

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen  
Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**"Zusammenhang zwischen IL-6, IL-8 und TNF-alpha-  
Spiegel**

**im Fruchtwasser und dem Vorkommen von Aborten,  
spontanen Frühgeburten und Präeklampsien"**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –

Universitätsmedizin Berlin

von

**Daniela Thiem**

aus Berlin (Deutschland)

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. K. Kalache  
2. Priv.-Doz. Dr. med. K.-S. Heling  
3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Krapp

Datum der Promotion: 19.09.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2. Herleitung der Aufgabenstellung</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Studiendesign</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Probandenauswahl</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Fruchtwassergewinnung</b>	<b>16</b>
<b>3.4 IMMULITE®-System</b>	<b>17</b>
<b>3.5 Zytokinmessung</b>	<b>17</b>
<b>3.6 Intra- und Interassay</b>	<b>19</b>
<b>3.7 Kontrollgruppe und Fallgruppen</b>	<b>20</b>
<b>3.8 Datenauswertung</b>	<b>21</b>
<b>3.9 Statistik</b>	<b>21</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Anamnestische Daten des Patientenkollektivs</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Demographische und klinische Daten der Kontrollgruppe</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Aborte</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Frühgeburten</b>	<b>27</b>
<b>4.5 Präeklampsien – Eklampsie</b>	<b>28</b>
<b>4.6 Zytokingehalt der gesamten Kontrollgruppe</b>	<b>29</b>
<b>4.7 Zytokingehalt bei Spontanaborten</b>	<b>31</b>
<b>4.8 Zytokingehalt der Frühgeburten <math>\leq</math> 34. SSW</b>	<b>33</b>
<b>4.9 Zytokingehalt der Frühgeburten <math>&gt;</math> 34. SSW und <math>&lt;</math> 37. SSW</b>	<b>35</b>
<b>4.10 Zytokingehalt bei Präeklampsien-Eklampsie</b>	<b>37</b>

<b>5. Diskussion</b>	<b>39</b>
<i>5.1 Interleukine und Schwangerschaft</i>	<b>39</b>
<i>5.2 Interleukine bei Aborten</i>	<b>40</b>
<i>5.3 Interleukine bei Frühgeburten</i>	<b>42</b>
<i>5.4 Interleukine bei Präeklampsie</i>	<b>49</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>7. Quellenverzeichnis</b>	<b>54</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APGAR	<u>A</u> tmung, <u>P</u> uls, <u>G</u> rundtonus, <u>A</u> ussehen und <u>R</u> eflexe
chrom.	chromosomal
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1 $\beta$	IL-1b-Rezeptors
IL-1ra	IL-1-Rezeptor-Antagonist
Gage	Größeneinheit der Punktionsnadel
$\mu$ l	Mikroliter ( $10^{-6}$ )
max	Maximum
min	Minimum
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NT-Screening	Nackentransparenz-Untersuchung
pg	Picogramm ( $10^{-12}$ )
PGE, PGE $_2$	Prostaglandin
PROM	<u>p</u> remature <u>r</u> upture <u>o</u> f <u>m</u> embranes, vorzeitiger Blasensprung
prim.	primär
rpm	Drehzahl der Zentrifuge
SSW	Schwangerschaftswoche
ST	Standardabweichung
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor

# Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Stufen der intraamniotischen Infektion
- Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des IMMULITE ® Systems
- Abbildung 3: Interleukingehalt im Fruchtwasser zwischen der 15.-20. SSW bei 4 Feten mit einem Abort und 74 Feten mit normalem Outcome
- Abbildung 4: Zytokingehalt im Fruchtwasser zwischen der 15.-20. SSW bei 8 Feten mit einer Frühgeburt  $\leq 34$ . SSW und 273 Feten mit normalem Outcome
- Abbildung 5: Zytokingehalt im Fruchtwasser zwischen der 15.-20. SSW bei 9 Feten mit einer Frühgeburt  $> 34$ . SSW und  $< 37$ . SSW und 155 Feten mit normalem Outcome
- Abbildung 6: Interleukingehalt im Fruchtwasser zwischen der 15.-20. SSW bei 4 Feten mit Präeklampsien-Eklampsie und 69 Feten mit normalen Outcome

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Ermittelte Messbereiche für die Interleukine IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  am Immulite (DPC Biermann)
- Tabelle 2: Intra-Assay
- Tabelle 3: Inter-Assay
- Tabelle 4: Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 74 Fällen der Kontrollgruppe und 4 Fällen mit Aborten
- Tabelle 5: Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 273 Fällen der Kontrollgruppe und 8 Fällen mit Frühgeburten  $\leq$  34. SSW
- Tabelle 6: Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 155 Fällen der Kontrollgruppe und 9 Fällen mit Frühgeburten  $>$  34. SSW und  $<$  37. SSW
- Tabelle 7: Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 69 Fällen der Kontrollgruppe und 4 Fällen mit Präeklampsien-Eklampsie
- Tabelle 8: IL-6-Konzentrationen (in pg/ml) zwischen der 15. und 20. SSW für die gesamte Kontrollgruppe
- Tabelle 9: IL-8-Konzentrationen (in pg/ml) zwischen der 15. und 20. SSW für die gesamte Kontrollgruppe
- Tabelle 10: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (in pg/ml) zwischen der 15. und 20. SSW für die gesamte Kontrollgruppe

# 1. Einleitung

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden im Bereich der Geburtshilfe und der Neonatologie wichtige Fortschritte erzielt. Für Frühgeborene gibt es mittlerweile ermutigende therapeutische Perspektiven. Doch trotz aller medizinischen und technischen Fortschritte ist die Frühgeburt nach wie vor ein Hauptproblem in der Geburtshilfe.

Zahlreiche Studien über die Problematik der Frühgeburtlichkeit belegen, welche große Herausforderung die Frühgeburt für den heutigen Mediziner darstellt (Romero et al., 1988, 1991, 1998, Yoon et al., 2001). Frühgeborene leiden gehäuft an Erkrankungen der Lunge, des Intestinaltraktes und des zentralen Nervensystems. Dazu zählen das Atemnotsyndrom, bronchopulmonale Dysplasie, nekrotisierende Enterokolitis, intraventrikuläre Hämorrhagie und periventrikuläre Leukomalazie (Driscoll et al., 1982; Jensen et al., 1992).

Der vorzeitige Blasensprung und vorzeitige Wehen sind in etwa 70% der Fälle die Ursache einer Frühgeburt (Schneider et al., 2000). Auch wenn die Ätiologie als multifaktoriell beschrieben wird, scheint die Infektion doch in etwa 50% der Fälle eine ausschlaggebende Rolle zu spielen (Romero et al., 1988). Zudem haben neuere Studien Hinweise auf eine mögliche frühe Infektion während der Schwangerschaft ergeben, die jedoch bis wenige Wochen vor der Geburt nicht bemerkt wird (Hillier et al., 1993). Bei vorzeitigen Wehen ohne Blasensprung ist eine Fruchtwasserkultur nur in 13 bis 20% der Fälle positiv (Romero et al., 1988). Eine vorausgegangene Frühgeburt ist bei einer erneuten Schwangerschaft ein wichtiger Risikofaktor für eine Wiederholung (Cnattingius et al., 1999).

Droht eine Frühgeburt, kann sie nicht mehr abgewendet werden. Trotz verbesserter Präventionsarbeit und Schwangerenvorsorge bleibt die Morbiditäts- und Mortalitätsrate mit 70 % stets erhöht (Kramer et al., 1998). In Deutschland werden 6-7% (rund 50.000 Kinder) mit steigender Tendenz zu früh geboren (Kramer et al., 1998). In den Vereinigten Staaten sind sogar mehr als 12% aller Lebendgeburten pro Jahr Frühgeburten (McCormick et al., 1985). Zwischen 1982 und 2002 stieg die Frühgeburtenrate dort um 27% (Martin et al., 2003). Die Frühgeburt ist die Hauptursache für perinatale Mortalität und Morbidität (McCormick et al., 1985; Stjernquist et al., 1999; Hack et al., 2000).

In zahlreichen Studien wurde ganz klar ein Zusammenhang zwischen der Infektion, der Aktivierung des Immunsystems und vorzeitigen Wehen festgestellt (Galask et al., 1984; Romero et al. 1988). Das Immunsystem antwortet auf jede Infektion mit der Ausschüttung von Substanzen, die eine Reihe von entzündlichen Reaktionen hervorrufen, welche wiederum für die Auslösung einer Frühgeburt eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (Keller, 1994). Der Fetus soll auch für die entzündliche Reaktion und somit die Auslösung seiner eigenen Frühgeburt mitverantwortlich sein (Bessler et al., 2004).

Bei einer Fruchtwasserinfektion produzieren insbesondere die Entzündungszellen des Chorion und der Dezidua zahlreiche proinflammatorische Zytokine: Interleukin-1b (IL-1b), IL-6, IL-8 und den Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Romero et al., 1988; Keller, 1994). Sie sind körpereigene Substanzen, die von Lymphozyten, Makrophagen aber auch von nicht-immunologischen Zellen wie Endothelzellen produziert werden und eine wichtige Rolle bei der Steuerung der körpereigenen Abwehr spielen. Sie sind Botenstoffe und in der Lage, verschiedenste Funktionen menschlicher Zellen zu steuern. Diese Zytokine fördern die Synthese vom Prostaglandin PGE<sub>2</sub> und stimulieren die Rezeptoren von Oxytocin, wodurch die Wehen ausgelöst werden. Sie führen via Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zudem zu Veränderungen in der extrazellulären Matrix, was den Blasensprung auslöst (Goldenberg et al., 2005). Zytokine bestehen aus kleinen Peptiden, die auch als regulatorische Peptide bezeichnet werden. Die Bedeutung der meisten dieser Peptide ist im menschlichen Organismus noch ungeklärt (Keller, 1994). Im Immunsystem bewirken sie unterschiedliche Prozesse: Man unterscheidet proinflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine.

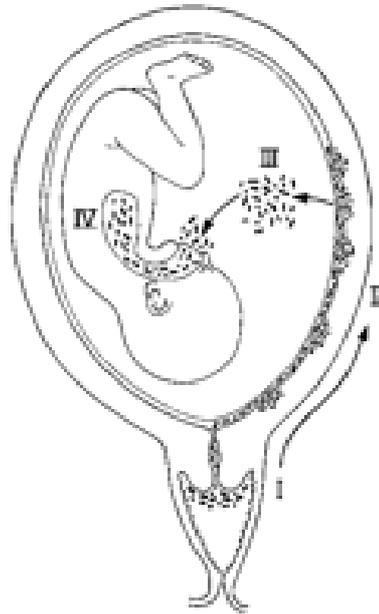
Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören insbesondere TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8; zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören insbesondere IL-10, IL-4 sowie IL-11. Je nach seinem Zytokin-Genotyp könnte er einem grösseren Frühgeburtsrisiko ausgesetzt sein. Das Vorkommen eines gewissen Allels des Antagonisten des IL-1 $\gamma$ -Rezeptors (IL-1ra) bei Feten spanischer Herkunft und eines gewissen Allels von IL-1 $\gamma$  bei Feten afroamerikanischer Herkunft steht in deutlichem Zusammenhang mit dem erhöhten Risiko eines vorzeitigen Blasensprungs (Nguyen et al., 2004). Desgleichen stellt bei einer Zwillingsschwangerschaft das Vorkommen des Allels 2 des IL-1 $\beta$  bei beiden Feten einen zusätzlichen Risikofaktor für eine Frühgeburt dar (de Craen et al., 2005). Diese Beobachtungen zu den fetalen

genetischen Faktoren sind unabhängig vom genotypischen Profil der Mutter.

Bereits 1988 untersuchten Romero et al. den Zusammenhang zwischen der Frühgeburt und intraamniotischer Besiedlung (Romero et al., 1988). Er definierte sie als das Auftreten einer amniotischen Zellkultur, ohne typische Symptome der Chorioamnionitis (Temperatur  $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , druckdolenter Uterus). Diese subklinische Infektion verursacht eine erhöhte Disposition für die Chorioamnionitis oder einen vorzeitigen Blasensprung. Um zunächst einen Zusammenhang zwischen einer intraamniotischen Besiedlung und dem Einsetzen der Geburt zu untersuchen, prüften Romero et al. 230 Patientinnen mit vorzeitigem Blasensprung im Zeitraum von 1985 bis 1987 (Romero et al., 1988). Es konnten 221 Fruchtwasserproben durch Amniozentesen gewonnen werden. 81 Patientinnen (35%) hatten eine Frühgeburt. Bei 48 (59,2%) dieser Patientinnen mit einer Frühgeburt konnte ein positiver mikrobieller Nachweis zum Zeitpunkt der Geburt geführt werden. 36 von diesen 48 Fruchtwasserproben wiesen bereits bei der Amniozentese eine positive Kultur auf. Das Auftreten von einer intraamniotischen Besiedlung war bei jenen Frauen signifikant häufiger vertreten, die eine Spontangeburt hatten, als bei denen mit eingeleiteter Geburt (75% versus 39%,  $p = 0.0004$ ). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass das Einsetzen der Geburt durch einen vorzeitigen Blasensprung öfter mit einer intraamniotischen Besiedlung verbunden ist.

Die Arbeitsgruppe von Romero differenziert zwischen 4 Stadien der subklinischen intraamniotischen Infektion (Abbildung 1). Das erste Stadium besteht in einer Änderung der vaginalen bzw. zervikalen Flora durch Bakterien wie Neisserien, die dann im Gebärmutterhals aufsteigen. Einige Formen der bakteriellen Vaginose werden zu dieser Stufe gezählt. Im zweiten Stadium haben die Bakterien Zugang zur Dezidua gefunden. Es kommt zur lokalen Deziduitis. Dringen die Erreger in Chorion und Amnion vor, können diese infiziert werden und zum Stadium 3 der intraamniotischen Infektion führen. Ein vorzeitiger Blasensprung ist nicht Voraussetzung für eine intraamniotische Infektion, da die Mikroorganismen auch intakte Eihäute überqueren können (Galask et al., 1984). In der Amnionhöhle haben die Erreger Zugang zum Fetus, indem dieser das Fruchtwasser aspiriert (Stadium 4). Daraus resultieren kongenitale Pneumonien, Otitiden, Konjunktivitiden und Omphalitiden. Ebenso können systemische Infektionen und Sepsis Folge der bakteriellen Kontamination sein.

**Abbildung 1:** Stufen der intraamniotischen Infektion (Romero et al., 2003)



Phasen der ascendierenden intrauterinen Infektion:

**Phase I** Milieuänderung der vaginalen und/oder zervikalen Flora durch Bakterien, Erstmanifestation als z.B bakterielle Vaginose

**Phase II** Bakterieller Zugang zur Dezipua (Dezipuitis)

**Phase III** Intraamniotische Infektion (Amnionitis), bei Besiedlung fetaler Gefäße liegt eine Choriovaskulitis vor

**Phase IV** Aspiration der Erreger durch den Fetus (Auslöser von kongenitalen Pneumonien, Sepsis bei Eindringen in die fetale Blutbahn)

Ghidini et al. erkannten 1997 ebenso einen Zusammenhang zwischen einer subklinischen intraamniotischen Infektion und der Frühgeburtlichkeit (Ghidini et al., 1997). Er und seine Mitarbeiter testeten in einer retrospektiven Studie die Hypothese, ob IL-6 im letzten Trimenon der Schwangerschaft bei drohenden Frühgeburten erhöht ist. Dazu wurde eine Kohortenstudie entworfen, um Fruchtwasser-Konzentrationen von IL-6 in der 14-20. SSW von zwei verschiedenen Frauengruppen zu vergleichen. Nämlich jene, die eine Frühgeburt von  $\leq 34$  SSW hatten (n=13) und einer Kontrollgruppe (n=166). Eingeschlossen wurden Schwangerschaften ohne Hinweise auf strukturelle oder chromosomale Anomalien oder mütterliche Erkrankungen, die zur Frühgeburt führen können (n = 179). Ebenso wurden Zwillingsschwangerschaften ausgeschlossen. Es gab eine Korrelation

zwischen amniozytären IL-6 Werten in der 15.-20. SSW und der Frühgeburtlichkeit. Frauen mit einer Frühgeburt vor der 34. SSW hatten signifikante IL-6 Erhöhungen im Fruchtwasser (570 pg/ml versus 330 pg/ml,  $p < 0,0001$ ). Diese Frauen waren vor allem Afroamerikanerinnen (50% versus 12%,  $p = 0,004$ ). Die Kinder hatten ein Gewicht oftmals unter der zehnten Perzentile verglichen mit den Kindern aus der Kontrollgruppe (31% versus 7%,  $p = 0,02$ ). Dabei gab es keine Korrelation zwischen Geburtsgewicht der Frühgeborenen und der IL-6-Konzentration im Fruchtwasser. Es wurde geschlussfolgert, dass erhöhte IL-6-Konzentrationen im Fruchtwasser von der 15.-20. SSW ein Risiko für Frühgeburtlichkeit aufdecken können.

