

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
PROF. DR. MED. BIRGIT SEELBACH-GÖBEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNMODULATORISCHER EFFEKT VON  
BETAMETHASON UND INDOMETACIN AUF DIE  
ZYTOKINPRODUKTION FETALER MONONUKLEÄRER  
ZELLEN NACH STIMULATION MIT LPS**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Anna Doblinger

2013



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
PROF. DR. MED. BIRGIT SEELBACH-GÖBEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNMODULATORISCHER EFFEKT VON  
BETAMETHASON UND INDOMETACIN AUF DIE  
ZYTOKINPRODUKTION FETALER MONONUKLEÄRER  
ZELLEN NACH STIMULATION MIT LPS**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Anna Doblinger

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Birgit Seelbach-Göbel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Fleck

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2013

*Widmung*

*gewidmet meinen lieben Eltern*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Widmung</b>	<b>5</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Frühgeburtlichkeit: Definition und Bedeutung	8
1.2 Die Rolle ascendierender Infektionen für die Schwangerschaft	9
1.3 Das Fetale Infektionssyndrom (FIRS)	13
1.4 Die Rolle des Toll-like Rezeptor 4 bei bakteriellen Infektionen	14
1.5 Zytokine	16
1.5.1 Definition	16
1.5.2 Proinflammatorische Zytokine	18
1.5.3 Antiinflammatorische Zytokine	19
1.6 Indometacin als Tokolytikum im „Off-Label“-Use	19
1.7 Die antenatale Steroidprophylaxe	20
1.8 Zielsetzung und Fragestellungen	21
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Material	22
2.1.1 Untersuchungsmaterial	22
2.1.2 Medikamente und Stimulanz für die Zellkultur	22
2.1.3 Reagenzien, Medien und Puffer	22
2.1.4 Reaktionskits	23
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.6 Geräte	23
2.1.7 Software	24
2.2 Methoden	24
2.2.1 Isolierung der CBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation	24
2.2.2 Bestimmung der LPS-Konzentration für den Stimulationsansatz	26
2.2.3 Ansatz der Zellkultur und Stimulation	26
2.2.4 Bestimmung der TGF $\beta$ -Konzentration mittels ELISA	29
2.2.5 Zytokinbestimmung mittels Luminex100™	30

## Inhaltsverzeichnis

2.2.6	Statistische Auswertung	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS ( <i>E.coli</i> ) und IL-6	33
3.2	Analyse der <i>in vitro</i> Zytokinproduktion durch umbilikale mononukleäre Zellen nach LPS-Stimulation	34
3.3	Bestimmung des <i>in vitro</i> Effekts von Betamethason und Indometacin auf die Zytokinproduktion umbilikaler mononukleärer Zellen	35
3.3.1	Einfluss von Betamethason und Indometacin auf die spontane Zytokinsekretion	35
3.3.2	Einfluss von Betamethason und Indometacin auf die Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS	36
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
	<b>Abstract</b>	<b>83</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>84</b>
	<b>Anhang A: Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
	<b>Anhang B: Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Frühgeburtschaftlichkeit: Definition und Bedeutung**

Im medizinischen Fachjargon spricht man von einer Frühgeburt, wenn ein Kind vor Vollendung der 37. SSW geboren wird. Das Geburtsgewicht liegt dabei definitionsgemäß zwischen 500 g und 2500 g [78].

In der Bundesrepublik Deutschland enden derzeit 7 – 9 % aller Schwangerschaften vor der 37. SSW [41; 67; 75; 110; 112; 142]. Nach den Zahlen der Bayerischen Perinatalerhebung wurden im Jahr 2008 8,1 % der Neugeborenen vor der 37. SSW, 1,2 % vor der 32. SSW und 0,4 % vor der 27. SSW geboren [12]. Die Frühgeburtschaftlichkeit stellt die häufigste Ursache für die perinatale und neonatale Morbidität und Mortalität dar. Insbesondere Frühchen vor der 32. SSW tragen mit bis zu 70 % beträchtlich dazu bei [31; 45; 67; 77; 133]. Dank der großen Fortschritte in der Neonatalmedizin ist es gelungen, die perinatale und neonatale Sterblichkeit in den letzten Jahrzehnten deutlich zu senken [77; 123; 142]. Diese Abnahme ist vor allem auf die verbesserte Überlebenschance von extrem frühen Frühgeborenen zurückzuführen [123]. Jedoch hat trotz umfangreicher Anstrengungen in den Bereichen der Prävention, Diagnostik und Therapie die Inzidenz der Frühgeburtschaftlichkeit nicht abgenommen [52; 123]. Nach den Zahlen der DAK muss in Deutschland von 1992 bis 2004 sogar ein Anstieg der Frühgeburtsrate um rund 30 % verzeichnet werden [61]. Dieser Trend lässt sich auch in den USA beobachten, wo die Frühgeburtsrate mit 11,3 % im Jahr 2003 um 13 % höher liegt als noch 1992 [123]. Dabei bleibt offen, ob die Frühgeburtsrate ohne die bestehenden Präventionsprogramme noch höher gewesen wäre. Die Gründe für die zunehmende Frühgeburtsfrequenz liegen unter anderem im immer höher werdenden Alter der gebärenden Mütter [91] und der Zunahme von Mehrlingsschwangerschaften durch die Reproduktionsmedizin [123]. Auch psychosoziale Faktoren spielen zunehmend eine Rolle [142].

Während Morbidität und Mortalität bei Frühgeborenen nach 34 + 0 SSW gering sind [15], haben Kinder, die vor der 33. SSW geboren werden, ein deutlich erhöhtes Risiko für bleibende physische Behinderungen und kognitive Störungen. Nach den Ergebnissen einer großen Fall-Kontroll-Studie aus Frankreich, konnte bei 39 % der untersuchten Kinder, die zwischen der 22. und der vollendeten 32. SSW geboren wurden, im Alter von 5 Jahren eine körperliche oder geistige Behinderung nachgewiesen werden [79].



Die Kosten der Frühgeburtlichkeit auf neonatalen Intensivstationen in Deutschland belaufen sich jährlich auf etwa 890 Millionen Euro [112]. Weitere Millionen sind nötig um die sozialpädiatrische und heilpädagogische Nachsorge zu gewährleisten [131].

Trotz des heutzutage flächendeckend hohen Standards der Neonatalmedizin kann eine wesentliche Verbesserung der Situation in den kommenden Jahren nur dann erreicht werden, wenn es gelingt, die Frühgeburtenrate als die Hauptursache für die perinatale und neonatale Morbidität und Mortalität zu senken oder zumindest den Geburtstermin in die höheren Tragzeitklassen zu verlagern [142]. Erste vielversprechende Ansatzpunkte zeichnen sich ab. Als Beispiele sind die Aufdeckung und Vermeidung ursächlicher Faktoren der Frühgeburtlichkeit, wie z.B. die Früherkennung bakterieller Vaginosen durch die vaginale pH-Selbstkontrolle [52; 58] sowie die Regionalisierung von Risikogeburten in die Perinatalzentren mit ihren besseren Behandlungsmöglichkeiten, zu nennen [77; 142].

### **1.2 Die Rolle ascendierender Infektionen für die Schwangerschaft**

Die Ursachen der Frühgeburtlichkeit sind vielfältig. Risikofaktoren sind neben Mehrlingsschwangerschaften, Plazentationsstörungen, fetaler Pathologie, Uteruspathologie und niedrigem sozialen Status vor allem ascendierende, seltener systemische Infektionen [77; 80; 90], welchen nach heutigem Kenntnisstand die Hauptrolle bei der Entwicklung von Frühgeburts Tendenzen zugeschrieben werden muss [33; 114; 125]. So sind mehr als 50 % aller Frühgeburten, die mit vorzeitigem Blasensprung oder vorzeitiger Wehentätigkeit ohne erkennbare Ursache einhergehen, auf subklinisch verlaufende, ascendierende intrauterine Infektionen zurückzuführen [75; 77; 102]. Dabei spielen ascendierende Infektionen vor allem bei Frühgeborenen vor der 28. SSW eine Rolle, während sie bei Frühgeburten um die 34. bis 36. SSW seltener nachgewiesen werden [45; 114].

Die Hauptinfektionsquellen stellen bakterielle Störungen der Vaginalflora mit Keimen der Darmflora (z.B. *E.coli*) und der bakteriellen Vaginose dar [90; 102]. Die bakterielle Vaginose ist eine der häufigsten Infektionen der Vagina bei sexuell aktiven Frauen mit einer Prävalenz von 10 – 20 %. Es handelt sich dabei um eine vaginale Dysbiose mit einer deutlichen Zunahme anaerober Mikroorganismen (z.B. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*) unter Verdrängung der physiologischen Lactobazillenflora [45; 87]. Bis zu 50 % der betroffenen Frauen haben keine oder nur geringe Symptome [90]. Erst das Zusammenspiel mehrerer ungünstiger Faktoren, wie Störungen der Vaginalflora,

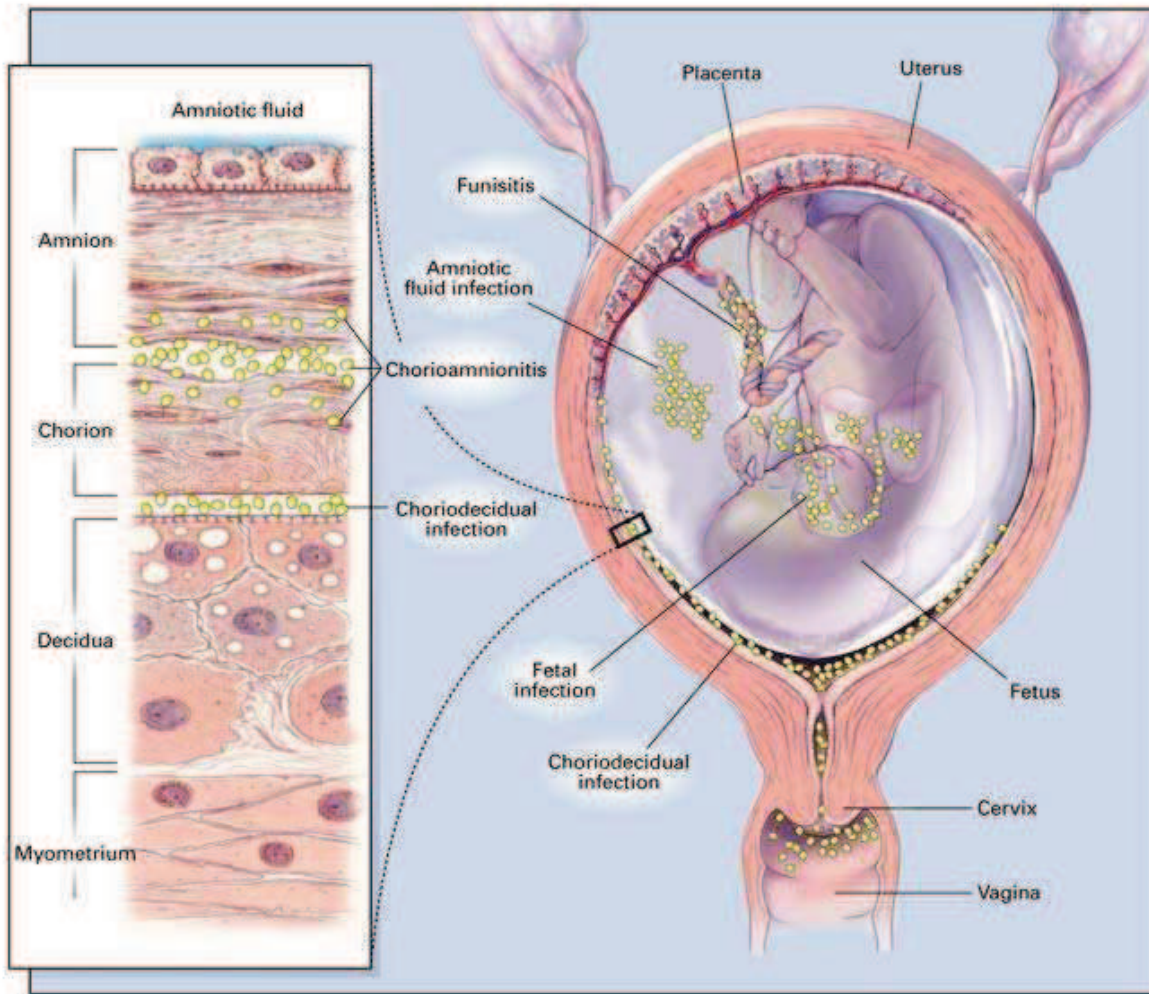
## 1. Einleitung

Zervixinsuffizienz oder Stresssituationen, begünstigt eine Aszension der Bakterien. Die aufsteigenden Keime infiltrieren die Dezidua und die Eihäute und führen zu einer lokalen Entzündungsreaktion (Chorioamnionitis). Schließlich können die Bakterien in die Amnionhöhle penetrieren und zu einer Infektion des Feten führen [45; 102; 116]. Klinische und epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass bei extremer Frühgeburtlichkeit vor der 28. SSW, in 50 – 60 % der Fälle eine Chorioamnionitis mit Entzündung der Eihäute und der Plazenta nachweisbar ist. In vielen Fällen verläuft die Chorioamnionitis asymptomatisch, sodass die Diagnose erst postpartal histologisch gesichert werden kann [75; 141]. Induziert die Chorioamnionitis eine systemische Entzündungsreaktion bei der Schwangeren, entwickelt sich ein klinisch fassbares Amnioninfektionssyndrom, das mit maternalem Fieber, steigenden maternalen Entzündungsparameter (wie Leukozytose, CRP-Anstieg), maternaler Tachykardie, fetaler Tachykardie, Schmerzhaftigkeit der Gebärmutter und übelriechendem Fruchtwasser einhergehen kann [23; 75].

Man unterscheidet 4 Stadien der ascendierenden Infektion [45; 114; 116]:

- I. Überwiegen von fakultativ pathogenen Organismen in der Vagina, d.h. bakterielle Vaginose bzw. Mischflora (häufiger).
- II. Befall der Dezidua (Deziduitis) und der Eihäute (Chorioamnionitis) durch Aszension der Bakterien.
- III. Befall des Fruchtwassers und der Nabelschnur (Funisitis).
- IV. Befall des Feten auf unterschiedlichen Wegen: Aspiration des infizierten Fruchtwassers mit nachfolgender kongenitaler Lungenentzündung; Direkter Kontakt mit Mikroorganismen im Fruchtwasser mit nachfolgender Konjunktivitis und Otitis; Befall des fetalen Kreislaufes über die Nabelschnur mit nachfolgender Bakteriämie, FIRS und Sepsis.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1-1:** Mögliche Wege und Ausbreitung intrauteriner Infektionen [45]

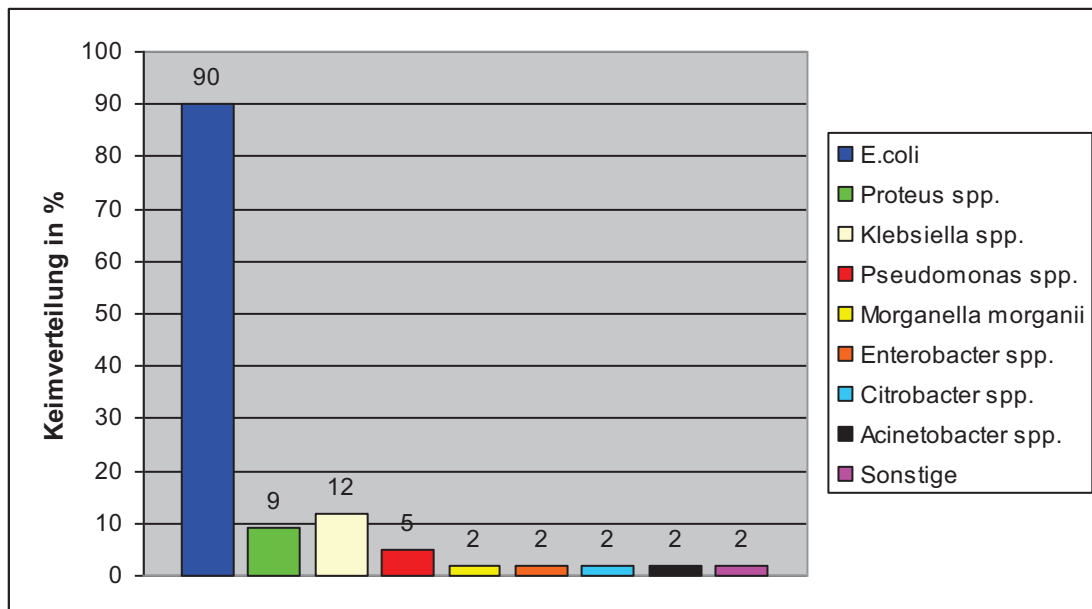
Prostaglandine, insbesondere  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$ , spielen sowohl bei der termingerechten Geburt wie auch bei der infektionsbedingten Frühgeburt eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der Geburtsvorgänge, da sie neben einer Beteiligung am Reifungsprozess der Zervix, zu einer Sensibilisierung des Myometriums gegenüber Oxytocin und zur Wehentätigkeit führen [77; 120]. Die Sensitivität des Myometriums gegenüber Prostaglandinen ist über die gesamte Schwangerschaft relativ hoch [120].

Die Bedeutung der Prostaglandine bei den Pathomechanismen der infektionsbedingten Frühgeburt wurde intensiv untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass die ascendierten Bakterien einerseits direkt in die Prostaglandinsynthese eingreifen, andererseits über eine Aktivierung von Makrophagen die Sekretion hochwirksamer Zytokine wie  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF}$  induzieren, welche eine vermehrte Produktion von wehenwirksamen Prostaglandinen im Bereich der Eihäute, Plazenta und der Dezidua bewirken. Darüberhinaus stimulieren  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF}$  die Freisetzung von  $\text{IL-6}$  aus Dezidua- und Chorionzellen.  $\text{IL-6}$  steigert parakrin die

## 1. Einleitung

Prostaglandinsynthese, wodurch sich ein positiver Feedbackmechanismus ergibt [41]. Durch den lokalen Entzündungsprozess kommt es zu einer vermehrten Invasion von neutrophilen Granulozyten, die durch die Synthese von Kollagenasen eine Erweichung des zervikalen Gewebes und die Öffnung des Muttermundes bedingen [77]. Diese Vorgänge können zu vorzeitiger Wehentätigkeit, vorzeitigem Blasensprung und Frühgeburt führen.

In der Klinik St. Hedwig in Regensburg werden schwangere Frauen mit Frühgeburtsbestrebungen bzw. mit Zervixinsuffizienz vor der 34 + 0 SSW bei stationärer Aufnahme auf das Vorhandensein pathologischer Keimen im Vaginalsekret untersucht. Die Ergebnisse werden jährlich statistisch ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass, bezogen auf das gramnegative Keimspektrum, *E.coli* mit Abstand am häufigsten als pathologische Besiedelung in der Vaginalflora von schwangeren Frauen vorgefunden wurde. Im Jahr 2005 konnte bei 90 % der Schwangeren mit positivem Keimnachweis *E.coli* aus dem Vaginalabstrich isoliert werden (Abbildung 1-2). Weitere relativ häufige Keime waren *Klebsiella spp.* mit 12 % und *Proteus spp.* mit 9 %. *Enterobacter spp.* konnten zwar nur bei 2 % der betroffenen Schwangeren nachgewiesen werden, allerdings ging die Präsenz von *Enterobacter spp.* im Vaginalsekret mit fulminanten Krankheitsverläufen bei den betroffenen Frühgeborenen einher. In einem Teil der Abstriche konnte mehr als ein Keim isoliert werden, was auf eine Mischinfektion zurückzuführen war.



**Abbildung 1-2:** Vorkommen von pathologischen Keimen im Vaginalabstrich schwangerer Frauen mit vorzeitiger Wehentätigkeit im Jahr 2005 (n=239 Schwangere mit positivem Keimnachweis)

Darüberhinaus konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass LPS von *E.coli in vitro* eine sehr starke Zytokinproduktion durch umbilikale mononukleäre Zellen hervorruft und folglich als ein äußerst aggressiver Erreger zu bezeichnen ist [120]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die vorliegende Arbeit LPS von *E.coli* zur Stimulation der umbilikalischen mononukleären Zellen eingesetzt.

### **1.3 Das Fetale Infektionssyndrom (FIRS)**

Wenn Mikroorganismen infolge aufsteigender intrauteriner Infektionen Zugang zum fetalen Blutkreislauf erhalten, führt dies zu einer systemischen Aktivierung des fetalen Immunsystems und zur Freisetzung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren. Dieser Zustand wird als Fetales Infektionssyndrom („fetal inflammatory response syndrome“, FIRS) bezeichnet und stellt das fetale Gegenstück zur SIRS („systemic inflammatory response syndrome“) dar, welches bei Erwachsenen beschrieben ist. FIRS ist ein subklinisch verlaufender Prozess und ist mit dem Auftreten vorzeitiger Wehen und vorzeitigem Blasensprung assoziiert [14; 48]. Diagnostische Kriterien des FIRS sind eine Erhöhung der IL-6 Konzentration im fetalen Plasma auf über 11 ng/ml und eine histologisch nachgewiesene Funisitis [48].

Früher war man der Meinung, dass die Immunzellen des Feten und des Neugeborenen unreif sind und nur vermindert auf Entzündungsprozesse reagieren können. Diese Ansicht ist überholt und es hat sich herausgestellt, dass das fetale Immunsystem durchaus in der Lage ist, eine angeborene und sogar eine erworbene Immunantwort zu bewerkstelligen [48].

FIRS ist ein systemischer Prozess und betrifft nahezu alle fetalen Organsysteme. Zwei der wichtigsten Zielorgane sind die fetale Lunge und das fetale Gehirn [48].

Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine chronische Lungenerkrankung sehr unreifer Frühgeborener, die häufig als Folgeerkrankung einer fetalen inflammatorischen Reaktion infolge aufsteigender intrauteriner Infektionen auftritt. Die Aktivierung des fetalen Immunsystems führt zu tiefgreifenden Modifikationen der Lungenentwicklung, die durch eine verminderte Alveolarisierung mit gestörter Kollagen- und Elastinbindung und eine pathologische Vaskularisierung gekennzeichnet ist [47]. Hieraus ergeben sich für die ehemals sehr frühen Frühgeborenen im Kindes- und Erwachsenenalter erhebliche Konsequenzen, die überwiegend als obstruktive Ventilationsstörungen beschrieben sind [75]. Die Inzidenz der BPD korreliert eng mit der Unreife der fetalen Lunge. 15 – 30 % der Frühgeborenen, die vor

der 28. SSW geboren werden, erkranken an einer BPD, während sie bei Frühgeborenen nach der 32. SSW kaum mehr vorkommt [10; 47].

Zahlreiche Studien weisen auf eine zentrale Rolle fetaler Infektionen in der Genese perinataler Hirnschädigungen hin [42; 48; 146; 147]. Dabei stehen neben peri- und intraventrikulären Hirnblutungen, insbesondere Läsionen der weißen Hirnsubstanz (periventrikuläre Leukomalazie, PVL) im Vordergrund. Die PVL wird heute als wichtigster Risikofaktor für die spätere Ausbildung einer infantilen Zerebralparese gesehen [42; 147]. Je nach Ausmaß und Lokalisation der Schädigung entwickeln die betroffenen Kinder spastische Paresen, Athetosen, Ataxien, Sprach-, Seh- oder Hörstörungen. Nicht selten ist die kognitive Leistungsfähigkeit eingeschränkt [42; 75]. Es hat sich gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine, die im Rahmen der fetalen Infektion freigesetzt werden, eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der perinatalen Hirnschädigung spielen. In den vergangenen Jahren haben zahlreiche Studien die pathophysiologischen Mechanismen der PVL untersucht [7; 13; 16; 42; 82; 146]. Dabei konnte in experimentellen Untersuchungen eine direkte neurozytotoxische Wirkung von Endotoxinen und proinflammatorischen Zytokinen auf das fetale Gehirn nachgewiesen werden [42]. Insbesondere der Anstieg der TNF-Expression ist mit der Entstehung fetaler und neonataler Hirnschäden assoziiert [13; 42; 82]. Während niedrige Zytokinkonzentrationen wichtig für die Ausreifung und Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferstufen sind, verhindern erhöhte TNF-Konzentrationen – wie sie bei einem fetalen Infektionssyndrom im Gehirn nachweisbar sind – diesen Reifungsprozess. Die daraus resultierende Störung der Myelinisierung wird heute als wesentliche Ursache für die Entstehung der PVL diskutiert [7; 14; 28; 75]. Neben der direkten neurozytotoxischen Wirkung von Endotoxinen und proinflammatorischen Zytokinen ist die infektionsassoziierte Beeinträchtigung der fetalen Herz-Kreislauf-Regulation mit Abfall des arteriellen Mitteldrucks, Verlust der zerebralen Autoregulation und konsekutiver Hypoxie für die perinatale Morbidität der betroffenen Kinder von wesentlicher Bedeutung. Darüberhinaus deuten Untersuchungen darauf hin, dass Endotoxine das fetale Gehirn gegenüber Sauerstoffmangel sensibilisieren [42].

### **1.4 Die Rolle des Toll-like Rezeptor 4 bei bakteriellen Infektionen**

Mikroorganismen, die die epitheliale Barriere durchbrechen und ins Gewebe eindringen, treffen zunächst auf Zellen des angeborenen Immunsystems, nämlich Gewebsmakrophagen,

## 1. Einleitung

Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen. Diese Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, mit denen sie körpereigene Partikel von pathogenen Partikeln unterscheiden können [3; 29]. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs). Sie dienen der Erkennung von Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen. Werden solche pathogenen Partikel erkannt, wird in der Zelle eine Signalkaskade eingeleitet, die zur Aktivierung der Infektionsabwehr und schließlich zur Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt [29; 137].

Bis heute wurden in Säugetieren dreizehn TLRs identifiziert, wobei beim Menschen nur die TLR1 bis 10 nachgewiesen werden konnten [29; 137]. Eine Übersicht über die verschiedenen TLRs und ihren Liganden zeigt Tabelle 1-1.

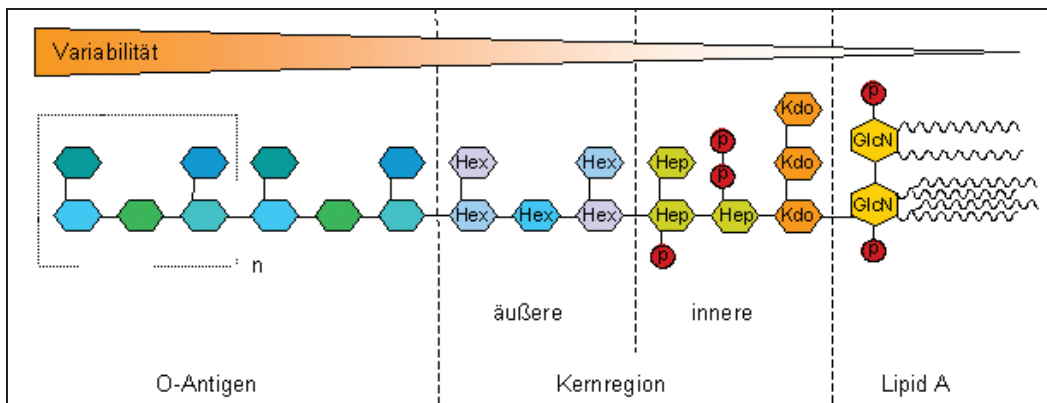
<u>Rezeptor</u>	<u>Ligand</u>	<u>Herkunft des Liganden</u>
TLR1	Heterodimerisierung mit TLR2; triacylierte Lipopeptide	Bakterien
TLR2	Heterodimerisierung mit TLR1 oder TLR6 Peptidoglykan, Lipoproteine, Lipopeptide, Lipoteichonsäure, atypisches LPS Zymosan, Phospholipomannan Glykophosphatidylinositol-Anker Hüllproteine Pam3 CSK4	Bakterien  Pilze Protozoen Viren synthetisch
TLR3	dsRNA Poly(I:C)	Viren synthetisch
TLR4	LPS Mannan, Glucuronoxylomannan Glykoinositolphospholipide RSV Fusionsprotein	Bakterien Pilze Protozoen Viren
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Heterodimerisierung mit TLR2 diacylierte Lipopeptide	Bakterien
TLR7/8 <sup>1</sup>	ssRNA Imidazoquinolin-ähnliche Moleküle	Viren synthetisch
TLR9	CpG-DNA  CpG-Oligodesoxynukleotide Hemozoin + Malaria-DNA	Bakterien, Protozoen, Viren synthetisch Protozoen
TLR10 <sup>2</sup>	nicht bekannt	nicht bekannt

TLR11 <sup>3</sup>	Profilin-ähnliches Molekül Komponente von uropathogenen Bakterien	Protozoen Bakterien
TLR12 <sup>3</sup>	nicht bekannt	nicht bekannt
TLR13 <sup>3</sup>	nicht bekannt	nicht bekannt

**Tabelle 1-1:** Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden, modifiziert nach Uematsu und Akira [137];  
<sup>1</sup> Pseudogen in der Maus; <sup>2</sup> nur human beschrieben; <sup>3</sup> nur in der Maus beschrieben; ss/ds: einzelsträngig/doppelsträngig; RSV: respiratorisches Syncytialvirus

Die Liganden der TLRs sind vielfältig und reichen von Nukleinsäuren, Proteinen bis hin zu Lipiden und Polysacchariden. LPS beispielsweise ist der wichtigste Ligand des TLR4.

LPS ist ein essentieller Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und zählt zu den potentesten bekannten Immunstimulatoren. Es besteht aus Lipid A, über welches das Molekül in der Membran verankert ist, einer Kernregion und einem O-Antigen, das den äußersten Teil des LPS darstellt. Während das O-Antigen durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet ist, die für jede Bakterienspezies spezifisch ist, ist Lipid A der am stärksten konservierte Teil des LPS-Moleküls [29; 72]. TLR4 erkennt die LPS-Moleküle unter Zuhilfenahme akzessorischer Proteine über das konstante Lipid A [137].



