81. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews W. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000;(342):1500–7.

82. Yoon BH, Yang SH, Jun JK, Park KH, Kim CJ, Romero R. Maternal blood C-reactive Protein, white blood cell count, and temperature in preterm labor: A comparison with amniotic fluid white blood cell count. *Obs Gynecol*. 1996;87(231-237).
83. Gronroos J, Forsstrom J, Irjala K, Nevalainen T. Phospholipase A2, C-reactive protein, and white blood cell count in the diagnosis of acute appendicitis. *Clin Chem*. 1994 Sep 1;40(9):1757–60.
84. Fuchs F, Senat M-V, Fernandez H, Gervaise A, Frydman R, Bouyer J. Predictive score for early preterm birth in decisions about emergency cervical cerclage in singleton pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012 Jun;91(6):744–9.
85. Cohen Y, Ascher-Landsberg J, Cohen A, Lessing JB, Grisaru D. The role of C-reactive protein measurement as a diagnostic aid in early pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 May;176:64–7.
86. Loukovaara MJ, Alfthan H V., Kurki MT, Hiilesmaa VK, Andersson SHM. Serum highly sensitive C-reactive protein in preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Sep;110(1):26–8.
87. Goffinet F, Maillard F, Mihoubi N, Kayem G, Papiernik E, Cabrol D, et al. Bacterial vaginosis: prevalence and predictive value for premature delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Jun;108(2):146–51.
88. Feikin DR, Thorsen P, Zywicki S, Arpi M, Westergaard JG, Schuchat A. Association between colonization with group B streptococci during pregnancy and preterm delivery among Danish women. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Feb;184(3):427–33.
89. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, Eschenbach DA, Blackwelder WC, Lou Y, et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 Apr;174(4):1354–60.
90. Gomez R, Romero R, Nien JK, Chaiworapongsa T, Medina L, Kim YM, et al. A short cervix in women with preterm labor and intact membranes: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Mar;192(3):678–89.
91. Carroll SG, Papaioannou S, Ntumazah IL, Philpott-Howard J, Nicolaides KH. Lower genital tract swabs in the prediction of intrauterine infection in preterm prelabour rupture of the membranes. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1996 Jan;103(1):54–9.
92. Mancuso MS, Figueroa D, Szychowski JM, Paden MM, Owen J. Midtrimester bacterial vaginosis and cervical length in women at risk for preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Apr;204(4):342.e1–5.
93. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008 Jan 5;371(9606):75–84.
94. Figueroa D, Mancuso MS, Szychowski JM, Paden MM, Owen J. Does midtrimester Nugent score or high vaginal pH predict gestational age at delivery in women at risk for recurrent preterm birth? *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Jan;204(1):46.e1–4.

