

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

**Der immunmodulatorische Effekt von
Indometacin und Betamethason auf die
Zytokinproduktion fetaler mononukleärer
Zellen nach in-vitro Stimulation mit
Streptococcus agalactiae und Enterococcus
faecalis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin

der
Fakultät der Medizin
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Evelyn Akuaa Akyaa Kusi

2015

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

**Der immunmodulatorische Effekt von
Indometacin und Betamethason auf die
Zytokinproduktion fetaler mononukleärer
Zellen nach in-vitro Stimulation mit
Streptococcus agalactiae und Enterococcus
faecalis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin

der
Fakultät der Medizin
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Evelyn Akuaa Akyaa Kusi

2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thorsten Reichert

Gutachter/in: 1. Fr. Prof. Dr. Birgit Seelbach-Goebel

2. PD Dr. Ludwig Deml

Datum der Einreichung: 29.03.2015

Datum der Promotion: 02.09.2015

Widmung

Für meinen geliebten Großvater Robert Owusu Afram

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Frühgeburtlichkeit	5
1.2 Aszendierende Infektionen in der Schwangerschaft	7
1.3 Grampositive Bakterien als Pathogene in der Geburtshilfe und Neonatologie	8
1.3.1 Aufbau der grampositiven Bakterien	9
1.3.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
1.3.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	11
1.4 Zytokine, die intrauterine Entzündungsreaktion und Frühgeburtlichkeit	13
1.5 FIRS	14
1.6 Intrauterine Infektion und die perinatale Gabe von Antibiotika	15
1.7 Tokolyse und die pränatale Gabe von Indometacin	16
1.8 Antenatale Lungereifung und die pränatale Gabe von Steroiden	18
2. Fragestellung	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Studiendesign	20
3.2 Probenmaterial	21
3.2.1 Untersuchungsmaterial	21
3.2.2 Stimulanzien	22
3.2.3 Ansatz der Zellkultur und Stimulation der fetalen mononukleären Zellen	24
3.2.4 Medikamente	26
3.2.5 Reagenzien, Medien und Puffer	26
3.2.6 Reaktionskits	26
3.2.7 Versuchsmaterialien	27
3.2.8 Geräte	27
3.3 Analyseverfahren	28
3.3.1 Zytokinbestimmung mittels Luminex xMAP® Technologie	28
3.3.2 Statistische Auswertung der Daten	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Die Basisexpression von Zytokinen bei unstimulierten fetalen mononukleären Zellen	31
4.2 Der Einfluss von Indometacin und Betamethason auf die unstimulierten Zellen	31
4.3 Der Einfluss von Antibiotika auf einen LPS-stimulierten Versuchsaufbau	33

Inhaltsverzeichnis

4.4 Grampositive Bakterien und ihr Einfluss auf die Zytokinexpression von mononukleären Zellen	34
4.5 Indometacin und Betamethason und deren Einfluss auf lysat-stimulierte mononukleäre Zellen	35
4.5.1 Veränderung der proinflammatorischen Zytokine	35
4.5.2 Veränderung des antiinflammatorischen Zytokins	62
5. Diskussion.....	65
5.1 Der immunmodulatorische Effekt von Indometacin und Betamethason auf die Zytokinfreisetzung von fetalen mononukleären Zellen.....	66
5.2 Einordnung des Antibiotikazusatzes	73
5.3 Klinische Bedeutung von perinatal applizierten Indometacin und Betamethason	73
5.4 Limitationen der Studie	76
6. Zusammenfassung	77
Abkürzungsverzeichnis.....	79
Literaturverzeichnis.....	81
Danksagung.....	

1. Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit

Die Frühgeburt, definiert als eine Geburt vor 37+0 abgeschlossenen Schwangerschaftswochen (SSW), ist bis zum heutigen Tag eine der zentralen Herausforderungen der Geburtsmedizin (1). 2011 erblickten in Deutschland zwischen 7-9 % aller Neugeborenen vorzeitig das Licht der Welt (3-6). Weltweit werden ca. 8-15 % aller Kinder vor der 37+0 SSW geboren (7). Für die Überlebenschancen dieser Kinder ist der Zeitpunkt der vorzeitigen Geburt im Outcome entscheidend. Während extrem frühe Frühgeburten (unter 28+0 SSW) eine Mortalitätsrate von bis zu 32 % aufweisen, sinkt die Mortalitätsrate ab 30+0 SSW auf unter 1,3 % (3). Insgesamt liegt der Anteil der Frühgeborenen an der perinatalen Morbidität und Mortalität in Deutschland bei ca. 70-77 % (6, 8, 9). In den vorherigen Jahrzehnten wurde durch die Verschiebung der neonatalen Überlebenschancen auf ein immer niedrigeres Gestationsalter ein Anstieg der Inzidenz der Frühgeburtlichkeit und in Folge dessen ein Anstieg der fetalen und maternalen Komplikationen festgestellt (2, 3). Gründe für diese Tendenz lagen zum einen in der Zunahme der Interventionsmaßnahmen der Reproduktionsmedizin mit Häufung von Mehrlingsschwangerschaften, und zum anderen im Anstieg der sogenannten indizierten Frühgeburten, bei der aus maternaler und fetaler Indikation heraus die Schwangerschaft vorzeitig beendet wird, begründet(1, 2). Auch der Anstieg der sogenannten spontanen Frühgeburtlichkeit, die die Folge einer vorzeitigen Wehentätigkeit oder eines vorzeitigen Blasensprungs ist, trug zur erhöhten Inzidenz bei (7).

Im Kampf gegen die Frühgeburtlichkeit ist die Erforschung der spontanen frühzeitigen Geburt aufgrund ihrer multifaktoriellen Genese und ihrer unverminderten Prävalenz von zentraler Bedeutung. Da sowohl ascendierende vaginale Infektionen, eine uteroplazentäre Dysfunktion, die pathologische Dehnung des Uterus und die vorzeitige Aktivierung der mütterlichen oder fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse nach neustem wissenschaftlichem Stand zur Pathogenese beitragen, bilden multimodale Konzepte der Prävention, Diagnostik und Therapie die Grundlage medizinischer Interventionsmaßnahmen (1-3).

Einleitung

Bekannte perinatale Risikofaktoren der spontanen Frühgeburtlichkeit (1-3):

- Vaginale Dysbiose
- Vorbelastete Schwangerschaftsanamnese
- Aktueller Status der Schwangerschaft: Zervixlänge, Uteruskontraktibilität
- Ethnische Zuordnung der Mutter
- Mütterliches Alter
- Mütterlicher sozioökonomischer Status
- Ernährungszustand
- Mütterlicher mentaler Zustand
- Genetische Vorbelastung

Tabelle 1-1: Tabellarische Darstellung bekannter perinataler Risikofaktoren der spontanen Frühgeburtlichkeit

In Deutschland gilt die Identifikation von Risikogruppen, die Aufklärung der betroffenen Frauen und Weiterleitung an spezialisierte Perinatalzentren mit fortlaufendem Monitoring der Schwangerschaften als Grundpfeiler der Prävention. Diagnostisch wird auf Zeichen einer drohenden Frühgeburtlichkeit wie eine verkürzte Zervixlänge oder eine erhöhte Kontraktibilität des Uterus geachtet. Neben diesen Maßnahmen sind auch die Messung des fetalen Fibronektins im Scheidensekret, die Selbstmessung des vaginalen pH-Wertes und die Testung des IGFBP-1 (Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor und Bindungsprotein-1) als auch des PAMG-1 (Plazenta-Alpha-Mikroglobulin-1) wichtige aktuelle Standards, um eine Frühgeburt innerhalb der nächsten 7-14 Tagen auszuschließen (2, 3, 5). Ist eine drohende Frühgeburt durch Behandlung mit Tokolytika nicht aufzuhalten, ist es die Norm, durch den Einsatz von Steroiden zur vorzeitigen Lungenreifung die bestmögliche Chance für das postnatale Überleben durch Verhinderung eines fetalen Respiratorischen Distress Syndroms (RDS) zu erreichen.

In den neunziger Jahren wurden durch mehrere umfassende Studien wie Monset-Couard et al., Hack et al. und Stjernqvist et al. die Folgen von Frühgeburtlichkeit erfasst. Dabei wurde ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung von verheerenden Langzeitschäden der Kinder festgestellt (10-12). Besonders frühe Frühgeborene weisen ein erhöhtes Risiko für neurologische und somatische Schäden wie infantile Zerebralparese, nekrotisierende Enterokolitis und bronchopulmonale Dysplasien auf (4). Volkswirtschaftlich werden die Kosten der Frühgeburtlichkeit auf bis zu 1 Milliarde Euro pro Jahr geschätzt (13). Dabei verursachen Frühgeborene viermal höhere Kosten als reifgeborene Kinder. Die Langzeitfolgen für die

Überlebenden mit Lernbehinderungen, Sehstörungen und folglich niedrigerem sozioökonomischen Status sind weitreichend.