**Abbildung 1-3:** Struktur von LPS modifiziert nach Rietschel [72]

## 1.5 Zytokine

### 1.5.1 Definition

Zytokine sind extrazelluläre Botenstoffe, die eine zentrale Rolle bei der Regulation der interzellulären Kommunikation spielen [69; 130]. Sie können von nahezu allen kernhaltigen



## 1. Einleitung

Zellen gebildet werden, wobei die Hauptproduktion bei den Zellen des Immunsystems liegt [30; 43]. Zytokine binden mit hoher Affinität an spezifische membranständige Rezeptoren ihrer Zielzellen und entfalten ihre Wirkungen bereits bei Konzentrationen im Picomolarbereich. In den letzten 35 Jahren wurden kontinuierlich neue Zytokine identifiziert, so dass gegenwärtig weit mehr als 100 unterschiedliche Zytokine beschrieben sind. Zytokine steuern grundlegende biologische Prozesse, wobei die Koordination von Immunreaktionen, die Vermittlung von Entzündungsreaktionen, die Regulation der Hämatopoese, die Förderung der Wundheilung, sowie die Regulation der spezifischen Zelldifferenzierung während der fetalen Entwicklung am Wichtigsten sind [69]. Die Wirkprinzipien der Zytokine sind vielfältig, so dass ein Zytokin an unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Wirkungen auslösen kann (Pleiotropie) oder verschiedene Zytokine auf eine Zielzelle die gleichen Wirkungen haben können (Redundanz). Außerdem kann sich die Wirkung verschiedener Zytokine gegenseitig verstärken (Synergismus) oder abschwächen (Antagonismus) [124]. Aufgrund dieser vielseitigen Interaktionen und der Vielfalt ihrer Steuerungsmöglichkeiten wird ihr Wirkungsgefüge innerhalb des Immunsystems auch als Zytokinnetzwerk bezeichnet [48].

Im Wesentlichen teilt man die Zytokine entsprechend ihren Hauptwirkungen in sechs Gruppen ein: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Koloniestimulierende Faktoren, Chemokine und Wachstumsfaktoren [124]. Eine Übersicht der Zytokinfamilien und einige wichtige Vertreter zeigt Tabelle 1-2.

<b>Interferone</b>	IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$
<b>Interleukine</b>	IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13
<b>Tumornekrosefaktoren</b>	TNF
<b>Kolonie-stimulierende Faktoren</b>	G-CSF, GM-CSF, IL-3
<b>Chemokine</b>	IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$
<b>Wachstumsfaktoren</b>	TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PDGF

**Tabelle 1-2:** Zytokinfamilien und einige wesentliche Vertreter [124]

Im Verlauf eines entzündlichen Prozesses werden proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine gebildet. Proinflammatorische Zytokine zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine Inflammation fördern und unterhalten, während antiinflammatorische

Zytokine die Aktivität der proinflammatorischen Mediatoren hemmen. Entscheidend für den physiologischen Ablauf der Entzündungsreaktion ist ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden Einflüssen [30].

### 1.5.2 Proinflammatorische Zytokine

Bakterien oder bakterielle Produkte, wie zum Beispiel LPS, aktivieren Makrophagen, die daraufhin verschiedene inflammatorische Zytokine produzieren und sezernieren. Die proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 $\beta$  stehen am Anfang der inflammatorischen Kaskade und werden daher oft als „early response cytokines“ bezeichnet. TNF und IL-1 $\beta$  wirken synergistisch und spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Koordinierung der Entzündungskaskade. Sie induzieren die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie IL-6 und IL-8 [21; 43]. Darüber hinaus stimulieren die „early response cytokines“ die Expression von Selektinen und anderen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, um die Adhäsion und Migration der Leukozyten zu ermöglichen [43]. IL-6 hat vielfältige biologische Funktionen. Es stimuliert das Wachstum und die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, induziert die Synthese von Akute-Phase-Proteine in der Leber, moduliert die Hämatopoese und aktiviert das Gerinnungssystem. Es hat sich gezeigt, dass IL-6 *in vitro* einen hemmenden Effekt auf die Produktion von TNF und IL-1 $\beta$  hat und daher möglicherweise auch bei der Eindämmung von Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt [2; 121]. IL-8 gehört zu der Gruppe der Chemokine und wirkt hauptsächlich auf Neutrophile Granulozyten. Diese wandern entlang des chemotaktischen Gradienten aus dem Blut zum Entzündungsort [21; 43]. Ein Überwiegen der Zytokine TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 ist stark mit der Entwicklung einer Sepsis assoziiert [21]. Weitere wichtige proinflammatorische Zytokine sind IL-12 und IFN $\gamma$ . IL-12 wird vorwiegend von Makrophagen und B-Lymphozyten gebildet und induziert durch eine Differenzierung von T-Helferzellen in TH1-Lymphozyten die Produktion von IFN $\gamma$  [130]. T-Helferzellen werden anhand der von ihnen sezernierten Zytokine in zwei wichtige Subpopulationen untergeteilt, die TH1-Lymphozyten und die TH2-Lymphozyten. TH1-Lymphozyten stimulieren die Ausbildung einer zellulären Immunreaktion, während TH2-Lymphozyten überwiegend eine humorale Immunreaktion fördern. IFN $\gamma$  ist das Leitzytokin der TH1-Reaktion und verstärkt gemeinsam mit IL-12 die Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der natürlichen Killerzellen [124].

### **1.5.3 Antiinflammatorische Zytokine**

Zu den antiinflammatorischen Zytokinen gehören IL-4, IL-10, IL-13 und TGF $\beta$ , wobei IL-10 eine Schlüsselrolle in der Unterdrückung der Entzündungsreaktion zukommt [30; 119]. IL-10 lenkt die T-Lymphozytenantwort von TH1 zu TH2 und kann somit als Gegenspieler von IL-12 aufgefasst werden. TH2-Lymphozyten fördern nicht nur die humorale Immunantwort, sondern sind auch für die Sekretion antientzündlicher Zytokine, wie IL-4, IL-10 und IL-13 verantwortlich. IL-4, IL-10, IL-13 und TGF $\beta$  hemmen *in vitro* die Produktion von TNF, IL-1 $\beta$  und IL-8. Außerdem kontrollieren sie den inflammatorischen Prozess durch eine Unterdrückung der Expression von Adhäsionsmolekülen, ohne die eine Adhäsion und Migration der Leukozyten nicht möglich ist [30].

### **1.6 Indometacin als Tokolytikum im „Off-Label-Use“**

Umfangreiche Bemühungen um die Problematik der Frühgeburt haben zu der Entwicklung einer Reihe von therapeutischen und prophylaktischen Ansätzen geführt, wie die Cerclage oder die Tokolyse. Die Tokolyse wird seit über 30 Jahren zur Behandlung vorzeitiger Wehen eingesetzt. Dennoch bleiben nach wie vor viele Probleme ungelöst [108]. Als Beispiel ist die fehlende Zulassung klinisch wirksamer Tokolytika zu nennen. In Deutschland sind derzeit nur das Betamimetikum Fenoterol und der Oxytocin-Rezeptorantagonist Atosiban zugelassen [15]. Zudem ist die Effizienz einer Dauertokolyse bisher nicht durch evidenzbasierte Daten gesichert. Jedoch ist sie häufig eine klinische Notwendigkeit bei Wunsch der Schwangeren nach Therapie. Auch die Frage nach einem First-Line-Tokolytikum bleibt ungeklärt [108].

Die Einleitung einer medikamentösen Tokolyse ist in der Regel bei spontaner vorzeitiger Wehentätigkeit, Verkürzung der funktionellen Zervixlänge und/oder Muttermunderweiterung zwischen der 24+0 und 34+0 SSW indiziert. Der Haupteffekt der Tokolyse besteht in einer signifikanten Verlängerung der Schwangerschaft um zwei bis sieben Tage gegenüber Placebo [15]. Es wird berichtet, dass bei Frühgeburtsbestrebungen zwischen der 23. und 26. SSW die Überlebenschancen des Kindes mit jedem gewonnenen intrauterinen Tag um 3 % steigt [109]. Außerdem ermöglicht eine Verlängerung der Schwangerschaft um mindestens 48 Stunden den Abschluss der Lungenreifeinduktion mit Betamethason, was die perinatale und neonatale Morbidität und Mortalität signifikant reduziert [26; 109]. Und schließlich kann und sollte der Zeitgewinn genutzt werden, die Schwangere in ein Perinatalzentrum zu verlegen, mit der Möglichkeit der intensivmedizinischen Versorgung des Frühgeborenen [109].

Neben Betamimetika und Oxytocin-Rezeptorantagonisten werden Kalziumantagonisten, Magnesium, Prostaglandinsynthesehemmer und NO-Donatoren als Tokolytika im „Off-Label-Use“ eingesetzt. Die Substanzen unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit, dem Nebenwirkungsprofil und den Kosten [15]. Indometacin gehört zu der Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika und hemmt als nicht-selektiver Cyclooxygenase-Inhibitor die Prostaglandinsynthese. Indometacin ist in Deutschland als Tokolytikum nicht zugelassen, obwohl es eine vergleichbare tokolytische Effizienz wie Fenoterol aufweist und aufgrund des einfachen Applikationsmodus und der geringen Rate mütterlicher Nebenwirkungen erhebliche Vorteile bietet [15; 107]. Allerdings ist Indometacin plazentagängig, so dass mit einer fetalen Affektion gerechnet werden muss. Es hat sich gezeigt, dass es bei einer längeren Anwendung von Indometacin nach der 32. SSW zu einem Verschluss des Ductus arteriosus (Botalli) und zu einem Oligohydramnion kommen kann [107]. Durch regelmäßige Ultraschall- und Dopplerkontrollen des Ductus arteriosus können diese Komplikationen rechtzeitig erkannt und die Indometacin-Applikation reduziert oder beendet werden [125]. Die im Zusammenhang mit Indometacin diskutierten neonatalen Komplikationen, wie peri- und intraventrikuläre Blutungen, periventrikuläre Leukomalazie und nekrotisierende Enterokolitis haben sich in jüngeren Studien nicht bestätigt [1; 132].

Nach den Beobachtungen der Klinik St. Hedwig in Regensburg scheint die Wirksamkeit der in Deutschland zugelassenen Tokolytika bei Frühgeburtstendenzen unterhalb der 28. SSW eingeschränkt zu sein, insbesondere dann, wenn eine subklinische Infektion als Ursache der vorzeitigen Wehentätigkeit angenommen werden muss. In diesen Ausnahmefällen hat sich neben der intravenösen Gabe von Antibiotika die rektale Applikation von Indometacin bewährt [125]. Diese Annahme wird durch eine aktuelle Metaanalyse unterstützt, die Indometacin als ein Tokolytikum der 1. Wahl hinsichtlich seiner Effizienz und Verträglichkeit postuliert [49].

### **1.7 Die antenatale Steroidprophylaxe**

Die antenatale Steroidapplikation ist nach einer Vielzahl von randomisierten Studien und Metaanalysen eine sichere und wirksame Methode zur Senkung der Mortalität und des Risikos eines „respiratory distress syndrome“ (RDS) bei Frühgeborenen [26; 62; 128]. Glukokortikoide fördern durch eine Differenzierung der Alveolarepithelzellen zu Typ-II-Pneumozyten die Synthese von pulmonalen Surfactant und führen somit zu einer Induktion

der fetalen Lungenreifung. Die pränatale Glukokortikoidgabe ist indiziert bei Frühgeburtsbestrebungen vor der 34. SSW. Als effektiv hat sich eine zweimalige Applikation von 12 mg Betamethason intramuskulär im Abstand von 24 h erwiesen [128].

Crowley et al konnten in einer Metaanalyse neben der fördernden Wirkung auf die fetale Lungenreifung weitere günstige Effekte einer antenatalen Steroidprophylaxe aufzeigen, wie beispielsweise eine signifikante Reduktion der Inzidenz von nekrotisierenden Enterokolitiden sowie periventrikulären Blutungen [27]. Es wird vermutet, dass dies möglicherweise mit den immunsuppressiven Eigenschaften der Glukokortikoide bei der häufig infektiösen Genese der Frühgeburten zusammenhängt. Die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide beruht im Wesentlichen auf einer Unterdrückung des nukleären Faktors  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), welcher die Hauptrolle in der Signaltransduktion der Zytokine spielt [138].

## **1.8 Zielsetzung und Fragestellungen**

Während sich zahlreiche Studien mit potentiellen, fetalen Nebenwirkungen einer Indometacin-Tokolyse auseinandergesetzt haben, ist über den Effekt von Indometacin auf das fetale Immunsystem nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit soll anhand eines *in vitro* Modells eine fetale Entzündungsreaktion nachgeahmt und der immunmodulatorische Effekt von Indometacin und Betamethason auf das stimulierte fetale Immunsystem untersucht werden. Dabei werden mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut von Neugeborenen unmittelbar nach deren Geburt isoliert, unter definierten Bedingungen mit LPS von *E.coli* stimuliert und mit Indometacin und/oder Betamethason behandelt. Die Analyse der Zytokinantwort erfolgt unter folgenden Gesichtspunkten:

- Welche Zytokine werden durch LPS im Feten hochreguliert?
- Welchen Einfluss hat Betamethason auf die fetale Zytokinproduktion?
- Wie beeinflusst Indometacin die fetale Zytokinproduktion und inwieweit spielen unterschiedliche Konzentrationen von Indometacin eine Rolle?
- Wie wirken beide Substanzen gemeinsam auf die fetale Zytokinproduktion?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Untersuchungsmaterial**

Die Nabelschnurblutproben stammen von 10 Reifgeborenen, die im Zeitraum von November 2008 bis März 2009 in der Klinik St. Hedwig, Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Universität Regensburg, spontan geboren wurden. Das Blut wurde unmittelbar nach der Geburt aus der Nabelschnur in einem mit Zitrat versetzten Beutel abgenommen. Die Blutentnahmen und die Speicherung verschlüsselter, personenbezogener Daten erfolgte nach Aufklärung und Einholung des Einverständnisses der Eltern. Es wurde nur das Blut von gesunden Reifgeborenen in die Studie einbezogen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Nabelschnurblutproben maximal 12 Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

#### **2.1.2 Medikamente und Stimulanz für die Zellkultur**

- Celestan soluble 4 mg (Betamethason), Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
- Confortid 50 mg (Indometacin), Alparma ApS, Kopenhagen, Dänemark
- LPS von *E.coli* B205 3 (ASI, 276), Nachlass von G. Haraguchi und U. Zähringer, Deutschland

#### **2.1.3 Reagenzien, Medien und Puffer**

- Aqua B. Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Ficoll 400, Sigma-Aldrich, Deutschland
- Lyse-Puffer, Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San José, Kalifornien, USA
- Humanes AB-Serum (bei 56 °C für 30 min inaktiviert), Nachlass vom Institut der Medizinischen Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg
- Natronlauge (NaOH), 1 N
- Pancoll human, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
- PBS, *phosphate buffered saline*, Lonza, Verviers, Belgien
- RPMI-Medium *with L-Glutamine*, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Salzsäure (HCl), 1 N
- Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2 N
- Sheath-Fluid für Lx-Gerät: Liquichip™ System fluid, Qiagen GmbH, Deutschland

- Trypan Blue solution, Sigma-Aldrich, Deutschland
- T-Zellmedium, selbst hergestellt aus 45 ml RPMI-Medium und 5 ml humanen AB-Serum

#### 2.1.4 Reaktionskits

- Human/Mouse TGF- $\beta$ 1 ELISA Ready-SET-Go, eBioscience
- 5plex mit GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  (LHC0003), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-4 (LHC0041), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-5 (LHC0051), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-12 p40/p70 (LHC0121), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-10 (LHC0101), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-15 (LHC0151), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IFN $\gamma$  (LHC 4031), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- MIP-1 $\alpha$  (LHC1021), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- MIP-1 $\beta$  (LHC1051), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- Extrazellulärer Pufferkit (LHB0001), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

#### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

- 96-Well-Platten, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
- Eppendorf-Tubes 1,5 ml/2,0 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Falcon-Röhrchen 15 ml/50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Pipetten 5,0 ml/10 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Pasteurpipetten
- Pipettenspitzen 10  $\mu$ l/200  $\mu$ l/1,0 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Zitratbeutel, Macopharma, Mouvaux, Frankreich

#### 2.1.6 Geräte

- Inkubator, Cellsafe, Integra Biosciences Inc., USA
- ELISA-Messgerät
- Luminex xMAP® 100™, Luminex Corporation, Austin, Texas, USA
- Mikroskop, AxioStar plus, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
- Pipetten 10 $\mu$ l/100 $\mu$ l/200 $\mu$ l/1ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Große Pipette, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Sterilbank, Herasafe KS, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
- Schüttelgerät, MS 2 Minishaker, IKA® Works, Inc., Wilmington, North Carolina, USA
- Wasserbad TW 20, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
- Zentrifuge, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Kühlschrank
- - 80 °C Gefrierschrank
- Einfrierbox

### 2.1.7 Software

- Liquichip™-Analyser-Software, Qiagen GmbH, Deutschland
- Microsoft Office 2007 (Word, Excel, Powerpoint)
- SPSS®

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung der CBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

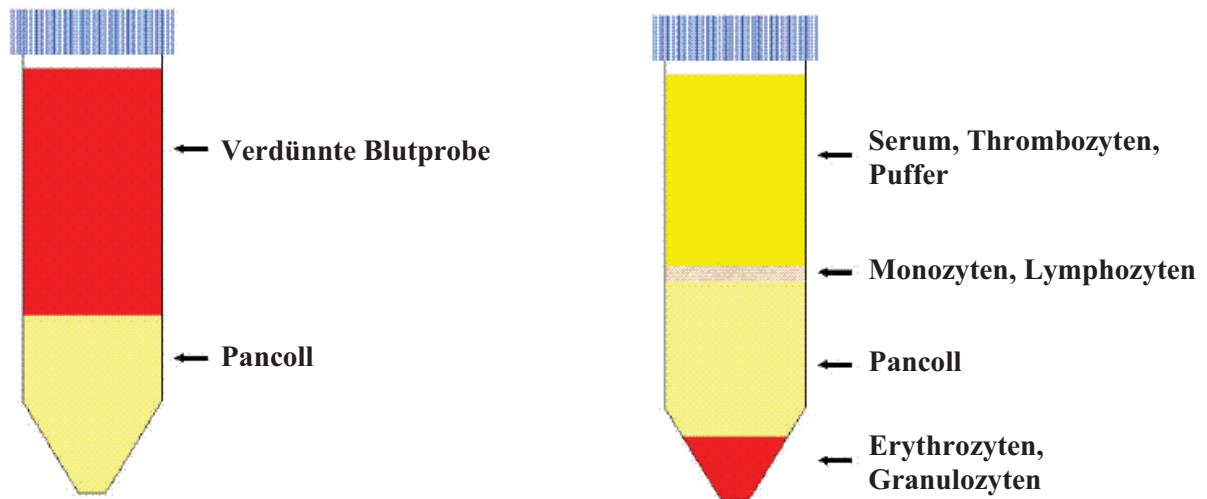
Die Isolierung der umbilikalen mononukleären Zellen (cord blood mononuclear cells, CBMC) erfolgt unter aseptischen Bedingungen unter der Sterilbank. Das mit Zitrat versetzte Nabelschnurblut wird in Falcon-Röhrchen gefüllt und im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Anschließend werden je 15 ml Pancoll human in Falcon-Röhrchen vorgelegt und mit je 15 - 30 ml des verdünnten Blutes überschichtet ohne die Phasen zu vermischen. Es folgt die Dichtegradientenzentrifugation bei 600 g ohne Bremse und 21 °C für 30 min. Dabei wandern die Zellen der Blutprobe zur Pancoll Grenzschicht, wo sie mit Ficoll 400 (enthalten in Pancoll) in Kontakt kommen. Durch diesen Stoff kommt es zu einer Aggregation der Erythrozyten und dadurch zu einer Erhöhung der Sedimentation dieser Zellen, so dass sie sehr schnell als Pellet zu Boden sinken. Auch die Granulozyten sedimentieren auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens, da es durch den Kontakt mit der leicht hypertonischen Pancoll-Lösung zu einer Erhöhung ihrer Dichte kommt. Die Lymphozyten und Monozyten können aufgrund ihrer geringeren Dichte nicht ins Pancoll eintreten und sammeln sich in einer konzentrierten Bande als Grenzschicht zwischen Serum und Pancoll. Durch diese Bandenbildung können die



Lymphozyten und Monozyten mit hoher Ausbeute und geringer Verunreinigung gewonnen werden.

**Vor Zentrifugation**

**Nach Zentrifugation**



**Abbildung 2-1:** Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll 400.

Nach der Zentrifugation wird die obere Phase (enthält Serum, Thrombozyten und Puffer) vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Mit einer neuen Pipette wird die Interphase mit den Lymphozyten und Monozyten in ein Falcon-Röhrchen überführt. Wichtig dabei ist, das gesamte Material der Interphase zu entnehmen, ohne zuviel Überstand (obere Phase: Verunreinigung mit Thrombozyten) bzw. Pancoll (untere Phase: Verunreinigung mit Granulozyten) zu überführen. Anschließend werden die Falcon-Röhrchen mit den Lymphozyten und Monozyten mit je 30 ml PBS aufgefüllt und bei 300 g und 21 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die Lymphozyten und Monozyten mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert. Um die noch vereinzelt vorhandenen Erythrozyten zu lysieren, werden je 3 ml Erylyse-Puffer in die Falcon-Röhrchen pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit zwei weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten werden die Lymphozyten und Monozyten von Thrombozyten, Serum und Pancoll gereinigt. Als Ergebnis erhält man eine hoch gereinigte Suspension von lebenden Lymphozyten und Monozyten.

Die Lymphozyten und Monozyten werden in 3 - 4 ml T-Zellmedium aufgenommen. Anschließend wird die Zellzahl ermittelt. Um vitale Zellen von abgestorbenen Zellen zu unterscheiden, mischt man 10 µl der Zellsuspension mit 190 µl Trypanblau (1:20). Dieser Farbstoff kann aufgrund der veränderten Membrandurchlässigkeit in abgestorbene Zellen

eindringen und diese blau färben, während die Membran lebender Zellen für diesen Farbstoff nicht durchlässig ist. Mit einer 10 µl Pipette wird die angefärbte Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gebracht und unter dem Mikroskop mit 40fach vergrößertem Objektiv ausgewertet. Dabei werden nur die ungefärbten, vitalen Zellen in jedem der vier Eckquadrate gezählt und der Mittelwert daraus bestimmt. Der errechnete Mittelwert wird mit dem Faktor 20 (Verdünnungsfaktor) und dem Faktor  $10^4$  (Neubauer-Zählkammerfaktor) multipliziert und man erhält die Anzahl der vitalen Zellen pro Milliliter. Anschließend wird die Zellsuspension mit T-Zellmedium auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter verdünnt.

### 2.2.2 Bestimmung der LPS-Konzentration für den Stimulationsansatz

Das in pulverisierter Form vorliegende LPS von *E.coli* (Einwaage 2,3 mg) wird in 2,3 ml Aqua B. Braun aufgelöst. Dann werden je 40 µl der LPS-Lösung (1,0 mg/ml) in beschriftete Eppendorf-Tubes pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

Bevor mit dem eigentlichen Stimulationsversuch begonnen werden kann, soll anhand einer Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen LPS und IL-6 die für den Stimulationsansatz geeignete LPS-Konzentration bestimmt werden. Dazu werden in einer 1:3 Verdünnungsreihe 7 LPS-Konzentrationen hergestellt (Konzentration im Ansatz zwischen 0,05 ng/ml und 36,45 ng/ml). Die Verdünnung der Proben erfolgt mit T-Zellmedium. Reines T-Zellmedium dient als Negativkontrolle. Wie in Punkt 2.2.1 beschrieben, werden Monozyten und Lymphozyten aus einer Nabelschnurblutprobe isoliert und eine Zellsuspension mit  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter hergestellt. Für den Ansatz der Zellkultur werden je 100 µl der Zellsuspension in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte ausplattiert. Pro Well werden 10 µl der LPS-Verdünnungen bzw. 10 µl T-Zellmedium zugegeben, wobei jeweils drei Ansätze angelegt werden. Die Inkubation erfolgt bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  für 24 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Stimulationsansätze in beschriftete Eppendorf-Tubes pipettiert und bei 3000 g 10 min zentrifugiert. Die Überstände werden in neue, beschriftete Eppendorf-Tubes überführt und bis zur Messung der IL-6-Konzentrationen bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Die Zellpellets werden verworfen.

### 2.2.3 Ansatz der Zellkultur und Stimulation

Es folgt die Herstellung der Verdünnungsreihen von Betamethason und Indometacin.

Die Betamethasonlösung wird zunächst mit T-Zellmedium auf eine Konzentration von 1,0 mg/ml gebracht und in weiteren Verdünnungsschritten eine Stimulationskonzentration von 80 ng/ml (im Ansatz) hergestellt. Diese Konzentration entspricht der physiologischen

## 2. Material und Methoden

Betamethasonkonzentration im fetalen Serum nach pränataler Glukokortikoidbehandlung der Mutter [9].

Das in pulverisierter Form vorliegende Indometacin wird in 10 ml H<sub>2</sub>O aufgelöst und mit T-Zellmedium auf eine Konzentration von 1,0 mg/ml verdünnt. In weiteren Verdünnungsschritten mit T-Zellmedium werden drei Konzentrationen (Konzentration im Ansatz: 0,3 µg/ml; 1,0 µg/ml; 3,0 µg/ml) für den Stimulationsansatz hergestellt. Diese Konzentrationen orientieren sich an den Indometacinkonzentrationen, die in der Literatur bei ähnlichen Versuchen verwendet wurden [125].

Für die Zellkultur werden 96-Well-Platten verwendet, wobei in jedes Well 100 µl der Zellsuspension ausplattiert werden. Entsprechend dem unten folgendem Schema werden 10 µl der Betamethasonverdünnung bzw. 10 µl der Indometacinverdünnung in die jeweiligen Wells pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 1 h präinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zur Stimulation der Lymphozyten und Monozyten 10 µl der LPS-Verdünnung in die entsprechenden Wells pipettiert. Auftretende Mengenunterschiede werden mit T-Zellmedium ausgeglichen, sodass am Ende in jedem Well 130 µl des Stimulationsansatzes ( $1,54 \times 10^5$  Zellen pro Well) enthalten sind. Der Ansatz der Kultur erfolgt jeweils im Dreifachansatz.

Pro Nabelschnurblut werden drei 96-Well-Platten angelegt. Das Stimulationsschema ist in zwei Abschnitte unterteilt: Abschnitt 1 umfasst die Ansätze 1-27 (blau unterlegt), die als Kontrollen dienen. Die Ansätze 1-3 (Z) enthalten nur die isolierten Zellen und T-Zellmedium und stellen die Negativkontrollen dar. Dadurch soll eine Kontamination der Zellsuspension ausgeschlossen werden. In den Ansätze 4-6 (Z+LPS) wurden die Monozyten und Lymphozyten mit LPS von *E.coli* stimuliert. Daraus soll bestimmt werden, welche Zytokine durch LPS hochreguliert und welche Zytokinpiegel maximal erreicht werden. Die Ansätze 7-9 (Z+BM) enthalten neben Zellen Betamethason. Daraus soll der Einfluss von Betamethason auf die spontane Zytokinproduktion untersucht werden. Die Ansätze 10-18 (Z+IM) enthalten neben Zellen Indometacin in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,3 µg/ml; 1,0 µg/ml; 3,0 µg/ml). Hier soll der Einfluss von Indometacin auf die spontane Zytokinproduktion bestimmt werden. Außerdem soll nachgewiesen werden, inwieweit die verschiedenen Konzentrationen von Indometacin eine Rolle spielen. Die Ansätze 19-27 (Z+BM+IM) enthalten Zellen, Betamethason und Indometacin. Daraus soll untersucht werden, wie die Kombination dieser Medikamente auf die spontane Zytokinproduktion wirkt. Abschnitt 2 umfasst die Ansätze 28-48 (grün unterlegt) und dient der Untersuchung des Einflusses von Betamethason bzw. von Indometacin und der Kombination beider Substanzen auf stimulierte

## 2. Material und Methoden

Monozyten und Lymphozyten. Insgesamt wurden n=10 Nabelschnurblüter untersucht, wobei Abschnitt 1 fünfmal und Abschnitt 2 zehnmal durchgeführt wurde.

Z	Z	Z	Z + LPS	Z + LPS	Z + LPS	Z + BM	Z + BM	Z + BM
Z + IM(3)	Z + IM(3)	Z + IM(3)	Z + IM(1)	Z + IM(1)	Z + IM(1)	Z + IM(0,3)	Z + IM(0,3)	Z + IM(0,3)
Z +BM +IM(3)	Z +BM +IM(3)	Z +BM +IM(3)	Z +BM +IM(1)	Z +BM +IM(1)	Z +BM +IM(1)	Z +BM +IM(0,3)	Z +BM +IM(0,3)	Z +BM +IM(0,3)
			Z +BM +LPS	Z +BM +LPS	Z +BM +LPS			
Z +IM(3) +LPS	Z +IM(3) +LPS	Z +IM(3) +LPS	Z +IM(1) +LPS	Z +IM(1) +LPS	Z +IM(1) +LPS	Z +IM(0,3) +LPS	Z +IM(0,3) +LPS	Z +IM(0,3) +LPS
Z +BM +IM(3) +LPS	Z +BM +IM(3) +LPS	Z +BM +IM(3) +LPS	Z +BM +IM(1) +LPS	Z +BM +IM(1) +LPS	Z +BM +IM(1) +LPS	Z +BM +IM(0,3) +LPS	Z +BM +IM(0,3) +LPS	Z +BM +IM(0,3) +LPS

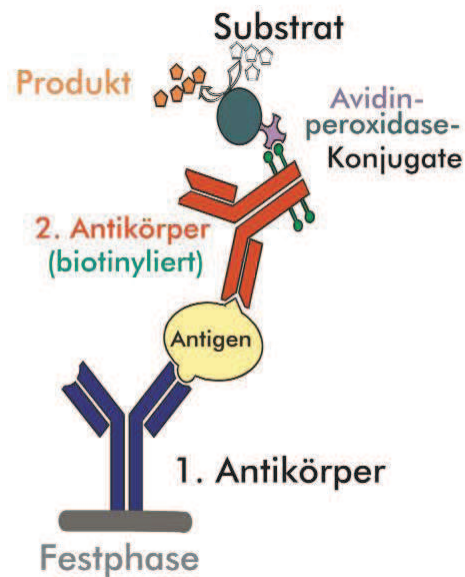
**Abbildung 2-2:** Stimulationsschema: **BM:** Betamethason, Konzentration im Ansatz 80 ng/ml; **IM(3):** Indometacin, Konzentration im Ansatz 3,0 µg/ml; **IM(1):** Indometacin, Konzentration im Ansatz 1,0 µg/ml; **IM(0,3):** Indometacin, Konzentration im Ansatz 0,3 µg/ml; **LPS:** Konzentration im Ansatz 1,5 ng/ml.