95. Guinn DA, Goldenberg RL, Cliver SP, Owen J. Relationship of gestational age and cervical dilatation to the timing of delivery. *Int J Gynecol Obstet*. 1999;64:233–7.
96. Jain S, Eathart A, Ruddock N, Wen T, V. HGD, Saade GR. The validity of cervical dilation as an indication of true labor between 32 and 36 weeks 6 days of gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197:431.e1–431.e3.
97. Benham BN, Balducci J, Atlas RO, Rust OA. Risk factors for preterm delivery in patients demonstrating sonographic evidence of premature dilation of the internal os, prolapse of the membranes in the endocervical canal and shortening of the distal cervical segment by second trimester ultrasound. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol*. 2002 Feb;42(1):52–6.
98. Iams JD, Johnson FF, Sonck J, Sachs L, Gebauer C, Samuels P. Cervical competence as a continuum: A study of ultrasonographic cervical length and obstetric performance. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Apr;172(4):1097–106.
99. Hartmann K, Thorp JM, L. MT, Savitz DA, Granados JL. Cervical dimensions and risk of preterm birth: a prospective cohort study. *Obs Gynecol*. 1999;93(4):504–9.
100. Cnattingius S, Forman MR, Berendes HW, Graubard BI, Isotalo L. Effect of age, parity, and smoking on pregnancy outcome: A population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Jan;168(1):16–21.
101. Bobrowski RA, Bottoms SF. Underappreciated risks of the elderly multipara. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Jun;172(6):1764–70.
102. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis PJ, Moawad AH, Shellhaas C, Das A, et al. The Preterm Prediction Study: Prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Sep;183(3):738–45.
103. Bai J, Wong FWS, Bauman A, Mohsin M. Parity and pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Feb;186(2):274–8.
104. Bloom SL, Yost NP, McIntire DD, Leveno KJ. Recurrence of preterm birth in singleton and twin pregnancies. *Obs Gynecol*. 2001;98:379–85.
105. Betrán AP, Merialdi M, Lauer JA, Bing-Shun W, Thomas J, Van Look P, et al. Rates of caesarean section: analysis of global, regional and national estimates. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2007 Mar;21(2):98–113.
106. Malloy MH, Onstad L, Wright E. The effect of cesarean delivery on birth outcome in very low birth weight infants. *Obs Gynecol*. 1991;77(4):498–503.
107. Malloy MH. Impact of cesarean section on intermediate and late preterm births: United States, 2000–2003. *Birth*. 2009 Mar;36(1):26–33.
108. Shah YG, Ronner W, Eckl CJ, Stinson SK. Acute maternal morbidity following classical cesarean delivery of the preterm infant. *Obs Gynecol*. 1990;July(76(1)):16–9.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Transvaginaler US einer normalen Zervix; Markierungen am inneren und äußeren MM (31)	6
Abbildung 2:	Transvaginaler US mit verkürzter Zervix, Trichterbildung und prolabierender Fruchtblase (31)	6
Abbildung 3:	Assoziation zwischen Infektion, Zytokinen und Frühgeburt (15)	10
Abbildung 4:	Einfluss von IL-10 auf das Immunsystem (46).....	12
Abbildung 5:	Beispiel für eine Standardkurve (hier von IL-23). Ordinate: optische Dichte, Abszisse: Konzentrationen der Standardlösung	32
Abbildung 6:	Boxplot zum Vergleich der Entbindungszeitpunkte von Fall- und Kontrollgruppe	36
Abbildung 7:	Entbindungsmodus von Fall- und Kontrollgruppe	37
Abbildung 8:	Boxplot zum Vergleich der Komplikationen in vorherigen Schwangerschaften bei der Kontroll- und bei der Fallgruppe	38
Abbildung 9:	Boxplot zum Vergleich der Leukozytenwerte bei der Fall- und Kontrollgruppe	39
Abbildung 10:	Boxplot zum Vergleich der CRP-Werte bei der Fall- und Kontrollgruppe	40
Abbildung 11:	Boxplot zum Vergleich der IL-6-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	42
Abbildung 12:	Boxplot zum Vergleich der IL-10-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	42
Abbildung 13:	Boxplot zum Vergleich der IL-12-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	43
Abbildung 14:	Boxplot zum Vergleich der IL-17a-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	43
Abbildung 15:	Boxplot zum Vergleich der IL-23-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	44
Abbildung 16:	Boxplot zum Vergleich der TNF- α -Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	44
Abbildung 17:	Boxplot zum Vergleich der MIP-1 β -Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	45
Abbildung 18:	ROC-Kurve für Interleukin-23	46
Abbildung 19:	ROC-Kurve für Interleukin-17	46
Abbildung 20:	ROC-Kurve für Interleukin-12	47
Abbildung 21:	ROC-Kurve für Interleukin-10	47

