

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik der  
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Stress assoziierter Abort: immunologische und  
endokrinologische Parameter in der Frühschwangerschaft**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Nina Bärenstrauch  
aus Pusan

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. P. Arck
2. Prof. Dr. med. G. Schönfelder
3. Priv.-Doz. Dr. med. habil. U. Markert

Datum der Promotion: 27.04.2007

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Verzeichnis der Abkürzungen.....	5
Zielsetzung.....	6
1. Einleitung.....	7
1.1 Problemstellung.....	7
1.2 Implantation und Frühschwangerschaft.....	9
1.3 Endokrinologische Parameter.....	12
1.3.1 Corticotropin Releasing Hormone (CRH).....	12
1.3.2 Progesteron.....	13
1.3.3 Progesterone induced blocking factor (PIBF).....	14
1.4 Immunologische Parameter.....	17
1.4.1 CD8 <sup>+</sup> Zellen.....	17
1.4.2 CCR5 <sup>+</sup> und CCR4 <sup>+</sup> Zellen.....	17
1.4.3 CD57 <sup>+</sup> Zellen.....	19
1.5 Stress.....	20
1.5.1 Definition.....	20
1.5.2 Stress und Schwangerschaft.....	21
1.5.3 Einfluss von Stress auf das endokrine System.....	22
1.5.4 Einfluss von Stress auf das Immunsystem.....	23
1.5.5 Perceived Stress Questionnaire (PSQ).....	24
1.6 Arbeitshypothesen.....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Studiendesign.....	25
2.1.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien.....	25
2.1.2 Gruppen: Abort versus komplikationslose Schwangerschaft.....	25
2.1.3 Beschreibung des Studienkollektivs der vorliegenden Arbeit.....	26
2.2 Blutprobengewinnung und Materialaufbereitung.....	27
2.2.1 Serumgewinnung für die CRH- und Progesteron-Bestimmung.....	27
2.2.2 Separation mononukleärer Zellen für die FACS-Analyse.....	27
2.3 ELISA.....	28
2.3.1 Grundlagen.....	28
2.3.2 CRH-ELISA.....	28
2.3.3 Progesteron-ELISA.....	30
2.4 Durchflusszytometrie.....	30
2.4.1 Grundlagen.....	30
2.4.2 Antikörperfärbung und Probenmessung.....	30
2.5 Verwendete Materialien und Geräte.....	31
2.6 Perceived Stress Questionnaire (PSQ).....	33
2.7 Datenbank.....	34
2.8 Statistische Tests.....	34
3. Ergebnisbeschreibung.....	36
3.1 Vergleich zwischen Frauen mit konsekutivem Abort und Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft.....	36
3.1.1 Corticotropin Releasing Hormone (CRH).....	36
3.1.2 Progesteron.....	38
3.1.3 CD8 <sup>+</sup> Zellen.....	39
3.1.4 CCR5 <sup>+</sup> Zellen.....	40

## Inhaltsverzeichnis

3.1.5	CCR4 <sup>+</sup> Zellen.....	41
3.1.6	CD57 <sup>+</sup> Zellen.....	42
3.1.7	Perceived Stress Questionnaire (PSQ).....	43
3.1.8	PSQ-Demands-Scale (Unterskala Anforderungen).....	44
3.2	Regressionsanalyse.....	46
3.2.1	Gebietsweise Durchführung der logistischen Regression.....	46
3.2.1.1	Schritt 1: Alter, SSW, PSQ.....	46
3.2.1.2	Schritt 2: Progesteron, CRH, CCR5.....	46
3.2.1.3	Schritt 3: CCR4, CD8, CD57.....	47
3.2.1.4	Schritt 4: PSQ, Progesteron, CRH, CCR5, CCR4, CD57.....	47
3.2.2	Wahrscheinlichkeitsmodell.....	47
4.	Diskussion.....	49
4.1	Interpretation der Ergebnisse.....	49
4.1.1	Corticotropin Releasing Hormone (CRH).....	49
4.1.2	Progesteron.....	51
4.1.3	CD8 <sup>+</sup> Zellen.....	54
4.1.4	CCR5 <sup>+</sup> und CCR4 <sup>+</sup> Zellen.....	55
4.1.5	CD57 <sup>+</sup> Zellen.....	57
4.1.6	Perceived Stress Questionnaire (PSQ).....	58
4.2	Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse.....	58
4.3	Vergleich mit bisherigen Studien zu Stress und Abort.....	59
4.4	Schlussfolgerung.....	60
5.	Zusammenfassung.....	62
5.1	Problem.....	62
5.2	Methoden.....	62
5.3	Ergebnis.....	63
5.4	Schlussfolgerung.....	63
Anhang	.....	64
	Literaturverzeichnis.....	64
	Lebenslauf.....	68
	Danksagung.....	69
	Erklärung.....	70