Neue medizinische Errungenschaften verschieben die Überlebensfähigkeit extrem Frühgeborener jedoch bis heute immer weiter. Ihre Langzeitmorbidity, Mortalität, aber auch die ökonomischen Belastungen unterstreichen, trotz der markanten Fortschritte in der Behandlung, die Dringlichkeit für eine weiterführende interdisziplinäre Forschung. Neue Ansätze wie die Messung des Östrogenspiegels im mütterlichen Speichel oder die Identifikation von genetischen Polymorphismen, die eine pathologische immunologische Auswirkung auf den Schwangerschaftsverlauf ausüben können, erscheinen dabei vielversprechend (2).

1.2 Aszendierende Infektionen in der Schwangerschaft

Die Verbindung zwischen intrauteriner Infektion, vorzeitiger Wehentätigkeit und spontaner Frühgeburt steht seit den siebziger Jahren im Fokus der perinatalen Forschung (14). 1977 konnte die Forschungsgruppe um Bobitt und Ledger erstmals einen intrauterinen bakteriellen Befall der Amnionflüssigkeit bei Frauen mit vorzeitigen Wehen nachweisen (14). Man geht davon aus, dass mindestens 40 % aller vorzeitigen Geburten mit einer intrauterinen Infektion assoziiert sind (15). Vor der 32+0 Woche sind die häufigsten Ursachen einer Infektion des Uterus, aszendierende, vaginale Bakterienbesiedelungen, die aufgrund einer Dysbiose die zervikale Barriere überschreiten (4, 16).

Die normale Vaginalflora ist zu 95 % von Lactobazillen besiedelt. Diese sorgen für ein physiologisch-saures Vaginalmilieu und bilden so einen essentiellen Schutz vor fremden Pathogenen. Allein in Deutschland weisen jedoch 20 % aller Schwangeren ein Ungleichgewicht dieses Milieus auf (16, 17). Die Florazusammensetzung verschiebt sich in diesem Fall von Lactobazillenspezies zu Anaerobiern wie *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum* und *Mycoplasma hominis* u.a. (18). Damit besteht das Risiko einer bakteriellen Vaginose, klinisch diagnostiziert nach Amsel- oder Nugent-Kriterien, welche durch die konsekutive Veränderung des vaginalen pH-Wertes ideale Umweltbedingungen für aufsteigende bakterielle wie virale Keime bietet (19, 20).

Einleitung

Aus Untersuchungen in frühen Trimestern ist davon auszugehen, dass diese Pathogene früh ascendieren ohne dabei symptomatisch auffällig zu werden. Sie befallen zunächst den unteren Fruchtpol, die Eihüllen und die Dezidua und können dort über Aktivierung einer Entzündungskaskade im Gewebe und durch die Veränderung der Gewebematrix eine vorzeitige Zervixreifung, sowie die Schwächung der embryonalen Hülle mit der Gefahr eines vorzeitigen Blasensprungs und einer Aktivierung der Uteruskontraktibilität induzieren (18). 50 % der Betroffenen werden erst zu diesem Zeitpunkt symptomatisch (14, 18). Eskalierend ist eine Amnionitis, eine Funisitis und im äußersten Fall eine intrauterine Infektion des Feten möglich. Dabei sind besonders frühe Frühgeborene durch schwerwiegende Komplikationen wie FIRS (fetales Infektionssyndrom) und Sepsis bedroht (16, 17). Neben dem direkten bakteriellen Befall ist auch eine Aktivierung der Entzündungskaskade durch den indirekten Einfluss von bakteriellen Endotoxinen, Exotoxinen und proinflammatorischen Zytokinen der Mutter über das Blutssystem nachweisbar.

1.3 Grampositive Bakterien als Pathogene in der Geburtshilfe und Neonatologie

In der St. Hedwigklinik wird regelhaft von Schwangeren mit vorzeitiger Wehentätigkeit vor der 34+0 SSW in der Eingangsuntersuchung ein vaginaler Abstrich entnommen (9). Diese Abstriche wiesen zu 90 % eine ausgeprägte gramnegative Belastung an dem Erreger *E. coli* auf. Bei vielen Abstrichen fand sich jedoch auch eine pathologische grampositive Keimbelastung. Unter diesen konnte in 64 % der Fälle der fäkale Keim, *Enterococcus faecalis*, und daneben als zweit-häufigster Keim mit 24 %, *Streptococcus agalactiae*, isoliert werden (5).

Seit Jahrzehnten ist *Streptococcus agalactiae* als Vertreter der Streptokokken der Gruppe B und hauptverantwortlicher Keim für das Auftreten von Neugeborensen im Fokus der Perinatalmedizin. Als neuer Verursacher von neonatalen Infektionen tritt *Enterococcus faecalis* immer mehr in den Blickpunkt der geburtshilflichen und neonatologischen Forschung. Noch vor 30 Jahren als nicht pathogen eingestuft, konnte dieser Erreger über eine vermehrte Antibiotikaresistenz eine besorgniserregende Virulenz entwickeln und ist mittlerweile als auslösender Keim von neonatalen Sepsen bekannt (21). Aufgrund dieser Sachverhalte entschieden wir uns, als Vertreter der grampositiven Erregergruppe Lysate von *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis* zur Stimulation fetaler mononukleärer Zellen einzusetzen.

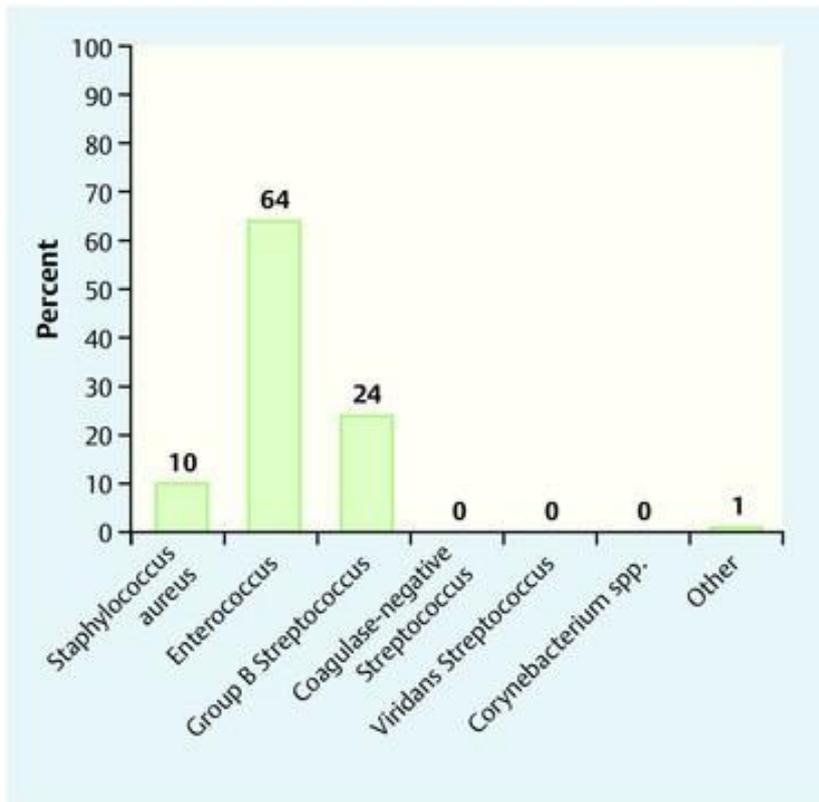


Abbildung 1-2: Darstellung der grampositiven Keimbelastung an der St. Hedwigklinik von 2005. Aufteilung in Prozent nach Erregergruppe (5)

1.3.1 Aufbau der grampositiven Bakterien

Alle grampositiven Bakterien haben einen ähnlichen Zellwandaufbau gemeinsam. Sie weisen eine massive polysaccharide Kapsel von bis zu 15-80 nm Dicke auf, die aus Peptidoglykanen und Teichonsäuren aufgebaut ist. In ihrem Zentrum befindet sich das Zytoplasma, umgeben von einer Plasmamembran und einem schmalen periplasmatischen Spalt (22).

Ein Großteil der Pathogenität der Erreger geht alleine von der Zellwand und den in ihr enthaltenen Teichonsäuren aus. Diese können sich aus dem Zellwandverband lösen und stellen als exogene Pyrogene einen entscheidenden Reiz für die entzündliche Reaktion im menschlichen Körper (23).