Yoon et al. untersuchten in einer weiteren retrospektiven Studie, wie häufig und klinisch bedeutsam eine intraamniotische Inflammation bei Patientinnen mit Frühgeburt und ohne vorzeitigem Blasensprung ist (Yoon et al., 2001). Dazu wurde bei 206 Patientinnen eine Amniozentese durchgeführt, die keinen Hinweis auf einen vorzeitigen Blasensprung aufwies. Das Fruchtwasser wurde anschließend auf aerobe und anaerobe Bakterien sowie auf Mykoplasmen untersucht. IL-6-Werte  $> 2,6$  ng/ml im Fruchtwasser bei Patientinnen mit negativen Bakterienkulturen dienten zum Nachweis einer Immunreaktion. Es wurde beobachtet, dass eine intraamniotische Inflammation ohne Erregernachweis weit häufiger (21%) auftrat, als eine intraamniotische Infektion (10%). Eine spontane Frühgeburt vor der 37. SSW trat häufiger bei Patientinnen mit einer intraamniotischen Inflammation auf als bei jenen mit einer negativen Kultur ohne Entzündung (98% vs. 35%;  $p < 0,001$ ). Patientinnen mit einer intraamniotischen Entzündung hatten ein ungünstigeres Outcome als Patientinnen mit einer negativen Kultur und ohne intraamniotische Entzündungszeichen. Dazu zählten die klinisch und histologisch nachgewiesene Chorioamnionitis, die Funisitis, frühzeitige Frühgeburten und bedeutsame Neugeborenenmorbiditäten. Insgesamt hatte 1/3 der Patientinnen mit einer intraamniotischen Entzündung bzw. Infektion eine Frühgeburt (32%; 65/206 Frauen) und ein erhöhtes Risiko für postnatale Komplikationen.

Wenstrom und Mitarbeiter versuchten in einer weiteren Studie den Anteil der Aborte zu bestimmen, der sich durch hohe IL-6-Werte im Fruchtwasser detektierte (Wenstrom et al., 1996). Dabei griffen sie auf eine Bank mit Fruchtwasser- und Serenproben zurück, die er von Frauen im zweiten Trimenon von 1988 bis 1995 ( $n=11.971$ ) gewonnen hatte. Er analysierte jene Proben auf IL-6 Werte, bei denen sich herausstellte, dass die Frauen 30 Tage nach der Amniozentese einen

Spontanaborte erlitten (n=66). Ausgeschlossen wurden Aborte mit Aneuploidien. Als Kontrollgruppe dienten 66 Frauen, die sich in Bezug auf mütterliches Alter bzw. Gestationsalter glichen und ebenso eine Amniozentese erhielten. In Abort- und Kontrollgruppe ähnelten sich die IL-6-Werte im Serum. Jedoch waren in einigen Fruchtwasserproben der Abortgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe die Werte für IL-6 erhöht. In acht Fällen waren die Werte besonders auffallend hoch ( $\geq 3$  SD bzw.  $\geq 2,5$  ng/ml). Nach Ausschluss dieser Proben waren der Mittel- und Wertebereich zwischen beiden Gruppen vergleichbar. Zwölf Prozent (8/66) der Fälle und drei Prozent (2/66) der Kontrollen hatten IL-6-Werte über oder gleich 2,5 ng/ml. Obwohl eine allgemeine Korrelation von IL-6 zwischen mütterlichem Serum und Fruchtwasser festzustellen war, wäre nur eine der acht Proben mit besonders erhöhtem IL-6 durch erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 identifiziert worden. Aus den Analysen wurde geschlossen, dass sich aus dieser unselektierten Gruppe mit postamniozytären Aborten eine intrauterine Entzündung in nur zwölf Prozent der Fälle ermitteln ließ. Diese Entzündung war nur lokal nachzuweisen und konnte nicht durch Untersuchungen im Serum identifiziert werden.

Diese aufgezählten Studien zeigen, dass die intraamniotische Inflammation als Ursache für die Frühgeburtlichkeit bzw. den Abort einen wichtigen Faktor darstellt (Romero et al., 1988, Yoon et al., 2001, Ghidini et al. 1997). Jedoch ist bis heute eine möglichst frühzeitige Detektion dieser Inflammationsreaktion sehr schwierig. Mediatoren der Entzündung sind Interleukine bzw. Zytokine. Die Frühgeburt bleibt eine heterogene Pathologie, bei der mehrere verschiedene Prozesse sich gegenseitig verstärken. Der Nachweis von genetischen Faktoren in Zusammenhang mit dem Polymorphismus der Zytokine beweist, dass eine gewisse individuelle Empfänglichkeit für die Entzündungsmechanismen, die zu einer Frühgeburt führen, besteht (Bessler et al., 2004). Das Auslösen dieser Kaskadenreaktion kann die Folge jeglicher Form von Stress und insbesondere einer Entzündung sein (Keller, 1994). Zurzeit stellt man fest, dass der Fetus selber eine aktive Rolle in der Ereignisfolge von entzündlichen Vorgängen spielen kann (Bessler et al., 2004). Sein Genotyp wird in einem speziellen Kontext zu einem entscheidenden Faktor oder Kofaktor (Nguyen et al., 2004).

## 2. Herleitung der Aufgabenstellung

Zahlreiche Studien belegen den Zusammenhang zwischen dem Auslösen einer inflammatorischen Kaskade und der Frühgeburtlichkeit sowie des Abortes und der Präeklampsie/Eklampsie (Romero et al., 1988; Kupferminc et al., 1996; Ghidini et al. 1997; Yoon et al, 2001). Jedoch ist bis heute eine frühzeitige Detektion dieser Inflammationsreaktion sehr schwierig. Nicht-invasive Methoden zur Frühgeburtendiagnostik sind aufwändig, umfangreich und oft nutzlos (Schneider et al., 2000). Aufgabe dieser prospektiven Studie ist die Bestimmung der Fruchtwasserkonzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  in der 15.-20. SSW. Dabei soll untersucht werden, ob diese Interleukine bereits zum Zeitpunkt der Amniozentese in der Routinevorsorge für Aborte, Frühgeburten und Präeklampsien-Eklampsie erhöht gemessen werden. Es gilt herauszufinden, ob die Bestimmung von Zytokinen im Fruchtwasser nach unauffälliger Amniozentese und unauffälliger Schwangerschaft einen Vorhersagewert von o.g. auffälligen Outcomes haben kann.

Häufig wurden Zytokine von Amniozentesen aus dem letzten Trimenon oder kurz vor dem Auftreten der Frühgeburt oder des Abortes quantifiziert (Ghidini et al., 1997, Romero et al., 1988). Dass zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Zytokinerhöhung im Fruchtwasser vorliegt, ist plausibel und bereits gezeigt worden (Hillier et al., 1993). Kann eine intraamniotische Infektion auch schon von gewonnenen Fruchtwasserproben aus der 15.-20. SSW durch erhöhte Interleukinwerte aufgedeckt werden?

Wenn gezeigt werden kann, dass die untersuchten Interleukine nützliche Marker für die Frühgeburt darstellen, wie verhalten sich die Interleukine bei anderen Pathologien in der Schwangerschaft? Durch vorgegebene Ausschlusskriterien fällt ein erheblicher Anteil, z.B. Schwangerschaften mit Aborten und Präeklampsien, aus den Studien der Frühgeburten weg. Interessant sind daher die prospektiven Ansätze dieser Studie, die zusätzlich Zytokinmessungen von Aborten und Präeklampsien mit einer Kontrollgruppe vergleichen. Die Zytokine der Kontrollgruppe stammen von unauffälligen Schwangerschaften, die von 2003 bis 2004 in der Pränataldiagnostik der Charité untersucht wurden. Dies ist in diesem Maße noch nicht untersucht worden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Studiendesign

Die Studie wurde an 385 Schwangeren, die zur pränatalen Diagnostik in die Charité kamen, in der Zeit von August 2003 bis Dezember 2004 prospektiv durchgeführt. In der Abteilung für Pränatale Diagnostik wurde wöchentlich Fruchtwasser von ca. 10 Patientinnen gewonnen. Davon waren nicht alle Patientinnen bereit an der Studie teilzunehmen. Vor der schriftlichen Einwilligung wurden alle Frauen darauf hingewiesen, dass für die Durchführung der Studie mehr Fruchtwasser entnommen wird als routinemäßig üblich. Die Frauen, die sich bereit erklärten an der Studie teilzunehmen, gaben dazu ihr schriftliches Einverständnis. Nach gründlicher Aufklärung und Einwilligung wurde das Fruchtwasser auf folgende Zytokine untersucht: IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ .

Eine vorausgegangene geburtshilfliche Anamnese betraf das Auftreten von Frühgeburten, Schwangerschaftskomplikationen, erfolgte Eingriffe an der Zervix, das Raucherverhalten, die Frage nach dem Grund der Amniozentese sowie zuvor durchgeführte Amniozentesen (bis 12 Monate).

Weiterhin wurden Daten zum errechneten Entbindungstermin bzw. gewünschten Entbindungsort erhoben. Allen Patientinnen wurde ein Antwortbogen mitgegeben, auf dem sie nach der Geburt Fragen beantworten und diesen wieder zurücksenden sollten. Außerdem wurden Daten über prä- und perinatale Komplikationen und das Geschlecht abgefragt. Nach Erhalt des Antwortbogens konnten insgesamt 307 Fälle ausgewertet werden. 78 Frauen schickten den Antwortbogen nach der Geburt ihrer Kinder nicht zurück und konnten telefonisch nicht mehr erreicht werden. Die Zustimmung für diese Studie erfolgte durch die Ethikkommission der Humboldt Universität Berlin.

### **3.2. Probandenauswahl**

Das Untersuchungskollektiv bestand aus Patientinnen, die sich zur Vorsorge in die Pränatale Diagnostik der Charité Berlin begeben hatten. Um ihnen die Studie verständlich zu machen, erhielten sie die Möglichkeit, ein Informationsblatt über die Studie zu lesen.

Einschlusskriterien:

- Schwangerschaften zwischen der 15. und 20. SSW
- Einlingsschwangerschaft
- Klar gewonnenes Fruchtwasser ohne Blutbeimischung

Ausschlusskriterien:

- Vorausgegangene Amniozentese während der jetzigen Schwangerschaft oder 12 Monate zuvor
- Maternale Erkrankungen
- Auffälliger Ultraschallbefund

### **3.3. Fruchtwassergewinnung**

Die Amniozentese wurde zwischen der 15. und 20. Schwangerschaftswoche durchgeführt bei bestehenden Indikationen. Zu den Indikationen gehören:

- Schwangere, die älter als 35 Jahre sind
- Auffälliger Triple Test bzw. NT-Screening
- Belastete Familienanamnese (zum Beispiel Erbkrankheiten bei bereits geborenen Kindern)
- Hinweise auf fetale Fehlbildungen, die durch vorausgegangene Ultraschalluntersuchungen festgestellt worden sind.
- Eigener Wunsch

Unter Ultraschallkontrolle wurde mit einer 20 Gage Punktionsnadel eine Fruchtwasserprobe entnommen. Dies war 2003 Standard in der Pränatalmedizin. Die Punktionsnadel wurde durch die Bauchdecke in die Amnionhöhle unter

Ultraschallsicht eingeführt. Anschließend wurde eine Fruchtwasserprobe von ca. 20 ml entnommen.

### **3.4. IMMULITE®-System**

Als gemeinsamer Reaktionsraum dienen bei diesem System Röhrchen, in denen mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Polysteren - Kugeln vorliegen. Hier binden die Antigene der Interleukine und rotieren dann mit 8500 Umdrehungen/ min um die eigene Achse. Durch diese Rotation wird überschüssige Flüssigkeit in ein Ausguss – Kompartiment aufgefangen. Dadurch kommt es annähernd zur vollständigen Trennung von Waschflüssigkeit und Antigen-Antikörper-Komplex, was für eine hohe Präzision des Assays führt. Die ständige Bildung eines instabilen Zwischenproduktes ermöglicht bei andauernder Lichtemission mehrere Messungen, welches die Messgenauigkeit verbessert.

### **3.5. Zytokinmessung**

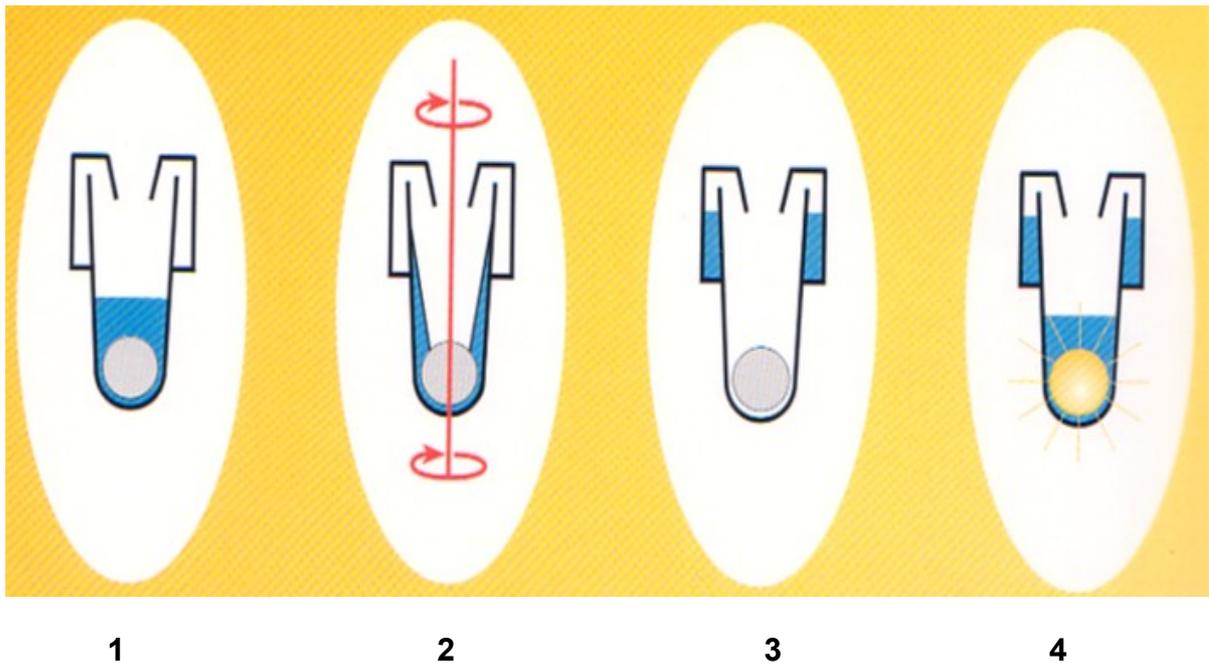
Für die Zytokinmessung wurden 5 ml Fruchtwasser 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abpipettiert und bei -86°C eingefroren. Innerhalb der nächsten 14 Tage erfolgte die Zytokinbestimmung. IL-6, IL-8, und TNF- $\alpha$  wurden aus Fruchtwasserproben mittels sequentiellm Festphasen-Chemiluminiszenz-immunometrischem Assay am IMMULITE ® der Firma Biermann gemessen (Abbildung 2).