## Verzeichnis der Abkürzungen

APS	Acetate Plate Sealer
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Celsius
CCR	Chemokine Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FSC	Forward Scatter
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leucocyte Antigene
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVF	In-vitro-Fertilisation
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
M	molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	milliliter
mmol	millimol
N	molar
ng	nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
pH	pondus Hydrogenii
PIBF	Progesterone Induced Blocking Factor
PSQ	Perceived Stress Questionnaire
rpm	rounds per minute
SA-HRP	Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase
sec	Sekunden
SSC	Side Scatter
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF	Transforming Growth Factor
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization

## Zielsetzung

### *Immunologische und endokrinologische Dysbalancen beim Abort*

Ziel der Studie war es, die aus Tiermodellen bekannten (möglicherweise durch Stress vermittelten) immunologischen und endokrinologischen Dysbalancen beim Abort auf die menschliche Schwangerschaft zu übertragen und auf Übereinstimmung zu überprüfen. Die Studie sollte untersuchen, ob in der humanen Schwangerschaft bereits vor Eintritt eines Abortes in der Frühschwangerschaft immunologische oder endokrinologische Entgleisungen vorlagen.

### *Zusammenhang zwischen Stress und Abort*

Mittels eines Fragebogens zum wahrgenommenen Stress wurde der psychosoziale Stress quantifiziert. Anhand dieses Fragebogens sollte überprüft werden, ob Schwangere mit hohem Stresswert eher eine Fehlgeburt erleiden als Schwangere mit einem niedrigen Stresswert und inwieweit der potentielle Einfluss von Stress auf die Veränderungen der gemessenen Parameter im Blut eine Rolle spielt.

Die Daten hierfür wurden in einer prospektiven Studie gewonnen zu einem Zeitpunkt, an dem die Schwangerschaft intakt und ohne Hinweis auf einen möglichen Abort war, so dass die potentiell veränderten Parameter als ursächlich und nicht als reaktiv angesehen werden konnten.

### *Suche nach einem prädiktiven Parameter*

Ein weiteres Ziel der Studie war es, möglicherweise einen prädiktiven Parameter zu identifizieren, der in der Frühschwangerschaft bereits verändert ist und auf eine später auftretende Fehlgeburt hinweist. Ein solcher Parameter könnte als Screening-Methode eingesetzt werden, um drohende Fehlgeburten frühzeitig erkennen und behandeln zu können bzw. Strategien zu entwickeln, niedrige Hormonspiegel durch Substitution oder eine inflammatorische Reaktion durch immunmodulatorische Therapie zu behandeln.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 *Problem*

Aborte zählen zu den häufigsten Schwangerschaftskomplikationen. Als Ursachen werden meist Infektionen, uterine Fehlbildungen und genetische Gründe angegeben. Es ist bekannt, dass Aborte auch durch immunologische und endokrinologische Veränderungen verursacht werden, die möglicherweise Stress assoziiert auftreten. Das Ziel dieser Studie war, diese Dysbalancen anhand von Corticotropin Releasing Hormone (CRH) und Progesteron sowie verschiedener Oberflächenmarker aufzuzeigen und mittels eines etablierten Fragebogens zum wahrgenommenen Stress (PSQ) einen Zusammenhang zwischen Stress und den Veränderungen herzustellen, die zum Abort geführt haben.

CRH wird vom Hypothalamus gebildet und auf einen Stressreiz hin ausgeschüttet. Auch uterine Strukturen produzieren CRH, das eine wichtige Rolle bei der Implantation des Embryos spielt und den utero-plazentaren Blutfluss reguliert. Progesteron ist essentiell zur Erhaltung der Schwangerschaft. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass Stress den Progesteronspiegel senkt und dass Ovariectomie im ersten Trimester zum Abort führt. Progesteron induziert die Bildung des immunmodulatorischen Proteins Progesterone-Induced-Blocking-Factor (PIBF) in  $CD8^+$  Lymphozyten. PIBF führt zur verstärkten Produktion der als schwangerschaftsprotektiv geltenden Th2-Zytokine (z. B. IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) aus  $CCR4^+$  T-Helfer-Zellen und zur verminderten Produktion der als abortogen geltenden, inflammatorischen Th1-Zytokine (z. B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) aus  $CCR5^+$  T-Helfer-Zellen sowie zu einer verminderten Aktivität von NK-Zellen. Die Arbeitshypothese war, dass – potentiell durch Stress vermittelt – hohe CRH- und niedrige Progesteronspiegel zur Dominanz von Th1-Zytokinen und über die Aktivierung von NK-Zellen zum Abort führen.