Die Inkubation der Platten erfolgt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, wobei pro Nabelschnurblut eine Platte für 4 h, die anderen beiden Platten für 24 h inkubiert werden. Es hat sich gezeigt, dass die Zytokine IL-12 und TNF frühzeitig exprimiert werden und bereits nach etwa 4 h ihren Maximalwert erreichen [21; 102]. Deshalb werden die Konzentrationen dieser Zytokine sowohl nach 4 h wie auch nach 24 h bestimmt. Die anderen Zytokine erreichen erst nach etwa 20 h ihr Maximum. Sie werden nach einer Inkubationszeit von 24 h gemessen. Nach Ablauf der Inkubationszeiten werden die Stimulationsansätze in Eppendorf-Tubes überführt und bei 3000 g 10 min zentrifugiert. Die Überstände werden in neue, beschriftete Eppendorf-Tubes pipettiert und bei -80 °C bis zur Messung tiefgefroren. Die Zellpellets werden verworfen.

### 2.2.4 Bestimmung der TGF $\beta$ -Konzentration mittels ELISA

Die Bestimmung der TGF $\beta$ -Konzentration aus den Probenüberständen wurde von Lophius Biosciences GmbH (Regensburg, Deutschland) anhand des Human/Mouse TGF $\beta$ 1 ELISA Ready-SET-Go von eBioscience durchgeführt.

Der „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein quantitatives immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Dabei fungiert das zu messende Molekül, in diesem Fall das Zytokin TGF $\beta$ , als Antigen, welches durch spezifische Antikörper und einer damit verbundenen enzymatischen Farbreaktion detektiert werden kann.



**Abbildung 2-3:** Prinzip des Sandwich-ELISA.

Im ersten Schritt werden die Vertiefungen einer 96-Well-Filterplatte mit je 100  $\mu$ l eines für TGF $\beta$  spezifischen monoklonalen Antikörpers (sogenannter „capture antibody“, verdünnt mit Coating-Puffer) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag werden die Wells unter Verwendung einer Vakuumpumpe mit je 250  $\mu$ l ELISA-Waschpuffer 5-mal gewaschen. Anschließend werden die beschichteten Wells mit je 200  $\mu$ l Assay Diluent für 1 h bei RT inkubiert, wodurch unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Der Waschvorgang wird wiederholt. Die bei -80 °C tiefgefrorenen Probenüberstände werden aufgetaut, gevortext und bei 4200 g für 10 min zentrifugiert. Um latentes TGF $\beta$  in die biologisch aktive Form zu überführen, werden pro 100  $\mu$ l des Probenüberstandes 20  $\mu$ l 1 N Salzsäurelösung (HCl) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Es folgt die Neutralisation mit je 20  $\mu$ l 1 N Natronlauge (NaOH). Pro Well werden 100  $\mu$ l des Probenüberstandes pipettiert und bei RT für 2 h inkubiert. Es erfolgt die Bindung des Capture-Antikörpers an TGF $\beta$ . Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte 5-mal gewaschen, um die nicht

gebundenen Bestandteile der Probe zu entfernen. Im nächsten Schritt werden je 100 µl eines spezifischen Biotin-konjugierten Zweitantikörpers (sogenannter „detection antibody“, verdünnt mit Assay Diluent) zugegeben und bei RT für 1 h inkubiert. Dieser Antikörper bindet ebenfalls an TGFβ, jedoch an einer anderen Stelle und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (deshalb der Name „Sandwich-ELISA“). Nach fünf Waschvorgängen folgt die Zugabe von je 100 µl Avidin-HRP (Meerrettichperoxidase, HRP, von engl. horseradish), ein Enzym, das unter Ausbildung eines Avidin-Biotin-Komplexes mit hoher Affinität an den Detektionsantikörper bindet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT und 7-maligem Waschen werden je 100 µl eines zum Enzym passenden chromogenen Substrates (Tetramethylbenzidine) zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch einen Farbumschlag erfolgt. Die enzymatische Farbreaktion wird nach 15 min durch je 50 µl 2 N Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Die Platte wird anschließend mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm analysiert. Dabei ist die Intensität der hervorgerufenen Farbreaktion proportional zur Konzentration des Zytokins. Unter Zuhilfenahme einer Standardkurve, welche mit rekombinantem TGFβ erstellt wird, kann schließlich die absolute TGFβ-Konzentration ermittelt werden.

Die Konzentration von TGFβ wurde in 3 Nabelschnurblutproben bestimmt.

### 2.2.5 Zytokinbestimmung mittels Luminex xMAP® Technologie

Die Bestimmung der Zytokine IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-15, IFNγ, TNF und der Chemokine IL-8, MIP-1α und MIP-1β wurde von MICROBIONIX GmbH (München, Deutschland) anhand von Human Multiplex Antibody Bead Kits von Invitrogen durchgeführt.

Das Prinzip der Luminex-Testsysteme ist dem ELISA ähnlich, allerdings gibt es ein paar Besonderheiten:

- Die zytokinspezifischen Capture-Antikörper sind nicht an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte gekoppelt, sondern an mikroskopisch kleinen Polystyrol-Kügelchen, den sogenannten Beads.
- Da die Beads aufgrund ihrer unterschiedlichen Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen eindeutig voneinander unterscheidbar sind, ist es möglich, verschiedene Beads in einem Well zu mischen und mehrere Parameter gleichzeitig zu bestimmen (Multiplex).

## 2. Material und Methoden

- Anstelle der enzymatischen Farbreaktion, entsteht nach Bindung von Streptavidin-RPE ein Fluoreszenzsignal, das zusammen mit dem Fluoreszenzsignal der Beads mit einem dualen Lasersystem detektiert wird.

Im ersten Schritt werden die Probenüberstände aufgetaut, gevortext und bei 4200 g für 10 min zentrifugiert. Die Vertiefungen einer 96-Well-Filterplatte werden 30 sec mit je 200 µl Waschpuffer befeuchtet und anschließend mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Dann werden die Antikörper-konjugierten Beads im Verhältnis 1:20 mit Waschpuffer verdünnt, gevortext und je 50 µl der Beadlösung in die Wells pipettiert. Es folgen zwei Waschschrte mit je 200 µl Waschpuffer pro Well. Mittels einer Vakuumpumpe wird überschüssige Flüssigkeit entfernt. Dann beginnt die eigentliche Testdurchführung. Pro Well werden 50 µl Inkubationspuffer vorgelegt. Es folgt die Zugabe von je 50 µl Assay Diluent und je 50 µl der Probe. Für den Standard werden zu den 50 µl Inkubationspuffer je 100 µl der Standardlösung (7 Standardkonzentrationen hergestellt in einer 1:3 Verdünnungsreihe und aufgelöst in einem 1:1 Gemisch aus Assay Diluent und Zellkulturmedium) pipettiert. Die Platte wird abgedeckt und 2 h bei RT auf einem Horizontalschüttler (600 rpm) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Flüssigkeit aus den Wells abgesaugt und die Platte wird zweimal gewaschen. Anschließend werden je 100 µl des Biotin-konjugierten Detektionsantikörper-gemisches zugegeben. Die Platte wird wieder abgedeckt und auf einem Horizontalschüttler 1 h bei RT inkubiert. Nach zwei Waschvorgängen werden pro Well 100 µl Streptavidin-RPE, ein Protein, das mit dem Fluorochrom R-Phycoerythrin (RPE) markiert ist, pipettiert. Streptavidin-RPE kann unter Ausbildung eines Avidin-Biotin-Komplexes mit hoher Affinität an den Detektionsantikörper binden. Die Platte wird abgedeckt und 30 min bei RT auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden pro Well 110 µl Waschpuffer zugegeben. Schließlich wird die abgedeckte Platte 2 – 3 min bei RT auf einen Horizontalschüttler gestellt bis die Messung beginnt.

Die Analyse der Platten erfolgt mit einem Luminex xMAP® 100™ Detektionsgerät, das ähnlich wie ein Durchflusszytometer aufgebaut ist. Mittels eines dualen Lasersystems werden die Beads aufgrund ihres spezifischen Farbcodes klassifiziert und von 100 Beads einer Population die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) des gebundenen Detektionsreagenz ermittelt. Unter Verwendung der Luminex™-Analyser-Software von Qiagen (Hilden, Deutschland) können anhand der Standardkurven und der mittleren Fluoreszenzintensitäten die absoluten Zytokinkonzentrationen bestimmt werden.

Die Konzentrationen von IL-4, IL-5 und IL-15 wurden in 3 Nabelschnurblutproben gemessen. Die IL-12 (4 h)- und MIP-1α-Spiegel wurden in 5 Proben bestimmt. Die Konzentrationen von

IL-8 wurden in 8, von IL-6, IL-10 und IL-12 (24 h) in 9 und von IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF (4 h/24 h) und MIP-1 $\beta$  in 10 Nabelschnurblutproben bestimmt.

### **2.2.6 Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten**

Die statistische Analyse der Daten wird mit Hilfe des Softwarepaketes SPSS® durchgeführt. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgt unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Test. Als Signifikanzniveau wird ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 festgelegt.

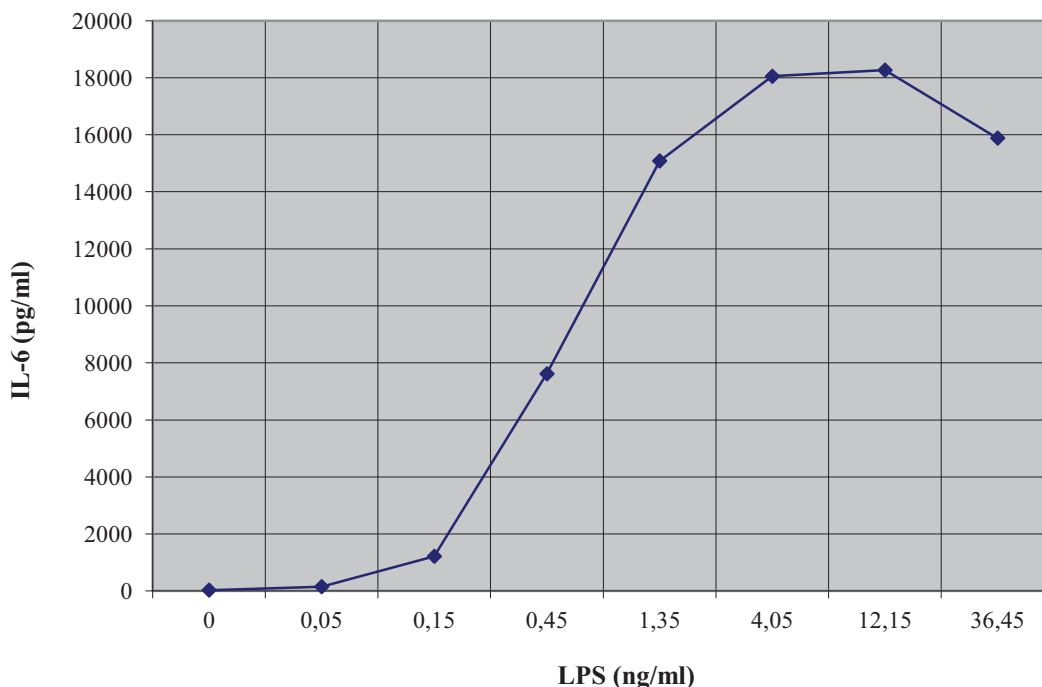
Für die grafische Darstellung der Daten wird das Programm Microsoft Office Excel 2007 verwendet. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS (*E.coli*) und IL-6

Zur Bestimmung der für die Stimulationsansätze geeigneten LPS-Konzentration wurden die isolierten umbilikalen mononukleären Zellen mit LPS von *E.coli* in einem Konzentrationsbereich von 0,05 ng/ml bis 36,45 ng/ml stimuliert. In Abbildung 3-1 ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS und IL-6 dargestellt. Die Freisetzung von IL-6 nimmt ab einer LPS-Konzentration von 0,15 ng/ml stark zu, bis sie bei einer LPS-Konzentration von 4,05 ng/ml ihr Maximum erreicht. Durch eine Stimulation der Monozyten und Lymphozyten mit noch höheren LPS-Konzentrationen konnte im vorliegenden Versuch keine weitere Steigerung der IL-6 Produktion erzielt werden. Daher wurde für die Stimulationsansätze eine LPS-Konzentration von 1,5 ng/ml festgesetzt. Diese Konzentration wurde so gewählt, dass sie im Übergangsbereich zwischen dem steilen Anstieg und dem Maximum der Kurve liegt. Dadurch wird eine nahezu maximale Stimulation der Monozyten und Lymphozyten erreicht und es bleibt noch Raum für etwaige kostimulatorische Effekte durch die eingesetzten Medikamente.



**Abbildung 3-1:** Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS (*E.coli*) und IL-6

### **3.2 Analyse der *in vitro* Zytokinproduktion durch umbilikale mononukleäre Zellen nach LPS-Stimulation**

In vorangegangenen Arbeiten der Klinik St. Hedwig in Regensburg wurde untersucht, welche Zytokine infolge einer Stimulation von umbilikal mononukleären Zellen mit LPS von verschiedenen gramnegativen Bakterien freigesetzt werden [120]. Anhand dieser Ergebnisse wurden für die vorliegende Arbeit solche Zytokine gewählt, deren Produktion durch die Stimulation mit LPS von *E.coli* signifikant gesteigert wurde oder die von besonderem Interesse für die Fragestellung waren (z.B. IL-4 als antiinflammatorisches Zytokin). Dabei handelte es sich um folgende Zytokine: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN $\gamma$ , TNF, TGF $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ .

Wie in den Vorversuchen wurde die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  durch Stimulation der umbilikal mononukleären Zellen mit LPS hochsignifikant gesteigert.

	<b>Z</b>	<b>Z+LPS</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	LOW	1418,1 $\pm$ 854,3
<b>IL-6</b>	LOW	16849,3 $\pm$ 6261,4
<b>IL-8</b>	478,0 $\pm$ 28,0	132062,5 $\pm$ 45139,0
<b>IL-10</b>	LOW	70,8 $\pm$ 21,1
<b>IL-12 (4 h)</b>	LOW	78,6 $\pm$ 63,1
<b>IL-12 (24 h)</b>	LOW	769,4 $\pm$ 669,6
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	LOW	15,8 $\pm$ 4,4
<b>TNF (4 h)</b>	LOW	773,9 $\pm$ 354,4
<b>TNF (24 h)</b>	LOW	409,0 $\pm$ 251,2
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	LOW	13682,7 $\pm$ 3664,7
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	LOW	10868,3 $\pm$ 4543,7

**Tabelle 3-1:** Zytokinsekretion in pg/ml spontan bzw. unter LPS-Stimulation nach 4- bzw. 24-stündiger Inkubation. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (Z: n=1 Nabelschnurblutprobe mit 3 Stimulationsansätze. Z+LPS: n=9 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze)  $\pm$  Standardabweichung. Die Zytokinspiegel von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  lagen bei spontaner Sekretion unterhalb der Nachweisgrenze (LOW).

Das antiinflammatorische Zytokin TGF $\beta$ , das in den Vorversuchen nicht bestimmt worden war, wurde durch LPS nicht hochreguliert. Auch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-15 wurde wie bereits in den Vorversuchen durch LPS nicht gesteigert. TGF $\beta$ , IL-4, IL-5 und IL-15 wurden aus drei Nabelschnurblutproben bestimmt. In allen drei Fällen lagen die

Zytokinlevel unter LPS-Stimulation unterhalb der Nachweisgrenze. Deshalb wurde auf eine weitere Messung dieser Zytokine verzichtet.

### **3.3 Bestimmung des *in vitro* Effekts von Betamethason und Indometacin auf die Zytokinproduktion umbilikaler mononukleärer Zellen**

#### **3.3.1 Einfluss von Betamethason und Indometacin auf die spontane Zytokinsekretion**

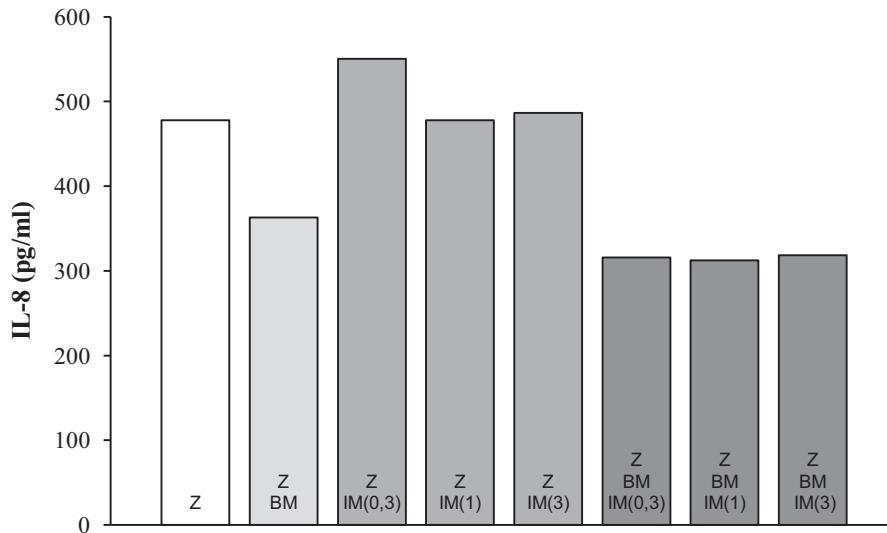
Der Einfluss von Betamethason und Indometacin auf die spontane Zytokinproduktion umbilikaler mononukleärer Zellen kann nur für das Chemokin IL-8 dargestellt werden, da bei den übrigen Zytokinen die Konzentrationen bei spontaner Sekretion unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Hierbei zeigte sich, dass durch die Zugabe von Betamethason die Produktion von IL-8 signifikant reduziert wurde ( $p = 0,050$ ). Indometacin dagegen hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die spontane IL-8 Sekretion. Bei Kombination von Betamethason und Indometacin ließ sich eine statistisch signifikante Inhibition der IL-8 Produktion beobachten ( $p = 0,050$ ), wobei dieser Effekt in erster Linie auf die Wirkung von Betamethason zurückzuführen ist.

			MW ± Stabw	p-Wert
<b>Z</b>			478,0 ± 28,0	
<b>Z</b>	<b>BM</b>		363,0 ± 60,8	0,050
<b>Z</b>		<b>IM(0,3)</b>	550,3 ± 45,9	0,077
<b>Z</b>		<b>IM(1)</b>	478,0 ± 68,2	0,827
<b>Z</b>		<b>IM(3)</b>	486,7 ± 76,3	0,827
<b>Z</b>	<b>BM</b>	<b>IM(0,3)</b>	315,7 ± 7,0	0,050
<b>Z</b>	<b>BM</b>	<b>IM(1)</b>	312,3 ± 8,1	0,050
<b>Z</b>	<b>BM</b>	<b>IM(3)</b>	318,3 ± 2,1	0,050

**Tabelle 3-2:** Spontane IL-8 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z).

In Abbildung 3-2 ist die spontane IL-8 Produktion mittels eines Balkendiagramms dargestellt. Die inhibierende Wirkung von Betamethason auf die IL-8 Produktion ist deutlich erkennbar. Indometacin scheint bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml einen leicht stimulierenden Effekt auf die IL-8 Sekretion zu haben, ohne dass dabei eine statistische Signifikanz erreicht wird.



**Abbildung 3-2:** Spontane IL-8 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe.

### 3.3.2 Einfluss von Betamethason und Indometacin auf die Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS

#### IL-1β:

Die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1β wurde in allen Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason signifikant gehemmt ( $p \leq 0,050$ ). Die alleinige Applikation von Indometacin erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. In 5 von 10 Nabelschnurblutproben zeigte sich keine statistisch signifikante Beeinflussung der IL-1β Produktion durch Indometacin. Dagegen fand sich in 3 von 10 Proben eine statistisch signifikante Erhöhung der IL-1β Produktion nach Zugabe von 0,3 und 1,0 µg/ml (NSBP 3) bzw. von 0,3 und 3,0 µg/ml Indometacin (NSBP 5/6) ( $p \leq 0,050$ ). In 2 von 10 Proben konnte eine statistisch signifikante Hemmung der IL-1β Produktion durch die Zugabe von 0,3 µg/ml (NSBP 2) bzw. 1,0 µg/ml Indometacin (NSBP 9) beobachtet werden ( $p \leq 0,050$ ). Bei Kombination von Betamethason und Indometacin wurde die IL-1β Sekretion in allen Nabelschnurblutproben signifikant inhibiert ( $p \leq 0,050$ ), wobei die suppressive Wirkung in erster Linie auf Betamethason zurückzuführen ist.

3. Ergebnisse

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	1166,7 ± 176,7		963,0 ± 79,9	
Z	BM		LPS	757,7 ± 77,9	0,050	637,0 ± 86,5	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	1340,0 ± 87,2	0,275	803,0 ± 13,0	0,050
Z		IM(1)	LPS	1022,7 ± 181,3	0,275	931,0 ± 70,4	0,827
Z		IM(3)	LPS	1260,0 ± 134,5	0,376	896,0 ± 174,2	0,658
Z	BM	IM(0,3)	LPS	1133,3 ± 138,0	0,658	723,0 ± 65,5	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	902,7 ± 83,0	0,050	639,0 ± 26,3	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	945,0 ± 93,2	0,077	776,3 ± 126,5	0,127

				NSBP 3		NSBP 4	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	1600,0 ± 98,5		1400,0 ± 95,4	
Z	BM		LPS	1055,3 ± 160,0	0,050	657,0 ± 118,6	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	1913,3 ± 87,4	0,050	1300,0 ± 156,2	0,275
Z		IM(1)	LPS	1920,0 ± 81,9	0,050	1400,0 ± 285,8	0,513
Z		IM(3)	LPS	1956,7 ± 325,2	0,127	1354,0 ± 396,1	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	1196,7 ± 55,1	0,050	1016,3 ± 47,6	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	1483,3 ± 30,6	0,184	933,0 ± 35,2	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	1306,7 ± 172,4	0,050	1070,7 ± 295,8	0,275

				NSBP 5		NSBP 6	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	573,7 ± 21,9		3430,0 ± 52,9	
Z	BM		LPS	288,7 ± 21,0	0,046	2303,3 ± 299,6	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	662,3 ± 33,0	0,046	4310,0 ± 529,2	0,050
Z		IM(1)	LPS	542,7 ± 30,9	0,268	3513,3 ± 316,6	0,513
Z		IM(3)	LPS	719,7 ± 70,7	0,046	4136,7 ± 245,8	0,050
Z	BM	IM(0,3)	LPS	263,0 ± 29,8	0,046	2760,0 ± 427,9	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	237,7 ± 16,8	0,046	2593,3 ± 87,4	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	299,0 ± 22,6	0,046	2473,3 ± 593,4	0,050

### 3. Ergebnisse

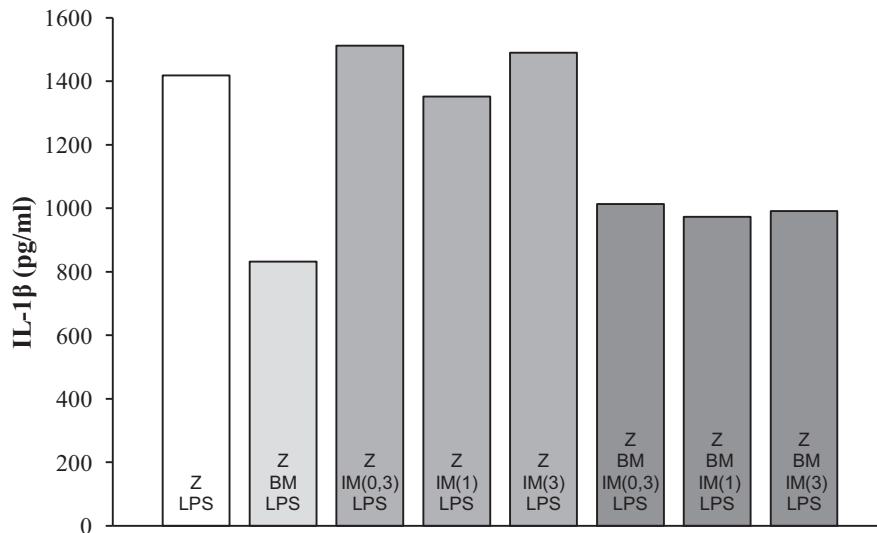
				NSBP 7		NSBP 8	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	2040,0 ± 256,3		473,3 ± 67,1	
Z	BM		LPS	945,0 ± 126,5	0,050	299,3 ± 22,1	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	1910,0 ± 355,1	0,513	536,0 ± 70,1	0,127
Z		IM(1)	LPS	1490,0 ± 321,9	0,127	509,0 ± 157,6	0,827
Z		IM(3)	LPS	1620,0 ± 262,1	0,127	487,0 ± 35,3	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	1142,0 ± 174,4	0,050	285,7 ± 19,0	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	1343,3 ± 136,5	0,050	304,0 ± 29,5	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	1196,7 ± 129,0	0,050	375,0 ± 94,5	0,275

				NSBP 9		NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	1566,7 ± 127,0		967,7 ± 124,7	
Z	BM		LPS	866,3 ± 78,8	0,046	511,3 ± 68,9	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	1503,3 ± 122,2	0,268	842,7 ± 120,0	0,275
Z		IM(1)	LPS	1236,7 ± 212,2	0,046	953,7 ± 177,5	0,827
Z		IM(3)	LPS	1583,3 ± 351,6	0,825	885,7 ± 111,2	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	1056,7 ± 20,8	0,046	560,3 ± 91,9	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	871,0 ± 38,6	0,046	422,7 ± 44,3	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	968,7 ± 152,2	0,046	503,3 ± 30,1	0,050

**Tabelle 3-3:** LPS-induzierte IL-1 $\beta$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe  $\pm$  Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

Abbildung 3-3 zeigt die IL-1 $\beta$  Produktion als Mittelwerte aller 10 Nabelschnurblutproben. Optisch ist die suppressive Wirkung von Betamethason auf die IL-1 $\beta$  Produktion deutlich erkennbar. Indometacin scheint die IL-1 $\beta$  Sekretion insgesamt kaum zu beeinflussen. Die Kombination von Betamethason und Indometacin führt zu einer Unterdrückung der IL-1 $\beta$  Sekretion. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben erhebliche Unterschiede aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3-3:** LPS-induzierte IL-1 $\beta$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 10 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

#### IL-6:

Die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 wurde in 4 von 9 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason signifikant gehemmt ( $p \leq 0,050$ ). In 5 von 9 Proben fand sich keine statistisch signifikante Beeinflussung der IL-6 Produktion durch Betamethason. Die alleinige Applikation von Indometacin zeigte in 7 von 9 Nabelschnurblutproben keinen signifikanten Effekt auf die IL-6 Sekretion. In den übrigen 2 Nabelschnurblutproben wurde die IL-6 Produktion durch die Zugabe von Indometacin in allen Konzentrationen (NSBP 6) bzw. von 3,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 8) signifikant inhibiert ( $p = 0,050$ ). Die Kombination von Betamethason und Indometacin bewirkte in 5 von 9 Proben eine statistisch signifikante Hemmung der IL-6 Produktion ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser inhibierende Effekt sowohl auf Betamethason als auch auf Indometacin zurückzuführen ist. In 4 von 9 Proben zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der IL-6 Sekretion.