Die quantitative Bestimmung der Interleukinkonzentrationen erfolgte nach dem Prinzip der Sandwich-Elisa-Methode mit einem Festphasen- Chemiluminiszenz - Assay. Dazu wurde das Fruchtwasser in Röhrchen mit Polysteren-Kugeln pipettiert. Auf den Polysteren-Kugeln befinden sich monoklonale Antikörper, die als feste Phase dienen. Bestimmte Epitope der Interleukine binden mit diesen monoklonalen Antikörpern. Nach dem Fruchtwasser wurde ein polyklonaler, vom Hasen gewonnener Antikörper dazugegeben, der wiederum enzymbehaftet ist.

Die Inkubation erfolgte zunächst bei einer Temperatur von 37°C (1). Anschließend rotierte die Testeinheit während des Waschvorgangs bei 8500 Umdrehungen/min um die eigene Achse (2). Im folgenden Waschvorgang wurden der noch nicht gebundene Überstand und alle störenden Substanzen in einem Kragen aufgefangen und entfernt (3). Der letzte Schritt und somit die Signalentwicklung entstand mit Hilfe eines stark sensitiven Chemilumineszenzsubstrats, dem

Adamantylidioxetanphenylphosphat (ADPP 2-). In einer zehn Minuten dauernden Inkubationszeit zerfällt durch enzymkatalysierte Dephosphorylierung das ADPP 2- in ein instabiles ADP-. Dabei trat eine Lichtemission auf, die direkt proportional zu den Interleukin Konzentrationen der Probe ist. Die Messbereiche für die Interleukine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  werden in der Tabelle 1 zusammengefasst.

**Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung des IMMULITE® Systems



Phasen zur Bestimmung der Interleukinkonzentration nach dem Prinzip der Sandwich-Elisa-Methode:

**Schritt 1:** Epitope der Interleukine binden mit monoklonalen Antikörpern auf der Polystyren-Kugel, anschließend Zugabe eines polyklonalen enzymbehafteten Antikörpers

**Schritt 2:** Rotation bei 8500 Umdrehungen/min

**Schritt 3:** Auswaschung des nicht gebundenen Überstandes

**Schritt 4:** Signalentwicklung durch ADPP 2- Zerfall und Lichtemission

**Tabelle 1:** Ermittelte Messbereiche für die Interleukine IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  am Immulite (DPC Biermann)

Interleukine	Messbereich
IL-6	2,0 – 1000 pg/ml
IL-8	2,0 – 7500 pg/ml
TNF- $\alpha$	1,7 – 1000 pg/ml

Durch die enzymgetriggerte Chemilumineszenz wird die Emission um das 100-fache im Vergleich zu herkömmlichen Systemen erhöht und ermöglicht dadurch eine höhere Sensitivität. Es wurden 100  $\mu$ l Probenmenge benötigt, um die Bestimmung durchführen zu können.

### 3.6. Intra- und Interassay

Vor jeder neuen Kitcharge oder alternativ alle zwei Wochen wurde diese mittels Kalibratoren geeicht. Um systematische Fehler und die Präzision der Methoden zu überprüfen, wurden der Intra- und Interassay bestimmt. Ein von der Firma angegebener Variationskoeffizient wurde zur eigenen Kontrolle in unserem Labor verglichen.

**Tabelle 2:** Intra-Assay

	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$ (DPC)
<b>Anzahl der Proben</b>	n= 20	n = 20	
<b>Variationskoeffizient</b>	4,53%	3,60%	3,5%
<b>Mittelwert</b>	470 pg/ml	594 pg/ml	34,0 pg/ml
<b>Streubereich (<math>\pm 2s</math>)</b>	427- 513 pg/ml	551-637 pg/ml	31,6-36,4 pg/ml

DPC – von der Firma DPC Biermann erstellter Intra-Assay

**Tabelle 3:** Inter-Assay

	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$ (DPC)
<b>Anzahl der Proben</b>	n=13	n=14	
<b>Variationskoeffizient</b>	9,1%	7,8%	5,8%
<b>Mittelwert</b>	463 pg/ml	536 pg/ml	33,0 pg/ml
<b>Streubereich (<math>\pm 2s</math>)</b>	379- 547 pg/ml	452- 620 pg/ml	29,2-36,8 pg/ml

DPC – von der Firma DPC Biermann erstellter Inter-Assay

Der Streubereich von 2s und der ermittelte Variationskoeffizient lagen in den vorgeschriebenen Grenzen. Die Daten sind somit präzise und fehlerfrei analysiert worden.

### 3.7. Kontrollgruppe und Fallgruppen

- Kontrollgruppe: 273 Schwangere mit Geburt nach der 37. SSW, die den Ein- und Ausschlusskriterien entsprechen
- Gruppe von Aborten: Definition: spontaner Verlust des Fetus mit einem Gewicht <500 g bis zur 24. SSW, n=4
- Gruppe von Frühgeborenen: Definition: Geburt vor der 37. SSW mit Ausschluss von chromosomalen Veränderungen, Präeklampsien und iatrogenen Frühgeburten; Geburten, bei denen entweder ein vorzeitiger Blasensprung oder vorzeitige Wehen auftraten, n=17
- Gruppe mit Präeklampsien und Eklampsie: Definition: hypertensive Schwangerschaftserkrankung mit einem initial gemessenen systolischen Blutdruck über 160 mmHg sowie einem diastolischen Blutdruck über 90 mmHg mit einer Proteinurie ( $\geq 300\text{mg}/24\text{h}$  oder  $100\text{ mg}/\text{dl}$  im Urinstix), n=3; sowie zusätzlich mit dem Auftreten von fokalen neurologischen Ausfällen und Konvulsion in dem klinischen Bild der Eklampsie, n=1

### **3.8. Datenauswertung**

Erstmalig wurden in unserer Klinik Kontrollwerte (n=273) für die Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  erstellt. Nachdem alle Gruppen eingeteilt wurden, konnte somit jede Fallgruppe mit einer eigens erstellten Kontrollgruppe verglichen werden. Um die Gruppen untereinander besser vergleichen zu können, wurden sie für die demographischen und klinischen Daten verglichen. Die Fälle mit signifikant unterschiedliche Daten wurden aussortiert. Die Auswertung der Interleukine ist damit unabhängig von den demographischen und klinischen Daten der Patientinnen. Es erfolgt ein Vergleich beider Gruppen bezüglich des Gestationsalters zum Zeitpunkt der Amniozentese, des Alters der Mutter, der Parität, der vorausgegangenen Aborte und Interruptiones, der vorausgegangenen Konisationen, des Raucherverhaltens und des Geschlechts des Kindes. Die Auswertung der Daten stützt sich dabei auf die vorhandenen Angaben in der jeweiligen Gruppe. Dies kann zu prozentualen Abweichungen bezogen auf die Gesamtzahl der Kontroll- oder Fallgruppe führen.

### **3.9. Statistik**

Die Messmethode des Festphasen-Chemiluminiszenz-immunometrischen Assays am IMMULITE® der Firma Biermann konnte durch die Bestimmung des Intra- und Interassays als präzise und fehlerfrei bewertet werden. Wir verwendeten zur statistischen Auswertung folgende Tests und Methoden: T-Test, Mann-Whitney-Test, Chi-Quadrat-Test, Mittelwert und Standardabweichung, Median, Minimalwert, Maximalwert. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  erachtet. Zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism 4.0 for Mac OS X verwendet.

## 4. Ergebnisse

Es erfüllten 385 Patientinnen die Ein- und Ausschlusskriterien und nahmen an der prospektiven Studie teil. 273 Patientinnen hatten einen normalen Ausgang der Schwangerschaft und konnten für die Auswertung als Kontrollgruppe herangezogen werden.

### 4.1. Anamnestische Daten des Patientenkollektivs

Bei Einschluss in die Studie wurde jeder Teilnehmerin ein Fragebogen betreffend des mütterlichen Alters, des Gestationsalters zum Zeitpunkt der Amniozentese, Parität, Aborten, Anzahl der Graviditäten, Interruptio, Anzahl der Punktionen bei bestehender Schwangerschaft sowie operativen Eingriffen an der Zervix ausgehändigt. Folgende Tabellen zeigen die Verteilungen.

### 4.2. Demographische und klinische Daten der Kontrollgruppe

Es konnten 273 Proben für die Kontrollgruppe gewonnen und ausgewertet werden. Das mediane Gestationsalter zur Amniozentese betrug in der Kontrollgruppe 17 SSW (Minimum = 15 SSW; Maximum = 20 SSW). Zusätzlich konnte ein medianes maternales Alter von 35 Jahren (Minimum = 19 Jahre; Maximum = 43 Jahre) berechnet werden. 33% des Kontrollkollektivs (n=82) waren Erstgebärende. In 25,9% der Fälle (n=64) war ein vorausgegangener Abort angegeben worden. 14 Frauen (5,8%) hatten zuvor eine Frühgeburt. Der Raucheranteil der Kontrollgruppe lag bei 11,6% (n=21). Insgesamt wurden 147 männliche Kinder geboren, das entspricht einem prozentualen Anteil von 53,8%. In der Mehrzahl der Fälle (188/68,8%) kamen die Frauen aufgrund der Altersindikation zur Amniozentese. 23 (8,6%) Frauen kamen mit Verdacht auf eine Trisomie 21 zur Amniozentese. 46 (17,2%) der Fälle waren auf eigenen Wunsch erfolgt.

**Tabelle 4:** Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 74 Fällen der Kontrollgruppe und 4 Fällen mit Aborten

Parameter	Kontrollgruppe (n=74)	Aborte (n=4)	p-Wert
Medianes maternales Alter, (Minimum - Maximum)	38 Jahre (35-43)	40,5 Jahre (37-45)	0,07
Medianes Gestationsalter bei der Amniozentese, (Minimum - Maximum)	17 SSW (15-19)	16,5 SSW (16-18)	0,991
Nullipara, n	23	1	0,797
Aborte in der Vorgeschichte, n	7	0	0,519
Spontane Frühgeburten in der Vorgeschichte, n	5	0	0,591
Vorausgegangene Konisationen, n	4	0	0,633
Raucherinnen, n	8	0	0,487
Männliche Kinder, n	39	2	0,571
Indikation der Amniozentese			
•Maternales Alter > 35 Jahre, n	70	3	0,119
•Verdacht auf Trisomie (nach auff. Triple Test bzw. NT-Screening), n	2	0	0,741
•Verdacht auf Toxoplasmosefrischinfektion, n	1	0	0,816
Andere (Wunsch, auff. Familienanamnese), n	1	0	0,816

SSW = Schwangerschaftswoche; auff.= auffällig; n = Anzahl; NT = Nackentransparenz

**Tabelle 5:** Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 273 Fällen der Kontrollgruppe und 8 Fällen mit Frühgeburten  $\leq 34$ . SSW

Parameter	Kontrollgruppe (n=273)	Frühgeburt $\leq 34$ . SSW (n=8)	p-Wert
Medianes maternales Alter, (Minimum - Maximum)	35 Jahre (19-43)	36 Jahre (32-38)	0,839
Medianes Gestationsalter bei der Amniozentese, (Minimum - Maximum)	17 SSW (15-20)	16 SSW (15-17)	0,159
Nullipara, n	82	3	1,0
Aborte in der Vorgeschichte, n	64	1	0,691
Spontane Frühgeburten in der Vorgeschichte, n	14	1	0,329
Vorausgegangene Konisationen, n	12	1	0,451
Raucherinnen, n	21	1	0,416
Männliche Kinder, n	147	5	0,628
Indikation der Amniozentese			
•Maternales Alter > 35 Jahre, n	188	4	0,362
•Verdacht auf Trisomie (nach auff. Triple Test bzw. NT-Screening), n	23	1	0,374
•Verdacht auf Toxoplasmosefrischinfektion, n	10	0	0,659
•Andere (Wunsch, auff. Familienanamnese), n	46	0	0,345

SSW = Schwangerschaftswoche; auff.= auffällig; n = Anzahl; NT = Nackentransparenz

**Tabelle 6:** Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 155 Fällen der Kontrollgruppe und 9 Fällen mit Frühgeburten > 34. SSW und < 37. SSW

Parameter	Kontrollgruppe (n=155)	Frühgeburt > 34. SSW und < 37. SSW (n=9)	p-Wert
Medianes maternales Alter, (Minimum - Maximum)	36 Jahre (35-41)	36 Jahre (35-41)	0,359
Medianes Gestationsalter bei der Amniozentese, (Minimum - Maximum)	16 SSW (15-19)	16 SSW (15-18)	0,967
Nullipara, n	40	3	0,618
Aborte in der Vorgeschichte, n	56	4	0,615
Spontane Frühgeburten in der Vorgeschichte, n	26	0	0,180
Vorausgegangene Konisationen, n	7	0	0,503
Raucherinnen, n	9	2	0,077
Männliche Kinder, n	121	8	0,441
Indikation der Amniozentese			
•Maternales Alter > 35 Jahre, n	130	5 (100)	0,394
•Verdacht auf Trisomie (nach auff. Triple Test bzw. NT-Screening), n	2	0	0,796
•Verdacht auf Toxoplasmosefrischinfektion, n	2	0	0,796
•Andere (Wunsch, auff. Familienanamnese), n	16	0	0,464

SSW = Schwangerschaftswoche; auff.= auffällig; n = Anzahl; NT = Nackentransparenz

**Tabelle 7:** Vergleich der demographischen und klinischen Daten zwischen 69 Fällen der Kontrollgruppe und 4 Fällen mit Präeklampsien-Eklampsie

Parameter	Kontrollgruppe (n=69)	Präeklampsie-Eklampsie (n=4)	p-Wert
Medianes maternales Alter, Jahre (Minimum - Maximum)	36 (17-43)	38 (34-41)	0,528
Medianes Gestationsalter bei der Amniozentese, SSW (Minimum – Maximum)	16 (15-20)	16,5 (16-18)	0,743
Nullipara, n	18	1	0,961
Aborte in der Vorgeschichte, n	18	0	0,191
Spontane Frühgeburten in der Vorgeschichte, n	4	1	0,139
Vorausgegangene Konisationen, n	3	0	0,670
Raucherinnen, n	21	2	0,413
Männliche Kinder, n	35	1	0,317
Indikation der Amniozentese			
•Maternales Alter > 35 Jahre, n	55	4	0,316
•Verdacht auf Trisomie (nach auff. Triple Test bzw. NT-Screening), n	3	0	0,670
•Verdacht auf Toxoplasmosefrischinfektion, n	0	0	
•Andere (Wunsch, auff. Familienanamnese)	11	0	0,386

SSW = Schwangerschaftswoche; auff.= auffällig; n = Anzahl; NT = Nackentransparenz

### 4.3. Aborte

6 Aborte (2,2%) waren aus dem Gesamtkollektiv zu ermitteln. In der Literatur werden sogar 15-31% der Schwangerschaften angegeben, die mit einem Abort enden (Warburton and Fraser, 1964). Zwei Aborte mussten aus der Fallgruppe ausgeschlossen werden. Dazu zählen ein iatrogen Abort aufgrund einer großen Theka-Luteumzyste sowie ein Abort mit blutig gewonnenem Fruchtwasser. In einem Fall (0,36%) trat der Abort 8 Tage nach der Amniozentese mit einsetzenden Blutungen auf. Dies ist der einzige Fall, der sicher im zeitlichen Zusammenhang mit der Amniozentese gesehen werden kann. Zwei Aborte, einer ein septischer Abort und ein weiterer aufgrund eines plötzlichen Herztodes, erfolgten beide vor der 24. SSW. In unserem Kollektiv waren keine früheren Aborte in der Anamnese angegeben. Keine der Frauen gab an zu rauchen. Diese Fallgruppe wird mit einer Kontrollgruppe von Schwangerschaften verglichen, die sich in bezug auf die demographischen und klinischen Daten nicht unterscheiden.