1.3.2 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae ist eine der häufigsten Ursachen für schwere Neugeborenensepten (19). In den siebziger Jahren trat der Erreger durch den Anstieg an Infektionen bei schwange-

Einleitung

ren Frauen und des folglich dramatischen Anstiegs von Infektionen bei Neugeborenen zentral in den Fokus der Geburtshilfe und Neonatologie (22). Bis heute liegt die geschätzte Inzidenz der Infektionsrate dieses Keimes bei 1:1000 Geburten (24).

Als fakultativ anaerober Diplococcus ist der Keim ein Vertreter der β -hämolyisierenden Streptokokken, Katalase negativ, unbeweglich und nicht sporenbildend. Unterschieden wird er aktuell durch Serotypisierung in Typ I-X. Neueste Genomforschungen haben ergeben, dass das Bakterium über Pilus-ähnliche Strukturen verfügt, die sich über dessen Kapsel hinaus erstrecken und Teil des erfolgreichen Virulenzsystems des Erregers sind (22). In einer anderen Differenzierung wird das Bakterium, nach Lancefield, als *Streptococcus* der Gruppe B (GBS) eingeteilt.

Der Keim ist sowohl respiratorisch, gastrointestinal als auch genital isolierbar und besitzt mehrere Eigenschaften, die seine Virulenz bestimmen. Seine Pathogenität und sein Invasionsvermögen, besonders bei Neugeborenen, begründen sich sowohl in seiner Fähigkeit, sich durch mehrere Proteine an die Wirtszelle zu binden und diese zu infiltrieren, als aber auch sich durch die Zerstörung des Wirtsgewebes zu vermehren und durch weitere Faktoren vor einer Immunantwort zu schützen.

Neben der Zellwand, die die Anlagerung von Komplementfaktoren verhindert, bildet der Erreger Proteasen wie *CspA*, Fibrinogenrezeptoren und andere Proteine, die sich an der Abwehr und der Zerstörung der Immunzellen und des Gewebes der Betroffenen beteiligen (22).

Im klinischen Bild der Sepsis führen neben den erregereigenen Teichonsäuren auch Peptidoglykane und das β -Hemolysin zur übermäßigen Ausschüttung von Zytokinen und zur Aktivierung des Immunsystems (22).

1.3.2.1 Pathologie in der Geburtshilfe und Neonatologie

Glücklicherweise weisen die meisten Neugeborenen, die in Kontakt mit *Streptococcus agalactiae* kommen, lediglich einen oberflächlichen Befall des Körpers mit mildem Verlauf auf. Die Erkrankungen beschränken sich dabei auf Infektionen des Mundes, Oropharynx oder des Gastrointestinaltraktes (22). Überspringt der Erreger jedoch diese oberflächliche Memb-

Einleitung

ranschwelle, verursacht er beim Neugeborenen Krankheitsverläufe, die je nach Ausprägung massive systemische Folgen nach sich ziehen können.

Grundsätzlich wird im klinischen Alltag zwischen einer „Early-“ (EOI) und einer „Late-Onset Infektion“ (LOI) unterschieden (22). EOI und LOI liegen unterschiedliche Infektionsursachen, -zeitpunkte und Risikofaktoren zugrunde, und betreffen nach dem Gestationsalter unterschiedliche Kohorten von Feten. Die Early-Onset Infektion gilt als die Erkrankung der vertikalen Transmission und tritt meist innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt auf. Der größte Risikofaktor ist dabei die vaginale Besiedelung der Mutter und die Übertragung des Erregers von Mutter auf Kind während der Geburt. Wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert, kann sich der Fetus über eine aufsteigende Infektion mit *Streptococcus agalactiae* infizieren, ausgehend von einer etwaigen Chorioamnionitis. Die Infektionsrate bei stark besiedelten Frauen liegt nach Studienlage zwischen 29-89 % und zeigt sich linear ansteigend zur vaginalen Besiedelungsdichte des Erregers (22). Die drei häufigsten Erkrankungen sind zum einen die Sepsis, Pneumonie und die Neugeborenenmeningitis. Allgemein wird die Mortalitätsrate einer Early-Onset-Infektion, die in eine neonatale Sepsis mündet, mit 3-10 % angegeben (22). Eine Studie berichtete jedoch in den ersten 72 Stunden von Mortalitätsraten von bis zu 26 % (19). Die EOI endet häufiger letal als die LOI. Ihr Inzidenzrisiko konnte allerdings durch die Implementierung von umfassenden Screening- und antibiotischen Therapieverfahren jüngst signifikant gesenkt werden (24).

Die LOI tritt definitionsgemäß 7 bis 89 Tage nach der Geburt auf und betrifft besonders Neugeborene, die vor 37+0 SSW geboren wurden (22). Die Erkrankung wird transversal über den Kontakt des Neugeborenen mit der Außenwelt und besiedelten Trägern verursacht. Klinisch weisen 65 % der Neugeborenen eine Bakteriämie ohne konkreten Fokus auf, 35 % einen Befall des ZNS (zentralen Nervensystems) und 5-10 % der Kinder leiden an einer Phlegmone, Osteomyelitis, septischen Arthritis oder einer Pneumonie (22). Die Inzidenz der LOI konnte durch Präventionsmaßnahmen wie Screening und prophylaktischer Antibiotikagabe nicht verbessert werden (19). Die Mortalitätsrate liegt bis heute zwischen 2-6 % (22).

1.3.3 *Enterococcus faecalis*

Eine Unterscheidung zwischen Enterokokken und Streptokokken konnte erstmals 1984 mittels DNA Hybridisierung und der 16S rRNA Sequenzierung erfolgen. Unter der neuen No-

Einleitung

menklatur wurde aus *Streptococcus faecium* und *faecalis*, *Enterococcus faecium* und *faecalis*(21). Genauso wie bei den Streptokokken handelt es sich bei den Enterokokken um Katalase-negative Diplokokken, die keine Sporen bilden und sich fakultativ anaerob verhalten. Nach Lancefield ist der Erreger der Antigengruppe D zugeordnet.

Noch bis in die neunziger Jahre hinein wurde diese Erregergruppe als nicht pathogen eingestuft und regelhaft in der Nahrungsmittelindustrie und in der Forschung eingesetzt (21). Heutzutage sind die Enterokokken eine der häufigsten nosokomialen Erregergruppe weltweit und lösen unter anderem Harnwegsinfekte, hepatobiliäre Sepsen, Endokarditiden, chirurgische Wundinfektionen, Bakteriämien und jüngst neonatale Sepsen aus (21).

Als grampositives Bakterium besitzt *Enterococcus faecalis* ähnliche Virulenzfaktoren wie *Streptococcus agalactiae*, ist allerdings zusätzlich zur Bildung eines Biofilms fähig, was seine zunehmende Antibiotikaresistenz begünstigt. Dieser Film schützt das Bakterium wie ein Puffersystem und verschleiert so seine Existenz vor der menschlichen Immunabwehr.

1.3.3.1 Pathologie in der Geburtshilfe und Neonatologie

Wie die Streptokokken können auch die Enterokokken EOI und LOI beziehungsweise EOS (Early Onset Sepsis) und LOS (Late Onset Sepsis) auslösen. In den achtziger Jahren wurde durch Dobson et al. ein Anstieg der Inzidenz der LOS durch Enterokokken berichtet (25). Dabei schwanken die Mortalitätsraten, bei meist kleinen Beobachtungskollektiven, je nach Studie, zwischen 6-17 % und 28-58 % (26). Bei bereits bestehender Bakteriämie und/oder Fremdkörpereinfluss können Enterokokken opportunistisch auch Meningitis und Ventrikulitis auslösen (26).

Eine Assoziation zwischen intrauterinem Enterokokkenbefall, Infektion und Frühgeburtlichkeit wurde Anfang 2014 hergestellt (27). Ardissonne et al. berichteten hier über erhöhte intrauterine Entzündungsparameter mit anschließender vorzeitiger Geburt der Feten besonders bei einem Enterokokkenbefall des Mekoniums vor der 33+0 SSW.