3. Ergebnisse

				NSBP 2		NSBP 3	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	22200,0 ± 3988,7		15946,7 ± 7777,3	
Z	BM		LPS	18733,3 ± 3707,2	0,275	15800,0 ± 3736,3	0,827
Z		IM(0,3)	LPS	24466,7 ± 4544,6	0,513	18433,3 ± 3852,7	0,513
Z		IM(1)	LPS	22400,0 ± 3051,2	0,827	15900,0 ± 2986,6	0,658
Z		IM(3)	LPS	22060,7 ± 1331,7	0,827	16800,0 ± 3815,8	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	21700,0 ± 3567,9	0,827	11930,0 ± 2615,9	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	20533,3 ± 3544,5	0,275	10123,3 ± 2732,7	0,275
Z	BM	IM(3)	LPS	19166,7 ± 5614,6	0,275	13933,3 ± 3426,9	0,827

				NSBP 4		NSBP 5	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	18266,7 ± 2956,9		5346,7 ± 271,4	
Z	BM		LPS	9400,0 ± 2261,1	0,050	1810,0 ± 225,4	0,046
Z		IM(0,3)	LPS	15900,0 ± 3241,9	0,513	4953,3 ± 1285,2	0,507
Z		IM(1)	LPS	15666,7 ± 550,8	0,184	4916,7 ± 414,8	0,268
Z		IM(3)	LPS	18200,0 ± 854,4	0,827	5360,0 ± 675,1	0,825
Z	BM	IM(0,3)	LPS	11293,3 ± 1519,3	0,050	1880,0 ± 981,5	0,046
Z	BM	IM(1)	LPS	9350,0 ± 1392,8	0,050	1446,7 ± 106,7	0,046
Z	BM	IM(3)	LPS	13666,7 ± 1301,3	0,050	1686,7 ± 229,4	0,046

				NSBP 6		NSBP 7	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	27666,7 ± 2909,2		11413,3 ± 4675,9	
Z	BM		LPS	16500,0 ± 2913,8	0,050	7860,0 ± 1855,5	0,275
Z		IM(0,3)	LPS	18433,3 ± 5493,0	0,050	14966,7 ± 3397,5	0,275
Z		IM(1)	LPS	16166,7 ± 2702,5	0,050	11600,0 ± 1510,0	0,513
Z		IM(3)	LPS	19766,7 ± 1011,6	0,050	10146,7 ± 3816,0	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	11486,7 ± 3624,7	0,050	8786,7 ± 1367,4	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	14433,3 ± 2730,1	0,050	9570,0 ± 1431,0	0,827
Z	BM	IM(3)	LPS	15933,3 ± 1877,1	0,050	11200,0 ± 700,0	0,513



### 3. Ergebnisse

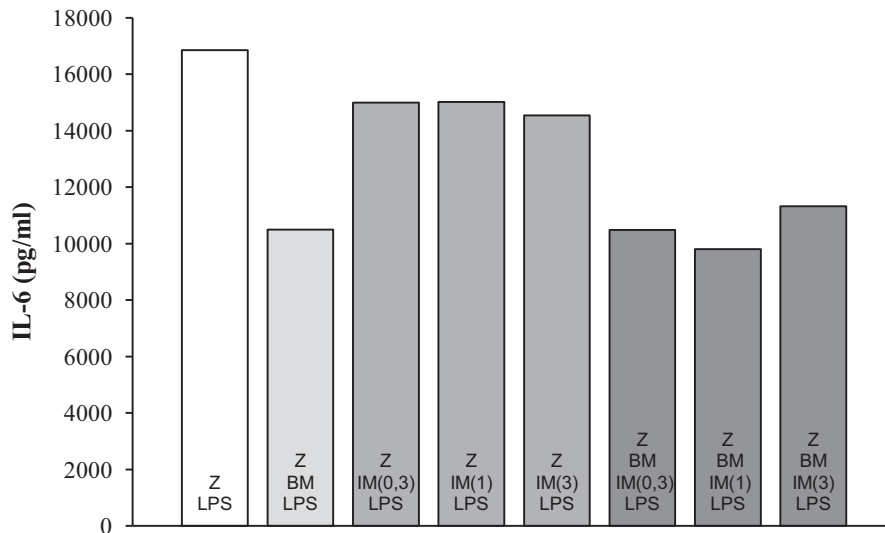
				NSBP 8		NSBP 9	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	15700,0 ± 6683,6		20450,0 ± 6436,4	
Z	BM		LPS	5270,0 ± 1714,3	0,050	10076,7 ± 3721,1	0,127
Z		IM(0,3)	LPS	10523,3 ± 4096,5	0,275	16266,7 ± 4781,6	0,827
Z		IM(1)	LPS	10460,0 ± 1888,6	0,275	13633,3 ± 1588,5	0,513
Z		IM(3)	LPS	9086,7 ± 690,8	0,050	17733,3 ± 2254,6	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	5986,7 ± 1475,5	0,050	12600,0 ± 3051,2	0,275
Z	BM	IM(1)	LPS	4496,7 ± 719,9	0,050	10770,0 ± 1851,1	0,275
Z	BM	IM(3)	LPS	7570,0 ± 2827,7	0,050	11733,3 ± 1327,9	0,507

				NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	22700,0 ± 7212,5	
Z	BM		LPS	9033,3 ± 2589,1	0,275
Z		IM(0,3)	LPS	11036,7 ± 2704,6	0,275
Z		IM(1)	LPS	24433,3 ± 3108,6	0,513
Z		IM(3)	LPS	11646,7 ± 4423,6	0,275
Z	BM	IM(0,3)	LPS	8656,7 ± 6625,9	0,127
Z	BM	IM(1)	LPS	7520,0 ± 1664,1	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	7006,7 ± 2924,1	0,127

**Tabelle 3-4:** LPS-induzierte IL-6 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

In Abbildung 3-4 sind die Mittelwerte der IL-6 Produktion von allen 9 Nabelschnurblutproben dargestellt. Optisch ist die suppressive Wirkung von Betamethason auf die IL-6 Produktion gut erkennbar. Indometacin scheint ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die IL-6 Sekretion zu haben. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben stark schwankte, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3-4:** LPS-induzierte IL-6 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 9 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

#### IL-8:

Die Sekretion des Chemokins IL-8 wurde in 5 von 8 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason nicht signifikant beeinflusst. Dagegen zeigte sich in den übrigen 3 Nabelschnurblutproben eine statistisch signifikante Hemmung der IL-8 Produktion durch Betamethason ( $p = 0,050$ ). Indometacin hatte in 7 von 8 Nabelschnurblutproben keinen signifikanten Effekt auf die IL-8 Produktion. In einer Nabelschnurblutprobe (NSBP 9) fand sich bei einer Konzentration von  $3,0 \mu\text{g/ml}$  eine signifikante Stimulation der IL-8 Sekretion durch Indometacin ( $p = 0,050$ ). Die gemeinsame Applikation von Betamethason und Indometacin führte in 5 von 8 Proben zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-8 Produktion. Wie bei der alleinigen Gabe von Betamethason zeigte sich in 3 von 8 Proben eine statistisch signifikante Inhibition der IL-8 Sekretion ( $p \leq 0,050$ ).

3. Ergebnisse

				NSBP 2		NSBP 3	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z				183333,3 ± 42158,4		102400,0 ± 49818,5	
Z	BM		LPS	149000,0 ± 30315,0	0,275	85566,7 ± 19317,4	0,827
Z		IM(0,3)	LPS	203333,3 ± 38630,7	0,275	117166,7 ± 29683,0	0,513
Z		IM(1)	LPS	211666,7 ± 50063,3	0,827	103033,3 ± 31373,0	0,827
Z		IM(3)	LPS	193333,3 ± 15011,1	0,507	117066,7 ± 34688,5	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	173000,0 ± 15716,2	0,827	73000,0 ± 15278,7	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	163333,3 ± 29670,4	0,275	62766,7 ± 17904,8	0,275
Z	BM	IM(3)	LPS	153333,3 ± 26274,2	0,275	82166,7 ± 20667,0	0,827

				NSBP 4		NSBP 5	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	180000,0 ± 33600,6		71333,3 ± 7559,3	
Z	BM		LPS	99833,3 ± 18445,1	0,050	23966,7 ± 2000,8	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	165333,3 ± 42782,4	0,513	63800,0 ± 16768,7	0,827
Z		IM(1)	LPS	156000,0 ± 15874,5	0,275	63733,3 ± 10455,8	0,275
Z		IM(3)	LPS	186000,0 ± 16093,5	0,827	75400,0 ± 7188,2	0,275
Z	BM	IM(0,3)	LPS	109466,7 ± 11868,2	0,050	29900,0 ± 17462,0	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	94533,3 ± 8784,8	0,050	21766,7 ± 981,5	0,046
Z	BM	IM(3)	LPS	125333,3 ± 5033,2	0,050	26300,0 ± 1300,0	0,050

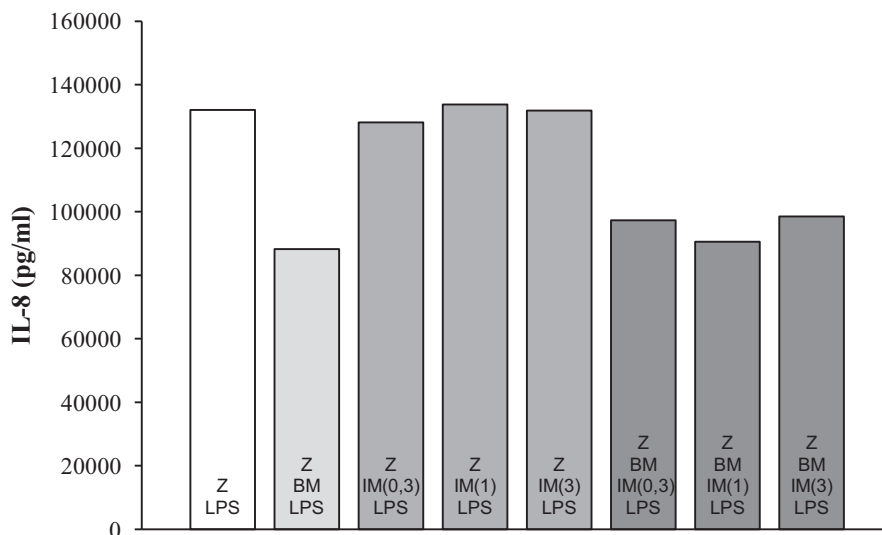
				NSBP 7		NSBP 8	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	72766,7 ± 22737,7		155000,0 ± 24980,0	
Z	BM		LPS	57100,0 ± 10768,5	0,275	94200,0 ± 25808,3	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	103133,3 ± 25769,2	0,127	123333,3 ± 27227,4	0,275
Z		IM(1)	LPS	82000,0 ± 14864,7	0,513	126000,0 ± 19672,3	0,184
Z		IM(3)	LPS	63933,3 ± 18407,2	0,513	136000,0 ± 5567,8	0,275
Z	BM	IM(0,3)	LPS	56766,7 ± 7657,9	0,275	102566,7 ± 14654,8	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	67100,0 ± 7279,4	0,827	85833,3 ± 5609,2	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	68833,3 ± 3619,9	0,513	109233,3 ± 26901,0	0,127

### 3. Ergebnisse

				NSBP 9		NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	132666,7 ± 23437,9		159000,0 ± 46486,6	
Z	BM		LPS	104066,7 ± 35733,8	0,275	92266,7 ± 24042,5	0,127
Z		IM(0,3)	LPS	142000,0 ± 21633,3	0,513	106700,0 ± 18608,3	0,127
Z		IM(1)	LPS	138000,0 ± 9848,9	0,827	189666,7 ± 13576,9	0,275
Z		IM(3)	LPS	155333,3 ± 5859,5	0,050	127533,3 ± 34615,8	0,275
Z	BM	IM(0,3)	LPS	128400,0 ± 29459,8	0,827	105100,0 ± 56397,1	0,184
Z	BM	IM(1)	LPS	130666,7 ± 24006,9	0,827	98500,0 ± 21960,2	0,127
Z	BM	IM(3)	LPS	134300,0 ± 33897,9	0,827	88566,7 ± 21400,1	0,127

**Tabelle 3-5:** LPS-induzierte IL-8 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

Abbildung 3-5 zeigt die IL-8 Produktion als Mittelwerte aller 8 Nabelschnurblutproben. Optisch ist die suppressive Wirkung von Betamethason auf die IL-8 Produktion gut erkennbar. Indometacin scheint keinen Einfluss auf die IL-8 Sekretion zu haben. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben deutliche Schwankungen aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 3-5:** LPS-induzierte IL-8 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 8 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

### 3. Ergebnisse

#### IL-10:

Die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde in 5 von 9 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason nicht signifikant beeinflusst. In den übrigen 4 Proben fand sich eine statistisch signifikante Hemmung der IL-10 Sekretion durch Betamethason ( $p = 0,050$ ). Indometacin dagegen führte in 6 von 9 Proben zu einer signifikanten Stimulation der IL-10 Produktion ( $p = 0,050$ ). Dabei war die Stimulation in 2 der 6 Proben unabhängig von der Indometacin-Konzentration. In den übrigen 4 Proben konnte eine signifikante Erhöhung der IL-10 Produktion durch Indometacin bei einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 1), 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 2/4) bzw. 3,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 8) erreicht werden. In 3 von 9 Proben hatte Indometacin keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10 Produktion. Das wohl bedeutungsvollste Ergebnis für die hier vorliegende Arbeit war, dass auch bei kombinierter Applikation von Betamethason und Indometacin die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in 4 von 9 Nabelschnurblutproben statistisch signifikant erhöht wurde ( $p = 0,050$ ). Dabei war die Stimulation in einer der 4 Proben unabhängig von der Indometacin-Konzentration. In 3 der 4 Proben konnte eine signifikante Stimulation der IL-10 Sekretion durch Indometacin bei einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 1/6), 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 6) bzw. 3,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 2) erzielt werden. In 3 von 9 Proben führten Betamethason und Indometacin zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-10 Sekretion. In 2 von 9 Proben (NSBP 9/10) zeigte sich eine signifikante Hemmung der IL-10 Produktion ( $p = 0,050$ ), wobei dieser Effekt auf die suppressive Wirkung von Betamethason zurückzuführen ist.

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	66,3 $\pm$ 11,3		100,2 $\pm$ 14,7	
Z	BM		LPS	44,9 $\pm$ 2,9	0,050	103,8 $\pm$ 9,0	0,827
Z		IM(0,3)	LPS	85,9 $\pm$ 4,3	0,050	119,7 $\pm$ 12,1	0,127
Z		IM(1)	LPS	66,7 $\pm$ 17,2	0,827	135,7 $\pm$ 24,8	0,050
Z		IM(3)	LPS	80,8 $\pm$ 11,3	0,127	127,7 $\pm$ 25,8	0,127
Z	BM	IM(0,3)	LPS	96,6 $\pm$ 16,0	0,050	109,4 $\pm$ 19,7	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	75,0 $\pm$ 9,9	0,275	109,3 $\pm$ 2,1	0,513
Z	BM	IM(3)	LPS	69,9 $\pm$ 14,5	0,513	135,7 $\pm$ 23,7	0,050

3. Ergebnisse

				NSBP 3		NSBP 4	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	61,8 ± 7,9		47,8 ± 7,9	
Z	BM		LPS	75,6 ± 17,1	0,268	34,4 ± 10,6	0,077
Z		IM(0,3)	LPS	132,6 ± 12,3	0,050	54,1 ± 12,6	0,827
Z		IM(1)	LPS	110,7 ± 5,1	0,050	62,3 ± 4,1	0,050
Z		IM(3)	LPS	142,0 ± 32,4	0,050	50,1 ± 20,1	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	111,3 ± 5,5	0,050	56,4 ± 8,9	0,275
Z	BM	IM(1)	LPS	139,0 ± 2,6	0,050	58,5 ± 5,6	0,127
Z	BM	IM(3)	LPS	108,4 ± 27,4	0,050	75,7 ± 30,0	0,127

				NSBP 6		NSBP 7	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	86,4 ± 6,0		103,6 ± 23,9	
Z	BM		LPS	84,9 ± 13,5	0,827	62,0 ± 11,3	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	137,7 ± 11,0	0,050	120,7 ± 18,8	0,513
Z		IM(1)	LPS	142,3 ± 15,5	0,050	98,6 ± 19,8	0,827
Z		IM(3)	LPS	143,3 ± 6,7	0,050	110,7 ± 11,7	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	123,7 ± 18,6	0,050	95,2 ± 9,6	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	126,0 ± 20,0	0,050	119,4 ± 23,3	0,513
Z	BM	IM(3)	LPS	109,0 ± 36,1	0,513	103,1 ± 9,0	0,827

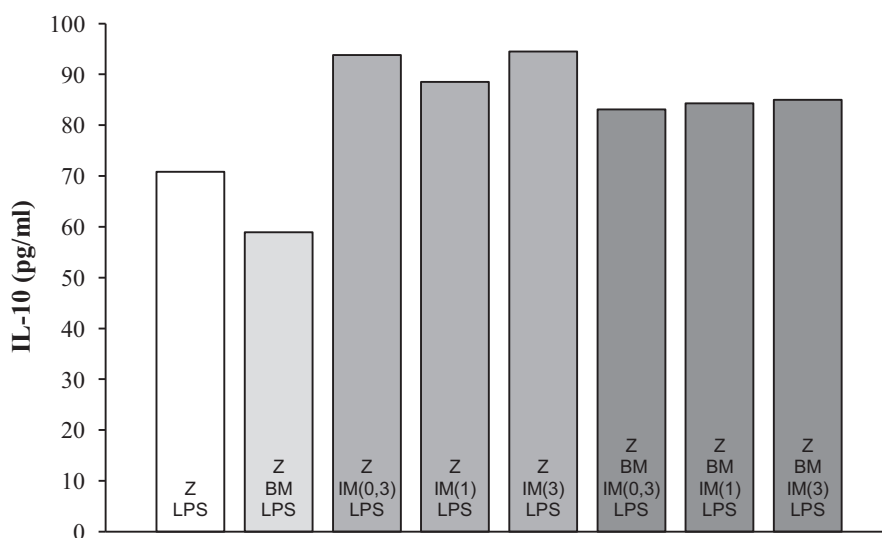
				NSBP 8		NSBP 9	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	48,5 ± 5,1		54,9 ± 11,8	
Z	BM		LPS	34,2 ± 6,6	0,050	39,8 ± 6,7	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	57,0 ± 5,1	0,077	65,8 ± 9,9	0,127
Z		IM(1)	LPS	60,0 ± 15,9	0,275	51,2 ± 11,8	0,827
Z		IM(3)	LPS	62,7 ± 5,2	0,050	69,2 ± 27,9	0,376
Z	BM	IM(0,3)	LPS	36,1 ± 9,8	0,127	54,3 ± 7,3	0,827
Z	BM	IM(1)	LPS	48,5 ± 16,4	0,658	37,7 ± 4,2	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	59,5 ± 25,2	0,827	56,7 ± 9,0	0,827

### 3. Ergebnisse

				NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	67,8 ± 9,9	
Z	BM		LPS	50,4 ± 14,6	0,127
Z		IM(0,3)	LPS	71,0 ± 17,3	0,827
Z		IM(1)	LPS	69,0 ± 28,3	0,827
Z		IM(3)	LPS	64,7 ± 10,6	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	64,4 ± 21,0	0,827
Z	BM	IM(1)	LPS	44,9 ± 13,3	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	46,8 ± 9,1	0,050

**Tabelle 3-6:** LPS-induzierte IL-10 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

Abbildung 3-6 zeigt die IL-10 Produktion als Mittelwerte aller 9 Nabelschnurblutproben. Optisch ist die stimulierende Wirkung von Indometacin auf die IL-10 Produktion deutlich erkennbar. Der inhibierende Effekt von Betamethason ist im Vergleich zu den anderen Zytokinen geringer ausgeprägt. Bei Kombination von Betamethason und Indometacin scheint der stimulierende Einfluss von Indometacin zu überwiegen. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben erhebliche Unterschiede aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erzielt werden.



**Abbildung 3-6:** LPS-induzierte IL-10 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 9 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

### 3. Ergebnisse

#### IL-12 (4 h):

Die Sekretion des TH1-polarisierenden Zytokins IL-12 wurde nach einer Inkubationszeit von 4 h in 2 von 5 Nabelschnurblutproben durch Betamethason signifikant inhibiert ( $p = 0,050$ ). In 3 von 5 Proben hatte Betamethason keinen signifikanten Einfluss auf die IL-12 Produktion. Bei alleiniger Applikation von Indometacin zeigte sich in 4 von 5 Proben keine signifikante Beeinflussung der IL-12 Produktion. In einer Proben fand sich allerdings eine signifikante Stimulation der IL-12 Sekretion durch die Zugabe von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). Die Kombination von Betamethason und Indometacin führte in 2 von 5 Proben zu einer signifikanten Hemmung der IL-12 Produktion ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser suppressive Effekt in erster Linie auf Betamethason zurückzuführen ist. In den übrigen 3 Nabelschnurblutproben zeigte sich keine statistisch signifikante Beeinflussung der IL-12 Produktion durch Betamethason und Indometacin.

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	49,9 $\pm$ 15,2		183,3 $\pm$ 18,3	
Z	BM		LPS	30,8 $\pm$ 3,1	0,050	108,9 $\pm$ 54,3	0,077
Z		IM(0,3)	LPS	38,5 $\pm$ 6,4	0,376	197,7 $\pm$ 42,9	0,513
Z		IM(1)	LPS	38,8 $\pm$ 10,0	0,275	187,0 $\pm$ 62,5	0,827
Z		IM(3)	LPS	45,7 $\pm$ 5,2	0,827	167,7 $\pm$ 53,3	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	43,4 $\pm$ 16,0	0,275	151,7 $\pm$ 20,4	0,127
Z	BM	IM(1)	LPS	39,6 $\pm$ 16,9	0,513	151,7 $\pm$ 30,4	0,184
Z	BM	IM(3)	LPS	36,9 $\pm$ 11,0	0,275	169,0 $\pm$ 5,2	0,268

				NSBP 3		NSBP 8	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	91,5 $\pm$ 21,6		37,5 $\pm$ 12,0	
Z	BM		LPS	52,3 $\pm$ 5,4	0,050	21,5 $\pm$ 9,4	0,127
Z		IM(0,3)	LPS	87,3 $\pm$ 5,2	0,658	34,9 $\pm$ 4,6	0,653
Z		IM(1)	LPS	77,2 $\pm$ 8,4	0,275	42,7 $\pm$ 9,0	0,487
Z		IM(3)	LPS	98,8 $\pm$ 6,6	0,658	34,9 $\pm$ 9,2	0,637
Z	BM	IM(0,3)	LPS	87,6 $\pm$ 13,5	0,827	27,0 $\pm$ 4,6	0,246
Z	BM	IM(1)	LPS	61,5 $\pm$ 5,5	0,050	32,3 $\pm$ 8,0	0,500
Z	BM	IM(3)	LPS	70,6 $\pm$ 25,6	0,376	24,3 $\pm$ 0,0	0,121

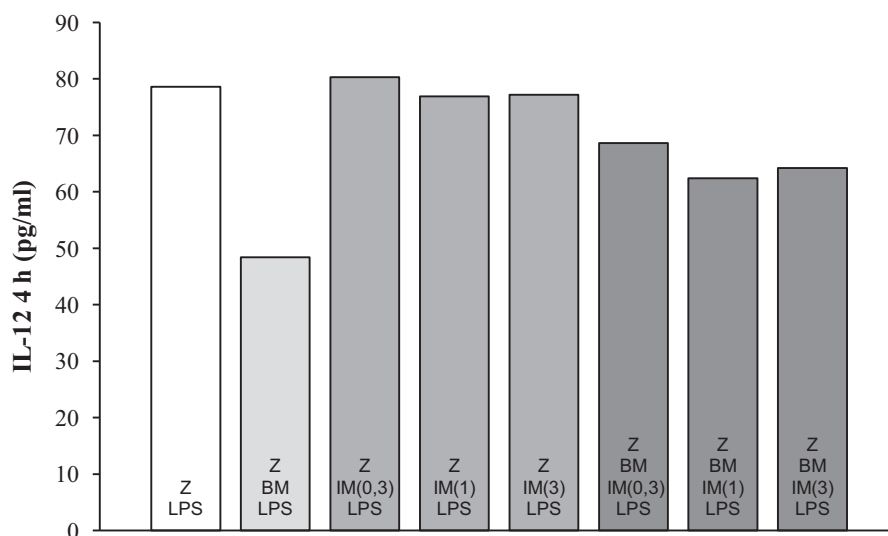


### 3. Ergebnisse

				NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	31,0 ± 2,3	
Z	BM		LPS	28,3 ± 6,9	0,500
Z		IM(0,3)	LPS	42,8 ± 4,4	0,043
Z		IM(1)	LPS	38,9 ± 6,0	0,105
Z		IM(3)	LPS	38,9 ± 6,0	0,105
Z	BM	IM(0,3)	LPS	33,5 ± 12,6	0,653
Z	BM	IM(1)	LPS	26,9 ± 12,2	0,507
Z	BM	IM(3)	LPS	20,3 ± 4,1	0,046

**Tabelle 3-7:** LPS-induzierte IL-12 Sekretion in pg/ml nach 4-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

In Abbildung 3-7 sind die Mittelwerte der IL-12 Produktion aller 5 Nabelschnurblutproben nach einer Inkubationszeit von 4 h dargestellt. Optisch ist die suppressive Wirkung von Betamethason auf die IL-12 Produktion gut erkennbar. Die alleinige Applikation von Indometacin scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die IL-12 Sekretion zu haben. Bei Kombination der beiden Substanzen scheint der inhibierende Effekt von Betamethason geringer ausgeprägt zu sein. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben deutliche Schwankungen aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 3-7:** LPS-induzierte IL-12 Sekretion in pg/ml nach 4-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 5 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

### 3. Ergebnisse

#### IL-12 (24 h):

Die Sekretion des TH1 polarisierenden Zytokins IL-12 wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h in allen Nabelschnurblutproben durch Betamethason statistisch signifikant gehemmt ( $p = 0,050$ ). Die alleinige Applikation von Indometacin erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. In 5 von 9 Proben zeigte sich keine statistisch signifikante Beeinflussung der IL-12 Produktion durch Indometacin. Dagegen fand sich in 3 von 9 Proben eine signifikante Erhöhung der IL-12 Sekretion nach Zugabe von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 3/6), 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 6) bzw. 3,0  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin (NSBP 3/6/8) ( $p = 0,050$ ). In einer Proben konnte eine signifikante Hemmung der IL-12 Produktion durch die Zugabe von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin (NSBP 2) beobachtet werden ( $p = 0,050$ ). Die Kombination von Betamethason und Indometacin führte in allen Nabelschnurblutproben zu einer signifikanten Inhibition der IL-12 Produktion ( $p = 0,050$ ).

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	670,7 $\pm$ 125,8		2073,3 $\pm$ 295,0	
Z	BM		LPS	237,7 $\pm$ 29,7	0,050	772,7 $\pm$ 113,3	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	800,0 $\pm$ 50,0	0,275	1596,7 $\pm$ 274,7	0,050
Z		IM(1)	LPS	479,0 $\pm$ 147,6	0,127	1666,7 $\pm$ 786,9	0,513
Z		IM(3)	LPS	695,3 $\pm$ 166,1	0,827	1983,3 $\pm$ 287,5	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	552,7 $\pm$ 74,1	0,184	1002,0 $\pm$ 199,4	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	393,0 $\pm$ 61,6	0,050	936,3 $\pm$ 133,7	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	421,7 $\pm$ 103,0	0,050	1456,7 $\pm$ 582,3	0,275

				NSBP 3		NSBP 4	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	1703,3 $\pm$ 363,5		223,3 $\pm$ 33,6	
Z	BM		LPS	635,0 $\pm$ 176,3	0,050	60,5 $\pm$ 14,2	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	2500,0 $\pm$ 270,6	0,050	288,0 $\pm$ 73,1	0,127
Z		IM(1)	LPS	2106,7 $\pm$ 259,7	0,275	287,0 $\pm$ 127,5	0,513
Z		IM(3)	LPS	2990,0 $\pm$ 805,8	0,050	206,0 $\pm$ 65,8	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	1074,3 $\pm$ 127,3	0,050	166,0 $\pm$ 15,0	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	1180,0 $\pm$ 70,0	0,050	149,7 $\pm$ 18,6	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	967,0 $\pm$ 221,8	0,050	191,3 $\pm$ 55,8	0,275

3. Ergebnisse

				NSBP 6		NSBP 7	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	331,0 ± 32,0		592,7 ± 164,3	
Z	BM		LPS	147,0 ± 21,7	0,050	110,3 ± 23,2	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	773,0 ± 159,7	0,050	481,0 ± 82,7	0,275
Z		IM(1)	LPS	497,3 ± 99,8	0,050	394,0 ± 145,3	0,275
Z		IM(3)	LPS	662,3 ± 108,7	0,050	465,7 ± 127,7	0,275
Z	BM	IM(0,3)	LPS	235,7 ± 42,4	0,050	155,7 ± 33,5	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	244,3 ± 18,5	0,050	214,7 ± 49,5	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	220,7 ± 98,0	0,275	192,7 ± 25,1	0,050

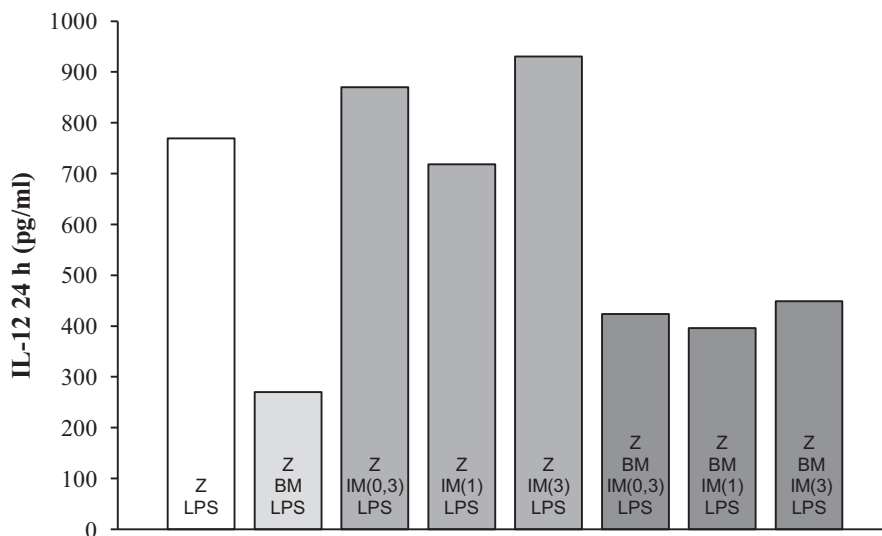
				NSBP 8		NSBP 9	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	151,7 ± 10,2		724,0 ± 218,1	
Z	BM		LPS	65,4 ± 11,6	0,050	270,0 ± 61,5	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	170,7 ± 19,0	0,275	784,3 ± 115,1	0,513
Z		IM(1)	LPS	164,0 ± 43,1	0,513	523,3 ± 124,0	0,275
Z		IM(3)	LPS	188,7 ± 33,2	0,050	845,0 ± 368,1	0,658
Z	BM	IM(0,3)	LPS	69,8 ± 13,7	0,050	354,7 ± 13,2	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	75,6 ± 26,4	0,050	254,3 ± 16,3	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	82,0 ± 9,5	0,050	381,3 ± 34,5	0,050

				NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	454,7 ± 49,0	
Z	BM		LPS	133,4 ± 35,4	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	438,3 ± 108,7	0,827
Z		IM(1)	LPS	347,3 ± 140,7	0,513
Z		IM(3)	LPS	337,0 ± 91,7	0,127
Z	BM	IM(0,3)	LPS	205,3 ± 92,2	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	117,8 ± 43,4	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	125,7 ± 37,5	0,050

**Tabelle 3-8:** LPS-induzierte IL-12 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

### 3. Ergebnisse

In Abbildung 3-8 sind die Mittelwerte der IL-12 Produktion aller 9 Nabelschnurblutproben nach einer Inkubationszeit von 24 h dargestellt. Optisch ist die stark suppressive Wirkung von Betamethason auf die IL-12 Produktion deutlich erkennbar. Indometacin scheint einen stimulierenden Effekt auf die IL-12 Sekretion zu haben, der aber in Kombination mit Betamethason vollständig unterdrückt wird. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben erhebliche Unterschiede aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 3-8:** LPS-induzierte IL-12 Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 9 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

#### IFN $\gamma$ :

Die Sekretion von IFN $\gamma$  wurde in 8 von 10 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe Betamethason nicht signifikant beeinflusst. In 2 von 10 Proben fand sich eine statistisch signifikante Inhibition der IFN $\gamma$  Produktion durch Betamethason ( $p \leq 0,050$ ). Die alleinige Applikation von Indometacin erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. In 7 von 10 Nabelschnurblutproben hatte Indometacin keinen signifikanten Einfluss auf die IFN $\gamma$  Produktion. In 2 Proben zeigte sich eine signifikante Hemmung der IFN $\gamma$  Sekretion durch die Zugabe von 0,3 und 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 3) bzw. 3,0  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin (NSBP 2) ( $p \leq 0,050$ ). In einer der 10 Proben wurde in Anwesenheit von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin signifikant mehr IFN $\gamma$  produziert als ohne Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). Die Kombination von Betamethason und Indometacin führte in 6 von 10 Nabelschnurblutproben zu einer signifikanten Inhibition der IFN $\gamma$  Sekretion ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser Effekt sowohl auf Betamethason als auch auf

### 3. Ergebnisse

Indometacin zurückzuführen ist. In 3 von 10 Proben zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die IFN $\gamma$  Produktion durch die beiden Substanzen. In NSBP 4, die bereits bei alleiniger Applikation von Indometacin erhöhte IFN $\gamma$ -Spiegel zeigte, kam es auch bei Kombination von Betamethason und Indometacin zu einer signifikanten Steigerung der IFN $\gamma$  Produktion, unabhängig von der Indometacin-Konzentration ( $p \leq 0,050$ ).