Abbildung 22:	ROC-Kurve für Interleukin-6	48
Abbildung 23:	ROC-Kurve für TNF- α	48
Abbildung 24:	ROC-Kurve für MIP-1 β	49
Abbildung 25:	Boxplot zum Vergleich der IL-23-Konzentration in der Fall- und der Kontrollgruppe	50
Abbildung 26:	Boxplot zum Vergleich der IL-17a-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	51
Abbildung 27:	Boxplot zum Vergleich der IL-12-Konzentration in der Fall- und der Kontrollgruppe	51
Abbildung 28:	Boxplot zum Vergleich der IL-10-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	52
Abbildung 29:	Boxplot zum Vergleich der IL-6-Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	52
Abbildung 30:	Boxplot zum Vergleich der MIP-1 β -Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	53
Abbildung 31:	Boxplot zum Vergleich der TNF- α -Konzentration in der Fall- und in der Kontrollgruppe	53
Abbildung 32:	Balkendiagramm zum Vergleich der Häufigkeit des Vorkommens von Fruchtblasenprolaps bei Patientinnen mit vs. ohne Frühgeburt.....	54
Abbildung 33:	Boxplot zum Vergleich der Muttermundweite bei Schwangerschaftsverlängerung ≤ 14 vs. ≥ 15 Wochen	55
Abbildung 34:	Balkendiagramm zur Häufigkeit des Auftretens von β -Streptokokken bei Patientinnen mit vs. Ohne Frühgeburt	56
Abbildung 35:	Balkendiagramm zur Häufigkeit des Auftretens von Enterokokken bei Patientinnen mit vs. ohne Frühgeburt	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung der Frühgeburt (2,5)	1
Tabelle 2:	Ursachen für eine Frühgeburt (5,10,15,18,19).....	3
Tabelle 3:	Verwendete Geräte.....	15
Tabelle 4:	Untersuchte Parameter bei beiden Gruppen	17
Tabelle 5:	Gravidität bei der Patientengruppe vs. der Kontrollgruppe	35
Tabelle 6:	Parität bei der Patientengruppe vs. der Kontrollgruppe.....	35
Tabelle 7:	Vergleich der Zytokine IL-23, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17a, TNF- α und MIP-1 β im Vaginalsekret zwischen Patientinnen mit FG- Bestrebungen und der Kontrollgruppe mittels ELISA.....	41
Tabelle 8:	Medianwerte der Konzentrationen von IL-23, IL-17a, IL-12, IL-10. IL-6, MIP-1 β und TNF- α bei Patientinnen mit und ohne Frühgeburt	50
Tabelle 9:	Muttermundsweite bei Schwangerschaftsverlängerung ≤ 14 vs. ≥ 15 Wochen	55
Tabelle 10:	p-Werte nach Durchführung des Fisher-Tests für verschiedene Bakterien	57

Danksagung

Hiermit möchte ich mich von Herzen bei all jenen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich danke Herrn Prof. Dr. S. Mahner für die Möglichkeit der Promotion an der Frauenklinik Maistrasse.

Ich bedanke mich besonders bei PD Dr. Tobias Weissenbacher für die immer herzliche, geduldige und unerlässliche Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich, besonders für die Unterstützung beim praktischen Teil dieser Arbeit, Hr. Prof. Dr. Udo Jeschke, Leiter des wissenschaftlichen Labors der I. Frauenklinik der LMU München – Campus Innenstadt.

Unerlässlich war auch die große Hilfe der medizinisch-technischen Assistentinnen Christina Kuhn, Sabine Hofmann und Susi Kunze.

Für ihren Einsatz und ihre Geduld möchte ich mich auch bei Gertraud Pföderl ganz herzlich bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Von Julia Maria Isabella Bauer

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

Die Bestimmung der Zytokine Interleukin-23, Interleukin-17a, Interleukin-12, Interleukin-10, Interleukin-6, Tumor-Nekrose-Faktor- α und MIP-1 β im Vaginalsekret und deren Bedeutung im Rahmen der Frühgeburtlichkeit

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

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

München, den 05.05.2016

Julia Maria Isabella Bauer