1.4 Zytokine, die intrauterine Entzündungsreaktion und Frühgeburtlichkeit

Neueste Studien konnten belegen, dass letztendlich die Aktivierung der intrauterinen Entzündungskaskade entscheidender Faktor für einen vorzeitigen Blasensprung, dem Einsetzen vorzeitiger Wehen und der Induktion einer Frühgeburt ist (4, 14, 15, 17, 28). Zytokine als Mediatoren und Regulatoren des Immunsystems spielen dabei eine bedeutende Rolle. Hauptsächlich von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems produziert, wirken diese löslichen Proteine und Glykoproteine an der Grenze der Detektierbarkeit im nano- bis femtomolaren Bereich und koordinieren das Zusammenspiel sowohl der intrauterinen Entzündungsreaktion als auch der Entzündungsvorgänge im gesamten menschlichen Körper (29, 30). Dabei werden sie je nach Wirkungsweise allgemein in anti- und proinflammatorische Zytokine eingeteilt. Bis heute konnten ca. 50 Zytokine und Chemokine identifiziert werden, die an einer vorzeitigen Wehentätigkeit und dem Ereignis der Frühgeburtlichkeit beteiligt sind. Viele Interaktionen konnten bereits aufgeklärt werden. Die genaue Pathophysiologie wird jedoch zur Zeit noch erforscht (31).

Bekannt ist, dass es beim entzündungsinduzierten Geburtsbeginn entweder über sogenannte PRRs (Pattern-Recognition-Rezeptoren) und Aktivierung des Translationsfaktors Nf- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) oder durch das direkte Einwirken von Entzündungsprodukten über ein positives Rückkopplungssystem zur erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und der Aktivitätserhöhung von TH-1 (T-Helfer-1) Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten kommt. Wichtige PRRs sind die sogenannten Toll-like-Rezeptoren, von denen unterschiedliche Subtypen für verschiedene Keime abgrenzbar sind. TLR-2 (Toll-like-Rezeptor-2) erkennt vor allem grampositive Bakterien, TLR-4 Gram-negative und TLR-3 vor allem virale Pathogene (14, 18, 28). Dabei wirken die einzelnen TLRs synergistisch in ihrem Transduktionsweg und schaffen so ein adaptives System (15). Bezüglich der Zytokinantwort wirkt sich eine erhöhte Aktivität von TH-1 Zellen besonders negativ auf einen Schwangerschaftsverlauf aus. TH-1 Zellen produzieren vor allem proinflammatorische Zytokine wie IL-1 (Interleukin-1), IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) und IFN- γ (Interferon- γ). Diese Zytokine, aber auch bakterielle Endotoxine regen Dezidua, Chorion und vor allem Amnionfibroblasten zur Produktion von Prostaglandinen, Endothelin und CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon) an. Während CRH rückkoppelnd stimulierend auf die Prostaglandinfreisetzung wirkt, induzieren die Prostaglan-

dine E_2 und $F_{2\alpha}$ und das freigesetzte Endothelin direkt myometriale Kontraktionen. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF wirken Oxytocin-agonistisch und induzieren IL-6, welches die Expression von Oxytocin-Rezeptoren hoch reguliert und so den Prozess der vorzeitigen Wehentätigkeit unterhält (3, 28, 32).

IL-1 β , TNF und IL-8 sind ebenfalls an der vorzeitigen Zervixreifung beteiligt. Sie fördern die Freisetzung von sogenannten Matrix-Metalloproteinasen und Elastasen, die wiederum einen Abbau der extrazellulären Matrix am unteren Uterinsegment und eine Erweichung des Muttermundes induzieren. Wird dieser Prozess nicht unterbrochen, droht im Verlauf die vorzeitige Geburt des Feten (3, 32).

1.5 FIRS

Die Diagnose einer FIRS ist zu stellen, wenn es über eine intrauterine Bakterienaszension zur systemischen Aktivierung des Immunsystems des Feten kommt. Erstmals 1998 durch Gomez et al. als eine Erhöhung der IL-6 Konzentration im fetalen Plasma auf über 11 pg/ml definiert, kann diese Erkrankung zusätzlich durch eine fetale CRP-Erhöhung, Leukozytose, aber auch Leukopenie und histopathologisch durch eine Funisitis und chronische Vaskulitis bestätigt werden (32, 33). Das Syndrom bildet das Äquivalent zur SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) im Erwachsenenalter (32).

Dabei stellt FIRS in Kombination mit der Aktivierung des mütterlichen Immunsystems, durch die Freisetzung von Zytokinen und Immunmodulatoren einen eigenen Risikofaktor für das Einsetzen von vorzeitigen Wehen dar (28, 32). Bei ungefähr 30 % aller Schwangeren mit vorzeitigem Blasensprung kann ein intrauteriner Infekt und bei einem weiteren Drittel ein zusätzlich mikrobieller Befall des Feten festgestellt werden. Bei Frauen, die eine MIAC (Mikrobielle Infektion der Amnionhöhle) und zusätzlich eine Chorioamnionitis aufwiesen, wurde in einer tschechischen Studie sogar bei bis zu 68 % der Kinder ein fetales inflammatorisches Syndrom nachgewiesen (34, 35). Über den Respirations- und Gastrointestinaltrakt und über die Haut erhalten dabei die Pathogene und Endo- und Exotoxine Zutritt zum Feten, um dort die fetale Immunkaskade zu aktivieren (35).

Ab dem 2. Trimester ist ein Fet intrauterin zu einer Immunantwort fähig (28). In diesem Stadium ist die „Feinabstimmung“ des fetalen Immunsystems im engeren Sinne noch nicht voll entwickelt und es bestehen sowohl im Bereich der unspezifischen als auch der spezifischen Immunabwehr Einschränkungen in der Expression der einzelnen Immunmodulatoren. Dabei weisen Neugeborene und vor allem Frühgeborene niedrigere Werte für TH-1 und TH-2 Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen, Granulozyten und Komplementfaktoren auf, produzieren allerdings anteilig mehr CD4+ Zellen als Erwachsene (36).

Kommt es bei einer MIAC zur Aktivierung dieses noch unreifen Immunsystems, ist eine adäquate Anpassung des Feten an die Infektsituation für dessen Überleben essentiell (32). Allerdings haben eine unausgewogene Expression von Immunmodulatoren, die Begünstigung vorzeitiger Wehen sowie eines vorzeitigen Blasensprungs, gefolgt von einer Frühgeburt, ein negatives bis fatales neonatales Outcome zur Folge (32, 35). Postnatale Komplikationen wie Pneumonie, RDS, intraventrikuläre Blutungen, periventrikuläre Leukomalazie, nekrotisierende Enterokolitis und neonatale Sepsis können auftreten (32). Die Assoziation zwischen dem Auftreten von Spätfolgen, wie Zerebralpareesen, Bronchodysplasien, Retinopathien, des fetalen inflammatorischen Syndroms, sowie im leichtesten Fall von Lernbehinderungen konnte in mehreren Studien inzwischen nachgewiesen werden (28, 32, 37-39).

Medikamente, welche die Entzündungskaskade *in uteri* hemmen oder antiinflammatorische Prozesse fördern, stehen deshalb, neben einer antimikrobiellen Behandlung und der Entbindung, im Fokus der perinatalen Therapie (40).

1.6 Intrauterine Infektion und die perinatale Gabe von Antibiotika

Bei Schwangeren mit bakteriellem Befall des Uterus ist einer der naheliegendsten therapeutischen Ansätze die perinatale Antibiotikagabe. Mehrere Metanalysen und Studien konnten in den letzten 20 Jahren belegen, dass der Einsatz von Antibiotika bei vorzeitigem Blasensprung das Risiko einer Frühgeburt signifikant senkt und die neonatale wie maternale Morbidität verbessert (5, 41). Der generelle routinemäßige Einsatz von Antibiotika ohne vorzeitigem Blasensprung scheint jedoch keinen Benefit für das perinatale Outcome zu haben (40). Hauptreferenz bilden dabei die sogenannten Oracle Studien I und II, die jeweils die Daten von über

6000 Patientinnen in Großbritannien zwischen 1994 und 2000 erfassten. Diese Studien hielten die Folgen für den Einsatz von verschiedenen Antibiotikakombinationen von Geburten mit und ohne vorzeitigem Blasensprung fest und verglichen diese mit der Kontrollgruppe. Ein Follow-up erfolgte sieben Jahre später (40-43).

Die deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (015/029), aktuell unter Revision, empfiehlt basierend auf dieser Grundlage den Einsatz von Antibiotika nach der 24+0 SSW bei intrauteriner bakterieller Infektion und vorzeitigem Blasensprung und sieht die Gabe von Penicillinen oder Makroliden wie Erythromycin und Clindamycin dafür vor (44). Leitlinien der englischsprachigen Industrienationen – z.B. Großbritannien und Kanada – gehen noch einen Schritt weiter und raten zu genauen Therapieregimen mit Erythromycin und Ampicillin. Amoxicillin kombiniert mit Clavulansäure wird allgemein aufgrund des viermal höheren Risikos der Entwicklung von fetaler NEC (nekrotisierender Enterokolitis) nicht empfohlen (45, 46). Der Nachweis von Streptokokken B gilt auch ohne Blasensprung aus deutscher und US-amerikanischer Sicht als Indikation für eine intrapartale prophylaktische Gabe von Antibiotika (24).