### 4.4. Frühgeburten

Insgesamt wurden 24 Frühgeburten verzeichnet, von denen 7 (29,2%) iatrogen verursacht waren. Dazu zählten pathologische CTGs oder Dopplerbefunde, Nabelschnurumwicklungen, das Amnioninfektionssyndrom sowie der schwangerschaftsinduzierte Hypertonus als Indikationen für die Sectiones. Die Prävalenz der Frühgeburten ohne iatrogenen Einfluss ( $n=17/273$ ) lag bei 6,2% und damit unter dem Durchschnittswert von 8,97% in Deutschland (Von der Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung veröffentlichte Zahlen für das Jahr 2003). Zum einen ist das Patientenkollektiv an einem Perinatalzentrum eines Universitätsklinikums eher nicht repräsentativ. Zum anderen liegen bereits Risikofaktoren vor, die mit einer engmaschigeren Kontrolle der Schwangeren einhergehen. 70,8% (17/24) aller Frühgeburten wurden ohne ärztliche Planung innerhalb der 26 – 37. SSW zur Welt gebracht. Von diesen Frauen gebaren 9 (53%) spontan. 10 (58,8%) der Frühgeburten waren durch vorzeitige Wehen eingeleitet und wiederum 7 (41,1%) der Frühgeburten begannen mit einem vorzeitigen Blasensprung. In 4 (23,5%) Fällen wurde durch eine Tokolyse versucht, die Geburt zu verzögern. Eine Frühgeburt war genetisch mit einer balancierten Inversion des Chromosoms 11 aufgefallen. Ein weiteres Frühgeborenes verstarb 1,15 h nach Geburt in der 26 SSW. Keine der Frauen hatte zuvor eine Amniozentese durchführen lassen. Auffällig in der Frühgeburtenengruppe war ebenfalls der hohe

Anteil an Raucherinnen. Rauchen ist ein wesentlicher Faktor, der eine Frühgeburt begünstigt (Cnattingius et al., 1999). Cnattingius et al. fanden zusätzlich heraus, dass Frauen, die während des 2. Trimesters das Rauchen begannen oder ihr Rauchverhalten änderten, stärker zu Frühgeburten tendierten. Für die Auswertung der Zytokine wurden die Frühgeburten in frühe ( $\leq 34$ . SSW) und späte ( $> 34$ . SSW und  $< 37$ . SSW) Frühgeburten unterteilt.

Verglichen mit der Kontrollgruppe ergibt sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf demographische und klinische Daten, so dass die gesamte Kontrollgruppe mit der frühen Frühgeburtengruppe ( $\leq 34$ . SSW) verglichen werden kann. Die Auswertung der späten Frühgeburten ( $> 34$ . SSW und  $< 37$ . SSW) erfolgt anhand von 155 Schwangerschaften aus der Kontrollgruppe.

#### **4.5. Präeklampsien – Eklampsie**

3 Präeklampsien (1,1%) und 1 Eklampsie (0,37%) sind aus dem gesamten Untersuchungskollektiv ermittelbar. Bekannt sind Prävalenzen von 5-10%. 60-70% aller Präeklampsien treten bei Nullipara auf (Haag und Mitarbeiter, 2003/04). In unserem Kollektiv betraf dies nur eine Patientin (25%). Bei einer Schwangeren mit einer Eklampsie wurde das Kind durch eine primäre Sectio mit einem Gewicht von 3580 g und einer Größe von 52 cm mit 38+5 SSW entwickelt. Das Kind war nach der Geburt gesund. Alle Schwangeren wurden 1-2 Wochen zuvor für die Geburtseinleitung in die Klinik eingewiesen. Die Gruppe der Präeklampsien/Eklampsien wird mit 79 Schwangerschaften aus der Kontrollgruppe verglichen.

## 4.6. Zytokingehalt der gesamten Kontrollgruppe

Es konnten 273 Proben für die Kontrollgruppe gewonnen und ausgewertet werden. Daraus ergaben sich folgende Werte der Zytokinkonzentrationen:

### 4.6.1. Interleukin-6

**Tabelle 8:** IL-6-Konzentrationen (pg/ml) zwischen der 15. und 20. SSW für die gesamte Kontrollgruppe

IL-6	Gestationsalter bei Amniozentese in SSW					
	15.	16.	17.	18.	19.	20.
Anzahl	21	101	87	40	10	6
Minimum	4,9	20,7	36,6	37,1	80,1	48,5
Maximum	1681	2620	1937	1624	920	231
Median	339	255	206	236	151	197
Perzentile 25%	174	115	101	137	88,4	97,8
75%	698	429	405	538	277	231

Es liegt keine Normalverteilung vor. Ebenso besteht kein signifikanter Unterschied der IL-6-Werte für die einzelnen Schwangerschaftswochen ( $p > 0,05$ ). Der ermittelte Messbereich beträgt 4,9 pg/ml bis 2620 pg/ml.

In Abhängigkeit zur Anzahl der Paritäten lässt sich kein signifikanter Zusammenhang der Interleukinkonzentrationen feststellen.

### 4.6.2. Interleukin-8

**Tabelle 9:** IL-8-Konzentrationen (pg/ml) zwischen der 15. und 20. SSW für die gesamte Kontrollgruppe

IL-8	Gestationsalter bei Amniozentese in SSW					
	15.	16.	17.	18.	19.	20.
Anzahl	22	106	89	40	10	6
Minimum	37,1	36,2	55,1	75,6	134	121
Maximum	1607	3542	4498	5843	948	841
Median	446	418	384	535	239	561
Perzentile 25%	222	203	197	296	197	142
75%	884	929	723	1213	663	809

Es liegt keine Normalverteilung vor. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Schwangerschaftswochen liegt nicht vor ( $p > 0,05$ ). Der Messbereich beträgt: 36,2 pg/ml – 5843 pg/ml. Auch hier liegt keine statistische Differenz in Abhängigkeit zur Parität vor.

#### 4.6.3 TNF- $\alpha$

**Tabelle 10:** TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (pg/ml) zwischen der 15. und 20. SSW für die gesamte Kontrollgruppe

TNF- $\alpha$	Gestationsalter bei Amniozentese in SSW					
	15.	16.	17.	18.	19.	20.
Anzahl	21	40	62	35	10	5
Mittelwert	16,3	20,2	18,7	19,6	18,7	18,9
Standardabweichung	3,80	4,15	3,46	3,95	3,37	4,41

Es liegt eine Normalverteilung vor. Zwischen der 15. und 16. sowie der 15. und 18. SSW konnte ein signifikanter Unterschied der gemessenen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen bestimmt werden. Es besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den gemessenen Schwangerschaftswochen. Der Messbereich liegt zwischen 8,0 pg/ml und 28,2 pg/ml.

## 4.7 Zytokingehalt bei Spontanaborten

### 4.7.1 Interleukin-6

Die mediane IL-6-Konzentration betrug 242,8 pg/ml (Minimum = 37,2 pg/ml; Maximum = 466 pg/ml). Der Median von IL-6 der Aborte liegt im Vergleich zum Median der Kontrollgruppe niedriger (IL-6: Median der Kontrollgruppe 256,5 pg/ml, Minimum = 36,6 pg/ml; Maximum = 2437 pg/ml). Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

### 4.7.2 Interleukin-8

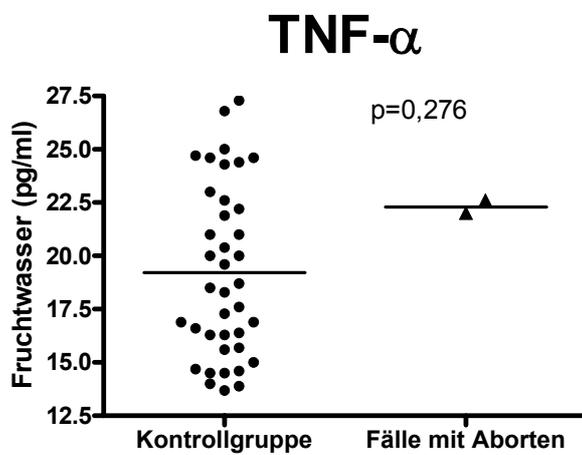
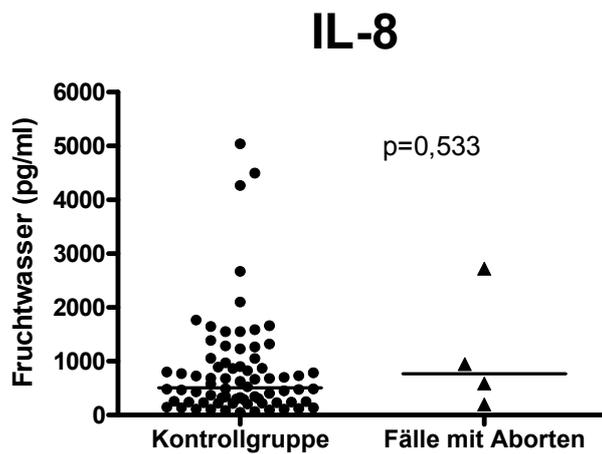
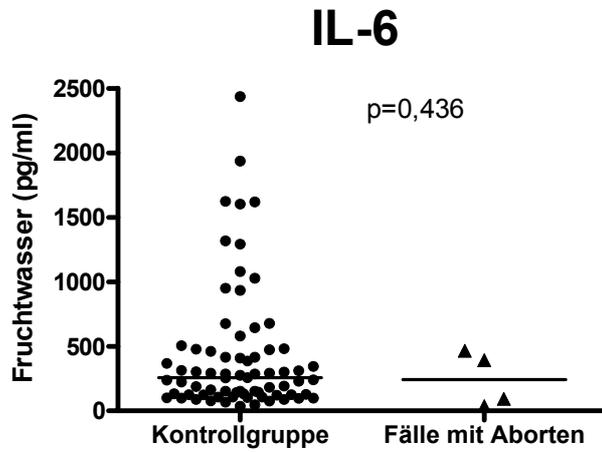
Für IL-8 ergab sich ein Median von 767 pg/ml (Minimum = 199 pg/ml; Maximum = 2723 pg/ml). Der ermittelte Median von IL-8 der Kontrollgruppe liegt mit 507,5 pg/ml (Minimum = 54,8 pg/ml; Maximum = 5041 pg/ml) deutlich unter dem Median aus der Gruppe mit spontanen Aborten. Aber auch hier kann keine signifikante Differenz errechnet werden.

### 4.7.3 TNF- $\alpha$

Für die Gruppe mit Spontanaborten konnten nur zwei TNF- $\alpha$ -Messungen gewonnen werden (22,00 pg/ml, 22,60 pg/ml). Der Mittelwert der Kontrollgruppe beträgt 19,22 pg/ml  $\pm$  4,02 pg/ml.

Die Verteilungen der Zytokine sind in den folgenden Abbildungen zusammenfassend dargestellt:

**Abbildung 3:** Zytokingehalt im Fruchtwasser zwischen der 15. - 20. SSW bei 4 Feten mit einem Abort und 74 Feten mit normalem Outcome



## 4.8 Zytokingehalt der Frühgeburten $\leq$ 34. SSW

### 4.8.1 Interleukin-6

Die mediane Konzentration betrug 131,5 pg/ml (Minimum = 16 pg/ml; Maximum = 332 pg/ml). Damit liegt der Median von IL-6 in der Gruppe der frühen Frühgeburten sogar unter dem Median der Kontrollgruppe mit 230 pg/ml (Minimum = 4,9 pg/ml; Maximum = 2620 pg/ml). Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollkollektiv ermitteln.

### 4.8.2 Interleukin-8

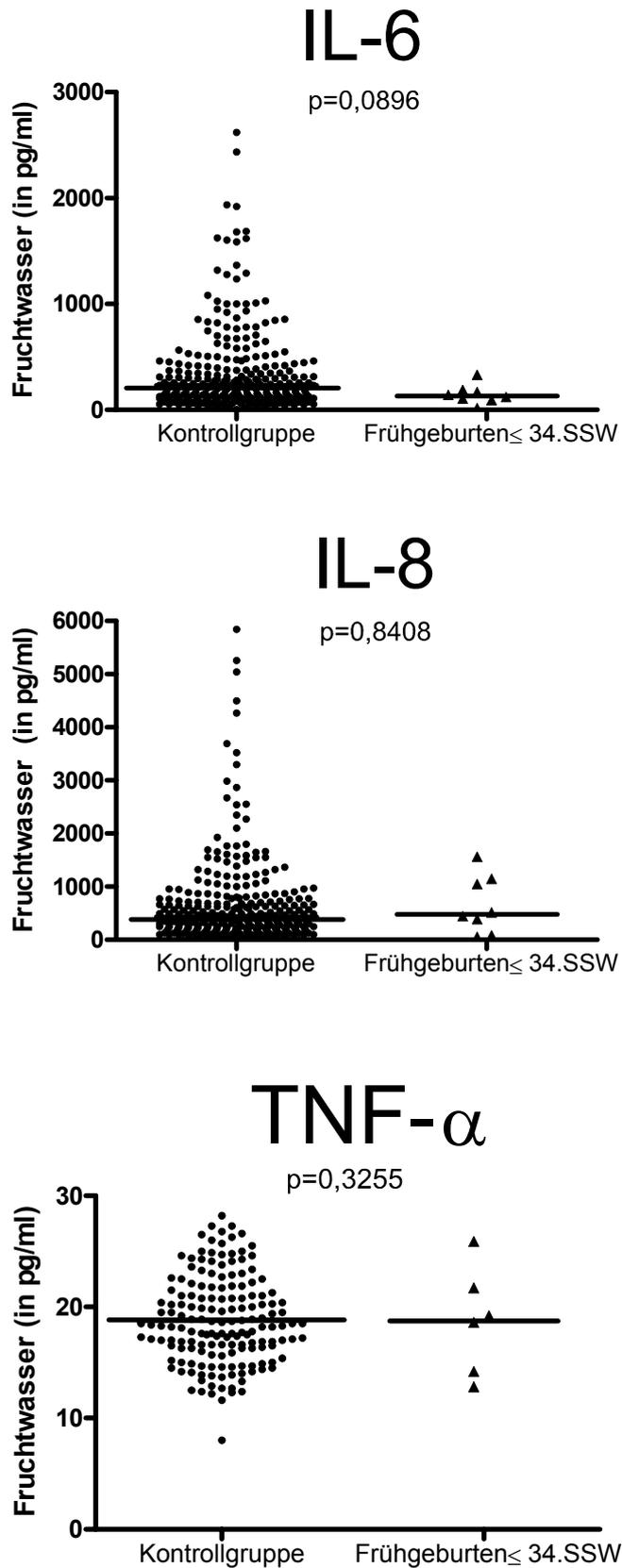
Der Median der IL-8-Messungen ergab 477 pg/ml (Minimum = 53,3 pg/ml; Maximum = 1564 pg/ml). Dieser liegt über der medianen IL-8-Konzentration der Kontrollgruppe (IL-8: Median Kontrollgruppe 434 pg/ml, Minimum = 36,2 pg/ml; Maximum = 5843 pg/ml). Beide Gruppen lassen sich hinsichtlich IL-8-Konzentrationen im Fruchtwasser nicht signifikant unterscheiden.