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	27,0 $\pm$ 1,6		16,7 $\pm$ 2,6	
Z	BM		LPS	26,5 $\pm$ 0,9	0,637	13,0 $\pm$ 1,5	0,077
Z		IM(0,3)	LPS	26,7 $\pm$ 1,6	0,822	14,2 $\pm$ 0,9	0,105
Z		IM(1)	LPS	26,5 $\pm$ 3,5	0,513	14,0 $\pm$ 1,2	0,105
Z		IM(3)	LPS	26,2 $\pm$ 0,8	0,500	13,4 $\pm$ 0,6	0,046
Z	BM	IM(0,3)	LPS	27,8 $\pm$ 4,3	1,000	13,0 $\pm$ 0,8	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	27,0 $\pm$ 0,0	1,000	14,0 $\pm$ 0,6	0,072
Z	BM	IM(3)	LPS	25,4 $\pm$ 1,6	0,261	13,7 $\pm$ 1,0	0,077

				NSBP 3		NSBP 4	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	18,4 $\pm$ 0,6		12,4 $\pm$ 0,6	
Z	BM		LPS	14,4 $\pm$ 2,1	0,050	10,9 $\pm$ 0,8	0,072
Z		IM(0,3)	LPS	15,4 $\pm$ 0,4	0,046	17,9 $\pm$ 0,3	0,043
Z		IM(1)	LPS	15,1 $\pm$ 1,3	0,046	14,8 $\pm$ 4,1	0,487
Z		IM(3)	LPS	17,4 $\pm$ 1,5	0,376	11,4 $\pm$ 1,2	0,239
Z	BM	IM(0,3)	LPS	13,6 $\pm$ 0,8	0,050	16,0 $\pm$ 0,6	0,043
Z	BM	IM(1)	LPS	14,1 $\pm$ 0,5	0,046	17,0 $\pm$ 1,5	0,046
Z	BM	IM(3)	LPS	14,6 $\pm$ 1,4	0,050	16,9 $\pm$ 2,0	0,046

### 3. Ergebnisse

				NSBP 5		NSBP 6	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	13,5 ± 0,8		12,2 ± 0,4	
Z	BM		LPS	10,9 ± 1,5	0,072	11,8 ± 1,5	0,658
Z		IM(0,3)	LPS	12,0 ± 0,8	0,072	12,9 ± 0,4	0,077
Z		IM(1)	LPS	12,7 ± 1,3	0,346	12,1 ± 1,1	0,658
Z		IM(3)	LPS	12,1 ± 1,3	0,121	12,9 ± 0,9	0,261
Z	BM	IM(0,3)	LPS	11,0 ± 1,3	0,046	10,5 ± 0,2	0,046
Z	BM	IM(1)	LPS	10,1 ± 0,8	0,043	11,6 ± 0,4	0,105
Z	BM	IM(3)	LPS	11,4 ± 1,1	0,072	11,2 ± 0,9	0,184

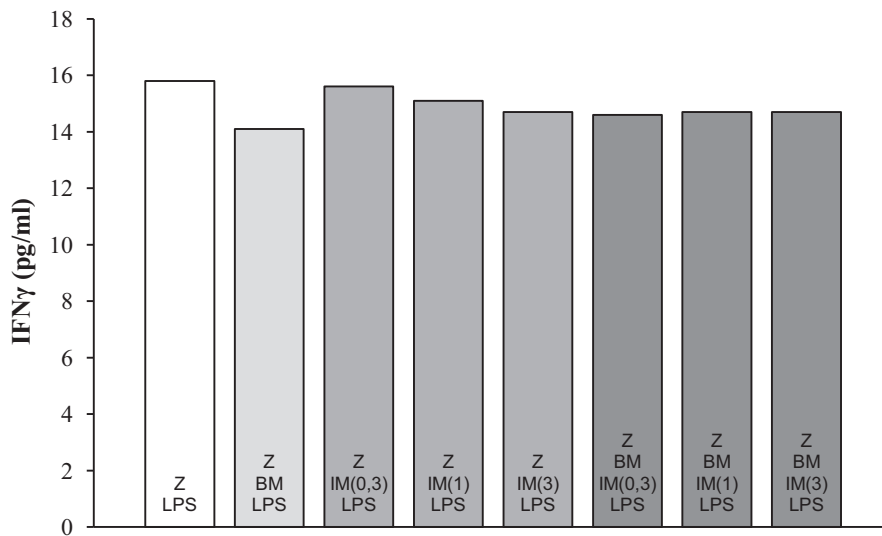
				NSBP 7		NSBP 8	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	14,1 ± 0,5		15,4 ± 0,4	
Z	BM		LPS	12,8 ± 0,8	0,072	15,1 ± 0,4	0,456
Z		IM(0,3)	LPS	14,4 ± 1,3	0,814	14,8 ± 0,2	0,099
Z		IM(1)	LPS	14,8 ± 1,8	0,817	14,0 ± 1,1	0,072
Z		IM(3)	LPS	13,2 ± 1,4	0,507	14,3 ± 0,6	0,072
Z	BM	IM(0,3)	LPS	12,3 ± 0,9	0,043	13,2 ± 1,1	0,046
Z	BM	IM(1)	LPS	13,9 ± 0,5	0,456	13,7 ± 1,1	0,072
Z	BM	IM(3)	LPS	12,8 ± 0,8	0,072	14,7 ± 1,1	0,346

				NSBP 9		NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	14,2 ± 1,2		13,7 ± 0,4	
Z	BM		LPS	14,0 ± 1,1	0,637	12,0 ± 0,8	0,046
Z		IM(0,3)	LPS	14,1 ± 0,6	0,507	13,4 ± 0,2	0,197
Z		IM(1)	LPS	13,7 ± 1,1	0,637	13,5 ± 0,7	0,637
Z		IM(3)	LPS	13,5 ± 0,7	0,369	13,0 ± 0,9	0,197
Z	BM	IM(0,3)	LPS	12,6 ± 0,8	0,121	16,1 ± 2,2	0,105
Z	BM	IM(1)	LPS	13,5 ± 0,0	0,480	11,8 ± 1,5	0,105
Z	BM	IM(3)	LPS	13,7 ± 1,1	0,637	12,3 ± 1,1	0,105

**Tabelle 3-9:** LPS-induzierte IFN $\gamma$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe  $\pm$  Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

### 3. Ergebnisse

Abbildung 3-9 zeigt die IFN $\gamma$  Produktion als Mittelwerte aller 10 Nabelschnurblutproben. Optisch ist ein leicht hemmender Effekt von Betamethason auf die IFN $\gamma$  Produktion erkennbar. Wie oben beschrieben, sind die Wirkungen von Betamethason und Indometacin auf die einzelnen Proben zum Teil gegensätzlich, so dass bei der Gesamtbetrachtung aller Proben keine eindeutige Tendenz zu beobachten ist.



**Abbildung 3-9:** LPS-induzierte IFN $\gamma$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 10 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

#### TNF (4 h):

Die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF wurde nach einer Inkubationszeit von 4 h in 7 von 10 Nabelschnurblutproben durch Betamethason nicht signifikant beeinflusst. In den übrigen 3 Proben fand sich eine statistisch signifikante Hemmung der TNF Produktion durch Betamethason ( $p = 0,050$ ). Die alleinige Applikation von Indometacin führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. In 6 von 10 Proben hatte Indometacin keinen signifikanten Einfluss auf die TNF Sekretion. In 3 von 10 Proben kam es zu einer signifikanten Stimulation der TNF Produktion durch die Zugabe von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 9/10), 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 10) bzw. von 3,0  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin (NSBP 5/9) ( $p = 0,050$ ). In einer Proben wurde in Anwesenheit von 3,0  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin signifikant weniger TNF produziert ( $p = 0,050$ ). Bei Kombination von Betamethason und Indometacin wurde der stimulierende Effekt von Indometacin nahezu aufgehoben. So wurde in Proben (NSBP 5/10), die unter alleiniger Applikation von Indometacin signifikant erhöhte TNF-Spiegel aufwiesen, die TNF Produktion bei Kombination von Betamethason und Indometacin auf die Höhe der

### 3. Ergebnisse

Kontrollwerte (Z+LPS) reduziert. In 2 von 10 Proben kam es zu einer signifikanten Hemmung der TNF Produktion ( $p \leq 0,050$ ). Lediglich in einer Probe blieben die TNF-Spiegel auch bei Kombination von Betamethason und Indometacin signifikant erhöht ( $p = 0,050$ ).

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	1093,7 ± 319,3		1186,7 ± 96,1	
Z	BM		LPS	668,0 ± 193,8	0,127	1090,7 ± 497,8	0,513
Z		IM(0,3)	LPS	832,3 ± 114,2	0,127	1423,3 ± 262,7	0,127
Z		IM(1)	LPS	948,0 ± 59,2	0,513	1502,3 ± 768,4	0,513
Z		IM(3)	LPS	926,3 ± 142,7	0,513	1170,3 ± 310,0	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	1309,7 ± 448,9	0,513	1015,7 ± 161,9	0,275
Z	BM	IM(1)	LPS	1048,0 ± 442,3	0,827	1270,0 ± 357,9	0,827
Z	BM	IM(3)	LPS	939,7 ± 269,5	0,827	1260,0 ± 87,2	0,275

				NSBP 3		NSBP 4	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	1133,7 ± 429,6		371,0 ± 131,4	
Z	BM		LPS	710,7 ± 169,4	0,127	188,7 ± 14,7	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	1243,3 ± 89,6	0,827	367,7 ± 30,2	0,827
Z		IM(1)	LPS	1172,7 ± 464,0	0,827	385,0 ± 115,1	0,827
Z		IM(3)	LPS	1280,0 ± 135,3	0,827	387,0 ± 49,9	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	1323,3 ± 198,6	0,513	245,3 ± 126,4	0,275
Z	BM	IM(1)	LPS	830,0 ± 129,3	0,513	240,3 ± 71,6	0,127
Z	BM	IM(3)	LPS	1025,7 ± 311,5	0,827	232,7 ± 23,0	0,127



### 3. Ergebnisse

				NSBP 5		NSBP 6	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	218,7 ± 63,0		1170,0 ± 204,2	
Z	BM		LPS	149,0 ± 41,6	0,127	792,0 ± 165,0	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	260,0 ± 47,8	0,275	1690,0 ± 745,4	0,275
Z		IM(1)	LPS	264,0 ± 41,5	0,275	1171,0 ± 310,6	0,827
Z		IM(3)	LPS	336,0 ± 2,6	0,050	911,7 ± 100,9	0,050
Z	BM	IM(0,3)	LPS	195,3 ± 30,0	0,513	834,0 ± 151,8	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	178,0 ± 27,7	0,376	1008,3 ± 22,5	0,184
Z	BM	IM(3)	LPS	222,7 ± 2,5	0,513	698,3 ± 62,9	0,046

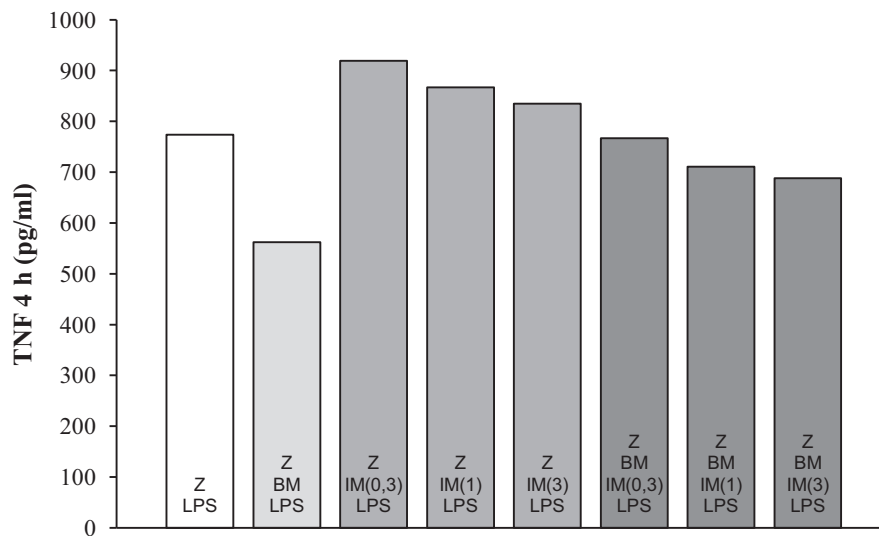
				NSBP 7		NSBP 8	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	654,0 ± 112,3		673,3 ± 206,1	
Z	BM		LPS	453,7 ± 81,6	0,050	499,7 ± 139,3	0,275
Z		IM(0,3)	LPS	651,0 ± 149,7	0,827	643,3 ± 144,9	0,827
Z		IM(1)	LPS	619,3 ± 34,3	0,827	816,0 ± 61,5	0,513
Z		IM(3)	LPS	738,3 ± 40,1	0,513	813,3 ± 233,5	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	618,7 ± 59,7	0,827	503,3 ± 77,5	0,275
Z	BM	IM(1)	LPS	583,3 ± 148,7	0,275	618,0 ± 160,5	0,827
Z	BM	IM(3)	LPS	632,7 ± 192,6	0,827	423,0 ± 44,6	0,050

				NSBP 9		NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	500,0 ± 94,0		737,7 ± 63,3	
Z	BM		LPS	410,0 ± 42,6	0,127	658,3 ± 107,7	0,275
Z		IM(0,3)	LPS	774,7 ± 181,5	0,050	1303,3 ± 180,4	0,050
Z		IM(1)	LPS	689,7 ± 165,8	0,127	1101,7 ± 115,1	0,050
Z		IM(3)	LPS	715,0 ± 83,1	0,050	715,0 ± 403,9	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	834,7 ± 52,2	0,050	787,0 ± 258,5	0,827
Z	BM	IM(1)	LPS	444,0 ± 75,9	0,827	886,0 ± 347,0	0,827
Z	BM	IM(3)	LPS	653,0 ± 18,2	0,050	796,7 ± 92,7	0,513

**Tabelle 3-10:** LPS-induzierte TNF Sekretion in pg/ml nach 4-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

### 3. Ergebnisse

Abbildung 3-10 zeigt die TNF Produktion als Mittelwerte aller 10 Nabelschnurblutproben nach einer Inkubationszeit von 4 h. Optisch ist die inhibierende Wirkung von Betamethason auf die TNF Produktion erkennbar. Der stimulierende Effekt von Indometacin auf die TNF Sekretion, der sich bei alleiniger Applikation zeigt, wird in Kombination mit dem suppressiv wirksamen Betamethason aufgehoben. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben erhebliche Unterschiede aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 3-10:** LPS-induzierte TNF Sekretion in pg/ml nach 4-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 10 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

#### TNF (24 h):

Die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h in 7 von 10 Nabelschnurblutproben durch Betamethason statistisch signifikant gehemmt ( $p \leq 0,050$ ). In 3 Proben hatte Betamethason keinen signifikanten Einfluss auf die TNF Produktion. Der stimulatorische Effekt von Indometacin, der nach einer Inkubationszeit von 4 h beobachtet wurde, bestätigte sich. So kam es in 5 von 10 Proben zu einer signifikanten Erhöhung der TNF Produktion durch Indometacin, unabhängig von der Indometacin-Konzentration ( $p \leq 0,050$ ). In den übrigen 5 Proben wurde die TNF Sekretion durch Indometacin nicht signifikant beeinflusst. Bei Kombination von Betamethason und Indometacin wurde der stimulierende Effekt von Indometacin nahezu vollständig unterdrückt. So wurde in Proben (NSBP 6/8), die unter alleiniger Applikation von Indometacin signifikant erhöhte TNF-Spiegel aufwies, die TNF Produktion bei

### 3. Ergebnisse

Kombination von Betamethason und Indometacin auf die Höhe der Kontrollwerte (Z+LPS) zurückgeführt. In einer Proben (NSBP 5) wurde die durch Indometacin signifikant erhöhte TNF Sekretion durch die Kombination der beiden Substanzen signifikant reduziert ( $p = 0,050$ ). Insgesamt kam es in 4 von 10 Proben zu einer signifikanten Hemmung der TNF Produktion durch Betamethason und Indometacin ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser Effekt auf das suppressiv wirksame Betamethason zurückzuführen ist. Lediglich in 2 Proben blieben die TNF-Spiegel auch bei Kombination der beiden Substanzen signifikant erhöht ( $p \leq 0,050$ ).

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	292,3 ± 59,5		366,0 ± 74,6	
Z	BM		LPS	159,7 ± 18,2	0,046	204,7 ± 76,5	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	420,3 ± 3,1	0,046	463,7 ± 117,0	0,127
Z		IM(1)	LPS	280,3 ± 100,1	0,825	440,7 ± 81,3	0,127
Z		IM(3)	LPS	399,0 ± 97,0	0,121	461,7 ± 164,2	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	454,0 ± 27,2	0,046	418,3 ± 7,8	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	341,0 ± 88,5	0,507	384,3 ± 29,0	0,513
Z	BM	IM(3)	LPS	384,3 ± 140,6	0,268	435,3 ± 238,9	0,513

				NSBP 3		NSBP 4	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	874,7 ± 89,0		160,0 ± 43,3	
Z	BM		LPS	601,3 ± 167,1	0,127	64,0 ± 18,7	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	1563,3 ± 221,4	0,050	238,7 ± 65,3	0,127
Z		IM(1)	LPS	1270,0 ± 55,7	0,050	200,0 ± 60,5	0,513
Z		IM(3)	LPS	1636,7 ± 310,9	0,050	198,5 ± 94,7	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	996,7 ± 99,8	0,127	174,7 ± 18,3	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	1163,3 ± 35,1	0,050	165,3 ± 10,5	0,513
Z	BM	IM(3)	LPS	1063,0 ± 271,5	0,275	218,0 ± 103,4	0,275

3. Ergebnisse

				NSBP 5		NSBP 6	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	122,7 ± 7,2		515,3 ± 118,0	
Z	BM		LPS	55,2 ± 12,4	0,050	339,0 ± 72,6	0,127
Z		IM(0,3)	LPS	208,3 ± 31,2	0,050	1102,7 ± 251,0	0,050
Z		IM(1)	LPS	151,3 ± 14,8	0,050	842,7 ± 141,8	0,050
Z		IM(3)	LPS	207,7 ± 6,5	0,050	1120,0 ± 125,3	0,050
Z	BM	IM(0,3)	LPS	58,3 ± 10,0	0,050	679,3 ± 288,5	0,513
Z	BM	IM(1)	LPS	52,9 ± 5,5	0,050	665,0 ± 95,8	0,127
Z	BM	IM(3)	LPS	79,4 ± 21,4	0,050	677,0 ± 328,3	0,827

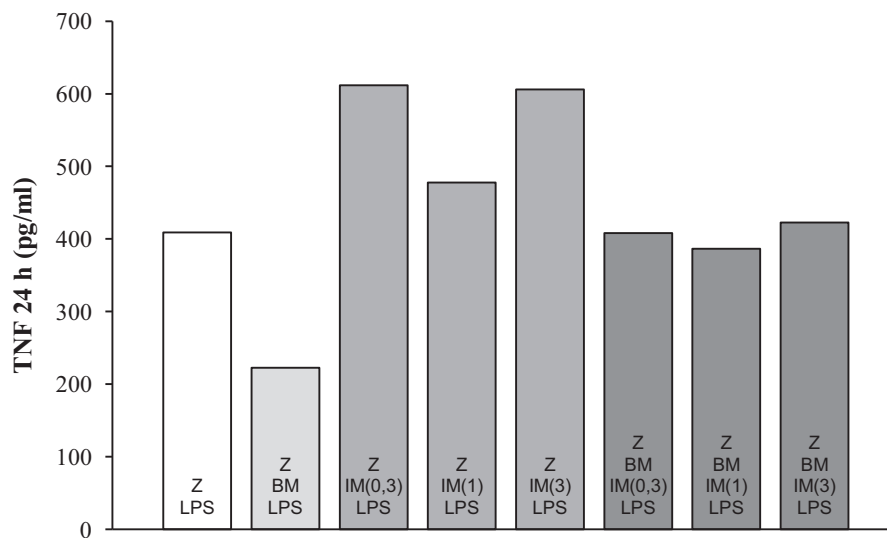
				NSBP 7		NSBP 8	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	522,0 ± 110,4		85,8 ± 10,4	
Z	BM		LPS	229,3 ± 33,7	0,050	77,3 ± 23,5	0,513
Z		IM(0,3)	LPS	707,3 ± 224,1	0,127	180,0 ± 28,8	0,050
Z		IM(1)	LPS	506,3 ± 164,2	0,827	210,3 ± 77,5	0,050
Z		IM(3)	LPS	492,7 ± 149,8	0,513	176,0 ± 13,0	0,050
Z	BM	IM(0,3)	LPS	304,7 ± 62,6	0,050	71,3 ± 9,3	0,127
Z	BM	IM(1)	LPS	479,0 ± 105,5	0,275	90,9 ± 25,4	0,827
Z	BM	IM(3)	LPS	456,0 ± 28,2	0,513	95,2 ± 15,8	0,513

				NSBP 9		NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	637,3 ± 148,8		514,3 ± 137,7	
Z	BM		LPS	318,7 ± 84,3	0,050	176,7 ± 55,0	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	762,3 ± 220,6	0,513	472,0 ± 42,0	0,513
Z		IM(1)	LPS	449,7 ± 114,6	0,127	427,7 ± 46,3	0,513
Z		IM(3)	LPS	877,3 ± 315,0	0,275	492,3 ± 189,4	0,827
Z	BM	IM(0,3)	LPS	571,7 ± 37,2	0,513	350,3 ± 149,2	0,127
Z	BM	IM(1)	LPS	348,7 ± 24,0	0,050	175,0 ± 49,8	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	569,3 ± 110,2	0,513	248,0 ± 44,6	0,050

**Tabelle 3-11:** LPS-induzierte TNF Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe ± Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

### 3. Ergebnisse

In Abbildung 3-11 sind die Mittelwerte der TNF Produktion aller 10 Nabelschnurblutproben nach einer Inkubationszeit von 24 h dargestellt. Optisch ist die inhibierende Wirkung von Betamethason deutlich erkennbar. Der stimulierende Effekt von Indometacin auf die TNF Sekretion, der sich bei alleiniger Applikation von Indometacin zeigt, wird in Kombination mit dem suppressiv wirksamen Betamethason aufgehoben. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben stark schwankte, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 3-11:** LPS-induzierte TNF Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 10 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

#### **MIP-1 $\alpha$ :**

Die Sekretion des Chemokins MIP-1 $\alpha$  wurde in allen Nabelschnurblutproben durch Betamethason signifikant gehemmt ( $p = 0,050$ ). Indometacin hatte in 3 von 5 Proben keinen signifikanten Einfluss auf die MIP-1 $\alpha$  Produktion. In den übrigen 2 Proben zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MIP-1 $\alpha$  Sekretion durch die Zugabe von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 2) bzw. 3,0  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin (NSBP 1/5). Dieser stimulatorische Effekt von Indometacin wurde bei Kombination von Betamethason und Indometacin vollständig unterdrückt. So wurde in Proben (NSBP 1/5), die unter alleiniger Applikation von Indometacin signifikant erhöhte MIP-1 $\alpha$ -Spiegel aufwiesen, die MIP-1 $\alpha$  Produktion bei Kombination von Betamethason und Indometacin entweder signifikant reduziert (NSBP 5) oder auf die Höhe der Kontrollwerte (Z+LPS) zurückgeführt (NSBP 1). Insgesamt kam es in 4 von 5 Proben zu einer signifikanten

### 3. Ergebnisse

Hemmung der MIP-1 $\alpha$  Produktion durch Betamethason und Indometacin ( $p = 0,050$ ), wobei dieser Effekt auf das suppressiv wirksame Betamethason zurückzuführen ist.

				NSBP 1		NSBP 5	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	16166,7 $\pm$ 1101,5		8380,0 $\pm$ 1079,5	
Z	BM		LPS	9300,0 $\pm$ 793,7	0,050	2453,3 $\pm$ 125,8	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	18933,3 $\pm$ 2289,8	0,127	12200,0 $\pm$ 1044,0	0,050
Z		IM(1)	LPS	15133,3 $\pm$ 3592,1	0,513	7783,3 $\pm$ 425,7	0,513
Z		IM(3)	LPS	18366,7 $\pm$ 862,2	0,050	11566,7 $\pm$ 251,7	0,050
Z	BM	IM(0,3)	LPS	15700,0 $\pm$ 3659,2	0,513	2480,0 $\pm$ 944,3	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	14000,0 $\pm$ 2722,1	0,275	2073,3 $\pm$ 238,6	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	14066,7 $\pm$ 2236,8	0,275	3300,0 $\pm$ 713,6	0,050

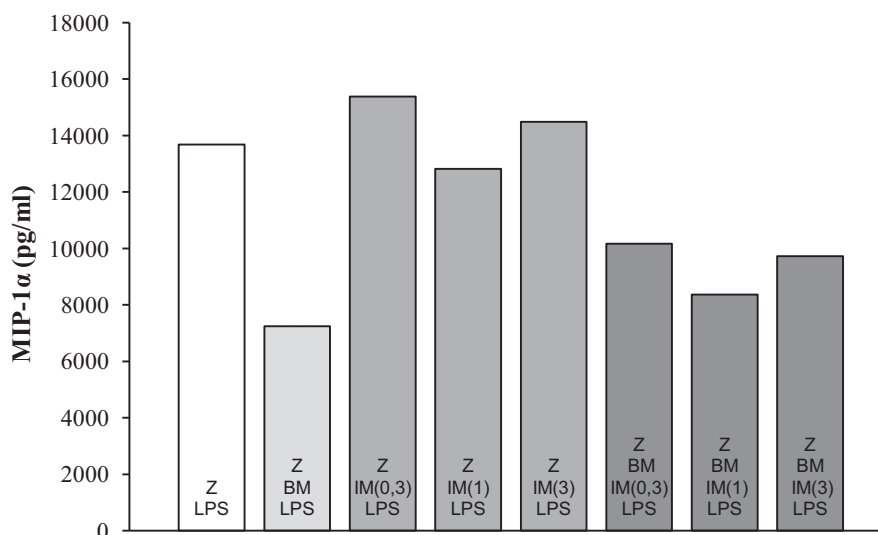
				NSBP 8		NSBP 9	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	11900,0 $\pm$ 3031,5		14300,0 $\pm$ 556,8	
Z	BM		LPS	4023,3 $\pm$ 280,4	0,050	10563,3 $\pm$ 806,9	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	14000,0 $\pm$ 1311,5	0,513	15533,3 $\pm$ 1361,4	0,275
Z		IM(1)	LPS	13073,3 $\pm$ 4892,7	0,827	13066,7 $\pm$ 1193,0	0,275
Z		IM(3)	LPS	12800,0 $\pm$ 3079,0	0,376	15400,0 $\pm$ 1835,8	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	5830,0 $\pm$ 903,4	0,050	13200,0 $\pm$ 2306,5	0,827
Z	BM	IM(1)	LPS	6043,3 $\pm$ 1734,9	0,050	11033,3 $\pm$ 321,5	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	7703,3 $\pm$ 2145,9	0,050	11720,0 $\pm$ 1648,4	0,050

### 3. Ergebnisse

				NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	17666,7 ± 3782,0	
Z	BM		LPS	9843,3 ± 760,0	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	16233,3 ± 2967,0	0,275
Z		IM(1)	LPS	15033,3 ± 1604,2	0,275
Z		IM(3)	LPS	14300,0 ± 1135,8	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	13600,0 ± 2718,5	0,827
Z	BM	IM(1)	LPS	8660,0 ± 2245,0	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	11810,0 ± 1985,0	0,050

**Tabelle 3-12:** LPS-induzierte MIP-1 $\alpha$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe  $\pm$  Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

Abbildung 3-12 zeigt die MIP-1 $\alpha$  Produktion als Mittelwerte aller 5 Nabelschnurblutproben. Optisch ist die suppressive Wirkung von Betamethason deutlich erkennbar. Der stimulierende Effekt von Indometacin auf die MIP-1 $\alpha$  Sekretion, der sich bei alleiniger Applikation von Indometacin zeigt, wird in Kombination mit Betamethason vollständig unterdrückt. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben erhebliche Schwankungen aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 3-12:** LPS-induzierte MIP-1 $\alpha$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 5 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

### 3. Ergebnisse

#### MIP-1 $\beta$ :

Die Sekretion des Chemokins MIP-1 $\beta$  wurde in 6 von 10 Nabelschnurblutproben durch Betamethason statistisch signifikant gehemmt ( $p = 0,050$ ). In 4 von 10 Proben zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der MIP-1 $\beta$  Produktion durch Betamethason. Indometacin hatte in 5 von 10 Proben keinen signifikanten Einfluss auf die MIP-1 $\beta$  Produktion. In den übrigen 5 Nabelschnurblutproben fand sich eine signifikante Stimulation der MIP-1 $\beta$  Sekretion durch die Zugabe von Indometacin in allen Konzentrationen (NSBP 3/6) bzw. von 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 5/8) und 3,0  $\mu\text{g/ml}$  (NSBP 2/5) ( $p = 0,050$ ). Bei Kombination von Betamethason und Indometacin wurde der stimulierende Effekt von Indometacin teilweise unterdrückt. So wurde in Proben (NSBP 2/8), die unter alleiniger Applikation von Indometacin signifikant erhöhte MIP-1 $\beta$ -Spiegel aufwiesen, die MIP-1 $\beta$  Produktion bei Kombination von Betamethason und Indometacin auf die Höhe der Kontrollwerte (Z+LPS) reduziert. In einer Probe (NSBP 5) wurde die durch Indometacin signifikant erhöhte MIP-1 $\beta$  Sekretion durch die Kombination der beiden Substanzen signifikant reduziert ( $p = 0,050$ ). Insgesamt kam es in 5 von 10 Proben zu einer signifikanten Hemmung der MIP-1 $\beta$  Produktion durch Betamethason und Indometacin ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser Effekt auf das suppressiv wirksame Betamethason zurückzuführen ist. Lediglich in 2 Proben blieben die MIP-1 $\beta$ -Spiegel auch bei Kombination der beiden Substanzen signifikant erhöht ( $p = 0,050$ ).