Bei Nachweis dieses Erregers konnte durch eine prophylaktische subpartale Antibiotikagabe das Risiko einer Early-Onset Infektion signifikant reduziert werden (24). Basierend auf diesen Studien, den Leitlinien und im Hinblick auf die klinische Realität entschied man sich deshalb in der vorliegenden Studie zur Kontrolle des bakteriellen Wachstums für das Antibiotikum Ampicillin, das als Standard in der GBS-Prophylaxe an der St. Hedwigsklinik eingesetzt wird.

1.7 Tokolyse und die pränatale Gabe von Indometacin

Bei drohender Frühgeburtlichkeit ist die medikamentöse Wehenhemmung eine der meist genutzten Therapiemaßnahmen in der Geburtshilfe (47). Dabei ist es die primäre therapeutische Intention ein Zeitfenster für die vorzeitige fetale Lungenreifung zu schaffen und bei gleichzeitiger Senkung der neonatalen Morbidität die Überlebenschancen, welche mit jedem Tag zwischen der 23+0 und der 27+0 SSW um drei Prozent steigen, zu verbessern (48).

Eine Tokolyse ist, nach deutscher Expertenmeinung, bei vorzeitiger Wehentätigkeit zwischen der 24+0 und der 34+0 SSW und funktioneller Zervixlänge unter 25 mm – nach transvagina-

Einleitung

ler Messung – und/oder Muttermunderweiterung indiziert. Dabei sollten mindestens drei Wehen in einer halben Stunde auftreten und die Wehen länger als 30 Sekunden anhalten (3).

Der wissenschaftliche Diskurs über den besten medikamentösen Ansatz zur Tokolyse ist weltweit fortlaufend (48). Der Einsatz eines bestimmten Medikaments beruht zum größten Teil auf Expertenmeinung der einzelnen Länder und der Berufserfahrung des jeweiligen Geburtshelfers. In Deutschland sind offiziell zwei Medikamente, der Oxytocin-Rezeptorantagonist „Atosiban“ und das Betasympatomimetikum „Fenoterol“, zur Wehenhemmung zugelassen. Regelmäßig werden aber im „Off-Label-Use“ der Calciumantagonist Nifedipin, NO-Donoren wie Nitroglycerin, Magnesiumsulfat und der Cyclooxygenasehemmer Indometacin eingesetzt (3).

Nachdem in England lange Zeit Atosiban und Nifedipin als die Mittel der ersten Wahl angesehen wurden, konnten Haas et al. 2012, in einer Veröffentlichung im BMJ (British Medical Journal), die bis dato ersten Netzwerk-Metanalysen zu diesem Thema vorlegen. Die Forschungsgruppe kam in der Analyse zu dem Ergebnis, dass Indometacin vor Nifedipin nach neuester Datenlage das wirksamste Tokolytikum darstellt (47).

Dabei konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Indometacin im Vergleich zu den gängigen Tokolytika die vorzeitige Wehentätigkeit über 48h und bis zu 7 Tagen bei ungefähr ähnlichem perinatalem und maternalem Outcome am effektivsten hinauszögert (47). In Versuchen mit Rhesus-Affen konnte festgestellt werden, dass unterhalb der 28+0 SSW die Fähigkeiten von Indometacin als einziges Tokolytikum mit immunmodulatorischer Wirkung bei intrauteriner Infektion und vorzeitiger Wehentätigkeit besonders bedeutsam sind (49).

In der eigentlichen Funktion ist Indometacin ein nicht-steroidales Antiphlogistikum, das reversibel, nicht selektiv Cyclooxygenaseenzyme hemmt, die Synthese von Prostaglandinen einschränkt und damit inflammatorische Prozesse unterbricht (48). Des Weiteren kann Indometacin als PPAR- γ Agonist (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ) direkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten hemmen (49, 50).

Seit 40 Jahren als Wehenhemmer im Einsatz, erfuhr dieses Medikament durch die neusten Studien jüngst eine Renaissance, nachdem es vorher aufgrund der hohen Plazentagängigkeit, mit fetalen Komplikationen wie der Induktion eines Oligohydramnions, eines vorzeitigen Ver-

schluss des Ductus Botalli, erhöhten Raten an NEC und periventrikulärer Leukomalazien assoziiert und deswegen im Einsatz sehr kritisch gesehen wurde (48, 49, 51). Dieser Verdacht konnte aber durch neuere Studien relativiert werden. Unter umfassendem Monitoring wird die Verwendung von Indometacin besonders als „Rescue“-Medikament grundsätzlich empfohlen (47, 51, 52).

In der St. Hedwigklinik wird Indometacin, nach Versagen der zugelassenen Tokolytika und bei niedrigem Gestationsalter (< 28+0 SSW), unter regelmäßiger Ultraschallkontrolle des Ductus Botalli sowie der Fruchtwassermenge, in einer Dosierung von maximal 3 x 100 mg/d für maximal 10 Tage rektal mit positiven Ergebnissen verabreicht (53).

Der Diskurs zum Einsatz von Indometacin als Tokolytikum ist auch nach Veröffentlichung neuerer Studien nicht beendet. Noch stehen große randomisierte Doppelblindstudien aus, die eine umfassendere Aussage zu den Therapien ermöglichen könnten (47).

1.8 Antenatale Lungereifung und die pränatale Gabe von Steroiden

1969 konnte erstmals belegt werden, dass der Einsatz von Kortikosteroiden die Surfactantbildung beim Feten vorzeitig aktivieren und eine vorzeitige Reifung der fetalen Lungen induzieren kann (54). Eine Erkenntnis, die die Perinatalmedizin revolutionierte, und die Überlebenschancen und Morbidität von Neugeborenen, die vor der 32+ 0 SSW mit noch unreifen Lungen zur Welt kamen, schlagartig verbesserte (47). Bis zu jenem Zeitpunkt war RDS die Hauptursache für die neonatale Mortalität und Morbidität derartiger früher Frühgeborener (54). Heute werden diese Kinder vor ihrer Geburt *lege artis* mit Kortikosteroiden behandelt und sind bei fortlaufender Verschiebung der Überlebenschancen für Frühgeborene mittlerweile unabdingbar für eine erfolgreiche Therapie.

Zur Behandlung werden sowohl Dexamethason als auch Betamethason eingesetzt. Auch hier ist der wissenschaftliche Diskurs über die „First-line Option“ und die optimale Dosierung nicht abgeschlossen. Nach den aktuellen deutschen Leitlinien (015/069) wird die zweimalige i.m. Injektion von 12 mg Betamethason empfohlen (55). Bei weiterhin drohender, aber nicht stattgehabter Geburt berichtete 2011 eine großangelegte Cochrane-Studie von einem positiven Benefit für das perinatale Outcome bei einer Wiederholungsgabe der Steroide nach 7 Tagen

Fragestellung

(56). Die Empfehlung zur Wiederholungsgabe von Kortikosteroiden ist jedoch umstritten. Eine großangelegte, multizentrische kanadische Studie aus 2013 konnte im Outcome in einer Follow-up Untersuchung von 1719 Kindern keinen Unterschied zwischen der Gruppe von Kindern mit antenataler Wiederholungsgabe und der Gruppe ohne feststellen. Aufgrund dieser Studie und des scheinbar nicht vorhandenen Benefits wird in Deutschland bis heute, als Empfehlung, von einer Wiederholung der Betamethasongabe abgesehen (57).

Sowohl Betamethason als auch Dexamethason sind plazentagängig und erreichen so bereits intrauterin den fetalen Kreislauf (49). Dabei zeigen beide Substanzen sowohl mineralokortikoide – Hypertonie, Natrium- und Wasserretention, Kaliumverlust – als auch glucokortikoide – Induktion der Gluconeogenese, Proteolyse, Lipolyse, Immunmodulation – Wirkung und induzieren in der Lunge über eine vermehrte Proteinproduktion die Synthese von Phospholipiden und Surfactant (54).

In Studien mit Rhesus-Affen konnte festgestellt werden, dass über die Inhibition der Inflammationskaskade beide Kortikosteroide einen Beitrag zur Wehenhemmung leisten können (58). Der immunmodulatorische Effekt der Substanzen wurde bereits näher untersucht, jedoch sind bis heute manche Aspekte ihres Wirkmechanismus weiter ungeklärt.

2. Fragestellung

In dem der Abhandlung vorausgegangen experimentellen Arbeit sollte mittels eines *in vitro* Modells die Veränderung der Zytokinexpression fetaler mononukleärer Zellen durch Stimulation mit grampositiven Bakterien untersucht und der Einfluss verschiedener in der Geburtsmedizin relevanter Medikamente darauf analysiert werden.