### 4.8.3 TNF- $\alpha$

Die mittlere Konzentration von TNF- $\alpha$  betrug 18,73 pg/ml  $\pm$  4,82 pg/ml. Für die Kontrollgruppe ergibt sich eine mittlere TNF- $\alpha$ -Konzentration von 18,8 pg/ml  $\pm$  3,93 pg/ml. Beide Mittelwerte sind nicht signifikant different.

Die Verteilungen der Zytokine sind in den folgenden Abbildungen zusammenfassend dargestellt:

**Abbildung 4:** Zytokingehalt im Fruchtwasser zwischen der 15. - 20. SSW bei 8 Feten mit einer Frühgeburt  $\leq 34$ . SSW und 273 Feten mit normalem Outcome



## 4.9 Zytokingehalt der Frühgeburten > 34. SSW und < 37. SSW

### 4.9.1 Interleukin-6

Die mediane Konzentration betrug 225 pg/ml (Minimum = 71,7 pg/ml; Maximum = 1856 pg/ml). Somit ergibt sich kein signifikanter Unterschied zum Median der Kontrollgruppe mit 231,0 pg/ml (Minimum = 20,7 pg/ml; Maximum = 1686 pg/ml).

### 4.9.2 Interleukin-8

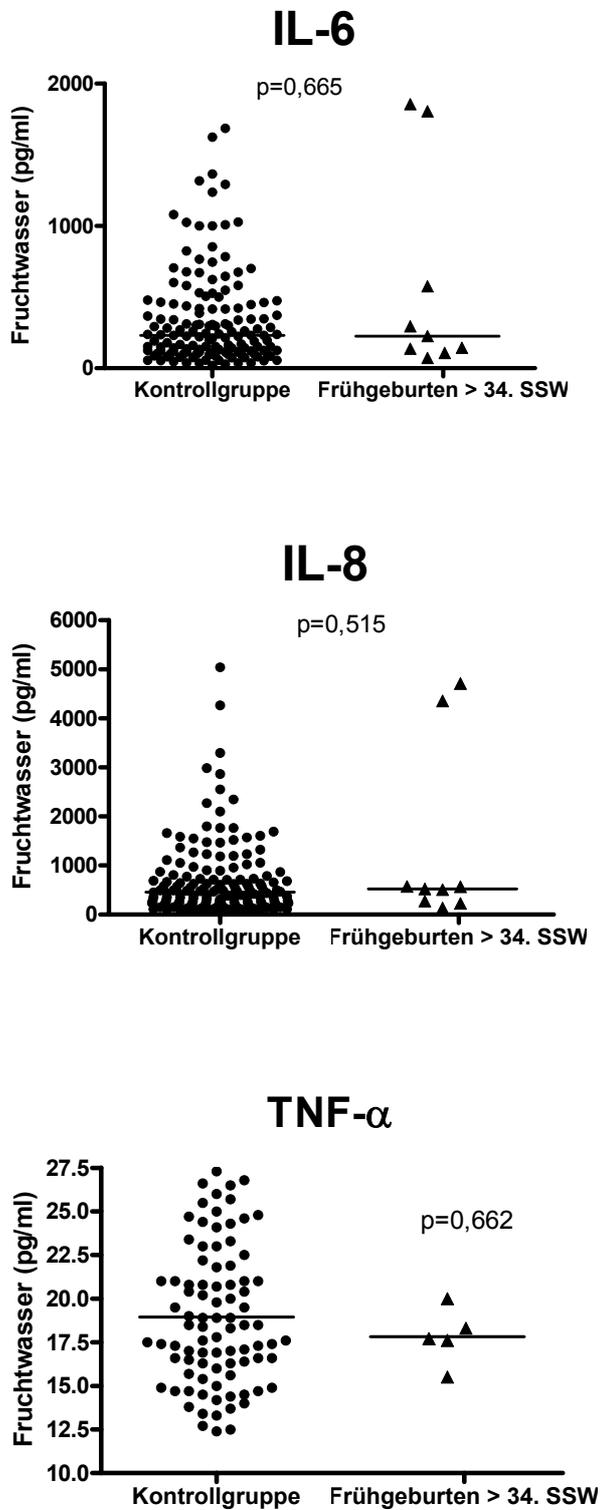
Für IL-8 ergab sich ein Median von 522 pg/ml (Minimum = 131 pg/ml; Maximum = 4714 pg/ml). Im Unterschied zum Kontrollkollektiv (Median Kontrollgruppe 458,5 pg/ml, Minimum = 36,2 pg/ml; Maximum = 5041 pg/ml) liegt der Median der späten Frühgeburten höher. Es ergibt sich aber keine signifikante Differenz .

### 4.9.3 TNF- $\alpha$

Die mittlere Konzentration von TNF- $\alpha$  ergab für die späten Frühgeburten 17,8 pg/ml  $\pm$  1,45 pg/ml. Die TNF- $\alpha$ -Messungen der späten Frühgeburten und der Kontrollgruppe sind nicht signifikant unterschiedlich (Mittelwert der Kontrollgruppe: 18,95 pg/ml  $\pm$  3,91 pg/ml, versus Mittelwert der späten Frühgeburten: 17,8 pg/ml  $\pm$  1,45 pg/ml,  $p=0,662$ ).

Die Verteilungen der Zytokine sind in den folgenden Abbildungen zusammenfassend dargestellt:

**Abbildung 5:** Zytokingehalt im Fruchtwasser zwischen der 15. - 20. SSW bei 9 Feten mit einer Frühgeburt > 34. SSW und < 37. SSW und 155 Feten mit normalem Outcome



## 4.10 Zytokingehalt bei Präeklampsien-Eklampsie

### 4.10.1 Interleukin-6

Der Median für IL-6 ergab für die Präeklampsien-Eklampsie 201 pg/ml (Minimum = 137 pg/ml; Maximum = 853 pg/ml). Damit liegt er unter den medianen IL-6-Konzentrationen der Kontrollgruppe (Median der Kontrollgruppe 287,0 pg/ml, versus Median der Präeklampsien-Eklampsie 201 pg/ml;  $p=0,865$ ). Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

### 4.10.2 Interleukin-8

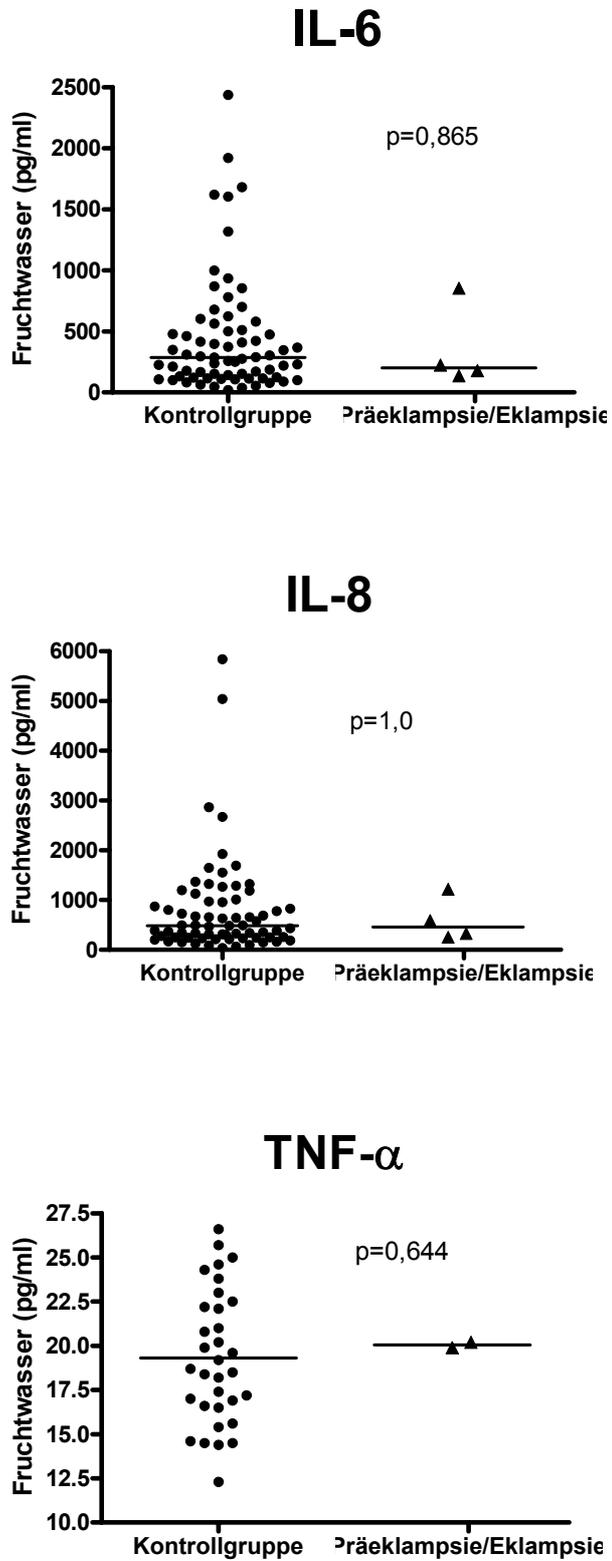
Die mediane IL-8-Konzentration betrug 457 pg/ml (Minimum = 253 pg/ml; Maximum = 1215 pg/ml). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (480 pg/ml; Minimum = 36,2 pg/ml; Maximum = 5843 pg/ml) liegt der Median der Gruppe mit Präeklampsien-Eklampsie nur minimal niedriger. Die ermittelten Mediane der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Präeklampsien-Eklampsie sind nicht signifikant verschieden ( $p=1,0$ ).

### 4.10.3 TNF- $\alpha$

Zwei TNF- $\alpha$ -Messergebnisse mit 20,2 pg/ml und 19,90 pg/ml wurden bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe beträgt 19,31 pg/ml  $\pm$  3,77 pg/ml. Doch kann daraus keine Auswertung erfolgen.

Die Verteilungen der Zytokine sind in den folgenden Abbildungen zusammenfassend dargestellt:

**Abbildung 6:** Zytokingehalt im Fruchtwasser zwischen der 16.-20. SSW bei 4 Feten mit Präeklampsien/Eklampsie und 69 Feten mit normalem Outcome



## 5. Diskussion

Die intrauterine Infektion wird postuliert als das initiale Ereignis für Frühgeburten wie auch für termingerecht entbundene Kinder (Romero et al., 1992; Wenstrom et al. 1997). Einige Autoren verweisen auf Zytokinbestimmungen wie IL-8 oder IL-6 aus dem Fruchtwasser, die zur Diagnostik der Frühgeburt oder dem Abort dienen können (Romero et al. 1988; Ghidini et al., 1997; Wenstrom et al. 2001). Wir konnten zeigen, dass IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Fruchtwasser zur Zeit der Amniozentese im Rahmen der präventiven Kontrolldiagnostik keine bestimmende Rolle als Frühmarker für das fetale Outcome zugeteilt werden kann. Alle Fruchtwasserproben der unterschiedlichen Fallgruppen – Aborte, Frühgeburten und Präeklampsien bzw. Eklampsie - zeigten in Hinblick auf IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  keine signifikante Differenz zu unserem Kontrollkollektiv.

### 5.1. Interleukine und Schwangerschaft

Bereits 1940 erkannte man den Zusammenhang zwischen von Bakterien produzierten Endotoxinen und dem Auftreten von Frühgeburten oder Aborten (Wenstrom et al., 1996, Romero et al., 1992, Zahl et al., 1943). Vermutet wird eine ascendierende Infektion mit Bakterien ausgehend von der Vagina oder der Zervix. Bereits in der Embryonalentwicklung spielen Zytokine eine wichtige Rolle. Im Tiermodell konnte von Murray et al. mRNA für IL-6 in Maus-Blastozysten kurz nach der Befruchtung nachgewiesen werden (Murray et al., 1990). Die mRNA wird dabei während der Follikelentwicklung und der Reifung der mütterlichen Dezidua ausgeschüttet. IL-6 wird von Epithelialzellen des Uterus gebildet und spielt eine wesentliche Rolle in der Angiogenese (Motro et al., 1990).

Norwitz et al. unterteilte die Aktivität des Uterus während der Schwangerschaft in 4 Phasen: Ruhephase, Phase der Aktivierung, Stimulation und Involution (Norwitz et al., 1999). Er untersuchte die Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Fruchtwasser zu der jeweiligen Phase und fand heraus, dass IL-6 und TNF- $\alpha$  zunächst ansteigen und während der Involution wieder abfallen. Beide Zytokine sind zur Zeit der Ruhephase niedrig konzentriert. IL-8-Konzentrationen sind in der 1. Phase der uterinen Aktivität hoch und fallen dann in den kommenden 2 Phasen ab. Erst zur letzten Phase steigt der IL-8-Spiegel wieder an. Unsere Zytokinmessungen

erfolgten in der 15.-20. SSW, welche in den meisten Fällen der Ruhephase entsprechen. Erst kurz vor der Geburt wandern weiße Blutzellen in das mütterliche Gewebe, Plazenta und fetales Gewebe (Thomson et al., 1999). Dabei spielen Mastzellen, Makrophagen und Neutrophile eine entscheidende Rolle, um die Geburt einzuleiten. All diese weißen Blutzellen sind in der Lage, Interleukine zu bilden (Saji et al., 2000). Interleukine wiederum aktivieren weitere weiße Blutzellen (Salamonsen et al., 2003), so dass ein sich verstärkender Kreislauf entsteht. IL-6 und TNF- $\alpha$  wurden dabei genauer untersucht und als wichtige Mediatoren während der Geburt eingestuft (Romero et al., 1998). Diese stimulieren Prostaglandine, die wiederum eine Stimulation der Gebärmutterkontraktionen bewirken und zur Einleitung der Geburt führen. Richani et al. fanden heraus, dass es während der Schwangerschaft zu einer Aktivierung des Komplementsystems durch Anaphylatoxine kommt (Richani et al., 2005). Sie vermuten eine erhöhte Abwehrbereitschaft des Körpers während der Schwangerschaft.

Je nach ethnischer Herkunft variiert die Inzidenz der Frühgeburten (Martin et al., 2003). Dies führt zur Aufstellung der Hypothese, dass ein genetischer Faktor wesentlichen Einfluss auf die Schwangerschaft und Frühgeburt hat (Bessler et al., 2004). Je nach dem individuellen genetischen Profil verhält sich das Ausmass einer Immunreaktion. Das ist auf Protein-kodierende und damit auch Zytokin-kodierende Allele zurückzuführen. Afroamerikanische Frauen weisen z.B. für IL-1b ein anderes genetisches Profil auf als Frauen kaukasischer Herkunft (Nguyen et al., 2004). Durch diese genetische Variante steigt das Risiko für Genitalinfektionen und somit auch für die Frühgeburt.