### 5.2 *Methoden*

Es wurden gesunden Schwangeren vor der 12. SSW ohne Risiken oder Zeichen einer Schwangerschaftskomplikation Blutproben entnommen. Zur gleichen Zeit wurde mit Hilfe des Perceived Stress Questionnaire (PSQ) ein Stress-Score ermittelt. Die Serumkonzentrationen an CRH und Progesteron wurden mittels ELISA bestimmt. Anhand von Durchflusszytometrie wurden Zellen mit den Oberflächenmarkern CD8 (zytotoxische oder Suppressor-T-Zellen), CCR5 (Th1-Marker), CCR4 (Th2-Marker) und CD57 (NK-Zell-Marker) identifiziert. Die Auswertung des PSQ ergab einen PSQ-Gesamt-Score, zusätzlich wurden Werte für die

Unterskalen des PSQ ermittelt. Nach dem Abwarten des Schwangerschaftsausganges wurden die Studienteilnehmerinnen in Frauen mit konsekutivem Abort ( $n = 40$ ) und Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft (Gruppen-Matching,  $n = 40$ ) eingeteilt. Die gemessenen Parameter wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests zwischen beiden Gruppen verglichen. Anhand einer Regressionsanalyse wurden Parameter identifiziert, die einen signifikanten Einfluss auf den Schwangerschaftsausgang nehmen.

### **5.3 Ergebnis**

Bei Frauen mit konsekutivem Abort fand sich eine signifikant erhöhte Serumkonzentration an CRH und eine signifikant erniedrigte Serumkonzentration an Progesteron im Vergleich zu Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft. Der Anteil an  $CD8^+$  Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Der Anteil an  $CCR5^+$  Zellen,  $CCR4^+$  Zellen und  $CD57^+$  Zellen war bei Frauen mit konsekutivem Abort signifikant höher. Der PSQ-Gesamt-Score zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen, jedoch fand sich bei Frauen mit konsekutivem Abort ein signifikant höherer Wert bezüglich der Unterskala „Anforderungen“. In der Regressionsanalyse zeigten die Parameter CRH-Serumkonzentration,  $CCR4$ ,  $CD57$  und PSQ einen signifikanten Einfluss auf den Schwangerschaftsausgang.

### **5.4 Schlussfolgerung**

Erwartungsgemäß fanden sich bei Frauen mit konsekutivem Abort erhöhte CRH- und erniedrigte Progesteronspiegel. Überraschenderweise war bei Frauen mit konsekutivem Abort nicht nur der Anteil an  $CCR5^+$  Zellen, sondern auch der Anteil an  $CCR4^+$  Zellen erhöht, die die antiinflammatorischen Th2-Zytokine produzieren. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich als Kompensationsmechanismus zu werten, jedoch unterstreicht es die aktuelle Diskussion um die Gültigkeit des Th1-/Th2-Paradigmas. Ebenfalls unerwartet zeigte sich ein signifikanter Unterschied nicht hinsichtlich des PSQ-Gesamt-Scores, jedoch in der Unterskala „Anforderungen“, in der Forderungen von außen bewertet werden. Dies deutet darauf hin, dass sich der für den Abort relevante Stress vorwiegend auf externale Stressoren bezieht.

Die vorliegende Studie zeigt, dass bei einem konsekutiven Abort bereits in der Frühschwangerschaft immunologische und endokrinologische Dysbalancen vorliegen. Stress durch externale Stressoren war bei Frauen mit konsekutivem Abort signifikant erhöht und wurde in der Regressionsanalyse als Parameter identifiziert, der den Schwangerschaftsausgang signifikant beeinflusst. Der Progesteron-Serum-Spiegel könnte als Screening-Parameter dienen, um Schwangere mit drohendem Abort zu identifizieren.



**Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Danksagung**

Frau PD Dr. med. Petra Arck danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Geduld, für die Vermittlung eines Forschungsaufenthaltes bei Dr. Alison Douglas an der University of Edinburgh und die Vermittlung einer studentischen Forschungsförderung durch die Charité.

Den Mitarbeitern des PsychoNeuroImmunologischen Labors danke ich für die Hilfe bei der praktischen Durchführung, v. a. Petra Busse. Mirjam Rücke danke ich für die Unterstützung bei der elektronischen Datenverarbeitung.

Dr. Alison Douglas und dem neuroendokrinen Labor der University of Edinburgh danke ich für die freundliche Aufnahme und die fachliche Unterstützung während meines Aufenthaltes dort.

Der Kommission für wissenschaftlichen Nachwuchs der Charité danke ich für die Unterstützung im Rahmen einer studentischen Forschungsförderung.

Den teilnehmenden Arztpraxen in Berlin danke ich für die Bereitschaft zur Mitwirkung an der vorliegenden Studie.

## **Erklärung**

Ich, Nina Bärenstrauch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Stress assoziierter Abort: immunologische und endokrinologische Parameter in der Frühschwangerschaft“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 30.11.2006