				NSBP 1		NSBP 2	
				MW $\pm$ Stabw	p-Wert	MW $\pm$ Stabw	p-Wert
Z			LPS	9930,0 $\pm$ 1620,1		9490,0 $\pm$ 1182,0	
Z	BM		LPS	6416,7 $\pm$ 151,4	0,050	8686,7 $\pm$ 761,1	0,275
Z		IM(0,3)	LPS	11300,0 $\pm$ 953,9	0,184	10630,0 $\pm$ 1025,0	0,275
Z		IM(1)	LPS	9303,3 $\pm$ 3190,6	0,513	11800,0 $\pm$ 1253,0	0,077
Z		IM(3)	LPS	10500,0 $\pm$ 100,0	0,513	12900,0 $\pm$ 818,5	0,050
Z	BM	IM(0,3)	LPS	12800,0 $\pm$ 2512,0	0,275	9146,7 $\pm$ 1605,5	0,827
Z	BM	IM(1)	LPS	9536,7 $\pm$ 1726,9	0,827	9016,7 $\pm$ 692,4	0,513
Z	BM	IM(3)	LPS	9220,0 $\pm$ 1549,8	0,275	11256,7 $\pm$ 1760,0	0,275



3. Ergebnisse

				NSBP 3		NSBP 4	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	11370,0 ± 1896,0		8283,3 ± 340,8	
Z	BM		LPS	11330,0 ± 3357,8	0,827	4826,7 ± 1142,0	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	20166,7 ± 4980,3	0,050	8306,7 ± 1331,7	0,513
Z		IM(1)	LPS	17766,7 ± 1209,7	0,050	8276,7 ± 997,1	0,513
Z		IM(3)	LPS	19533,3 ± 3818,8	0,050	8400,0 ± 3050,0	0,513
Z	BM	IM(0,3)	LPS	13833,3 ± 321,5	0,050	6696,7 ± 531,6	0,050
Z	BM	IM(1)	LPS	16866,7 ± 568,6	0,050	7110,0 ± 314,3	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	13766,7 ± 2853,7	0,275	9063,3 ± 3442,2	0,513

				NSBP 5		NSBP 6	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	3240,0 ± 326,0		12366,7 ± 1436,4	
Z	BM		LPS	2203,3 ± 102,6	0,050	9866,7 ± 1968,7	0,275
Z		IM(0,3)	LPS	4423,3 ± 368,6	0,050	19400,0 ± 3218,7	0,050
Z		IM(1)	LPS	3723,3 ± 230,1	0,127	17800,0 ± 1808,3	0,050
Z		IM(3)	LPS	4716,7 ± 297,0	0,050	19200,0 ± 264,6	0,050
Z	BM	IM(0,3)	LPS	2176,7 ± 456,3	0,050	15100,0 ± 3469,9	0,127
Z	BM	IM(1)	LPS	1910,0 ± 244,3	0,050	15700,0 ± 2080,9	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	2780,0 ± 285,1	0,127	13913,3 ± 4837,6	0,827

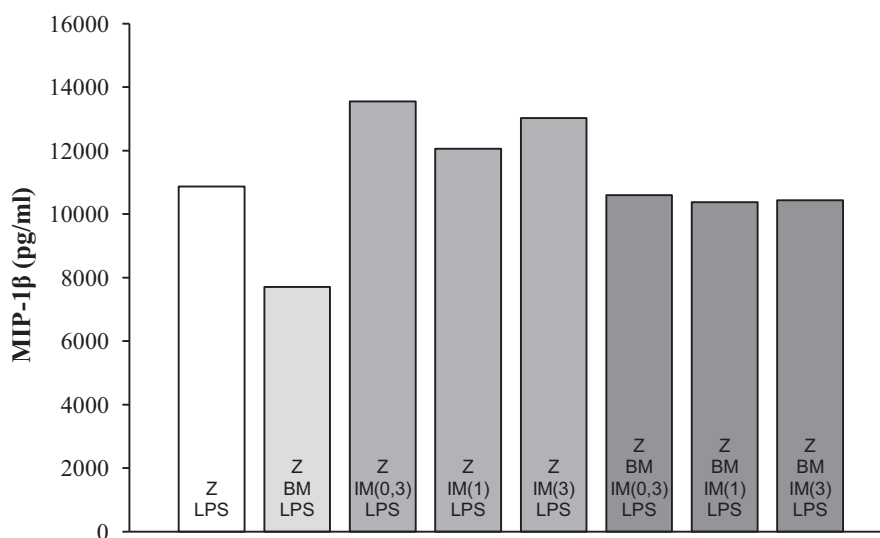
				NSBP 7		NSBP 8	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	19766,7 ± 2154,8		12566,7 ± 2871,1	
Z	BM		LPS	10330,0 ± 655,5	0,050	7790,0 ± 561,1	0,050
Z		IM(0,3)	LPS	21533,3 ± 2602,6	0,513	15900,0 ± 624,5	0,050
Z		IM(1)	LPS	17333,3 ± 3614,3	0,513	13866,7 ± 3288,4	0,827
Z		IM(3)	LPS	18700,0 ± 1300,0	0,275	14700,0 ± 1276,7	0,275
Z	BM	IM(0,3)	LPS	16433,3 ± 2454,2	0,275	9810,0 ± 1557,0	0,127
Z	BM	IM(1)	LPS	18500,0 ± 3340,7	0,827	10876,7 ± 1709,6	0,513
Z	BM	IM(3)	LPS	15833,3 ± 635,1	0,046	10540,0 ± 1411,0	0,275

### 3. Ergebnisse

				NSBP 9		NSBP 10	
				MW ± Stabw	p-Wert	MW ± Stabw	p-Wert
Z			LPS	6736,7 ± 196,6		14933,3 ± 1258,3	
Z	BM		LPS	4686,7 ± 553,7	0,050	10963,3 ± 2438,2	0,077
Z		IM(0,3)	LPS	6893,3 ± 418,8	0,513	16900,0 ± 2930,9	0,513
Z		IM(1)	LPS	6363,3 ± 1267,5	0,513	14300,0 ± 2882,7	0,827
Z		IM(3)	LPS	8076,7 ± 2186,0	0,275	13566,7 ± 1761,6	0,268
Z	BM	IM(0,3)	LPS	6496,7 ± 687,3	0,513	13433,3 ± 1680,3	0,275
Z	BM	IM(1)	LPS	4690,0 ± 444,4	0,050	9593,3 ± 3152,2	0,050
Z	BM	IM(3)	LPS	6030,0 ± 1087,4	0,513	11913,3 ± 2307,9	0,127

**Tabelle 3-13:** LPS-induzierte MIP-1 $\beta$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 3 parallelen Stimulationsansätzen einer Nabelschnurblutprobe  $\pm$  Standardabweichung. Die p-Werte zeigen den statistischen Unterschied zum Kontrollansatz (Z+LPS).

In Abbildung 3-13 sind die Mittelwerte der MIP-1 $\beta$  Produktion aller 10 Nabelschnurblutproben dargestellt. Optisch ist die hemmende Wirkung von Betamethason deutlich erkennbar. Der stimulierende Effekt von Indometacin auf die MIP-1 $\beta$  Sekretion, der sich bei alleiniger Applikation von Indometacin zeigt, scheint durch die Kombination mit Betamethason aufgehoben zu werden. Da die Höhe der Zytokinspiegel zwischen den einzelnen Nabelschnurblutproben erhebliche Unterschiede aufwies, konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abbildung 3-13:** LPS-induzierte MIP-1 $\beta$  Sekretion in pg/ml nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte (n = 10 Nabelschnurblutproben, je 3 Stimulationsansätze).

## **4. Diskussion**

Wie bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte, nehmen Glukokortikosteroide wie Betamethason und nicht-steroidale Antiphlogistika wie Indometacin Einfluss auf die Zytokinproduktion von mononukleären Zellen [18; 19; 127; 135; 136]. Glukokortikosteroide entfalten ihre Wirkung weitgehend über zytoplasmatische Rezeptoren, sogenannte Glukokortikoid-Rezeptoren, die in zahlreichen Zellen vorgefunden werden. Der Glukokortikosteroid-Rezeptor-Komplex dringt in den Zellkern ein und führt dort zu einer Modulation der Gentranskription. Die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide funktioniert hauptsächlich über die Unterdrückung des nukleären Faktors  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [138]. Dieser Faktor spielt eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion der Zytokine [111]. Die Wirkung von Indometacin beruht auf einer Hemmung der Prostaglandinsynthese. Jedoch lassen sich nicht alle Effekte von Indometacin durch diesen Mechanismus erklären, weshalb ein weiterer PGE2-unabhängiger Pathway diskutiert wird [136].

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, welche Zytokine durch umbilikale mononukleäre Zellen von gesunden Reifgeborenen infolge einer Stimulation mit LPS von *E.coli* vermehrt produziert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Sekretion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  unter LPS-Stimulation hochsignifikant gesteigert wurde. Die Produktion von IL-4, IL-5, IL-15 und TGF $\beta$  wurde dagegen durch LPS nicht induziert. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen von Takahashi et al, die nachweisen konnten, dass die Serumspiegel von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$  und TNF in Nabelschnurblutproben von Frühgeborenen und Reifgeborenen, bei deren Müttern histologisch eine Chorioamnionitis diagnostiziert wurde, signifikant höher war als von Kindern mit Müttern ohne Chorioamnionitis. Die Produktion von IL-4 und IL-5 wurde durch das Vorliegen einer Chorioamnionitis nicht signifikant gesteigert [134].

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung des immunmodulatorischen Effektes von Betamethason und Indometacin auf die Produktion von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen durch umbilikale mononukleäre Zellen spontan bzw. nach Stimulation mit LPS von *E.coli*. Dabei konnten wir nachweisen, dass die spontane IL-8 Produktion durch Betamethason signifikant reduziert wurde ( $p = 0,050$ ). Die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikosteroide ist bekannt und wurde mehrfach in Studien beschrieben [18; 19; 138].

#### 4. Diskussion

Indometacin dagegen hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die spontane IL-8 Sekretion.

Bei Kombination von Betamethason und Indometacin ließ sich eine statistisch signifikante Inhibition der IL-8 Produktion beobachten ( $p \leq 0,050$ ). Da Indometacin alleine die spontane IL-8 Produktion nicht signifikant beeinflusst hatte, führten wir den inhibierenden Effekt bei Kombination der beiden Substanzen auf Betamethason zurück.

Als weiteres Ergebnis konnten wir zeigen, dass die LPS-induzierte IL-1 $\beta$  Sekretion in allen Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason signifikant gehemmt wurde ( $p \leq 0,050$ ). Auch Bessler et al untersuchten die Wirkung von Glukokortikoiden auf die Zytokinproduktion durch mononukleäre Zellen. Dabei fanden sie, dass Dexamethason, ebenfalls ein synthetisches Glukokortikoid, die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen und Reifgeborenen und durch LPS-stimulierte PBMC von Erwachsenen dosisabhängig und signifikant hemmt [19].

Die alleinige Applikation von Indometacin erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. In 5 von 10 Nabelschnurblutproben ergab sich keine statistisch signifikante Beeinflussung der IL-1 $\beta$  Produktion durch Indometacin. Dagegen wurde in 3 von 10 Proben nach Zugabe von Indometacin signifikant mehr IL-1 $\beta$  produziert als ohne Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). In 2 von 10 Proben konnte eine statistisch signifikante Hemmung der IL-1 $\beta$  Produktion durch Indometacin beobachtet werden ( $p \leq 0,050$ ). Auch in der Literatur sind unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. So konnten Sirota et al keinen signifikanten Einfluss von Indometacin auf die IL-1 $\beta$ -Synthese durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen bzw. PBMC von Erwachsenen nachweisen [127], während Kunkel et al zeigen konnten, dass Indometacin die IL-1 Produktion durch LPS-stimulierte mononukleäre Zellen von Mäusen dosisabhängig steigert. Gleichzeitig fanden Kunkel et al, dass die LPS-induzierte PGE<sub>2</sub>-Synthese durch Indometacin dosisabhängig gehemmt wurde und eine exogene Zufuhr von PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> die IL-1-Synthese durch LPS-stimulierte mononukleäre Zellen supprimiert. Aufgrund dieser Beobachtungen folgerten Kunkel et al, dass die Steigerung der IL-1 Produktion durch Indometacin über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese vermittelt wird [76].

Bei Kombination von Betamethason und Indometacin wurde die IL-1 $\beta$  Sekretion in allen Nabelschnurblutproben signifikant inhibiert ( $p \leq 0,050$ ), wobei die suppressive Wirkung in erster Linie auf Betamethason zurückzuführen ist.

#### 4. Diskussion

Bei der Untersuchung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 konnten wir zeigen, dass die IL-6 Produktion in 4 von 9 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason signifikant gehemmt wurde ( $p \leq 0,050$ ). In 5 von 9 Proben fand sich keine signifikante Beeinflussung der IL-6 Produktion durch Betamethason. Allerdings waren die IL-6 Spiegel bis auf eine Ausnahme unter dem Einfluss von Betamethason tendenziell niedriger, ohne dass dabei eine statistische Signifikanz erreicht wurde. Auch Bessler et al konnte nachweisen, dass Dexamethason die IL-6 Produktion durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen und Reifgeborenen und durch LPS-stimulierte PBMC von Erwachsenen dosisabhängig und signifikant hemmt [19].

Die alleinige Applikation von Indometacin führte in 7 von 9 Nabelschnurblutproben zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-6 Sekretion. In den übrigen 2 Nabelschnurblutproben wurde die IL-6 Produktion durch die Zugabe von Indometacin signifikant inhibiert ( $p = 0,050$ ). Sirota et al konnten ebenfalls keine signifikante Veränderung der IL-6 Produktion durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen bzw. PBMC von Erwachsenen infolge einer Inkubation mit Indometacin verzeichnen [127]. Dagegen konnten Komatsu et al in ihren Untersuchungen zeigen, dass Indometacin die IL-6 Produktion durch LPS-stimulierte PBMC von gesunden Erwachsenen signifikant reduziert. Zur Analyse des Wirkmechanismus von Indometacin untersuchten Komatsu et al den Einfluss von Indometacin auf die IL-6 mRNA-Expression. Hierbei konnten sie nachweisen, dass die mRNA-Expression von IL-6 durch eine Stimulation der PBMC mit LPS signifikant zunimmt und bei Zugabe von Indometacin wieder reduziert wird. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Komatsu et al, dass die Hemmung der IL-6 Produktion durch Indometacin bereits auf Ebene der mRNA-Expression erfolgt. Darüberhinaus konnten sie zeigen, dass eine exogene Zufuhr von hochdosiertem PGE2 die IL-6 Sekretion durch unstimulierte PBMC signifikant steigert, während anti-PGE2-Antikörper die IL-6 Produktion durch LPS-stimulierte PBMC signifikant hemmen. Jedoch war der Effekt der anti-PGE2-Antikörper auf die IL-6 Sekretion deutlich geringer als der von Indometacin, so dass angenommen werden muss, dass die Hemmung der IL-6 Produktion durch Indometacin nicht nur durch eine Inhibition der PGE2 Synthese vermittelt wird, sondern noch weitere Mechanismen eine Rolle spielen [71]. Tsuboi et al untersuchten den Einfluss von Indometacin auf unstimulierte PBMC von gesunden Erwachsenen und konnten ebenfalls eine Hemmung der IL-6 mRNA-Expression und IL-6 Sekretion beobachten [136]. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Sironi et al, die den *in-vivo* Effekt von Indometacin auf die IL-6 Produktion nach intraperitonealer Injektion von LPS in Mäusen untersuchten und eine Steigerung der IL-6-Spiegel um 80% bei den mit Indometacin behandelten Mäusen

#### 4. Diskussion

nachweisen konnten [126]. Wie oben beschrieben wird der Einfluss von Indometacin auf die IL-6 Produktion kontrovers diskutiert. Die Mechanismen scheinen komplex zu sein und lassen sich nur unzureichend über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese erklären [71; 105; 126].

Die Kombination von Betamethason und Indometacin bewirkte in 5 von 9 Proben eine statistisch signifikante Hemmung der IL-6 Produktion ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser inhibierende Effekt sowohl auf Betamethason als auch auf Indometacin zurückzuführen ist. In 4 von 9 Proben zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der IL-6 Sekretion.

Ein weiteres Ergebnis unserer Untersuchungen war, dass die Sekretion des Chemokins IL-8 in 5 von 8 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason nicht signifikant beeinflusst wurde. In den übrigen 3 Proben zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der IL-8 Produktion durch Betamethason ( $p = 0,050$ ). Newnham et al untersuchten den Einfluss von Betamethason auf die IL-8 mRNA-Expression und die IL-8 Konzentration im Fruchtwasser von Schafen nach intraamniotischer Injektion von LPS von *E.coli*. Dabei konnten sie nachweisen, dass Betamethason zwar die LPS-induzierte IL-8 mRNA-Expression hemmt, jedoch nicht die LPS-induzierte Erhöhung der IL-8 Konzentration im Fruchtwasser unterdrücken konnte [100].

Indometacin hatte in 7 von 8 Nabelschnurblutproben keinen signifikanten Effekt auf die IL-8 Produktion. In einer Nabelschnurblutprobe fand sich bei einer Konzentration von 3,0 µg/ml eine signifikante Stimulation der IL-8 Sekretion durch Indometacin ( $p = 0,050$ ). Janabi et al untersuchten die Wirkung von Indometacin auf die IL-8 Produktion von Mikroglia-Zellen und Astrozyten menschlicher Embryonen, die mit TNF und IL-1 $\beta$  stimuliert worden waren und konnten ebenfalls keinen signifikanten Effekt von Indometacin auf die IL-8 Sekretion nachweisen [64].

Die gemeinsame Applikation von Betamethason und Indometacin führte in 5 von 8 Proben zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-8 Produktion. Wie bei der alleinigen Gabe von Betamethason zeigte sich in 3 von 8 Proben eine statistisch signifikante Inhibition der IL-8 Sekretion ( $p \leq 0,050$ ).

Die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde in 5 von 9 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe von Betamethason nicht signifikant beeinflusst. In den übrigen 4 Proben fand sich eine statistisch signifikante Hemmung der IL-10 Sekretion durch Betamethason ( $p = 0,050$ ). Bessler et al untersuchten den Effekt von Dexamethason auf

#### 4. Diskussion

die IL-10 Produktion durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen und Reifgeborenen und durch LPS-stimulierte PBMC von Erwachsenen. Dabei konnten sie zeigen, dass die IL-10 Sekretion durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen und Reifgeborenen durch Dexamethason nicht signifikant beeinflusst wurde. Die IL-10 Sekretion durch LPS-stimulierte PBMC von Erwachsenen wurde dagegen durch Dexamethason signifikant reduziert [18].

Das wohl bedeutungsvollste Ergebnis für die hier vorliegende Arbeit war, dass Indometacin in 6 von 9 Proben zu einer signifikanten Stimulation der IL-10 Produktion führte ( $p = 0,050$ ). Dabei war die Stimulation in 2 der 6 Proben unabhängig von der Indometacin-Konzentration. In den übrigen 4 Proben konnten punktuelle Effekte erzielt werden. So zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IL-10 Produktion durch Indometacin bei einer oder zwei der Indometacin-Konzentrationen. In 3 von 9 Proben hatte Indometacin keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10 Produktion. Dieser Zusammenhang wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben und unterstreicht die antiinflammatorische Wirkung von Indometacin. Allerdings steht das Ergebnis im Widerspruch zu den Beobachtungen von Bour et al, die nachweisen konnten, dass Indometacin in hohen Dosierungen (4,0 bzw. 16,0  $\mu\text{g/ml}$ ) die IL-10 Produktion in LPS-stimulierten Vollblutproben von älteren Erwachsenen signifikant hemmt. Bei den niedrigeren Indometacin-Konzentrationen (0,4 bzw. 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) war die IL-10 Sekretion ebenfalls tendenziell niedriger als in den Kontrollen ohne Indometacin, ohne dass dabei eine statistische Signifikanz erreicht wurde [22]. Viele Studien weisen darauf hin, dass Prostaglandine, insbesondere PGE<sub>2</sub>, die Freisetzung von IL-10 stimulieren [54; 103; 149]. So konnten Yoshijuki et al zeigen, dass durch die Zugabe von PGE<sub>2</sub> die mRNA-Expression von IL-10 sowohl in unstimulierten als auch in LPS-stimulierten PBMC deutlich erhöht wurde [149]. Da Indometacin ein wirksamer Inhibitor der Prostaglandinsynthese ist, kann die von uns beobachtete Stimulation der IL-10 Produktion durch Indometacin nicht über diesen Mechanismus erklärt werden. Deshalb vermuten wir einen weiteren PGE<sub>2</sub>-unabhängigen Pathway. Dies wird auch in der Literatur diskutiert [136].

Bei Kombination von Betamethason und Indometacin war der stimulierende Effekt von Indometacin auf die IL-10 Produktion so stark, dass dieser auch durch das suppressiv wirksame Betamethason kaum beeinflusst werden konnte. So wurde die IL-10 Produktion in 4 von 9 Nabelschnurblutproben durch die kombinierte Applikation von Betamethason und Indometacin statistisch signifikant erhöht ( $p = 0,050$ ). Dabei war die Stimulation in einer der 4 Proben unabhängig von der Indometacin-Konzentration. In 3 der 4 Proben konnten punktuelle Effekte erreicht werden. In 3 von 9 Proben führten Betamethason und Indometacin zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-10 Sekretion. In 2 von 9 Proben

#### 4. Diskussion

zeigte sich eine signifikante Hemmung der IL-10 Produktion ( $p = 0,050$ ), wobei dieser Effekt am ehesten auf die suppressive Wirkung von Betamethason zurückzuführen ist.

Als weiteres Ergebnis konnten wir zeigen, dass die Sekretion des TH1-polarisierenden Zytokins IL-12 nach einer Inkubationszeit von 4 h in 2 von 5 Nabelschnurblutproben durch Betamethason signifikant inhibiert wurde ( $p = 0,050$ ). In 3 von 5 Proben hatte Betamethason keinen signifikanten Einfluss auf die IL-12 Produktion. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die IL-12 Sekretion in allen Nabelschnurblutproben durch Betamethason statistisch signifikant gehemmt ( $p = 0,050$ ). Bessler et al untersuchten den Einfluss von Dexamethason auf die IL-12p40 Produktion durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen und Reifgeborenen und durch LPS-stimulierte PBMC von Erwachsenen nach einer Inkubationszeit von 24 h. Dabei konnten sie zeigen, dass die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-12p40 in allen drei Gruppen durch die Zugabe von Dexamethason dosisabhängig und signifikant gehemmt wurde [18].

Die alleinige Applikation von Indometacin führte in 4 von 5 Proben zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-12 Produktion nach 4 h. In einer Proben fand sich eine signifikante Stimulation der IL-12 Sekretion durch die Zugabe von  $0,3 \mu\text{g/ml}$  Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). Nach einer Inkubationszeit von 24 h kam es in 5 von 9 Proben zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der IL-12 Produktion durch Indometacin. In 3 von 9 Proben fand sich eine signifikante Erhöhung der IL-12 Sekretion durch Indometacin ( $p = 0,050$ ). In einer Probe konnte eine signifikante Hemmung der IL-12 Produktion durch die Zugabe von  $0,3 \mu\text{g/ml}$  Indometacin beobachtet werden ( $p = 0,050$ ). Die Stimulation der IL-12-Synthese durch Indometacin ist in der Literatur beschrieben. So konnten Iwasaki et al zeigen, dass die IL-12 Produktion durch PBMC von gesunden Erwachsenen, die mit LPS von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert worden waren, durch eine 48-stündige Inkubation mit Indometacin signifikant erhöht wurde. Die endogene PGE2-Synthese wurde signifikant gehemmt. Durch eine exogene Zufuhr von PGE2 wurde die IL-12 Produktion dosisabhängig supprimiert. Aufgrund dieser Beobachtungen postulierten Iwasaki et al, dass die Steigerung der IL-12 Produktion durch Indometacin über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese vermittelt wird [63].

Die Kombination von Betamethason und Indometacin führte nach einer Inkubationszeit von 4 h in 2 von 5 Proben zu einer signifikanten Hemmung der IL-12 Produktion ( $p \leq 0,050$ ). In den übrigen 3 Nabelschnurblutproben zeigte sich keine statistisch signifikante Beeinflussung der IL-12 Sekretion durch Betamethason und Indometacin. Nach 24 h kam es bei



#### 4. Diskussion

kombinierter Applikation der beiden Substanzen in allen Nabelschnurblutproben zu einer signifikanten Inhibition der IL-12 Produktion ( $p = 0,050$ ), wobei dieser Effekt in erster Linie auf das suppressiv wirksame Betamethason zurückzuführen ist. Der stimulierende Effekt von Indometacin wurde somit in Kombination mit Betamethason vollständig unterdrückt.

Ein weiteres Ergebnis unserer Untersuchungen war, dass die  $\text{IFN}\gamma$  Sekretion in 8 von 10 Nabelschnurblutproben durch die Zugabe Betamethason nicht signifikant beeinflusst wurde. In 2 von 10 Proben fand sich eine statistisch signifikante Inhibition der  $\text{IFN}\gamma$  Produktion durch Betamethason ( $p \leq 0,050$ ). Auch Talayev et al konnten eine signifikante Inhibition der  $\text{IFN}\gamma$  Produktion durch umbilikale mononukleäre Zellen, die mit Anti-CD3 und IL-7 stimuliert worden waren, durch Dexamethason nachweisen [135].

Die alleinige Applikation von Indometacin erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. In 7 von 10 Nabelschnurblutproben hatte Indometacin keinen signifikanten Einfluss auf die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion. In 2 Proben zeigte sich eine signifikante Hemmung der  $\text{IFN}\gamma$  Sekretion durch Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). In einer der 10 Proben wurde in Anwesenheit von  $0,3 \mu\text{g/ml}$  Indometacin signifikant mehr  $\text{IFN}\gamma$  produziert als ohne Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). Die Stimulation der  $\text{IFN}\gamma$  Produktion durch Indometacin ist in der Literatur beschrieben. So konnte Tsuboi et al nachweisen, dass Indometacin die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion von unstimulierten PBMC auf Ebene der mRNA-Expression dosisabhängig hochreguliert [136]. Die Wirkung von Indometacin auf die  $\text{IFN}\gamma$ -Synthese durch stimulierte PBMC wurde von Tsuboi et al jedoch nicht untersucht, weshalb ihre Beobachtungen mit unseren Ergebnissen nur bedingt vergleichbar sind. Die Tatsache, dass Indometacin die Produktion des TH1-polarisierenden Zytokins IL-12 erhöht, welches bekanntlich die  $\text{IFN}\gamma$ -Synthese induziert, spricht ebenfalls für eine sekundäre Hochregulation der  $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel infolge einer Inkubation mit Indometacin. Darüberhinaus konnte Hilkens et al nachweisen, dass PGE2 einen hemmenden Effekt auf die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion durch LPS-stimulierte T-Zellen ausübt [56]. Alle diese Mechanismen erklären nicht die von uns gezeigte Inhibition der  $\text{IFN}\gamma$  Produktion durch Indometacin, weshalb wir einen weiteren, möglicherweise PGE2-unabhängigen Pathway vermuten.

Die Kombination von Betamethason und Indometacin führte in 6 von 10 Nabelschnurblutproben zu einer signifikanten Hemmung der  $\text{IFN}\gamma$  Sekretion ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser Effekt entsprechend unserer Ergebnisse sowohl auf Betamethason als auch auf Indometacin zurückzuführen ist. In 3 von 10 Proben zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion durch die beiden Substanzen. In einer der Proben, in der bereits bei alleiniger Applikation von Indometacin erhöhte  $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel auffielen, kam es auch bei

#### 4. Diskussion

Kombination von Betamethason und Indometacin zu einer signifikanten Steigerung der IFN $\gamma$  Produktion, unabhängig von der Indometacin-Konzentration ( $p \leq 0,050$ ).

Bei der Untersuchung des proinflammatorischen Zytokins TNF konnten wir zeigen, dass die TNF Sekretion nach einer Inkubationszeit von 4 h in 7 von 10 Nabelschnurblutproben durch Betamethason nicht signifikant beeinflusst wurde. In den übrigen 3 Proben fand sich eine statistisch signifikante Hemmung der TNF Produktion durch Betamethason ( $p = 0,050$ ). Nach 24-stündiger Inkubation waren die TNF-Spiegel in 7 von 10 Nabelschnurblutproben unter dem Einfluss von Betamethason statistisch signifikant niedriger als ohne Betamethason ( $p \leq 0,050$ ). In 3 Proben hatte Betamethason keinen signifikanten Einfluss auf die TNF Produktion. Auch Bessler et al untersuchten den Effekt von Glukokortikoiden auf die TNF Produktion und konnten zeigen, dass Dexamethason die TNF Sekretion durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen und Reifgeborenen und durch LPS-stimulierte PBMC von Erwachsenen dosisabhängig und signifikant hemmt [19].