Konkret stellten sich dabei folgende Fragen:

- 1.) Wie wirkt sich die *in vitro* Stimulation mit Bakterienlysaten von *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis* auf die Zytokinexpression fetaler mononukleärer Zellen aus?
- 2.) Welchen Einfluss hat der Zusatz des Prostaglandinsynthesehemmers Indometacin auf die Zytokinexpression? Gibt es einen Unterschied bezüglich proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine?

3.) Welchen Einfluss hat der Zusatz des Glucocorticoids Betamethason auf die Zytokinexpression? Gibt es einen Unterschied bezüglich proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine?

4.) Welchen Einfluss hat der Zusatz der Kombination von Indometacin und Betamethason auf die Zytokinexpression? Gibt es einen Unterschied bezüglich proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine? Wirken die beiden Medikamente antagonistisch oder synergistisch?

Die Ergebnisse der unter diesen Leitfragen durchgeführten Untersuchungen werden nachfolgend in der vorliegenden Arbeit im wissenschaftlichen Kontext erörtert und abschließend hinsichtlich möglicher klinischer Konsequenzen für das neonatale Outcome interpretiert und diskutiert.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die Erfassung der Auswirkung von Indometacin und Betamethason auf die Zytokinfreisetzung fetaler monokleärer Zellen nach Stimulation mit *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis* erfolgte experimentell durch eine *in-vitro* durchgeführte Studie.

Von zehn Nabelschnurblutspenden von reifgeborenen Einlingen wurden die benötigten monokleären Zellen, sogenannte CBMC (*cord blood mononuclear cells*), isoliert, und mit Indometacin und Betamethason beimpft. Nachfolgend wurden die Immunzellen mit grampositiven Bakterienlysaten aus *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis* stimuliert. Als Negativkontrolle dienten reine unbeimpfte Zellproben. Zur Differenzierung des rein bakteriellen Einflusses wurden Proben mit den fetalen Zellen und den Erregern angelegt. Die Proben wurden durch Zentrifugation von unnötigen Zellteilen befreit und die Überstände bis zur Vermessung in Eppendorf-Tubes bei -80 °C gelagert. Die Erfassung der Zytokinproduktion erfolgte durch die Firma Microbionix GmbH (München, Deutschland) mit der Luminex-Multiplex-Zytokin-Detektion.

3.2 Probenmaterial

3.2.1 Untersuchungsmaterial

Eingeschlossen in die Studie wurde Blutprobenmaterial aus Nabelschnüren von Neugeborenen, die nach der 37+0 Woche vaginal geboren wurden und bei denen während der Schwangerschaft laut Mutterpass keine Infektion vorlag bzw. in einem klinischen mikrobiologischen Abstrich nachgewiesen wurde.

Die Entnahme des Nabelschnurblutes erfolgte postpartal aus der *Vena umbilicalis* mit einem Nabelschnurblut-Entnahmesystem mit Zitratlösung. Das Blut, im Zitratbeutel gelagert, wurde nachfolgend bei Raumtemperatur ohne Zeitverzug ins mikrobiologische Labor der Universitätsklinik Regensburg transportiert, wo die Weiterverarbeitung des entnommen Blutes spätestens innerhalb von 12 Stunden erfolgen musste.

Die Entnahme erfolgt zwischen den Monaten März bis Mai 2010 in der Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Universität Regensburg-St. Hedwig.

3.2.1.1 Isolierung der fetalen mononukleären Zellen

Um die mononukleären Zellen aus dem entnommenen Blut verwenden zu können, wurden diese durch Pancoll-Dichtezentrifugation isoliert. Dazu wurde das Blut zunächst mit PBS-Lösung in einen 1:2 Verhältnis verdünnt und davon jeweils 30 ml, in 50 ml Falcons bei 15 ml vorgelegten Pancoll mit einer 10 ml Pipette überschichtet und austariert. Nach der Anleitung des Herstellers und durchgeführten Vorversuchen wurde nachfolgend der Gradient gefahren.

Dazu wurde das Gemisch bei 650 g ohne Bremse und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang zentrifugiert, wodurch im Falcon aufgrund unterschiedlicher Dichteverhältnisse der Blutbestandteile und des Pancolls drei Phasen absonderten. Die für die Versuche determinante Schicht, reich an mononukleären Zellen, zeichnete sich als weißer Film zwischen dem thrombozytenreichen Plasma und dem Pancoll ab.

Nachfolgend wurden Verunreinigungen entfernt. Dazu wurde der weißliche Film zunächst mit einer sterilen Glaspipette abgenommen und in ein weiteres Falcon mit 45 ml PBS zur Waschung überführt. Es erfolgte eine Grundwaschung durch Zentrifugation (bei 300 g mit Brem-

se und bei Raumtemperatur) für 10 Minuten, wobei die Überstände zügig abgekippt wurden. Das entstandene Pellet mit den Zellen wurde wieder in Lösung gebracht. Zur Abtrennung überständiger Erythrozyten wurde ein Erylysepuffer eingesetzt, der in der Herstellung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Die Erylyse erfolgte jeweils mit 3 ml des Puffers für 10 Minuten. Danach wurde das Gemisch erneut zweimal mit PBS gewaschen.

Zur Stabilisierung der nun isolierten CBMC wurden diese am Ende der Aufbereitungsphase mit einem T-Zell-Medium (TZM), jeweils 1 ml pro Falcon, versetzt, welches aus inaktivierten AB-Humanserum und RPMI im Verhältnis 1:10 hergestellt und mit 0,1 mg/ml Ampicillin gemischt wurde.

Um einen identischen Versuchsaufbau zu gewährleisten, wurden die Zellen mittels einer Neubauerzählkammer gezählt und einem Vitaltest mit Tryptanblau (0.2 % in NaCl-Lösung) unterzogen. Pro Ansatz (Well) wurden $2,6 \times 10^5$ Zellen eingesetzt. Zellsuspensionen, welche mehr als 10 % tote Zellen enthielten, wurden verworfen.

3.2.2 Stimulanzen

Die zur Stimulation benötigten grampositiven Bakterienlysate wurden an der Hedwigsklinik Regensburg aus Probematerial einer Abstrichuntersuchung einer 29-jährigen Patientin (ID:33866436) hergestellt. Die Isolation erfolgte am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg. In Kooperation mit Lophius Biosciences GmbH (Regensburg, Deutschland) wurden die isolierten Stämme aufgereinigt. Zunächst wurden dazu die Bakterienstämme auf Mueller-Hinton-Agar-Platten ausgestrichen, wobei im Falle von *Streptococcus agalactiae* ein fünfprozentiges Blutnährmedium hinzugefügt wurde. Nach erfolgreichem Wachstum wurde jeweils eine Kolonie von *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis* zur erneuten Kultivierung ausgewählt und über Nacht in 5 ml LB-Medium, geschüttelt bei 220 rpm und 37 °C, inkubiert. Danach wurde jeweils eine 1-Liter-Lösung LB-Medium mit 7,5 ml bis 10 ml der Bakteriensuspension beimpft und diese erneut für 16 Stunden bei 37 °C, geschüttelt bei 150 rpm, inkubiert. Zur Herstellung eines umfangreichen Pellets wurden die Medien nachfolgend bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 10 bis 20 ml PBS-Lösung resuspendiert. Die Lyse der Bakterienstämme erfolgte in einer French-Press bei 1,5 kbar und 3 °C. Das Lysat wurde zum Schluss aliquotiert und bei -20 °C bis zu den Stimulationsversuchen gelagert. Um ein eventuelles

Wachstum einzelner Bakterien in den Lysaten zu vermeiden, wurde den jeweiligen Stimulationen Ampicillin als Wachstumshemmer hinzugefügt.

3.2.2.1 Konzentrationsbestimmung der Stimulanzen

Um eine Veränderung der Zytokinausschüttung durch Indometacin und Betamethason adäquat darstellen zu können, wurde in Vorversuchen über die Bestimmung von zehn Zytokinen bei zwei Nabelschnurblutproben eine Konzentration für die einzelnen Erreger gewählt, die unterhalb des physiologisch stimulierten Konzentrationsmaximums der Zytokine lag und die bei der Zellpopulationszahl von $2,6 \times 10^5$ Zellen pro Well die größtmögliche Modulation der Zytokinproduktion erlaubte. Dazu wurden fünf Konzentrationen des jeweiligen Erregers über eine Verdünnungsreihe angesetzt und die CBMCs nach dem im Kapitel 3.2.1.1 bereits beschriebenen Verfahren aufbereitet. Angelehnt an die eigentlichen Stimulationsversuche wurde 100 μl CBMC-Suspension ($2,6 \times 10^5$ Zellen/Well) in zwei 96-Well-Platten vorgelegt, mit jeweils 10 μl der Bakterienlysate oder als Negativkontrolle mit 10 μl TZM-Lösung versetzt und für 36 Stunden inkubiert. Nachfolgend wurde, wie im nächsten Unterpunkt detailliert beschrieben, die Suspension von Zellteilen befreit und die einzelnen Zytokinkonzentrationen bestimmt. Nach Analyse des Zytokinprofils wurde eine Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pro Well für beide Bakterienstämme festgelegt. Beispielhaft ist in Abb. 3-1 das Zytokinprofil von IL-6, unterteilt nach Erregern, zur Veranschaulichung dargestellt.