## **5.2. Interleukine bei Aborten**

Zytokinen wird eine wichtige Rolle für den Pathomechanismus des Abortes zugesprochen. So sind IL-6 und TNF- $\alpha$  wichtige Mediatoren für das Antiphospholipid-Syndrom (Carp et al., 2004). Das Antiphospholipid-Syndrom steht mit einem erhöhten Abortrisiko im Zusammenhang (Alijotas-Reig and Ferrer-Raventos, 2005). Zusätzlich können uterine Fehlbildungen für eine erhöhte Zytokinkonzentrationen im Fruchtwasser ursächlich sein (Carp et al., 2004). Zenclussen et al. untersuchten die Rolle der T-Zellen während der Schwangerschaft und besonders bei Aborten (Zenclussen et al., 2005). Zunächst wurde festgestellt, dass das mütterliche Immunsystem den Fetus tolerieren muss. Spezifische Th2-Zellen unterdrücken das Abwehrverhalten anderer Th1-Zellen. Jede T-Zelle

produziert dabei spezifische Zytokine, wie z.B. IL-4 oder IL-10 im Fall der antiinflammatorischen Th2-Zellen. Ein Wechsel von Th2-Zellen zu Th1-Zellen könnte dabei ein wichtiger Pathomechanismus im Bezug auf den Abort sein. Unsere Zytokine zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe einen wenn auch nicht signifikanten Anstieg von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ . Daraus kann jedoch kein Verhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen der Th1/Th2-Zellen, wie Zenclussen es empfiehlt, bestimmt werden. Von Linsingen et al. konnten einen Polymorphismus des IL-6 Genotyps bei wiederholten Aborten nachweisen (von Linsingen et al., 2005). Ob aus einem Genpolymorphismus eine gesteigerte Zytokinbildung resultiert, bleibt fraglich und wurde nicht von von Linsingen untersucht. Ihr Patientinnenkollektiv bestand zudem nur aus brasilianischen Frauen und ist mit unserem nicht vergleichbar. Wenstrom et al. verglich bei postamniozytären Aborten die IL-6-Konzentration im Fruchtwasser mit einer Kontrollgruppe ohne Spontanaborte (Wenstrom et al., 1996). Im Serum konnte kein Unterschied für IL-6 beobachtet werden. Zwölf Prozent (8/66) der Abort-Gruppe und drei Prozent (2/66) der Kontrollen hatten hohe IL-6 Werte über oder gleich 2,5 ng/ml im Fruchtwasser. Damit ist zwar eine erhöhte IL-6-Produktion für die Abort-Gruppe gezeigt worden, doch nur 12% der Aborte konnten durch die IL-6-Bestimmungen erkannt werden. Unsere Messungen ergaben für IL-6 eine mediane Konzentration von 242,8 pg/ml. Dabei wurde ein maximaler Wert von 466 pg/ml gemessen. IL-8 ist mit 767 pg/ml ebenso erhöht. Möglicherweise ist der Nachweis eines Wechsels der Th-Zellen im Serum geeigneter einen Abort zu detektieren. Dennoch stimmen unsere Ergebnisse mit der Theorie überein, dass es zu einer Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  im Fruchtwasser kommt (Zenclussen et al., 2005). Sollte ein erhöhtes Abortrisiko von einer Variation des Genotypes und nicht von der Zytokinkonzentration abhängig sein (von Linsingen et al., 2005), ist die genetische Untersuchung auf diesen Polymorphismus möglicherweise sinnvoller. Diese These würde die Variation der Messergebnisse in den vorliegenden Studien erklären. Auch Perni et al. fanden ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Spontanaborten bei einem genetischen Profil mit einem homozygoten Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten-Allel 1 (IL1RN\*1). Der IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) ist ein natürlicher Inhibitor von Interleukin-1 $\beta$ , welches eine proinflammatorische Immunantwort auslöst, in dem es an seinen Rezeptor bindet (IL-1 $\beta$ r). Der IL-1ra hat einen Polymorphismus mit 5 Allelen. Es ist bereits gezeigt worden, dass das Vorhandensein eines dieser Allele (IL1RN\*2) mit dem Auftreten von spontanen

Frühgeburten assoziiert ist (Genc et al., 2002, Witkin et al., 2003). Bei Vorhandensein von IL1RN\*2 kommt es zu einer proinflammatorischen Antwort durch IL-1 $\beta$ -Produktion. Dieses reduziert das Auftreten von Aborten im ersten Trimester (Perni et al., 2004).

Zuletzt sind die eher geringen Fallzahlen, bedingt durch den prospektiven Ansatz unserer Studie, die Ergebnisse zusätzlich schwer zu interpretieren.

### 5.3. Interleukine bei Frühgeburten

Als eine wesentliche Ursache für die Frühgeburt wird die intrauterine Infektion gesehen (Romero et al., 1992). Oft kann die bakterielle Besiedlung von Chorion und Amnion nicht ausreichend nachgewiesen werden. In nur 30-40% wurde von Romero und Mazor 1988 eine bakterielle Besiedlung des Amnions bei vorzeitigem Blasensprung gefunden (Romero und Mazor, 1988). Die allgemein bekannten Risikoscores, wie das Rauchverhalten, haben für die Detektion einer Frühgeburt mit einer Früherkennung von unter 50% einen eher verminderten Stellenwert. Der positive Vorhersagewert ist mit ca. 30% ebenso gering (Keirse et al., 1989). Daher wird die Bestimmung von Zytokinen als frühen Marker für eine Infektion im Fruchtwasser diskutiert.

In der Literatur findet man sehr unterschiedlich interpretierte Ergebnisse zu diesem Thema. Hampl et al. untersuchten in einer prospektiven Studie von 78 Patientinnen das Frühgeburtsrisiko anhand der Zytokine TNF- $\alpha$ , Interferon  $\gamma$ , IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-6 und deren Rezeptoren TNF R55, R75, IL-2R und INF  $\gamma$ R (Hampl et al., 1995). Er zeigte, dass Frauen mit einem vorzeitigem Blasensprung (n=23) einen signifikant höheren TNF- $\alpha$ - ( $80 \pm 120$  pg/ml) und IL-6-Spiegel im Fruchtwasser ( $1400 \pm 1315$  pg/ml) aufwiesen. Das Gleiche traf für die Rezeptoren zu. TNF- $\alpha$  und IL-6 waren bei Frühgeburten mit vorzeitigem Wehen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht (TNF- $\alpha$ :  $50 \pm 73$  pg/ml und IL-6:  $5000 \pm 4384$  pg/ml). Patientinnen mit einer Tokolyse wiesen keine oder nur geringe Zytokinerhöhungen auf. Fraglich in dieser Studie sind die Mechanismen zur Konservierung der Zytokine bei  $-20^\circ\text{C}$ . Dies kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Auffallend ist ebenso der Einschluss von Entbindungen in der 24. SSW zum Kontrollkollektiv. Daher ist ein Vergleich mit unseren Werten eher schwierig. Die Auswertungen unserer Studie ergaben weder für die frühen Frühgeburten ( $\leq 34$ . SSW) noch für die späten Frühgeburten ( $> 34$ . SSW) wesentliche Differenzen der Zytokine zur Kontrollgruppe.

Ghidini et al. bemerkte einen Zusammenhang zwischen einer subklinischen intraamniotischen Infektion und der Frühgeburtlichkeit mittels IL-6-Messungen im Fruchtwasser (Ghidini et al., 1997). Sie testeten in einer retrospektiven Studie die Hypothese, ob IL-6 im letzten Trimenon der Schwangerschaft bei drohenden Frühgeburten erhöht ist. Er fand dabei eine Erhöhung von IL-6 im Fruchtwasser, gewonnen während der 15.-20. SSW, bei Frauen, die eine Frühgeburt vor der 34. SSW hatten. Das Patientinnenkollektiv bestand jedoch zum großen Teil aus Afroamerikanerinnen. Velez et al. stellen deutlich dar, dass die Frühgeburtenrate bei afrikanischen Frauen ungefähr zweimal so hoch ist wie bei europäischen Frauen. Sie diskutieren über eine genetische Ursache, die diesen Unterschied erklärt (Velez et al., 2007). Unsere Patientinnen stammen zumeist aus Europa. Daher könnte ein unterschiedliches Patientenkollektiv zu abweichende Resultate führen. Ebenso kann ein Selektionsbias durch den retrospektiven Ansatz der Studie von Ghidini et al. nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden Zytokine aus dem letzten Trimenon gewonnen, bei denen eine Frühgeburt drohte. Norwitz et al. fanden äquivalente Ergebnisse, in denen zum Ende der Schwangerschaft eine Zunahme von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Fruchtwasser zu messen ist (Norwitz et al., 1999).

Jacobsson et al. untersuchten das Fruchtwasser in der 16.-19. SSW und Zervixabstriche von 21 schwedischen Patientinnen mit einer Frühgeburt und schloss dabei Schwangerschaften mit einem vorzeitigen Blasensprung aus (Jacobsson et al., 2005). In 8 Fällen konnte eine positive Bakterienkultur sowohl im Fruchtwasser als auch im Chorioamnion gefunden werden. IL-6 und IL-8 waren bei diesen Fruchtwasserproben wie auch im Zervixabstrich bei den Frühgeburten mit einem Median von 13 ng/ml und 7,2 ng/ml höher als die Zytokinwerte von Frühgeburten ohne bakteriellen Nachweis (n=10). Es wurde eine intraamniotische Infektion ab einem IL-6-Wert von 1,5 ng/ml und einem IL-8-Wert von 1,3 ng/ml definiert. Es konnten insgesamt 13 positive Bakterienkulturen nachgewiesen werden, jedoch nur 8 von diesen wiesen eine Infektion von Chorion und Amnion auf. Die Messungen der Zytokine mit positiven Bakteriennachweisen im Fruchtwasser waren nur grenzwertig verschieden zu den Fruchtwassermessungen ohne bakterielle Infektion.

Bashiri et al. untersuchten von 30 Schwangeren zwischen der 17.-19. SSW IL-6-Konzentrationen im Fruchtwasser (Bashiri et al. 1999). Sie verglichen diese mit dem Nachweis von Bakterien im Fruchtwasser. Der Mittelwert für IL-6 von Fruchtwasser ohne bakteriellen Nachweis (n=23) betrug  $78 \pm 206$  pg/ml. 3 von 7

Fruchtwasserproben wiesen hohe IL-6-Werte bei einer Kontamination mit Ureaplasma urealyticum auf. 4 Fruchtwasserproben hatten IL-6-Konzentrationen bis 60 pg/ml. Diese eher geringen Konzentrationen gingen 3mal mit einem Staphylococcus epidermidis-Nachweis und in einem Fall mit grampositiven Bakterien einher. Die 4 Frauen mit einem positiven bakteriellen Nachweis hatten eine termingerechte Entbindung und keine weiteren Komplikationen. Ebenso hatten 2 der Frauen mit einem negativen Bakteriennachweis eine Frühgeburt. In einem Fall ging die Frühgeburt mit einer hohen IL-6-Konzentration (1000 pg/ml) und in dem anderen Fall mit einem niedrigen IL-6 von 80 pg/ml einher. Diese Studie zeigt, dass hohe Zytokinwerte nicht immer mit einer Frühgeburt einhergehen. Auch unsere Resultate decken sich mit diesen Ergebnissen. In 20 Proben wurde im Kontrollkollektiv eine IL-6-Konzentration von über 1000 pg/ml gemessen. Diese Schwangerschaften verliefen komplikationslos. In 2 Fällen wurden von Bashiri et al. kein Bakteriennachweis gefunden und dennoch hatten diese Frauen eine Frühgeburt. Eine mögliche Erklärung für diese Frühgeburten könnte beispielsweise eine Minderversorgung durch die Plazenta sein. Yoon et al. definierten den Nachweis einer Immunreaktion durch IL-6-Werte  $> 2,6$  ng/ml im Fruchtwasser bei Patientinnen mit negativen Bakterienkulturen (Yoon et al., 2001). Eine intraamniotische Entzündung ohne Erregernachweis trat weit häufiger (21%) auf als eine intraamniotische Infektion (10%). Eine spontane Frühgeburt vor der 37. SSW wurde häufiger bei Patientinnen mit intraamniotischer Inflammation beobachtet als bei jenen mit einer negativen Kultur und ohne Infektion. Doch konnte Yoon in nur 30% aller Fälle eine Frühgeburt durch den Nachweis einer intraamniotischen Infektion durch IL-6 sowie direkten Keimnachweis detektieren.

Hillier et al. konnten beweisen, dass IL-6 ein hervorragender Marker für eine Frühgeburt innerhalb der folgenden 7 Tage ist (Hillier et al., 1993). Dazu untersuchten Hillier und Mitarbeiter das Fruchtwasser von Frauen mit regelmäßigen Uteruskontraktionen zwischen 16-40 Jahren. Er bestimmte einen Median von IL-6 mit 7400 pg/ml der Frauen, deren Kind in den nächsten 7 Tagen geboren wurde. Sicherlich sind diese Werte wegen starker Auslese und anderem Patientinnenkollektiv schwer vergleichbar, dennoch zeigt diese Studie, dass IL-6 kurz vor der Geburt stark ansteigt. Die Indikation für eine Amniozentese war in dieser Studie an erster Stelle das Alter, gefolgt vom eigenen Wunsch und einem auffälligen Triple Test. 3 von 30 Frauen hatten eine Frühgeburt. Die

Fruchtwasserproben wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend mit einem Immunoassay gemessen. Porter et al. fanden heraus, dass  $-80^{\circ}\text{C}$  die optimale Temperatur zum Aufbewahren der Interleukine ist (Porter et al., 2001). Somit sind falsch positive Messergebnisse durch ungünstige Lagerbedingungen in dieser Studie nicht auszuschließen. Norwitz et al. fanden ebenso eine erhöhte Zytokinkonzentration von IL-6 während der letzten Phase der Geburt (Norwitz et al., 1999). D'Alfonso et. al. führten vergleichbar eine prospektive Studie in der Zeit von Januar bis Juni 2004 durch. 33 Patientinnen erhielten eine Amniozentese in der 16.-19. SSW. Die Schwangerschaften waren bis zu dem Zeitpunkt der Fruchtwassergewinnung normal verlaufen. Die ermittelten IL-6-Daten wurden in 3 Gruppen unterteilt. Gruppe 1 mit einer IL-6-Konzentration bis zu 450 pg/ml (28 Patientinnen), Gruppe 2 mit 450-900 pg/ml (3 Patientinnen) und Gruppe 3 mit über 900 pg/ml (2 Patientinnen). Dabei hatte eine Frau aus der 2. Gruppe eine Präeklampsie. Zu Gruppe 1 zählten zwei Frühgeburten. Auch in dieser Studie konnte mit einem prospektiven Ansatz keine Verbindung zwischen dem Auftreten einer Frühgeburt und der Bestimmung von IL-6 im Fruchtwasser während der Kontrolluntersuchungen im Midtrimester gezeigt werden (D'Alfonso et al., 2006). Unsere Messungen ergaben für die frühen Frühgeburten einen IL-6-Median von 131,5 pg/ml, für die späten Frühgeburten 225 pg/ml. Verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppe (Kontrollgruppe - Median für die frühen Frühgeburten: 230 pg/ml,  $p=0,615$ ; Median der späten Frühgeburten: 231, 0 pg/ml,  $p=0,665$ ) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Mediane der Frühgeburtengruppen für IL-6 liegen sogar unter denen der Kontrollgruppen. Die höchste Konzentration von IL-6 ist mit 2620 pg/ml in der Kontrollgruppe zu finden. Jacobsson et al. konnten zeigen, dass die Zytokinwerte im Fruchtwasser bei bakterieller Besiedlung nicht immer erhöht gemessen werden (Jacobsson et al., 2005). Ebenso konnten Yoon et al. nur in 30 % durch IL-6 im Fruchtwasser eine Infektion nachweisen (Yoon et al., 2001). Dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Frühgeburtengruppen und den Kontrollgruppen gezeigt werden konnte, zeigt uns, dass die Untersuchung des Fruchtwassers möglicherweise zu früh durchgeführt wurde. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die These, ob eine Akkumulation von Zytokinen gleich eine Infektion, die eine Frühgeburt bedingt, anzeigt. Cox et al. untersuchten die Zytokinkonzentrationen von IL-6 und IL-1 $\beta$  im Fruchtwasser bei Frühgeburten in der 24.-34. SSW und in der 35.-42. SSW vor und nach Einsetzen der Geburt. Diese Daten wurden mit IL-6 und IL-1 $\beta$ -Werten von normal verlaufenden

Schwangerschaften verglichen. Sie fanden heraus, dass IL-6 und IL-1 $\beta$  gleichermaßen während der ersten 18 Stunden nach Einsetzen der Wehen für Frühgeburten und termingerechte Schwangerschaften ansteigen. Sie postulieren, dass die Ergebnisse dieser Studie eher nicht für die Theorie sprechen, dass eine intraamniotische Infektion Ursache einer Frühgeburt ist. Es wird daher der Einsatz von Zytokinen und der Nachweis von Mikroorganismen im Fruchtwasser zur Detektion von Frühgeburten in Frage gestellt (Cox et al., 1997).