Die alleinige Applikation von Indometacin führte nach einer Inkubationszeit von 4 h zu unterschiedlichen Ergebnissen. In 6 von 10 Proben hatte Indometacin keinen signifikanten Einfluss auf die TNF Sekretion. In 3 von 10 Proben kam es zu einer signifikanten Stimulation der TNF Produktion durch Indometacin ( $p = 0,050$ ). In einer Probe wurde in Anwesenheit von 3,0  $\mu\text{g/ml}$  Indometacin signifikant weniger TNF produziert als ohne Indometacin ( $p = 0,050$ ). Der stimulatorische Effekt von Indometacin, der nach einer Inkubationszeit von 4 h beobachtet wurde, bestätigte sich nach 24 h. So kam es in 5 von 10 Proben zu einer signifikanten Erhöhung der TNF Produktion durch Indometacin, unabhängig von den Indometacin-Konzentrationen ( $p \leq 0,050$ ). In den übrigen 5 Proben wurde die TNF Sekretion durch Indometacin nicht signifikant beeinflusst. Auch Sirota et al konnten eine signifikante Erhöhung der TNF Produktion durch mononukleäre Zellen infolge einer Inkubation mit Indometacin nachweisen [127]. Dabei ergab sich, dass Indometacin sowohl die spontane als auch die LPS-induzierte Sekretion von TNF durch PBMC von gesunden Erwachsenen signifikant stimulierte. Außerdem konnten sie zeigen, dass Indometacin die spontane TNF-Produktion durch CBMC Frühgeborener signifikant steigerte, während die LPS-induzierte TNF Produktion nicht signifikant beeinflusst wurde. Als eine mögliche Erklärung für die beobachteten Sensitivitätsunterschiede von PBMC und CBMC gegenüber Indometacin wurden Variationen in den Zell-Subpopulationen diskutiert [127]. Eine Reihe von Studien bestätigten eine stimulierende Wirkung von Indometacin auf die TNF Sekretion

#### 4. Diskussion

[126; 136]. Es wird angenommen, dass die Stimulation der TNF Produktion durch Indometacin über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese vermittelt wird [136].

Bei Kombination von Betamethason und Indometacin wurde der stimulierende Effekt von Indometacin durch das suppressiv wirksame Betamethason nach einer Inkubationszeit von 4 h nahezu vollständig unterdrückt. So wurde in Proben, die unter alleiniger Applikation von Indometacin signifikant erhöhte TNF-Spiegel aufwiesen, die TNF Produktion bei Kombination mit Betamethason auf die Höhe der Kontrollwerte (Z+LPS) reduziert. In 2 von 10 Proben kam es zu einer signifikanten Hemmung der TNF Produktion durch die kombinierte Applikation von Betamethason und Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). Lediglich in einer Probe blieben die TNF-Spiegel auch bei Kombination der beiden Substanzen signifikant erhöht ( $p = 0,050$ ). Nach 24 h konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Auch hier wurde in Proben, die unter alleiniger Applikation von Indometacin signifikant erhöhte TNF-Spiegel aufwiesen, die TNF Produktion bei Kombination von Betamethason und Indometacin auf die Höhe der Kontrollwerte (Z+LPS) zurückgeführt. In einer Probe wurde die durch Indometacin signifikant erhöhte TNF Sekretion durch die Kombination der beiden Substanzen signifikant reduziert ( $p = 0,050$ ). Insgesamt kam es in 4 von 10 Proben zu einer signifikanten Hemmung der TNF Produktion durch Betamethason und Indometacin ( $p \leq 0,050$ ). Lediglich in 2 Proben blieben die TNF-Spiegel auch bei Kombination der beiden Substanzen signifikant erhöht ( $p \leq 0,050$ ).

Die Sekretion des Chemokins MIP-1 $\alpha$  wurde in allen Nabelschnurblutproben durch Betamethason signifikant inhibiert ( $p = 0,050$ ). Die Sekretion des Chemokins MIP-1 $\beta$  wurde in 6 von 10 Nabelschnurblutproben durch Betamethason statistisch signifikant gehemmt ( $p = 0,050$ ). In 4 von 10 Proben zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der MIP-1 $\beta$  Produktion durch Betamethason.

Indometacin hatte in 3 von 5 Proben keinen signifikanten Einfluss auf die MIP-1 $\alpha$  Produktion. In den übrigen 2 Proben zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MIP-1 $\alpha$  Sekretion durch Indometacin. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für MIP-1 $\beta$  nachgewiesen werden. So hatte Indometacin in 5 von 10 Proben keinen signifikanten Einfluss auf die MIP-1 $\beta$  Produktion. In den übrigen 5 Nabelschnurblutproben fand sich eine signifikante Stimulation der MIP-1 $\beta$  Sekretion ( $p = 0,050$ ). Janabi et al untersuchten die Wirkung von Indometacin auf die Chemokin-Produktion von Mikroglia-Zellen und Astrozyten menschlicher Embryonen, die mit TNF und IL-1 $\beta$  stimuliert worden waren und konnten

#### 4. Diskussion

ebenfalls eine signifikante Stimulation der MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  Produktion durch Indometacin nachweisen [64].

Bei Kombination von Betamethason und Indometacin wurde der stimulatorische Effekt von Indometacin auf die MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  Sekretion nahezu vollständig unterdrückt. So wurde in Proben, die unter alleiniger Applikation von Indometacin signifikant erhöhte MIP-1 $\alpha$ - und MIP-1 $\beta$ -Spiegel aufwiesen, die Chemokin-Produktion bei Kombination von Betamethason und Indometacin entweder signifikant reduziert ( $p = 0,050$ ) oder auf die Höhe der Kontrollwerte (Z + LPS) zurückgeführt. Insgesamt kam es in 4 von 5 Proben bei MIP-1 $\alpha$  und in 5 von 10 Proben bei MIP-1 $\beta$  zu einer signifikanten Hemmung der Chemokin-Produktion durch Betamethason und Indometacin ( $p \leq 0,050$ ), wobei dieser Effekt auf das suppressiv wirksame Betamethason zurückzuführen ist. Lediglich in 2 Proben blieben die MIP-1 $\beta$ -Spiegel auch bei Kombination der beiden Substanzen signifikant erhöht ( $p = 0,050$ ).

Auffallend war, dass die Fähigkeit zur Zytokinproduktion durch die umbilikalen mononukleären Zellen nach Stimulation mit LPS von Probe zu Probe stark schwankte. So sezernierten beispielsweise mononukleäre Zellen einer Nabelschnurblutprobe  $5346,7 \pm 271,4$  pg/ml IL-6, während in einer anderen Probe mehr als die 5-fache Menge an IL-6, also  $27666,7 \pm 2909,2$  pg/ml produziert wurde. Auch das Ansprechen auf die eingesetzten Medikamente war zwischen den Proben zum Teil unterschiedlich. Aufgrund dieser teils erheblichen Schwankungen konnte bei der Beurteilung der durchschnittlichen Zytokinproduktion von allen Nabelschnurblutproben keine statistische Signifikanz erzielt werden. Optisch sind in den dargestellten Diagrammen dennoch deutliche Tendenzen erkennbar. Als mögliche Ursachen für die unterschiedliche interindividuelle Fähigkeit zur Zytokinproduktion und Reaktion auf die eingesetzten Medikamente, werden in der Literatur neben genetischen Variationen und einer altersabhängigen Reife des fetalen Immunsystems auch eine pränatale Exposition gegenüber natürlichen, mikrobiellen Umwelteinflüssen entsprechend der Hygiene-Hypothese diskutiert [6; 83; 84].

Die Bedeutung einer pränatalen Gabe von Glukokortikoiden wurde in einer Vielzahl von randomisierten Studien und Metaanalysen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine pränatale Glukokortikoidgabe nicht nur die fetale Lungenreife induziert und dadurch Mortalität und Risiko eines „respiratory distress syndrome“ (RDS) von Frühgeborenen senkt, sondern auch eine protektive Wirkung auf das unreife fetale Gehirn hat [36; 81; 111]. So konnten Foix-L'Hélias et al in der EPIPAGE-Studie nachweisen, dass eine pränatale Gabe

von Glukokortikoiden bei Frühgeborenen, die zwischen der 28. und 32. SSW geboren wurden, mit einer signifikant niedrigeren Mortalität und einer signifikant geringeren Schädigung der weißen Gehirns substanz – detektiert mittels kranialer Sonographie – assoziiert war [36]. Bei den Follow-up Untersuchungen nach fünf Jahren wiesen die Kinder, die eine pränatale Steroidprophylaxe erhalten hatten, seltener einer Zerebralparese und kognitive Beeinträchtigungen auf als solche Kinder, die keine Prophylaxe bekommen hatten, ohne dass dabei eine Signifikanz erreicht wurde. Auch bei den Frühgeborenen zwischen der 24. und 27. SSW konnte eine signifikant niedrigere Mortalität infolge einer pränatalen Glukokortikoidgabe beobachtet werden. Das Risiko für eine Schädigung der weißen Substanz war ebenfalls tendenziell niedriger als bei der Kontrollgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei den Follow-up Untersuchungen nach fünf Jahren konnte kein verbessertes Outcome bei den Kindern, die eine pränatale Steroidprophylaxe erhalten hatten, nachgewiesen werden [36]. Die protektive Wirkung der Glukokortikoide wird einerseits durch einen direkten Effekt auf das fetale Gehirn, andererseits durch verbesserte respiratorische Parameter und durch stabilere Blutdruckverhältnisse erreicht [111]. Dabei spielt die von uns gezeigte Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine eine wichtige Rolle [19; 111].

Der Einsatz von Indometacin als medikamentöser Wehenhemmer ist in der Literatur nach wie vor umstritten [49; 101; 107; 108; 109; 129]. Die im Zusammenhang mit Indometacin diskutierten neonatalen Komplikationen, wie peri- und intraventrikuläre Blutungen, periventrikuläre Leukomalazie und nekrotisierende Enterokolitis haben sich in jüngeren Studien nicht bestätigt [1; 132]. So konnten Suarez et al in einer Fall-Kontroll-Studie, in der Indometacin als Tokolytikum der ersten Wahl verwendet wurde, nach multivariabler Analyse zeigen, dass kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Indometacin-Tokolyse und dem Auftreten einer IVH besteht [132]. Mehrere Studien weisen sogar auf einen potenziell protektiven Effekt von Indometacin auf das Gehirn Frühgeborener hin [8; 93; 95; 139; 143; 144]. Ment et al konnten in einer prospektiven, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie eine signifikante Abnahme der Inzidenz und der Schwere von intraventrikulären Blutungen nach prophylaktischer postnataler Gabe von Indometacin bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von 600 bis 1250 g aufzeigen. Insbesondere das Auftreten der schweren Form (IVH Grad 4) konnte durch die Indometacin-Prophylaxe signifikant reduziert werden ( $p = 0,010$ ) [93]. Miller et al fanden ebenfalls einen neuroprotektiven Effekt einer postnatalen Indometacin-Exposition. In einer prospektiven

Kohortenstudie konnten sie nachweisen, dass bei Frühchen, die vor der 28. SSW geboren wurden, die Schädigung der weißen Substanz, detektiert mittels Magnetresonanztomographie, infolge einer postnatalen Indometacin-Applikation signifikant geringer ausgeprägt war, als bei Frühchen ohne Indometacin-Exposition [95]. Als mögliche Mechanismen dieses protektiven Effekts wurden eine Erhöhung des zerebralen Gefäßwiderstandes und eine Stabilisierung der zerebralen Hämodynamik durch Indometacin diskutiert [8; 11; 144]. Auch die von uns gezeigte Stimulation der IL-10 Sekretion durch Indometacin könnte möglicherweise eine Rolle spielen. Somit ist denkbar, dass nicht nur eine postnatale Gabe, sondern auch eine pränatale Indometacin-Applikation im Rahmen einer Tokolyse bei infektionsassoziierten Frühgeburtsbestrebungen einen ähnlich protektiven Effekt auf das fetale Gehirn haben könnte [139].

Die von uns gezeigte Stimulation der IL-10 Produktion durch Indometacin ist deshalb von so großer Bedeutung, da in Studien nachgewiesen werden konnte, dass sowohl Frühgeborene als auch Reifgeborenen eine mangelhafte IL-10 Sekretion aufweisen. So konnten Kotiranta-Ainamo et al zeigen, dass die unstimulierte und LPS-stimulierte IL-10 Produktion durch CBMC von Frühgeborenen und Reifgeborenen signifikant niedriger war als die IL-10 Sekretion durch PBMC von Erwachsenen [73]. Es wird diskutiert, dass dies ein möglicher Grund für die erhöhte Anfälligkeit von Früh- und Reifgeborenen gegenüber Infektionen sein könnte [73; 74; 104]. Darüberhinaus weisen Studien darauf hin, dass IL-10 möglicherweise einen protektiven Effekt auf das fetale Gehirn bei hypoxisch-ischämischen oder entzündlichen Zuständen hat [40; 70; 88; 118]. Dabei wird die neuroprotektive Wirkung von IL-10 unter anderem auf eine direkte Hemmung der Genexpression von TNF in LPS-stimulierten Monozyten zurückgeführt [70; 149]. Eine erhöhte zerebrale TNF-Konzentration wird heutzutage als wesentliche Ursache für die Entstehung fetaler und neonataler Hirnschäden diskutiert [13; 42; 82]. Knoblach et al beobachteten, dass eine systemische Applikation von IL-10 das neurologische Outcome von Ratten nach traumatischer Hirnschädigung und dadurch induzierter Entzündungsreaktion signifikant verbesserte. Außerdem konnte durch IL-10 die posttraumatische Expression von TNF im Kortex signifikant reduziert werden [70]. Molina-Holgado et al konnten nachweisen, dass IL-10 das Überleben von Oligodendrozyten infolge einer Stimulation von Zellkulturen mit LPS und IFN $\gamma$  signifikant erhöht [96]. Dabei wird als möglicher Mechanismus neben der suppressiven Wirkung von IL-10 auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auch eine Hemmung der Expression der NO-Synthase und der NO-vermittelten Zytotoxizität diskutiert

[96]. Fróen et al konnten durch ihre Untersuchungen die neuroprotektive Wirkung von IL-10 bestätigen [40]. Sie fanden, dass neugeborene Schweine, die mit LPS von *E.coli* infiziert, mit IL-10 behandelt und nach 2 h hypoxisch-ischämischen Bedingungen ausgesetzt wurden, sich besser erholten im Bezug auf die zerebrale Mikrozirkulation und die zerebrale metabolische Situation als eine Kontrollgruppe, die kein IL-10 erhalten hatte. Auf der Basis dieser Ergebnisse folgerten Fróen et al, dass bei Verdacht auf eine intrauterine Infektion eine sofortige pränatale Behandlung mit IL-10 eine protektive Wirkung auf das fetale Gehirn haben könnte [40]. Diese Studie birgt jedoch Limitationen, die vor allem darin bestehen, dass LPS und IL-10 gleichzeitig verabreicht wurden, was nicht den klinischen Gegebenheiten entspricht. Intrauterine Infektionen verlaufen in der Regel subklinisch und werden häufig erst bei Eintritt vorzeitiger Wehen erkannt. In diesen Fällen hat möglicherweise bereits eine Infektion des Feten und auch des fetalen Gehirns stattgefunden. Somit kommt die Frage auf, ob die Gabe von IL-10 auch bei bereits länger bestehenden Infektionen einen Benefit für das fetale Gehirn bringt. Aufgrund dieser Überlegungen wurde der Versuch von derselben Arbeitsgruppe, diesmal unter Lyng et al, wiederholt mit dem Unterschied, dass IL-10 erst 30 min nach der LPS-Infektion appliziert wurde [88]. Dabei zeigte sich, dass die TNF-Plasmaspiegel in der Gruppe, die sowohl LPS als auch IL-10 erhalten hatte, tendenziell niedriger war als in einer Kontrollgruppe, die nicht mit IL-10 behandelt worden war ( $p = 0,100$ ). Im Gegensatz zum vorherigen Versuch ließ sich der positive Effekt von IL-10 auf die zerebrale Mikrozirkulation und die zerebrale metabolische Situation nicht reproduzieren [88]. Als mögliche Begründung für die widersprüchlichen Ergebnisse aus den beiden Studien, wird genannt, dass IL-10 die Produktion der „early response cytokines“ TNF und IL-1 $\beta$  zu Beginn der Entzündungskaskade effektiver hemmen kann als im Verlauf, wenn bereits andere pathologische Entzündungsprozesse aktiviert worden sind [88]. Allerdings hat auch diese Studie Schwächen, die sich insbesondere auf den begrenzten Beobachtungszeitraum beziehen, der möglicherweise zu kurz war, um die volle Ausprägung der neuronalen Schädigung bzw. der möglichen Protektion durch IL-10 beurteilen zu können. Darüberhinaus stand zur Diskussion, ob nicht andere Endpunkte, wie zum Beispiel die Größe des infarzierten Hirnareals, aussagekräftiger gewesen wären [88]. Somit ist noch nicht vollständig geklärt, ob oder in wieweit IL-10 protektiv gegen infektionsassoziierte perinatale Hirnschädigungen wirkt. Die Mehrzahl der Studien sprechen sich für eine neuroprotektive Wirkung von IL-10 aus [40; 70; 88; 118].

#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Indometacin die IL-10 Sekretion durch LPS-induzierte CBMC stimuliert. Bei kombinierter Applikation von Betamethason und Indometacin blieb die IL-10 Produktion in 44 % der untersuchten Nabelschnurblutproben (4 von 9) signifikant erhöht, während die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine in nahezu allen Proben entweder gehemmt oder auf die Höhe der Kontrollwerte (Z+LPS) zurückgeführt wurden. Auf diese Weise und im Bezug auf die bereits diskutierten Wirkmechanismen von Betamethason und Indometacin könnte eine Kombination der beiden Präparate im Rahmen der Behandlung von infektionsassoziierten Frühgeburtsstendenzen unterhalb der 28. SSW einen protektiven Effekt auf das fetale Gehirn ausüben. Es sind jedoch dringend weitere Untersuchungen notwendig, um mehr über die immunmodulatorische Wirkung von Betamethason und Indometacin und eine potenzielle Neuroprotektion der beiden Substanzen zu erfahren.

Die vorliegende Studie birgt Limitationen, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

Bei der Umsetzung des *in vitro* Modells stellte sich das Problem, dass Nabelschnurblut von Frühgeborenen häufig infolge aufsteigender intrauteriner Infektionen kontaminiert ist, was eine Standardisierung der Versuchsbedingungen unmöglich macht. Außerdem kann aus der Nabelschnur von Frühgeborenen nur eine sehr geringe Menge Blut gewonnen werden, die zur Durchführung der Versuche nicht ausreicht. Aufgrund dieser Tatsachen wurde Nabelschnurblut von gesunden Reifgeborenen verwendet. Inwieweit die LPS-induzierte Zytokinsekretion von reifen Neugeborenen mit der von Frühgeborenen verglichen werden kann, ist nicht vollständig geklärt. Bessler et al konnten zeigen, dass die TNF und IL-12 Produktion durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen signifikant niedriger war, als von Reifgeborenen, während die IL-1 $\beta$  und IL-6 Sekretion bei beiden Gruppen annähernd gleich war. Die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch LPS-stimulierte CBMC von Frühgeborenen war ebenfalls tendenziell niedriger als von reifen Neugeborenen, ohne dass dabei eine statistische Signifikanz erreicht wurde [18; 19]. In unserer Arbeitsgruppe sind weitere Studien in Planung, die die gezeigten Zusammenhänge unter Verwendung von Nabelschnurblut von Frühgeborenen aufklären sollen.

Zudem war die Zahl der untersuchten Nabelschnurblüter mit  $n = 10$  relativ niedrig. Dazu kam, dass die Fähigkeit zur Zytokinproduktion durch die mononukleären Zellen von Probe zu Probe stark schwankte und auch das individuelle Ansprechen auf die eingesetzten Medikamente zum Teil unterschiedlich war. Daher bedürfen die Ergebnisse einer vorsichtigen Interpretation.



#### 4. Diskussion

Eine weitere Schwäche der vorliegenden Studie war, dass sie, als *in vitro* Modell, die vielfältigen Interaktionen und die Gesamtheit des menschlichen Körpers nur unzureichend widerspiegelt. Allerdings ist diese Limitation allen *in vitro* Modellen gemeinsam und muss bei Verwendung solcher Modelle in Kauf genommen werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die Frühgeburtlichkeit ist nach wie vor eines der Hauptprobleme in der Perinatalmedizin. Laut klinischer und epidemiologischer Studien spielen ascendierende intrauterine Infektionen eine zentrale Rolle bei der Genese von Frühgeburtsbestrebungen. Im Verlauf dieses Entzündungsprozesses kann es zur Ausbildung eines fetalen Infektionssyndroms kommen, dessen Vorliegen zu schwerwiegenden Komplikationen wie peri- und intraventrikulären Hirnblutungen und periventrikulärer Leukomalazie führen kann. Dabei wird eine direkte neurozytotoxische Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere von TNF, auf das fetale Gehirn vermutet. Seit über 30 Jahren wird der Einsatz von Indometacin als medikamentöser Wehenhemmer heftig diskutiert und untersucht. Frühere Befürchtungen einer erhöhten Komplikationsrate beim Neugeborenen infolge einer Indometacin-Tokolyse konnten durch neuere Studien nicht bestätigt werden. Mehrere Studien weisen sogar auf einen potenziell neuroprotektiven Effekt von Indometacin hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines *in vitro* Modells eine fetale Entzündungsreaktion nachgeahmt und der immunmodulatorische Effekt von Betamethason und Indometacin auf die Zytokinproduktion untersucht. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut von gesunden Reifgeborenen isoliert, unter definierten Bedingungen mit LPS von *E.coli* stimuliert und mit Betamethason bzw. Indometacin behandelt. Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Studie war, dass Indometacin die LPS-induzierte Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 signifikant stimuliert. In Kombination mit Betamethason blieben die IL-10 Spiegel in 44 % der untersuchten Nabelschnurblutproben signifikant erhöht. Allerdings führte Indometacin auch zu einer signifikanten Stimulation des proinflammatorischen Zytokins TNF. Dieser stimulatorische Effekt wurde durch Betamethason vollständig unterdrückt. Die Sekretion der übrigen proinflammatorischen Zytokine und Chemokine wurden durch eine kombinierte Applikation der beiden Präparate entweder signifikant gehemmt oder auf die Höhe der Kontrollwerte reduziert. Die Stimulation der IL-10 Produktion durch Indometacin ist deshalb von so großer Bedeutung, da in Studien nachgewiesen werden konnte, dass IL-10 nicht nur eine Schlüsselrolle in der Unterdrückung von Entzündungsreaktionen spielt, sondern möglicherweise auch eine neuroprotektive Wirkung hat. Auf diese Weise und im Bezug auf die diskutierten Wirkmechanismen von Betamethason und Indometacin könnte die Kombination beider Präparate im Rahmen der Behandlung von infektionsassoziierten Frühgeburtsbestrebungen unterhalb der 28. SSW einen protektiven Effekt auf das fetale Gehirn ausüben.

## **Immunomodulatory effect of betamethasone and indomethacin on lipopolysaccharide-induced fetal cytokine production**

Prematurity continues to be the major problem in perinatal medicine. It has been reported that almost half of all preterm births are caused by ascending intrauterine infections, particularly at early gestation. The ascending microorganisms may infect the fetus and induce a fetal inflammatory response syndrome, which is characterized by an activation of the fetal cytokine network. There is strong evidence that pro-inflammatory cytokines released during the course of infection play a central role in the pathophysiology of white matter lesions and subsequent development of cerebral palsy. In particular an increase of fetal TNF expression is associated with perinatal brain damage. Indomethacin has been used successfully as a tocolytic agent for more than 30 years. Neonatal complications which were put in context with the use of indomethacin have not been confirmed in recent studies. Several studies indicate that indomethacin may have protective effects on the immature brain of preterms.

The aim of this study was to determine the immunomodulatory effect of betamethasone and indomethacin on cytokine production by cord blood mononuclear cells stimulated with LPS of *E.coli*. Therefore, cord blood mononuclear cells of ten healthy full-term deliveries were isolated by density gradient centrifugation and incubated with LPS of *E.coli*, indomethacin and betamethasone.

The most important finding of our study was that indomethacin significantly stimulated LPS-induced secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by CBMC. When indomethacin and betamethasone were combined, the IL-10 level remained significantly higher than the control value in 44 % of the cord blood samples. However, indomethacin also significantly increased the LPS-induced secretion of the pro-inflammatory cytokine TNF by CMBC. This stimulatory effect on TNF production was suppressed when betamethasone was added. The production of all other pro-inflammatory cytokines and chemokines tested in our study were either significantly inhibited by the combination of indomethacin and betamethasone or as high as the level of the control values. The stimulation of IL-10 production by CMBC due to indomethacin is of major importance as several studies suggest a neuroprotective role of IL-10. In context with our findings and the reported benefits of betamethasone and indomethacin we hypothesize that a combined treatment of infection-associated preterm labour before 28 weeks of gestation with indomethacin for tocolytic purpose and betamethason may have protective effects on fetal brain.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Birgit Seelbach-Göbel für die Vergabe des interessanten Themas dieser Dissertation sowie für die stets gute und freundliche Betreuung und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn PD Dr. rer. nat. Ludwig Deml danke ich für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Tipps und Anregungen beim Versuchsaufbau, sowie beim Verfassen der Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Fleck für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Frau Dr. med. Edith Reuschel danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die Zustellung von zahlreichen Literaturen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Martina und Maren für die Durchführung der Zytokinbestimmungen mittels Luminex-Technologie und für die ständige Hilfsbereitschaft.

Außerdem danke ich Monika für die Durchführung der Zytokinbestimmung mittels ELISA.

Besonders möchte ich mich bei Ellen für die Einführung in die Labortätigkeit und für die stetige Hilfe und freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Daniela Männel danke ich für die Bereitstellung von Gerätschaften und Räumlichkeiten zur Durchführung meiner Arbeit im Institut für Immunologie.

Bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Immunologie bedanke ich mich für die angenehme Zeit im Labor.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner lieben Familie für die stetige Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums bedanken. Ich danke meinem lieben Freund Peter, dass er immer für mich da ist.

## **Anhang A: Abkürzungsverzeichnis**

BM	Betamethason
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CBMC	Cord Blood Mononuclear Cells
CD	Cluster of Differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
DAK	Deutsche Angestellten-Krankenkasse
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIRS	Fetal Inflammatory Response Syndrom
g	Erdschwerebeschleunigung
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IM	Indometacin
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
LPB	LPS-Bindeprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	Leucin-Rich Repeats
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minuten
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaOH	Natronlauge
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis

*Anhang A: Abkürzungsverzeichnis*

NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
NSBP	Nabelschnurblutprobe
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PG	Prostaglandin
PRR	Pattern Recognition Rezeptor
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RDS	Respiratory Distress Syndrome
RPE	R-Phycoerythrin
rpm	Rounds per Minute
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
SARM	Sterile α and HEAT-Armadillo Motifs-containing Protein
sec	Sekunden
spp	Spezies
SSW	Schwangerschaftswoche
Stabw	Standardabweichung
TGF	Transforming Growth Factor
TIR	Toll-/IL-1-Rezeptor
TIRAP	TIR Domain-Containing Adapter Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	TRIF-Related Adapter Molecule
TRIF	TIR Domain-Containing Adapter Including IFN-β
USA	United States of America
Z	Zellen
z.B.	Zum Beispiel

## Literaturverzeichnis

- 1) ABBASI, S; GERDES, JS; SEHDEV, HM; SAMIMI, SS; LUDMIR, J: *Neonatal outcome after exposure to indomethacin in utero: a retrospective case cohort study.* American Journal of Obstetrics and Gynecology 2003; 189: 782-785.
- 2) ADERKA, D; LE, J; VILCEK, J: *IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells and mice.* Journal of Immunology 1989; 143: 3517-3523.
- 3) AKIRA, S: *Toll-like receptor signaling.* The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. In: The Journal of Biological Chemistry 2003; 40: 38105-38108.
- 4) AMIN, SB; KAMALUDDEEN, M; SANGEM, M: *Neurodevelopmental outcome of premature infants after exposure to antenatal indomethacin.* American Journal of Obstetrics and Gynecology 2008; 199: 1:41.e1-41.e8.
- 5) AMIN, SB; SINKIN, RA; GLANTZ, JC: *Metaanalysis of the effect of antenatal indomethacin on neonatal outcomes.* American Journal of Obstetrics and Gynecology 2007; 197: 486.e1-486.e10.
- 6) BACH, JF: *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.* New England Journal of Medicine 2002; 347: 911-920.
- 7) BACK, SA; VOLPE, JJ: *Cellular and molecular pathogenesis of periventricular white matter damage.* Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 1997; 3: 96-107.
- 8) BADA, HS; GREEN, RS; POURCYROUS, M; LEFFLER, CW; KORONES, SB; MAGILL, HL; ARHEART, K; FITCH, CW; ANDERSON, GD; SOMES, G; TULLIS, K; CAMPBELL, J: *Indomethacin reduces the risks of severe intraventricular hemorrhage.* Journal of Pediatrics 1989; 115: 631-637.
- 9) BALLARD, PL; LIGGINS, GC: *Glucocorticoid activity in cord serum: comparison of hydrocortisone and betamethasone regimens.* The Journal of Pediatrics 1982; 101: 468-470.
- 10) BALTZER, J; FRIESE, K; GRAF, M; WOLFF, F: *Praxis der Gynäkologie und Geburtshilfe.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2004. ISBN: 3-13-129151-6.
- 11) BANDSTRA, ES; MONTALVO, BM; GOLDBERG, RN; PACHECO, I; FERRER, PL; FLYNN, J: *Prophylactic indomethacin for prevention of intraventricular hemorrhage in premature infants.* Pediatrics 1988; 82: 533-542.