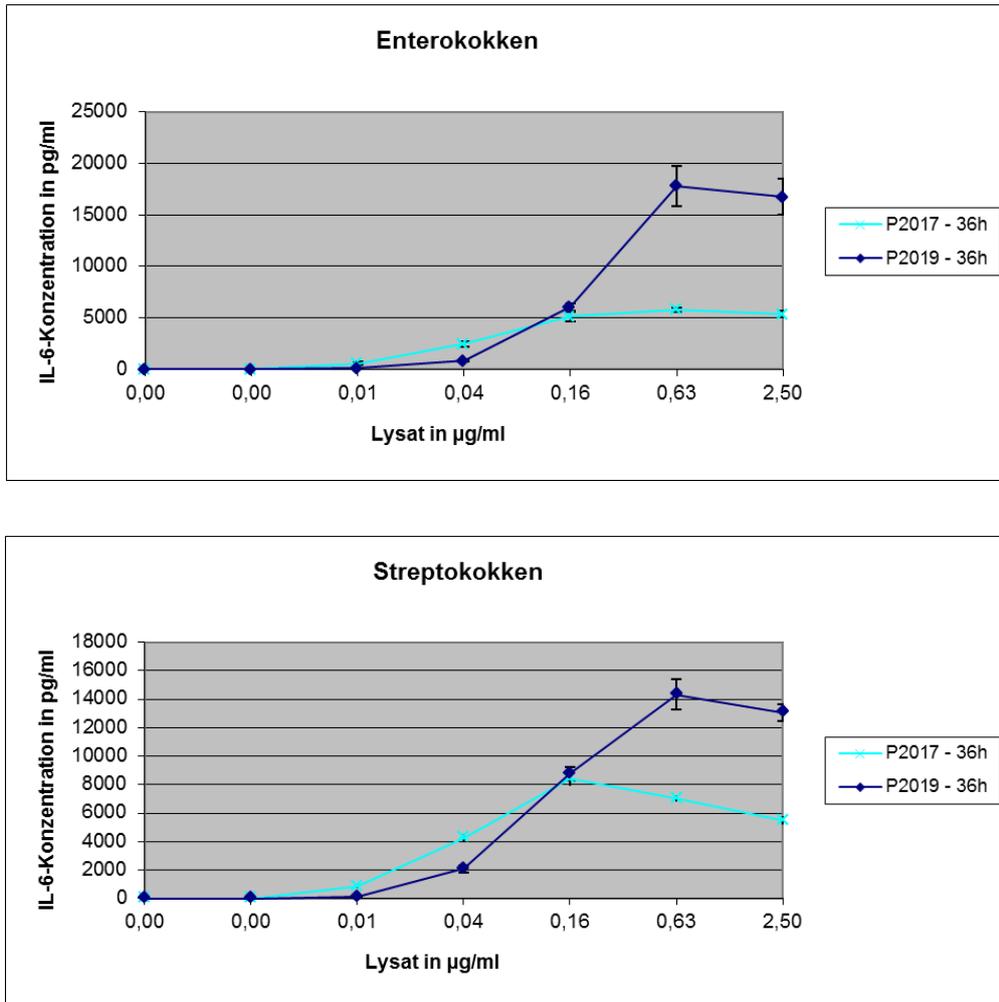


Abbildung 3-1: Darstellung von IL-6. Lysate von *S. agalactiae* und *E. faecalis* in 5-facher Verdünnung. Zwei Nabelschnurblutproben (P2017, P2019), jeweils drei Ansätze für jede Konzentration. Festlegung der Lysatkonzentration von 0,1 µg/ml bei ansteigender Zytokinexpression.

3.2.3 Ansatz der Zellkultur und Stimulation der fetalen mononukleären Zellen

Für den eigentlichen Versuchsaufbau der Stimulation wurden, jeweils separat für die Streptokokkenlysate- und die Enterokokkenlysate-Versuchsordnung, zwei Wells-Aufpipetierplatten mit CBMCs angelegt. Insgesamt wurden 68 Wells pipettiert. Jeder Einzelversuch, außer den jeweiligen Zellkontrollen, enthielt bei einem Gesamtvolumen von 260 µl mononukleäre Zellen, Betamethason, Indometacin, einzeln oder in Kombination und je nach Versuchsreihe, versetzt mit *Streptococcus agalactiae*- oder *Enterococcus faecalis*-Lysat.

Material und Methoden

Im Ansatz befanden sich jeweils $2,6 \times 10^5$ Zellen/Well Betamethason in einer Konzentration von 0,08 $\mu\text{g/ml}$, Indometacin in drei verschiedenen Konzentrationen (3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,3 $\mu\text{g/ml}$ zur besseren Differenzierung), und Strepto- und Enterokokkenlysate in einer Konzentration von jeweils 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Jeder Einzelversuch erfolgte in viermaliger Wiederholung (s. Abb. 3-2).

Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
+	+	+	+	+	+	+	+	
SK	SK+BM	SK+IM3	SK+IM1	SK+IM0,3	SK+BM+IM3	SK+BM+IM1	SK+BM+IM0,3	Z
Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	TZM
+	+	+	+	+	+	+	+	
EK	EK+BM	EK+IM3	EK+IM1	EK+IM0,3	EK+BM+IM3	EK+BM+IM1	EK+BM+IM0,3	
TZM	TZM	TZM	TZM	TZM				

Abbildung 3-2: Pipettierschema des Versuchsaufbaus. Pipettierte Wells: 68. Z = Zellen, SK = Streptokokken, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 $\mu\text{g/ml}$), IM1 = Indometacin (1 $\mu\text{g/ml}$), IM0,3 = Indometacin (0,3 $\mu\text{g/ml}$). Farbliche Schattierung gibt Wiederholung an.

Zur Versuchsdurchführung wurden die CBMCs zunächst mit Betamethason und Indometacin für eine Stunde vorinkubiert, um dann mit den Lysaten versetzt zu werden. Die einzelnen Wells wurden mit T-Zellmedium auf das Gesamtvolumen von 260 µl ausgeglichen und für 24 Stunden weiter inkubiert. Dann wurden die Überstände abgenommen, in Eppendorf-Tubes übergeführt und für zehn Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das Pellet mit den festen Zellbestandteilen wurde verworfen und der Überstand bei -80 °C zur Analyse gelagert. Die für die Untersuchungen benötigten Materialien und Geräte sind im Folgenden detailliert aufgelistet.

3.2.4 Medikamente

- Celestan soluble 4 mg (Betamethason), Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
- Confortid 50 mg (Indometacin), Alparma ApS, Kopenhagen, Dänemark
- Ampicillin-ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

3.2.5 Reagenzien, Medien und Puffer

- Aqua B. Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Pancoll, 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
- Pancoll human, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
- PBS, phosphate buffered saline, Lonza, Verviers, Belgien
- RPMI-Medium with L-Glutamine, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- 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
- Mueller-Hinton-Agar, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland.