Fortunato et al. fanden heraus, dass IL-8 sowohl vom Chorion als auch vom Amnion produziert werden kann (Fortunato et al., 1996). IL-8 konnte bei einer Granulozyteninfiltration des kindlichen Gewebes gemessen werden. Durch die Aktivierung weiterer Granulozyten beginnt eine Kaskade, die zur Prostaglandinausschüttung und somit zu Uteruskontraktionen führt. Nach Zugabe eines Lipopolysaccharides für 72 h wurde eine bakterielle Inflammation von Chorioamnion imitiert und IL-8 nach Endotoxinzufuhr mit 72 pg/ml gemessen. Ohne die Zufuhr des Lipopolysaccharides wurde eine durchschnittliche Konzentration von 21 pg/ml gemessen. Fraglich ist, ob die Zytokinentwicklung für 3 Tage vergleichbar mit unserer Studie ist. Dennoch beweist diese Studie, dass TNF- $\alpha$  wahrscheinlich bei einer intraamniotischen Infektion direkt in das Amnion abgegeben werden kann. Romero et al. wiesen im Zusammenhang mit vorzeitiger Wehentätigkeit und Wehentätigkeit am Termin IL-8 mit und ohne intraamniotische Keimbesiedlung nach (Romero et al., 1991). IL-8-Konzentrationen wurden ebenso erhöht im Fruchtwasser mit einer Keimbesiedlung gemessen. Dennoch soll IL-8 eine intrauterine Prostaglandinproduktion nicht stimulieren (Baumann und Romero, 1995). Puchner et al. untersuchten IL-8 von 80 Schwangeren, um einen Zusammenhang mit einer Chorioamnionitis zu untersuchen. Dazu lagerten Puchner et al. 80 Fruchtwasserproben bei -10°C. 9 von 12 Patientinnen mit einer Chorioamnionitis wurden mittels IL-8-Werten über 10.000 pg/ml erkannt. Dabei konnten IL-8-Werte von über 1000 pg/ml im Fruchtwasser von unauffälligen Schwangerschaften bestimmt werden (Puchner et al., 1993). Fraglich ist die Lagerung der Interleukine, so dass z.B. die Lagerung der Zytokine bei -10°C bis zur Messung die Ergebnisse verfälscht. Menon et al. beschäftigten sich mit der Bestimmung von IL-8 und IL-1 $\beta$  im Fruchtwasser bei afrikanischen und weißen Frauen. Er fand dabei einen signifikanten Unterschied der Zytokinwerte von IL-1 $\beta$  im Fruchtwasser für afrikanische (höhere IL-1 $\beta$ -Werte) und weiße Frauen mit Frühgeburten. Jedoch

konnte er keinen signifikanten Unterschied für IL-8 feststellen. Innerhalb der afrikanischen und weißen Frauen teilte er weitere Gruppen ein, jene Frauen mit einer Frühgeburt und jene mit normal ausgegangener Schwangerschaft. Dabei fand er innerhalb der Gruppe der afrikanischen Frauen eine signifikante Erhöhung von IL-1 $\beta$  bei den Frühgeburt. Bei den weißen Frauen ließ sich ein signifikanter Unterschied für IL-8 finden. Dieser war bei den Frühgeburten höher. Für IL-1 $\beta$  ließ sich bei den weißen Frauen kein Unterschied zwischen Frühgeburtengruppe und Kontrollgruppe finden, das gleiche trifft für die afrikanischen Frauen mit einer Frühgeburt und termingerechter Geburt für IL-8 finden (Menon et al., 2007). Möglicherweise spielt auch hier ein unterschiedlicher Zytokin-Genotyp für afrikanische und weiße Frauen eine Rolle. Die IL-8-Werte unserer Studie ergaben einen Median von 434 pg/ml für die Kontrollgruppe der frühen Frühgeburten und einen Median von 458,5 pg/ml für die späten Frühgeburten. Die minimale und maximale Konzentration betrug dabei zusammen 36,2-5843 pg/ml. Der IL-8-Median der frühen Frühgeburten ergab 477 pg/ml mit minimal 53,3 pg/ml und maximal 1564 pg/ml. Die medianen IL-8-Konzentrationen betragen für späte Frühgeburten 522 pg/ml (Minimal = 131 pg/ml; Maximal = 4714 pg/ml). Auch hier ist der höchste Wert in der Kontrollgruppe zu finden. Die Mediane der Frühgeburtengruppe liegen dabei höher als die Mediane der Kontrollgruppen. Dennoch konnte kein signifikant unterschiedliches Ergebnis zu den Kontrollgruppen erhoben werden. Fortunato et al. konnten wie wir höhere IL-8-Konzentrationen bei unauffälligen Schwangerschaften messen (Fortunato et al., 1996).

TNF- $\alpha$  konnte in unseren Proben nicht durchgehend gemessen werden. 6 von 17 Messungen fehlen in der Frühgeburtengruppe. Die Messungen ergaben für die Kontrollgruppe einen Median von 18,8 pg/ml TNF- $\alpha$  der frühen Frühgeburten und 18,95 pg/ml für die späten Frühgeburten. Für die frühe Frühgeburtengruppe betrug der Mittelwert von TNF- $\alpha$  18,73 pg/ml, für die späte Frühgeburtengruppe 17,8 pg/ml. Die Mittelwerte von TNF- $\alpha$  beider Frühgeburtengruppen liegen im Vergleich zur Kontrollgruppe tiefer. Fortunato et al. beobachteten einen Anstieg von TNF- $\alpha$  auf 410 pg/ml nach Lipopolysaccharid-Zugabe im Fruchtwasser von einem Ausgangswert von 40 pg/ml (Fortunato et al., 1996). Opsjon et al. fanden heraus, dass TNF- $\alpha$  bei Einsetzen der Geburt im Fruchtwasser dreifach erhöht ist (von 17 pg/ml auf 58 pg/ml) (Opsjon et al., 1993). Doch ist dieses Resultat bedenklich, da unter der Geburt das Fruchtwasser kontaminiert wird. Dies könnte die

Zytokinmessung verfälschen. Der Ausgangswert von TNF- $\alpha$  mit 17 pg/ml ist mit unseren Untersuchungen des Kontroll-Gesamtkollektivs in etwa vergleichbar.

Der Fetus soll für die entzündliche Reaktion und somit die Auslösung seiner eigenen Frühgeburt mitverantwortlich sein. Je nach seinem Zytokin-Genotyp könnte er einem grösseren Frühgeburtsrisiko ausgesetzt sein (Bessler et al., 2004). In Zwillingschwangerschaften stellt das Vorkommen des Allels 2 IL-1 $\beta$ -Rezeptors (IL-1 $\beta$ ) bei beiden Feten einen zusätzlichen Risikofaktor für eine Frühgeburt dar (de Craen et al., 2005). Diese Beobachtungen zu den fetalen genetischen Faktoren seien unabhängig vom genotypischen Profil der Mutter. Zugleich muss diskutiert werden, ob das Immunsystem einiger Frauen eine Infektion mit Bakterien gut bewältigt und daraus keine Frühgeburt resultiert. Damit wären hohe proinflammatorische Zytokinmessungen erklärbar. Eine weitere These besagt, dass je nach mütterlichen Genotyp ein individuelles Risiko für eine uterine Infektion besteht. Velez et al. stellten dabei den Unterschied zwischen Afro-Amerikanerinnen und europäischen Amerikanerinnen mittels Analyse der genetischen Variationen für IL-6 und dem IL-6-Rezeptor (IL-6R). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden ethnischen Gruppen für die Expression der Gene (Velez et al., 2007). Menon et al. untersucht die genetische Variation in Hinblick auf eine multilokale Interaktion der Gene im Zusammenhang mit dem Auftreten von Frühgeburten bei Europäerinnen. Er fand heraus, dass ein Zusammenlagern mehrerer spezifischer Gene das Auftreten einer Frühgeburt bedingen können. Er untersuchte dabei nukleotid Polymorphismen für TNF- $\alpha$ , IL-6 und den IL-6-Rezeptor (Menon et al., 2006). Sie schlossen dabei keine Umweltfaktoren in die Studie ein. Eine ungefähre Voraussage des Outcomes der Schwangerschaften konnte dabei mit bis zu 65%-iger Sicherheit getätigt werden. Eine weitere Untersuchung von Menon et al. betraf die Untersuchung von der mRNA Synthese des Plazentagewebes für IL-1, IL-8, IL-10 und der Expression der Cyclooxygenase 1 sowie 2 und von 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (PGDH) nach Gabe von Lipopolysaccharid, einem Endotoxin von *Escherichia coli* (Menon et al., 2006). Dabei wurden kaukasische und afrikanische Frauen in die Studie eingeschlossen. Es lies sich eine signifikant höhere Konzentration von IL-6 und IL-10 bei kaukasischen Schwangerschaften feststellen. Die Werte von IL-8 differierten dabei nicht.

Zahlreiche Arbeiten zum Thema Frühgeburt sind retrospektiv gestaltet (Wenstrom et al., 1996; Yoon et al., 2001), welches das häufigere Auftreten von Selektionsfehlern

bedingt. Die Untersuchung des Fruchtwassers erfolgte oft verspätet. Durch die frühzeitige Abtrennung der korpuskulären Bestandteile im Fruchtwasser, wie Erythrozyten, wird einer Verfälschung der Werte durch Zellverfall vorgebeugt (Spong et al, 1998, Porter et al., 2001). In unserer Studie erfolgte die Interleukinbestimmung nach sofortigem Entfernen störender Bestandteile durch Zentrifugation des Fruchtwassers.

Untersuchungen über Lagerungsbedingungen unternahm Porter et al.. Seine Messungen aus dem Fruchtwasser mittels Enzymimmunoassays von Angiogenin, IL-6 und VEGF zeigten, dass die niedrigste Konzentration der Zytokine durch Zerfall bei 4°C vorlagen, die höchste bei -80°C (Porter et al., 2001). Spong et al. untersuchten ebenso die Stabilität der Zytokine wie IL-6 für ein Jahr in Fruchtwasserproben. Dabei wurden die Konzentrationen von 30 Proben vor und nach einer einjährigen Lagerung bei -70°C gemessen. Hierbei wurde ein signifikanter Konzentrationsabfall von IL-6 ermittelt (Spong et al., 1998). Unsere Fruchtwasserproben wurden zügig zentrifugiert und dann bei -86°C eingefroren, um später eine Zytokinbestimmung durchführen zu können. Der prospektive Ansatz der Studie war das vorrangige Ziel. In 2 Jahren waren trotz dem Einschluss von 385 Fällen insgesamt 17 Frühgeburten aufgetreten. Allein anhand der Interleukine zum Zeitpunkt der Amniozentese (15.-20 SSW) ist in Zusammenschau aller Ergebnisse keine Vorhersage für den möglichen Ausgang der Schwangerschaft möglich. Aktuelle Studien decken sich mit unserem Ergebnis (D'Alfonso et al., 2006). Die meisten Studien sind retrospektiv gehalten und haben aus einem Gesamtkollektiv lediglich die Fallgruppen herausortiert und untersucht. Und zumeist wurde dann eine Amniozentese im späteren Schwangerschaftsabschnitt durchgeführt. Ein aktuelles Thema beschäftigt sich mit der genetischen Grundlage. So zeigte sich im Vergleich von kaukasisch abstämmigen Amerikanerinnen mit Afro-Amerikanerinnen ein deutlicher Unterschied im Genotypen für IL-6 und IL-6R (Velez et al., 2007). Dadurch kann die unterschiedliche Frühgeburtenrate zwischen afrikanischen und europäischen Frauen erklärt sein. Hier stellt sich die Frage, ob durch unterschiedliche Genotypen das Abweichen unserer Ergebnisse von anderen (Ghidini et al., 1997, Yoon et al., 2001) erklärt.

#### **5.4. Interleukine bei Präeklampsie**

Als Ursache für die Präeklampsie wird eine Remodulation von Spiralarterien des Myometriums angesehen, die das Risiko einer plazentaren Hypoxie steigert (Conrad

et al., 1997). Diese Remodulation durch Trophoblastenzellen soll durch Zytokine beeinflusst werden (Kupferminc et al., 1996). IL-6 wurde von Kupferminc und Mitarbeitern im Fruchtwasser von 19 Schwangeren mit einer Präeklampsie vermindert gemessen. Im maternalen Serum konnte in seiner Studie kein signifikanter Unterschied zu einer Kontrollgruppe gemessen werden. Da IL-6 die Differenzierung und das Wachstum des Trophoblasten beeinflusst, kann bei vermindertem IL-6-Spiegel eine Trophoblastenfehlfunktion die Plazentainsuffizienz bedingen (Kauma et al., 1995). Heikkinen et al. untersuchten von 2028 Schwangeren das Fruchtwasser in der 14.-16. SSW auf IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  (Heikkinen et al., 2001). Er fand keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Frauen mit einer Präeklampsie. Diese Befunde decken sich mit unseren Ergebnissen. Die mediane Konzentration von IL-6 (201 pg/ml), IL-8 (457 pg/ml) und TNF- $\alpha$  (Mittelwert: 20,05 pg/ml) unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe IL-6: 287 pg/ml; IL-8: 480 pg/ml; TNF- $\alpha$ : 19,31 pg/ml). Für IL-6 und IL-8 konnte Heikkinen ebenso einen niedrigeren Median im Vergleich zur Kontrollgruppe messen. TNF- $\alpha$  lag wie in unseren Messungen über dem Mittelwert der Kontrollgruppe (Mittelwert: Präeklampsie TNF- $\alpha$ : 20,05 pg/ml, Mittelwert Kontrollgruppe: 19,31 pg/ml). Nakabayashi et al. hingegen konnten einen signifikanten IL-6- und IL-8-Anstieg im Fruchtwasser von präeklampsischen Frauen im Midtrimester verzeichnen (Nakabayashi et al., 1998).

Für die Entstehung einer Präeklampsie wird zusätzlich von einer abnormalen Funktion des Immunsystems ausgegangen (Wegmann et al., 1993). Kupferminc und Mitarbeiter zeigten bereits 1994 einen erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegel im Fruchtwasser bei Schwangeren mit einer Präeklampsie. Er verweist in diesem Zusammenhang auf die Wirkung der Zytokine auf das Gefäßsystem. In einer weiteren Studie wurde sowohl der Rezeptor für IL-6 wie auch Rezeptoren von TNF im Fruchtwasser von 206 Schwangeren im Laufe der Schwangerschaft gemessen (Opsjon et al., 1995). Hier zeigten sich keine Differenzen zwischen normaler Schwangerschaft und Schwangerschaften mit Präeklampsien für beide Zytokin-Rezeptoren. Es wurde eine Korrelation zwischen den gemessenen Rezeptoren und den zugehörigen Zytokinen gefunden. Heikkinen et al. vermuten genetische Faktoren, die Einfluss auf die Schwangerschaft nehmen. Daraus resultiert eine individuelle Reaktion des Gewebes in der Schwangerschaft (Heikkinen et al., 2001). TNF- $\alpha$  kann möglicherweise erst im fortgeschrittenen Stadium der Präeklampsie erhöht gemessen werden und ist in der

15.-20. SSW noch nicht wesentlich von Bedeutung. Ebenso muss von unterschiedlichen Pathomechanismen ausgegangen werden, die zu einer Präeklampsie bzw. Eklampsie führen. Folglich ist eine Fehlfunktion des Immunsystems nicht immer ursächlich und durch Zytokinmessungen detektierbar. Durch die kleine Fallzahl sind Vergleiche mit anderen Studien eher schwierig.