- 12) BAQ (Bayerische Arbeitsgemeinschaft für Qualitätssicherung in der stationären Versorgung): *Geburtshilfe: Jahresauswertung 2008, Modul 16/1, Bayern gesamt.*
- 13) BARONE, FC; ARVIN, B; WHITE, RF; MILLER, A; WEBB, CL; WILLETTE, RN; LYSKO, PG; FEUERSTEIN, GZ: *Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury.* Stroke 1997; 28: 1233-1244.
- 14) BASHIRI, A; BURSTEIN, E; MAZOR, M: *Cerebral palsy and fetal inflammatory response syndrome: a review.* Journal of Perinatal Medicine 2006; 34: 5-12.
- 15) BEINDER, E; DUDENHAUSEN, J; FEIGE, A; HACKELÖER, BJ; HECHER, K; RATH, W; SCHLEUSSNER, E; SCHNEIDER, H; SPÄTLING, L; VETTER, K: *Medikamentöse Wehenhemmung bei drohender Frühgeburt.* URL: <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/015-025.htm> (04.August 2008).
- 16) BERGER, R; GARNIER, Y: *Pathophysiology of perinatal brain damage.* Brain Research Reviews 1999; 30: 107-134.
- 17) BERGER, R; GARNIER, Y; JENSEN, A: *Perinatale Neuroprotektion: Ist eine Senkung hypoxisch-ischämischer Hirnschäden möglich?* Deutsches Ärzteblatt 2001; 98: A-1124 / B-958 / C-898.
- 18) BESSLER, H; KAGAZANOV, S; PUNSKY, I; SIROTA, L: *Effect of dexamethasone on IL-10 and IL-12p40 production in newborns and adults.* Biology of the Neonate 2001; 80: 262-266.
- 19) BESSLER, H; MENDEL, C; STRAUSSBERG, R; GURARY, N; ALONI, D; SIROTA, L: *Effects of dexamethasone on IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  production by mononuclear cells of newborns and adults.* Biology of the Neonate 1999; 75: 225-233.
- 20) BESSLER, H; ZIYADA, S; BERGMANN, M; PUNSKY I; SIROTA, L: *Indomethacin and ibuprofen effect on IL-1ra production by mononuclear cells of preterm newborns and adults.* Biology of the Neonate 2002; 82: 73-77.
- 21) BLACKWELL, TS; CHRISTMAN, JW: *Sepsis and cytokines: current status.* British Journal of Anaesthesia 1996; 77: 110-117.
- 22) BOUR, AMJJ; WESTENDORP, RGJ; LATERVEER, JC; BOLLEN, ELEM; REMARQUE, EJ: *Interaction of indomethacin with cytokine production in whole blood. Potential mechanism for a brain-protective effect.* Experimental Gerontology 2000; 35: 1017-1024.
- 23) BRIESE, V: *Amnioninfektionssyndrom.* Gynäkologe 1999; 32: 507-511.



- 24) BRUNS, T: *Bakteriurie bei Schwangeren sicherheitshalber immer behandeln*. Ärztliche Praxis, Gynäkologie, Medizin – Fortbildung – Politik – Management 2008; 4: 16-17.
- 25) COOLS, N; PONSARTS, P; VAN TENDELOO, VFI; BERNEMAN, ZN: *Regulatory T cells and human disease*. Clinical and Developmental Immunology 2007; 2007: 89195-89206.
- 26) CROWLEY, P: *Prophylactic corticosteroids for preterm birth*. Cochrane Database of Systematic Reviews 2000; 2: CD000065.
- 27) CROWLEY, P: *Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1995; 173: 322-335.
- 28) DAMMANN, O; LEVITON, A: *Maternal intrauterine infection, cytokines and brain damage in the preterm newborn: a review*. Pediatric Research 1997; 42: 1-8.
- 29) DE FRANCO, AL; LOCKSLEY, RM; ROBERTSON, M: *Immunity: The immune response in infectious and inflammatory disease*. New Science Press Ltd. 2007. ISBN 978-0-9539181-0-2.
- 30) DINARELLO, CA: *Proinflammatory cytokines*. Chest 2000; 118: 503-508.
- 31) DIRSCHLMAYER, W: *Zur Problematik der Frühgeburt*. Facharzt 2009; 3: 12-14.
- 32) DOYLE, NM; GARDNER, MO; WELLS, L; QUALLS, C; PAPILE, L-A: *Outcome of very low birth weight infants exposed to antenatal indomethacin for tocolysis*. Journal of Perinatology 2005; 25: 336-340.
- 33) ELOVITZ, MA; MRINALINI, C; SAMMEL, MD: *Elucidating the early signal transduction pathways leading to fetal brain injury in preterm birth*. Pediatric Research 2006; 59: 50-55.
- 34) FALKERT, A; BÜCHNER, M; HUBER, G; SEELBACH-GÖBEL, B: *Veränderungen im Blutflussmuster des fetalen Ductus arteriosus Botalli unter Tokolyse mit Indomethacin: Erfahrungsbericht von 12 Schwangerschaften < 30 kpl*. SSW. URL: <http://www.thieme-connect.com> (05.August 2008).
- 35) FAVRAIS, G; SCHWENDIMANN, L; GRESSENS, P; LELIEVRE, V: *Cyclooxygenase-2 mediates the sensitizing effects of systemic IL-1 beta on excitotoxic brain lesions in newborn mice*. Neurobiology of Disease 2007; 25: 496-505.

- 36) FOIX-L'HELIAS, L; MARRET, S; ANCEL, P-Y; MARCHAND, L; ARNAUD, C; FRESSON, J; PICAUD, J-C; ROZE, J-C; THERET, B; BURGNET, A; LARROQUE, B; KAMINSKI, M and the EPIPAGE Study Group: *Impact of the use of antenatal corticosteroids on mortality, cerebral lesions and 5-year neurodevelopmental outcomes of very preterm infants: the EPIPAGE cohort study*. BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology 2008; 115: 275-282.
- 37) FOWLIE, PW; DAVIS, PG: *Prophylactic indomethacin for preterm infants: a systematic review and meta-analysis*. Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition 2003; 88: 464-466.
- 38) FRIEDMAN, S; FLIDEL-RIMON, O; STEINBERG, M; SHINWELL, ES: *Indomethacin tocolysis and white matter injury in preterm infants*. The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2005; 18: 87-91.
- 39) FRIESE, K; PLATH, C; BRIESE, V: *Frühgeburt und Frühgeborenes: Eine interdisziplinäre Aufgabe*. Berlin: Springer-Verlag 2000. ISBN 3-540-66311-8.
- 40) FRØEN, JF; MUNKEBY, BH; STRAY-PEDERSEN, B; SAUGSTAD, OD: *Interleukin-10 reverses acute detrimental effects of endotoxin-induced inflammation on perinatal cerebral hypoxia-ischemia*. Brain Research 2002; 942: 87-94.
- 41) GARNIER, Y; BERGER, R: *Antenatale Infektionen – Bedeutung für Frühgeburtlichkeit und perinatale Morbidität*. Gynäkologe 2004; 9: 1-10.
- 42) GARNIER, Y; GANTERT, M; BERGER, R: *Perinatale Hirnschädigung: Bedeutung der intrauterinen Infektion*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2004; 64: 464-472.
- 43) GEISER, T: *Inflammatorische Zytokine und Chemokine bei akuter, entzündlicher Lungenerkrankung*. Schweizerische Medizinische Wochenschrift 1999; 129: 540-546.
- 44) GOERKE, K; LACK, N: *Qualitätssicherung in der Geburtshilfe-Perinatalerhebung: Aktueller Stand und weitere Schritte*. Gynäkologe 2000; 33: 220-224.
- 45) GOLDENBERG, RL; HAUTH, JC, ANDREWS, WW: *Intrauterine infection and preterm delivery*. The New England Journal of Medicine 2000; 20: 1500-1507.
- 46) GOMEZ, R; GHEZZI, F; MUNOZ, H; TOLOSA, JE; ROJAS, I: *Premature labor and intra-amniotic infection: clinical aspects and role of the cytokines in diagnosis and pathophysiology*. Clinics in Perinatology 1995; 22: 281-341.
- 47) GORTNER, L; MEYER, S: *Die bronchopulmonale Dysplasie Frühgeborener: Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie*. Intensivmedizin 2007; 44: 475-485.

- 48) GOTSCH, F; ROMERO, R; KUSANOVIC, JP; MAZAKI-TOVI, S; PINELES, BL; EREZ, O; ESPINOZA, J; HASSAN, SS: *The fetal inflammatory response syndrome*. Clinical Obstetrics and Gynecology 2007; 3: 652-683.
- 49) HAAS, DM; IMPERIALE, TF; KIRKPATRICK, PR; KLEIN, RW; ZOLLINGER, TW; GOLICHOWSKI, AM: *Tocolytic therapy: a meta-analysis and decision analysis*. Obstetrics and Gynecology 2009; 113: 585-594.
- 50) HAGBERG, H; MALLARD, C; JACOBSSON, B: *Role of cytokines in preterm labour and brain injury*. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 2005; 112: 16-18.
- 51) HAGBERG, H; WENNERHOLM, U-B; SÄVMAN, K: *Sequelae of chorio-amnionitis*. Current Opinion in Infectious Diseases 2002; 15: 301-306.
- 52) HAHNE, D: *Frühgeburt durch pH-Selbstkontrolle vermeiden*. Deutsches Ärzteblatt 2001; 98: A-739 / B-604 / C-564.
- 53) HANNA, N; BONIFACIO, L; WEINBERGER, B; REDDY, P; MURPHY, S; ROMERO, R; SHARMA, S: *Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta*. American Journal of Reproductive Immunology 2006; 55: 19-27.
- 54) HARIZI, H; JUZAN, M; PITARD, V; MOREAU, J-F; GUALDE, N: *Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E2 enhances the production of endogenous IL-10, which downregulates dendritic cell functions*. The Journal of Immunology 2002; 168: 2255-2263.
- 55) HERVEG, J-P: *Toll-like receptor 4 or TLR4*. URL: <http://www.icampus.ucl.ac.be/courses/SBIM2520/document/genemol/pictures/TRL-04.html> (12.August 2008).
- 56) HILKENS, CMU; SNIJDERS, A; VERMEULEN, H; VAN DER MEIDE, PH; WIERENGA, EA; KAPSENBERG, ML: *Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN- $\gamma$  level of activated human CD4<sup>+</sup> T cells*. The Journal of Immunology 1996; 156: 1722-1727.
- 57) HODGE, S; HODGE, G; FLOWER, R; HAN, P: *Cord blood leucocyte expression of functionally significant molecules involved in the regulation of cellular immunity*. Scandinavian Journal of Immunology 2001; 53: 72-78.
- 58) HOYME, UB; MÖLLER, U; SALING, E: *Ergebnisse und mögliche Konsequenzen der Thüringer Frühgeburtenvermeidungsaktion 2000*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2002; 62: 257-263.

- 59) IBELGAUFT, H: *Cytokines & cells online pathfinder encyclopedia: IL-6*. Version 19.4 (April 2007). URL: <http://www.copewithcytokines.org/> (12. August 2008).
- 60) IBELGAUFT, H: *Cytokines & cells online pathfinder encyclopedia: TNF $\alpha$* . Version 19.4 (April 2007). URL: <http://www.copewithcytokines.org/> (12. August 2008).
- 61) *Integrierter Versorgungsvertrag soll Frühgeburtenrate senken*. Ärzteblatt 02. Februar 2007.
- 62) IROMLOO, M; GHAZALEH, N; ABOLHASANI, E: *Betamethasone or dexamethasone as the preferred antenatal corticosteroid to decrease neonatal morbidities: a randomized controlled clinical trial*. Anatolian Journal of Obstetrics and Gynecology 2011; 4: 1-4.
- 63) IWASAKI, K; NOGUCHI, K; ENDO, H; KONDO, H; ISHIKAWA, I: *Prostaglandin E2 downregulates interleukin-12 production through EP4 receptors in human monocytes stimulated with lipopolysaccharide from actinobacillus actinomycetemcomitans and interferon- $\gamma$* . Oral Microbiology and Immunology 2003; 18: 150-155.
- 64) JANABI, N; HAU, I; TARDIEU, M: *Negative feedback between prostaglandin and  $\alpha$ - and  $\beta$ -chemokine synthesis in human microglial cells and astrocytes*. The Journal of Immunology 1999; 162: 1701-1706.
- 65) JENSEN, A; GARNIER, Y; MIDDELANIS, J; BERGER, R: *Perinatal brain damage – from pathophysiology to prevention*. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 2003; 110: 70-79.
- 66) KENYON, SL; TAYLOR, DJ; TARNOW-MORDI, W: *Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomised trial*. The Lancet 2001; 357: 989-994.
- 67) KISS, H; PETRICEVIC, L; HUSSLEIN, P; BREITENECKER, G: *Infektions-screening und Frühgeburt: Die Bedeutung einer pathologischen Vaginalflora für den Schwangerschaftsverlauf*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2002; 62: 762-767.
- 68) KLIMEK, L; BACHERT, C: *Aktuelle Aspekte der nasalen Glukokortikosteroidtherapie*. HNO 2000; 48: 544-555.
- 69) KLOUCHE, M: *Zytokine: Ein zweischneidiges Schwert in der Pathogenese und der Therapie von Krebserkrankungen*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2003; 46: 203-210.

- 70) KNOBLACH, SM; FADEN, AI: *Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury*. Experimental Neurology 1998; 153: 143-151.
- 71) KOMATSU, H; YAJU, H; CHIBA, K; OKUMOTO, T: *Inhibition by cyclo-oxygenase inhibitors of interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells*. International Journal of Immunopharmacology 1991; 13: 1137-1146.
- 72) KOSCAVA, H; DUBNICKOVA, M; BUKOVSKY, M; MLYNARCIK, D: *Effects of LPS, lipid A and polysaccharide from adapted strains of Escherichia coli on human leucocyte activity*. Pharmazie 2008, 63: 147-150.
- 73) KOTIRANTA-AINAMO, A; RAUTONEN, J; RAUTONEN, N: *Imbalanced cytokine secretion in newborns*. Biology of the Neonate 2004; 85: 55-60.
- 74) KOTIRANTA-AINAMO, A; RAUTONEN, J; RAUTONEN, N: *Interleukin-10 production by cord blood mononuclear cells*. Pediatric Research 1997; 41: 110-113.
- 75) KRAMER, BW; GARNIER, Y: *Chorioamnionitis – Eine inflammatorische Multiorganerkrankung des Feten?* Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2007; 67: 1-9.
- 76) KUNKEL, SL; CHENSUE, SW; PHAN, SH: *Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production*. The Journal of Immunology 1986; 136: 186-192.
- 77) KÜNZEL, W; WULF, K-H; BAUMANN, P; BERG, D; BÖRGENS, S; DUDENHAUSEN, JW; FEIGE, A; GEMBRUCH, U; HERMSTEINER, M; HOHMANN, M; HUCH, A; LUKESCH, H; MARTIUS, J; SCHNEIDER, H, SCHNEIDER, KTM; SCHÜCK, R; SCHULTE, FJ; SPÄTLING, L; STOCKHAUSEN, HB; STUTH, R; ULSENHEIMER, K: *Frühgeburt*. München: Urban & Schwarzenberg 1997. ISBN 3-541-30721-8.
- 78) KUTZNER, M: *Was ist ein Frühchen?* Gen Re LifeHealth 2005; 1: 1-2.
- 79) LARROQUE, B; ANCEL, P-Y; MARRET, S; MARCHAND, L; ANDRE, M; ARNAUD, C; PIERRAT, V; ROZE, J-C; MESSER, J; THIRIEZ, G; BURGUET, A; PICAUD, J-C; BREART, G; KAMINSKI, M: *Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE Study): a longitudinal cohort study*. The Lancet 2008; 371: 813-820.
- 80) LEINMÜLLER, R: *Frühgeburt: Eine Hypothek für das Leben*. Deutsches Ärzteblatt 2001; 98: A-740 / B-605 / C-565.

- 81) LEROUX, P; HENNEBERT, C; CATTEAU, J; LEGROS, H; HENNEBERT, O; LAUDENBACH, V; MARRET, S: *Neuroprotective effects vary across nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a mouse model of developing excitotoxic brain injury.* Neuroscience 2010; 167: 716-723.
- 82) LEVITON, A: *Preterm birth and cerebral palsy: is tumor necrosis factor the missing link?* Developmental Medicine and Child Neurology 1993; 35: 553-558.
- 83) LEVY, O: *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates.* Nature Reviews Immunology 2007; 7: 379-390.
- 84) LIU, AH; LEUNG, DY: *Renaissance of the hygiene hypothesis.* Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 117: 1063-1066.
- 85) LOE, SM; SANCHEZ-RAMOS, L; KAUNITZ, AM: *Assessing the neonatal safety of indomethacin tocolysis.* Obstetrics and Gynecology 2005; 106: 173-179.
- 86) LU, Y-C; YEH, W-C; OHASHI, PS: *LPS/TLR4 signal transduction pathway.* Cytokine: The Official Journal of the International Cytokine Society 2008; 42: 145-151.
- 87) LUDWIG, AK; NEUMANN, G; KRAPP, M: *Erkrankungen und Infektionen in der Schwangerschaft.* Frauenheilkunde up2date 2008; 1: 37-66.
- 88) LYNG, K; MUNKEBY BH; SAUGSTAD, OD; STRAY-PEDERSEN, B; FRØEN, JF: *Effect of interleukin-10 on newborn piglet brain following hypoxia-ischemia and endotoxin-induced inflammation.* Biology of the Neonate 2005; 87: 207-216.
- 89) MACONES, GA; MARDER, SJ; CLOTHIER, B; STAMILIO, DM: *The controversy surrounding indomethacin for tocolysis.* American Journal of Obstetrics and Gynecology 2001; 184: 264-272.
- 90) MARTIUS, G; RATH, W; MARTIUS, J: *Praxis der Frauenheilkunde: Geburtshilfe und Perinatologie.* Band 2. Stuttgart: Thieme-Verlag 1998. ISBN 3-13-109681-0.
- 91) MATTISON, DR; DAMUS, K; FIORE, E; PETRINI, J; ALTER, C: *Preterm delivery: a public health perspective.* Paediatric and Perinatal Epidemiology 2001; 15: 7-16.
- 92) MENT, LR; DUNCAN, CC; EHRENKRANZ, RA; KLEINMAN, CS; TAYLOR, KJW; SCOTT, DT; GETTNER, P; SHERWONIT, E; WILLIAMS, J: *Randomized low-dose indomethacin trial for prevention of intraventricular hemorrhage in very low birth weight neonates.* Journal of Pediatrics 1988; 112: 948-955.

- 93) MENT, LR; OH, W; EHRENKRANZ, RA; PHILIP, AG; VOHR, B; ALLAN, W; DUNCAN, CC; SCOTT, DT; TAYLOR, KJ; KATZ, KH: *Low-dose indomethacin and prevention of intraventricular hemorrhage: a multicenter randomized trial*. Pediatrics 1994; 93: 543-550.
- 94) MENT, LR; STEWART, WB; DUNCAN, CC; SCOTT, DT; LAMBRECHT, R: *Beagle puppy model of intraventricular hemorrhage. Effect of indomethacin on cerebral blood flow*. Journal of Neurosurgery 1983; 58: 857-862.
- 95) MILLER, SP; MAYER, EE; CLYMAN, RI; GLIDDEN, DV; HAMRICK, SEG.; BARKOVICH, AJ: *Prolonged indomethacin exposure is associated with decreased white matter injury detected with magnetic resonance imaging in premature newborns at 24 to 28 weeks' gestation in birth*. Pediatrics 2006; 117: 1626-1631.
- 96) MOLINA-HOLGADO, E; VELA, JM; AREVALO-MARTIN, A; GUAZA, C: *LPS/IFN- $\gamma$  cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10*. European Journal of Neuroscience 2001; 13: 493-502.
- 97) MONGA, M; BLANCO, DJ: *Intrauterine infection and preterm labor*. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology 1995; 3: 37-44.
- 98) MURPHY, DJ; HOPE, RL; JOHNSON, A: *Neonatal risk factors for cerebral palsy in very preterm babies: case-control study*. British Medical Journal 1997; 314: 404-408.
- 99) MUZIO, M; POLENTARUTTI, N; BOSISIO, D; MANOJ KUMAR, PP; MANTOVANI, A: *Toll-like receptor family and signalling pathway*. Biochemical Society Transactions 2000; 28: 563-566.
- 100) NEWNHAM, JP; KALLAPUR, SG; KRAMER, BW; MOSS, TJM; NITSOS, I; IKEGAMI, M; JOBE, AH: *Betamethasone effects on chorioamnionitis induced by intra-amniotic endotoxin in sheep*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2003; 189: 1458-1466.
- 101) NORTON, ME; MERRILL, J; COOPER, B; KULLER, JA; CLYMAN, RI: *Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor*. The New England Journal of Medicine 1993; 329: 1602-1607.
- 102) PETERSEN, EE: *Infektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe: Lehrbuch und Atlas*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme-Verlag 2003. ISBN 3-13-722904-9.

- 103) PLATZER, C; MEISEL, C; VOGT, K; PLATZER, M; VOLK, H-D: *Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- $\alpha$  and cAMP elevating drugs*. International Immunology 1995; 7: 517-523.
- 104) POWELL, C; ORSI, N; SIMPSON, N; LEVENE, M: *Characterisation of the cytokine inflammatory response in LPS stimulated full-term cord blood*. Journal of Perinatal Medicine 2004; 32: 440-445.
- 105) PRUIMBOOM, WM; VAN DIJK, JAPM; TAK, CJAM; GARRELDS, I; BONTA, IL; WILSON, PJH; ZIJLSTRA, FJ: *Interactions between cytokines and eicosanoids: a study using human peritoneal macrophages*. Immunology Letters 1994; 41: 225-260.
- 106) RAGHAVAN, S; HOLMGREN, J: *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2005; 44: 121-127.
- 107) RATH, W: *Tokolyse – aktueller Stand*. Frauenarzt 2006; 47: 528-531.
- 108) RATH, W: *Tokolyse: Offene Fragen – ungelöste Probleme – Zukunftsperspektiven*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2009; 69: 677-681.
- 109) RATH, W; DUDENHAUSEN, JW: *Alte und neue Tokolytika – eine aktuelle Diskussion um Nutzen, Nebenwirkungen und Kosten*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2003; 63: 119-123.
- 110) RATH, W; PECKS, U: *Management der drohenden Frühgeburt ohne vorzeitigen Blasensprung*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2008; 68: 1061-1068.
- 111) REIMER, T; ULFIG, N; FRIESE, K: *Immunmodulation am unreifen fetalen Gehirn*. Gynäkologie 2001; 34: 531-538.
- 112) RIEGL, C: *Qualitätsmanagement Geburtskliniken: Erfolgsmodelle im Vergleichstest*. Deutsches Ärzteblatt 2005; 102: A-220 / B-183 / C-176.
- 113) RIETSCHEL, ET; KIRIKAE T; SCHADE, FU; ULMER, AJ; HOLST, O; BRADE, H; SCHMIDT, G; MAMAT, U; GRIMMECKE, H-D; KUSUMOTO, S; ZÄHRINGER, U: *The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity*. Immunobiology 1993; 187: 169-190.
- 114) ROMERO, R; CHAIWORAPONGSA, T; ESPINOZA, J: *Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome*. The Journal of Nutrition 2003; 133: 1668-1673.



- 115) ROMERO, R; GOTSCH, F; PINELES, B; KUSANOVIC, JP: *Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications and fetal injury*. Nutrition Reviews 2007; 65: 194-202.
- 116) ROMERO, R; MAZOR, M: *Infection and preterm labor*. Clinical Obstetrics and Gynecology 1988; 3: 553-584.
- 117) RONCAROLO, MG; GREGORI, S; BATTAGLIA, M; BACCHETTA, R; FLEISCHHAUER, K; LEVINGS, MK: *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*. Immunological Reviews 2006; 212: 28-50.
- 118) SALIBA, E; HENROT, A: *Inflammatory mediators and neonatal brain damage*. Biology of the Neonate 2001; 79: 224-227.
- 119) SAMARASINGHE, R; TAILOR, P; TAMURA, T; KAISHO, T; AKIRA, S; OZATO, K: *Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling*. Journal of Interferon and Cytokine Research 2006; 26: 893-900.
- 120) SCHÄFER, WR; ZAHRADNIK, HP: *(Patho-) Physiologische Grundlagen des Geburtsbeginns*. Gynäkologe 2004; 37: 305-313.
- 121) SCHINDLER, R; MANCILLA, J; ENDRES, S; GHORBANI, R; CLARK, SC; DINARELLO, CA: *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF*. Blood 1990; 75: 40-47.
- 122) SCHMALZBAUER-REUSCHEL, E; DEML, L; ENTLEUTNER, K; ZÄHRINGER, U; SEELBACH-GOEBEL, B: *Immunomodulatory Effects of LPS of Clinically Relevant Pathogens to the Fetale Immune System in Pregnancy*. Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie 2009; 213 DOI: 10.1055/s-0029-1222850.
- 123) SCHNEIDER, H; HUSSLEIN, P; SCHNEIDER, K-TM: *Die Geburtshilfe*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2006. ISBN: 3-540-33896-9.
- 124) SCHÜTT, C; BRÖKER, B: *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2009. ISBN: 978-3-8274-2027-5.
- 125) SEELBACH-GÖBEL, B: *Vorzeitiger Blasensprung – Zervixinsuffizienz – drohende Frühgeburt*. 1. Bayernseminar München (12.-13.November 2004).
- 126) SIRONI, M; GADINA, M; KANKOVA, M; RIGANTI, F; MANTOVANI, A; ZANDALASINI, M; GHEZZI, P: *Differential sensitivity of in-vivo TNF and IL-6 production to modulation by anti-inflammatory drugs in mice*. International Journal of Immunopharmacology 1992; 14: 1045-1050.

- 127) SIROTA, L; PUNSKY, I; BESSLER, H: *Effect of indomethacin on IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  production by mononuclear cells of preterm newborns and adults.* Acta Paediatrica 2000; 89: 331-335.
- 128) SMRCEK, J; MÖLLER, J; SCHULTZ, C; GEMBRUCH, U: *Lungenreifeinduktion bei drohender Frühgeburt.* Der Gynäkologe 2001; 34: 1100-1102.
- 129) SOUTER, D; HARDING, J; MCCOWAN, L; O'DONNELL, C; MCLEAY, E; BAXENDALE, H: *Antenatal indomethacin – adverse fetal effects confirmed.* The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology 1998; 38: 11-16.
- 130) STABINSKY, Y; GOLDMAN, R: *Cytokine index.* PeproTech Inc.; 2. Auflage 2006.
- 131) STOSCHEK, J: *Nachsorgesymposium: Von den Folgen einer frühen Geburt.* Deutsches Ärzteblatt 2001; 98: A-2007 / B-1695 / C-1591.
- 132) SUAREZ, RD; GROBMAN, WA; PARILLA, BV: *Indomethacin tocolysis and intraventricular hemorrhage.* Obstetrics and Gynecology 2001; 97: 921-925.
- 133) SWEET, RL; GIBBS, RS: *Infectious diseases of the female genital tract.* 4. Auflage. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2002. ISBN 0-7817-2615-8.
- 134) TAKAHASHI, N; UEHARA, R; KOBAYASHI, M; YADA, Y; KOIKE, Y; KAWAMATA, R; ODAKA, J; HONMA, Y; MOMOI, MY: *Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings.* Cytokine 2010; 49: 331-337.
- 135) TALAYEV, VY; ZAICHENKO, IY; BABAYKINA, ON; LOMUNOVA, MA, TALAYEVA, EB; NIKONOVA, MF: *Ex vivo stimulation of cord blood mononuclear cells by dexamethasone and interleukin-7 results in the maturation of interferon- $\gamma$ -secreting effector memory T cells.* Clinical and Experimental Immunology 2005; 141: 440-448.
- 136) TSUBOI, I; TANAKA, H; NAKAO, M; SHICHIJO, S; ITOH, K: *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production in human lymphocytes: up-regulation of TNF, IFN $\gamma$  and IL-2, in contrast to down-regulation of IL-6 production.* Cytokine 1995; 7: 372-379
- 137) UEMATSU, S; AKIRA, S: *Toll-like receptors and innate immunity.* Journal of Molecular Medicine 2006; 84: 712-725.
- 138) VAN DER BURG, B; VAN DER SAAG, PT: *Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs.* Molecular Human Reproduction 1996; 2: 433-438.

- 139) VERMILLION, ST; NEWMAN, RB: *Recent indomethacin tocolysis is not associated with neonatal complications in preterm infants*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1999; 181: 1083-1086.
- 140) WOOD, NS; MARLOW, N; COSTELOE, K; GIBSON, AT; WILKINSON, AR: *Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth*. The New England Journal of Medicine 2000; 343: 378-384.
- 141) WU, YW; COLFORD, JM: *Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: a meta-analysis*. The Journal of the American Medical Association 2000; 284: 1417-1424.
- 142) WULF, K-H: *Frühgeburt und Grenzen*. Deutsches Ärzteblatt 1997; 94: A-2061 / B-1781 / C-1657.
- 143) YANOWITZ TD; BAKER, RW; BROZANSKI, BS: *Prophylactic indomethacin reduces grades III and IV intraventricular hemorrhages when compared to early indomethacin treatment of a patent ductus arteriosus*. Journal of Perinatology 2003; 23: 317-322.
- 144) YANOWITZ, TD; YAO, AC; WERNER, JC; PETTIGREW, KD; OH, W; STONESTREET, BS: *Effects of prophylactic low-dose indomethacin on hemodynamics in very low birth weight infants*. Journal of Pediatrics 1998; 132: 28-34.
- 145) YERKOVICH, ST; WIKSTRÖM, ME; SURIYAARACHCHI, D; PRESCOTT, SL; UPHAM, JW; HOLT, PG: *Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide*. Pediatric Research 2007; 62: 547-552.
- 146) YOON, BH; JUN, JK; ROMERO, R; PARK, KH; GOMEZ, R; CHOI, J-H: *Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ ), neonatal brain white matter lesions and cerebral palsy*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1997; 177: 19-26.
- 147) YOON, BH; PARK, C-W; CHAIWORAPONGSA, T: *Intrauterine infection and the development of cerebral palsy*. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 2003; 110: 124-127.
- 148) YOON, BH; ROMERO, R; PARK, JS; KIM, CJ; KIM, SH; CHOI, J-H; HAN, TR: *Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2000; 182: 675-681.

- 149) YOSHIYUKI, N; HIROAKI, N; YOSUKE, T; HITOSHI, N; TAKESHI, O: *Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes*. Acta Haematologica 1998; 99: 165-170.
- 150) ZENCLUSSEN, AC; SCHUMACHER, A; ZENCLUSSEN, ML; WAFULA, P; VOLK, H-D: *Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus*. Expert Reviews in Molecular Medicine 2007; 9: 1-14.