Unsere Messungen zeigen keine signifikanten Unterschiede für alle Fallgruppen im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Die Hypothese einer individuellen Regulation der Schwangerschaft auf z.B. Gen-Ebene wäre eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse vieler Studien. So existiert keine einheitliche Studienlage über den Einsatz der Zytokine als Frühmarker. Es wird im Gegenteil oft eine weite Spannbreite der Zytokinmessungen und Resultate beobachtet. Es existieren bereits Studien, die sich mit dem Einsatz von Multimarkern auseinandersetzen, da einzelne Zytokine keine gleichen Resultate liefern (Goffinet et al., 2001). Für eine bessere Prävention erfolgt beispielsweise die Einteilung in risikoreiche und risikoarme Schwangerschaften, wobei jede Gruppe mit einem anderen Test untersucht wird. Ein guter negativer Vorhersagewert für eine Frühgeburt wurde dabei der fetalen Fibronectinbestimmung aus dem Zervixsekret kombiniert mit einem Ultraschall der Zervix zugesprochen (Goffinet et al., 2001). Ferner gab es gute Ergebnisse für IL-6 kombiniert mit einem Ureaplasma urealyticum - Nachweis im Fruchtwasser (Vogel et al., 2005).

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser prospektiven Studie war IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Fruchtwasser in der 15.-20. SSW zu bestimmen und mit dem Outcome der Schwangerschaften zu vergleichen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Aborte, Frühgeburten sowie Präeklampsien bzw. die Eklampsie gelegt. Insgesamt wurden 4 Aborte, 17 Frühgeburten und 3 Präeklampsien bzw. 1 Eklampsie aus dem Gesamtkollektiv gezählt. Die Messergebnisse der Zytokine ergaben keine signifikanten Unterschiede der drei Fallgruppen verglichen mit einer für jede Fallgruppe erstellten Kontrollgruppe. Bei nicht signifikant unterschiedlichen demographischen und klinischen Daten ließen sich die Interleukine fehlerfreier vergleichen.

Für die Gruppe der Aborte fanden sich insgesamt erhöhte IL-8- und TNF- $\alpha$ -Fruchtwassermessungen verglichen mit der Kontrollgruppe, dennoch sind die Ergebnisse nicht signifikant verschieden. IL-8 wurde als einziges Zytokin für die beiden Frühgeburtengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem leicht höherem Median gemessen. Der Median für IL-6, bzw. Mittelwert von TNF $\alpha$  der Frühgeburten lagen teilweise sogar unter dem errechneten Median (Mittelwert) der Kontrollgruppe. Die Unterteilung in frühe und späte Frühgeburten zeigte keine Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Die Gruppe der Präeklampsien/Eklampsie lagen mit den Medianen von IL-6 und IL-8 unter den Medianen der Kontrollgruppe.

Unsere Studie zeigt, dass möglicherweise IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  zwischen der 15.-20. SSW keine günstigen Marker, sondern eher kurzfristig vor einer Geburt erhöht sind (Hillier et al., 1993; Opsjon et al., 1993). Der Trend der Frühgeburtsdiagnostik geht zu multiplen Markern, die die Multikausalität der Frühgeburt besser erfassen. IL-6 zusammen mit dem Nachweis von Ureaplasma urealyticum im Fruchtwasser wurde als guter Marker für eine Frühgeburt ermittelt (Vogel et al., 2005). Zusätzlich scheint die genetische Variabilität für Zytokine oder Zytokinrezeptoren einen bedeutenden Einfluss auf das Outcome der Schwangerschaft zu nehmen (Bessler et al., 2004; Nguyen et al., 2004; von Linsingen et al., 2005). Aktuell zeigen die Untersuchungen zu unterschiedlichen Genotypen der Interleukine von afrikanischen und kaukasischen Frauen eine große Relevanz in Bezug auf die Bedeutung für die

Frühgeburtlichkeit. Doch erst wenn eine signifikante Reduktion der Frühgeburten erreicht wurde, ist die Einführung als Routinediagnostik sinnvoll.

## 7. Quellenverzeichnis

1. Alijotas-Reig J, Ferrer-Raventos JC. 2005. [Recurrent miscarriage and inherited thrombophilia: diagnostic work-out and therapeutic management.]. *Med Clin (Barc)* 125:626-631.
2. Bashiri A, Horowitz S, Huleihel M, Hackmon R, Dukler D, Mazor M. 1999. Elevated concentrations of interleukin-6 in intra-amniotic infection with *Ureaplasma urealyticum* in asymptomatic women during genetic amniocentesis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78:379-382.
3. Baumann P., R. R. 1995. Intraamniale Infektion, Zytokine und Frühgeburtslichkeit. *Wiener klinische Wochenschrift* 107/20:598-607.
4. Bessler H, Osovsky M, Sirota L. 2004. Association between IL-1ra gene polymorphism and premature delivery. *Biol Neonate* 85:179-183.
5. Carp H. 2004. Cytokines in recurrent miscarriage. *Lupus* 13:630-634.
6. Cnattingius S, Granath F, Petersson G, Harlow BL. 1999. The influence of gestational age and smoking habits on the risk of subsequent preterm deliveries. *N Engl J Med* 341:943-948.
7. Conrad KP, Benyo DF. 1997. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 37:240-249.
8. Cox SM, Casey ML, MacDonald PC. 1997. Accumulation of interleukin-1beta and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm. *Hum Reprod Update* 3:517-527.
9. de Craen AJ, Posthuma D, Remarque EJ, van den Biggelaar AH, Westendorp RG, Boomsma DI. 2005. Heritability estimates of innate immunity: an extended twin study. *Genes Immun* 6:167-170.
10. D'Alfonso A, Piancatelli D, Maccarone D, Adorno D, Iovenitti P, Carta G. 2006. Cytokine levels in amniotic fluid: a marker of preterm labor? *Clin Exp Obstet Gynecol* 33:34-35.

11. Driscoll JM, Jr., Driscoll YT, Steir ME, Stark RI, Dangman BC, Perez A, Wung JT, Kritz P. 1982. Mortality and morbidity in infants less than 1,001 grams birth weight. *Pediatrics* 69:21-26.
12. Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. 1996. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 and 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 174:1855-1861; discussion 1861-1852.
13. Galask RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. 1984. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 148:915-928.
14. Genc MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS. 2002. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 187:157-163.
15. Ghidini A, Jenkins CB, Spong CY, Pezzullo JC, Salafia CM, Eglinton GS. 1997. Elevated amniotic fluid interleukin-6 levels during the early second trimester are associated with greater risk of subsequent preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 37:227-231.
16. Goffinet F, Maillard F, Fulla Y, Cabrol D. 2001. Biochemical markers (without markers of infection) of the risk of preterm delivery. Implications for clinical practice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 94:59-68.
17. Goldenberg RL, Goepfert AR, Ramsey PS. 2005. Biochemical markers for the prediction of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 192:S36-46.
18. Haag P, Hanhart N, Müller M und Mitarbeiter. 2003/04. *Gynäkologie und Urologie*, S.
19. Hack M, Fanaroff AA. 2000. Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990s. *Semin Neonatol* 5:89-106.
20. Hampl M, Friese K, Pracht I, Zieger W, Weigel M, Gallati H. 1995. [Determination of cytokines and cytokine receptors in premature labor]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 55:483-489.

21. Heikkinen J, Mottonen M, Pulkki K, Lassila O, Alanen A. 2001. Cytokine levels in midtrimester amniotic fluid in normal pregnancy and in the prediction of pre-eclampsia. *Scand J Immunol* 53:310-314.
22. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. 1993. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol* 81:941-948.
23. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H. 2005. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes. *Bjog* 112:719-724.
24. Jensen A, Klingmüller V, Künzel W, S S. 1992. Das Hirnblutungsrisiko bei Früh-und Reifgeborenen. *Geburtshilfe Frauenheilkunde* 52:6-20.
25. Kauma SW, Wang Y, Walsh SW. 1995. Preeclampsia is associated with decreased placental interleukin-6 production. *J Soc Gynecol Investig* 2:614-617.
26. Keirse MJ. 1989. An evaluation of formal risk scoring for preterm birth. *Am J Perinatol* 6:226-233.
27. Keller R. 1994. *Immunologie und Immunpathologie*. 4. Auflage.
28. Kramer MS, Platt R, Yang H, Joseph KS, Wen SW, Morin L, Usher RH. 1998. Secular trends in preterm birth: a hospital-based cohort study. *Jama* 280:1849-1854.
29. Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Aderka D, Wallach D, Socol ML. 1996. Soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin-6 levels in patients with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 88:420-427.
30. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Munson ML. 2003. Births: final data for 2002. *Natl Vital Stat Rep* 52:1-113.
31. McCormick MC. 1985. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 312:82-90.

32. Menon R, Merialdi M, Lombardi SJ, Fortunato SJ. 2006. Differences in the placental membrane cytokine response: a possible explanation for the racial disparity in preterm birth. *Am J Reprod Immunol* 56:112-118.
33. Menon R, Velez DR, Simhan H, Ryckman K, Jiang L, Thorsen P, Vogel I, Jacobsson B, Merialdi M, Williams SM, Fortunato SJ. 2006. Multilocus interactions at maternal tumor necrosis factor-alpha, tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-6 receptor genes predict spontaneous preterm labor in European-American women. *Am J Obstet Gynecol* 194:1616-1624.
34. Menon R, Williams SM, Fortunato SJ. 2007. Amniotic fluid interleukin-1beta and interleukin-8 concentrations: racial disparity in preterm birth. *Reprod Sci* 14:253-259.
35. Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. 1990. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3092-3096.
36. Murray R, Lee F, Chiu CP. 1990. The genes for leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are expressed in mouse blastocysts prior to the onset of hemopoiesis. *Mol Cell Biol* 10:4953-4956.
37. Nakabayashi M, Sakura M, Takeda Y, Sato K. 1998. Elevated IL-6 in midtrimester amniotic fluid is involved with the onset of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 39:329-334.
38. Nguyen DP, Genc M, Vardhana S, Babula O, Onderdonk A, Witkin SS. 2004. Ethnic differences of polymorphisms in cytokine and innate immune system genes in pregnant women. *Obstet Gynecol* 104:293-300.
39. Norwitz ER, Robinson JN, Challis JR. 1999. The control of labor. *N Engl J Med* 341:660-666.
40. Opsjon SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G, Sundan A, Waage A, Austgulen R. 1993. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 169:397-404.

41. Opsjon SL, Novick D, Wathen NC, Cope AP, Wallach D, Aderka D. 1995. Soluble tumor necrosis factor receptors and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and pre-eclamptic pregnancies. *J Reprod Immunol* 29:119-134.
42. Perni SC, Vardhana S, Tuttle SL, Kalish RB, Chasen ST, Witkin SS. 2004. Fetal interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, intra-amniotic interleukin-1beta levels, and history of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 191:1318-1323.
43. Porter AE, Auth J, Prince M, Ghidini A, Brenneman DE, Spong CY. 2001. Optimization of cytokine stability in stored amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 185:459-462.
44. Puchner T, Egarter C, Wimmer C, Lederhilger F, Weichselbraun I. 1993. Amniotic fluid interleukin-8 as a marker for intraamniotic infection. *Arch Gynecol Obstet* 253:9-14.
45. Richani K, Soto E, Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Nien JK, Edwin S, Kim YM, Hong JS, Mazor M. 2005. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. *J Matern Fetal Neonatal Med* 17:239-245.
46. Romero R, Ceska M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I. 1991. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 165:813-820.
47. Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J. 2003. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *J Nutr* 133:1668S-1673S.
48. Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Edwin SS, Berry SM. 1998. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 179:186-193.
49. Romero R, Mazor M. 1988. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 31:553-584.

50. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. 2000. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 47:185-196.
51. Salamonsen LA. 2003. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* 125:301-311.
52. Schneider H. 2000. Vorzeitige Wehen, Zervixreifung und Blasensprung. *Gynäkologe* 33:336-343.
53. Spong CY, Ghidini A, Ossandon M, Walker CN, Pezzullo JC. 1998. Are the cytokines interleukin-6 and angiogenin stable in frozen amniotic fluid? *Am J Obstet Gynecol* 178:783-786.
54. Stjernqvist K, Svenningsen NW. 1999. Ten-year follow-up of children born before 29 gestational weeks: health, cognitive development, behaviour and school achievement. *Acta Paediatr* 88:557-562.
55. Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJ, Cameron IT, Greer IA, Norman JE. 1999. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 14:229-236.
56. Velez DR, Menon R, Thorsen P, Jiang L, Simhan H, Morgan N, Fortunato SJ, Williams SM. 2007. Ethnic differences in interleukin 6 (IL-6) and IL6 receptor genes in spontaneous preterm birth and effects on amniotic fluid protein levels. *Ann Hum Genet* 71:586-600.
57. Vogel I, Thorsen P, Curry A, Sandager P, Uldbjerg N. 2005. Biomarkers for the prediction of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84:516-525.
58. von Linsingen R, Bompeixe EP, Bicalho Mda G. 2005. A case-control study in IL6 and TGFB1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in southern Brazilian patients. *Am J Reprod Immunol* 53:94-99.
59. Warburton D, Fraser FC. 1964. Spontaneous Abortion Risks in Man: Data from Reproductive Histories Collected in a Medical Genetics Unit. *Am J Hum Genet* 16:1-25.

60. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14:353-356.
61. Wenstrom KD, Andrews WW, Tamura T, DuBard MB, Johnston KE, Hemstreet GP. 1996. Elevated amniotic fluid interleukin-6 levels at genetic amniocentesis predict subsequent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 175:830-833.
62. Witkin SS, Vardhana S, Yih M, Doh K, Bongiovanni AM, Gerber S. 2003. Polymorphism in intron 2 of the fetal interleukin-1 receptor antagonist genotype influences midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 189:1413-1417.
63. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, Jun JK. 2001. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 185:1130-1136.
64. Zahl PA BC. 1943. Induction of decidua-placental hemorrhage in mice by the endotoxins of certain gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* 54:329.
65. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD. 2005. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol* 166:811-822.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Karim Kalache für die freundliche Überlassung des Themas und die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die vielen anregenden Diskussionen und für die stete und engagierte Unterstützung und Betreuung.

Vielen Dank an Herrn Professor Bollmann sowie die Ärzte der Pränataldiagnostik der Charité.

Mein weiterer Dank gilt meiner Kommilitonin und Mitdoktorandin Mattea Linder für die vielfältige Unterstützung in wissenschaftlichen und programmiertechnischen Fragen und ihr Engagement für die Erhebung der Daten.

Dank sei auch Frau Korlach unserer medizinisch-technischen Assistentin. Ihre Unterstützung und Durchführung der Datenmessungen und Auswertungen sowie Bereitstellung von Materialien waren essentieller Teil der Arbeit und ohne sie nicht möglich!

Ebenso gilt mein herzlicher Dank der ehemaligen Sekretärin für Geburtshilfe und pränatalen Diagnostik Frau Magerstädt, ohne deren tatkräftige Hilfe die Arbeit nicht fertigzustellen war.

Großer Dank geht zuletzt an all meine Freunde und meine Familie, die mich unheimlich durch ihre Hilfe unterstützten. Dazu danke ich meinen Eltern Annegret und Harald Thiem für die mentale Unterstützung und die hervorragende technische Ausrüstung, meinen Schwestern Annette und Julia, meinen Freunden Daniela Hennersdorf, Sandra Kassin, Annika Kasten und Romain Martin.

Daniela Thiem

## Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel, ohne Hilfe Dritter oder Teilkopien anderer Arbeiten angefertigt habe. Die benutzten Hilfsmittel sowie angegebene Literaturangaben sind vollständig. Die Arbeit wurde an der Charité Universitätsmedizin zu Berlin zur Promotion eingereicht.

Berlin, Januar 2008

## **Lebenslauf**

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