3.2.6 Reaktionskits

- Human/Mouse TGF-β1 ELISA Ready-SET-Go, eBioscience

Material und Methoden

- 5plex mit GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α (LHC0003), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-12 p40/p70 (LHC0121), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- MCP1 (LHC1011), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-1 β (LHC0011), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- TNF- α (LHC3011), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-8 (LHC0081), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-6 (LHC0061), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IL-10 (LHC0101), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- IFN γ (LHC 4031), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- MIP-1 α (LHC1021), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- MIP-1 β (LHC1051), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- Extrazellulärer Pufferkit (LHB0001), Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

3.2.7 Versuchsmaterialien

- 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 μ l/200 μ l/1,0 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Zitratbeutel, Macopharma, Mouvaux, Frankreich

3.2.8 Geräte

- Inkubator, Cellsafe, Integra Biosciences Inc., USA
- Hochdruck-Zellaufschlußsystem Modell Basic-Z, 0,75 KW, Costant-Systems Ltd, England
- Luminex xMAP® 100™, Luminex Corporation, Austin, Texas, USA
- Mikroskop, Axiostar plus, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
- Pipetten 10 μ l/100 μ l/200 μ l/1ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Große Pipette, Sarstedt, Nürnbrecht, 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 für Falcons, (Heraeus Multifuge 3SR Plus), Heraeus, Hanau, Deutschland
- Zentrifuge für Eppendorf-Tubes (Heraeus Biofuge Pico), Heraeus, Hanau, Deutschland
- Kühlschrank
- -80 °C Gefrierschrank
- Einfrierbox

3.3 Analyseverfahren

- Liquichip™-Analyser-Software, Qiagen GmbH, Deutschland
- Microsoft Office 2007 (Word, Excel, Powerpoint), Microsoft Office 2010 (Word, Excel, Powerpoint)
- SPSS 19, 20®

3.3.1 Zytokinbestimmung mittels Luminex xMAP® Technologie

Zur Bestimmung der einzelnen Zytokinkonzentrationen wurde die Luminex xMaP® Technologie eingesetzt. Die Quantifizierung der Parameter erfolgte durch die Firma Microbionix GmbH (München, Deutschland). Dieses immunologische Verfahren, welches durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion eine genaue Analyse der Konzentrationsmengen von Proteinen ermöglicht, ähnelt der ELISA (*Immun-Linked Immunosorbent Assay*) Technologie. In der Anwendung benutzt es jedoch zur simultanen Bestimmung mehrerer Parameter sogenannte Beads, kleine Polystyrol-Kugeln, die mit zytokinspezifischen Antikörpern bestückt sind und sich durch verschiedene Fluoreszenzstoffe in der Färbung unterscheiden. Die Probenüberstände wurden hierfür aufgetaut, aufgeschüttelt und bei 4200 g für 10 min zentrifugiert. Gleichzeitig wurde eine 96-Well-Filterplatte mit 200 µl/Well Waschpuffer befeuchtet und der Puffer anschließend mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die Beads wurden mit einem

Material und Methoden

Waschpuffer im Verhältnis von 1:20 verdünnt und aufgeschüttelt. Danach wurden je 50 µl der Lösung in die einzelnen Wells gegeben und zweimal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Überständige Lösung wurde mittels einer Vakuumpumpe entfernt. Nachdem die einzelnen Testkomponenten aufgearbeitet wurden, wurde pro Well 50 µl Inkubationspuffer vorgelegt und anschließend je 50 µl Assay Diluent und je 50 µl der Probe-Lösung hinzugegeben. Für den Standard wurden zu den 50 µl Inkubationspuffer je 100 µl der Standardlösung, mit jeweils 7 Standardkonzentrationen pipettiert, welche in einer 1:3 Verdünnungsreihe hergestellt und in einem 1:1 Gemisch aus Assay Diluent und Zellkulturmedium aufgelöst wurden. Nachfolgend wurde die Platte abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei 600 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Platte zweimal gewaschen. Zur Detektion der einzelnen Antikörper-Antigen-Reaktionen wurden je 100 µl eines biotinylierten Antikörper-Gemisches hinzu pipettiert. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurden nach erneuter zweimaliger Waschung 100 µl Streptavidin-RPE hinzugegeben. RPE (Fluorchrom-R-Phycoerytin) ist eine Phycobilliprotein, das aus roten Algen gewonnen wird und als Fluoreszenz erkannt werden kann. Streptavidin wurde als Bindungsprotein eingesetzt. Streptavidin-RPE verbunden mit dem Biotinkonjugierten Antikörper ergab ein Fluoreszenzsignal, das zusammen mit dem Fluoreszenzsignal der Beads mit einem dualen Lasersystem detektiert werden konnte (Abb. 3-3).

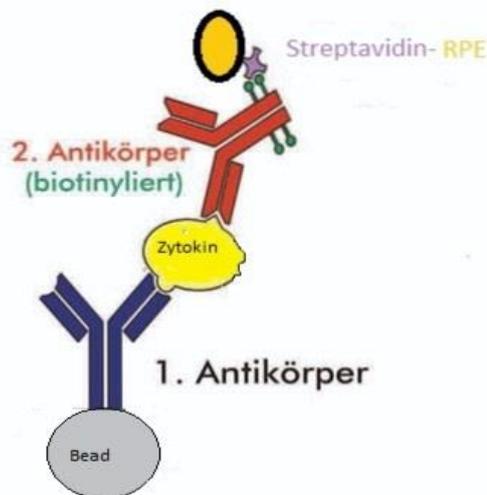


Abbildung 3-3: Prinzip der Luminex xMAP Technologie

Nach dreimaligen Waschvorgang erfolgt die Analyse der Farbsequenzen über das Luminex xMAP® 100™ Detektionsgerät. Der duale Argon-Laser klassifizierte die spezifischen Farbcodes der Beads und erstellte anhand einer 100 Bead-Population die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI). Unter Anwendung der Liquidchip™-Analyse-Software von Qiagen (Hilden, Deutschland) konnten anhand der Standardkurven und der mittleren Fluoreszenzintensitäten die absoluten Zytokinkonzentrationen bestimmt werden. Die Konzentrationen der Zytokine IL-8, INF- γ , IL-1 β und MCP-1, MIP-1 β , IL-6, IL-10, TNF α nach vier und 24 Stunden, IL-12 nach vier und 24 Stunden und MIP-1 α wurden im Zellkulturüberstand zunächst bei fünf Nabelschnurblutproben vermessen. Nach weiterer Analyse wurde dann von fünf weiteren Nabelschnurblutproben die Zytokine IL-6, IL-10, TNF α nach 24 Stunden, IL-12 nach 24 Stunden und MIP-1 α bestimmt. Für die genaue Vermessung von IL-8 und MCP-1 wurde aufgrund von zu hohen Konzentrationen pro ml, die sich außerhalb des messbaren Bereiches befanden, von den Proben eine einheitliche Verdünnung von 1:100 hergestellt und diese Zytokine erneut vermessen.

3.3.2 Statistische Auswertung der Daten

Die Ergebnisse wurden weiterführend analysiert und über Microsoft Office Excel 2007 aufgezeichnet. Das Luminex-Detektionsgerät kodifizierte für jeden Wert gleich oder unterhalb/oberhalb eines messbaren Bereiches eine „Low“- oder „High“- Messung. Diese wurden in Vorbereitung zur statistischen Auswertung durch die vorgegebenen Grenzwerte des möglichen Messbereiches für die einzelnen Zytokine ersetzt. Die Analyse erfolgte über das statische Programm IBM SPSS 19, 20® mit den parameterfreien Test nach Wilcoxon für zwei unabhängige Stichproben und den nicht-parametrischen Test nach Kruskal-Wallis für zwei oder mehr unabhängige Stichproben.

4. Ergebnisse

4.1 Die Basisexpression von Zytokinen bei unstimulierten fetalen mononukleären Zellen

Um den Einfluss von Indometacin und Betamethason auf die Zytokinfreisetzung von IL-6, IL-10, MiP-1 α , TNF, IL-12, IL-8, MCP-1, MiP-1 β , INF- γ und IL-1 β von Lysat-stimulierten mononukleären Zellen darzustellen, wurden als Basiswert für die einzelnen Zytokine in den Versuchsreihen Überstände unstimulierter CBMCs vermessen. Das Zytokin IL-8 wies dabei als einziges Zytokin bei einem Mittelwert von 338,4 pg/ml eine markante Grundexpression auf. Für die anderen Zytokine zeigte sich, dass die Zytokinfreisetzungen unstimuliert unterhalb der Nachweisgrenze lagen oder sich in einem sehr niedrigen Bereich befanden. Diese Ausschüttungen lagen bei allen Zytokinen außer INF- γ und IL-12 nach vier Stunden weit unter den stimulierten Werten und sind nachfolgend in Kapitel 4.4 in der Abbildung dargestellt.

4.2 Der Einfluss von Indometacin und Betamethason auf die unstimulierten Zellen

Auch ein eventueller Einfluss von Indometacin, Betamethason und Ampicillin auf die Zytokinproduktion der CBMC wurde in Vorversuchen näher betrachtet. Bei der Vermessung von zwei Nabelschnurblutspenden in je einem vierfachen Ansatz zeigte sich, dass die Versuchskomponenten Betamethason und Indometacin allein bei den meisten Zytokinen keinen Einfluss auf die Freisetzung hatten. Im Falle von IL-10, TNF und IL-12 konnte zwar eine Signifikanz innerhalb der Testung nach Kruskal-Wallis gesehen werden, diese war jedoch der Verteilung der Werte geschuldet. Die Veränderung der Freisetzung war so gering, dass von keiner inhaltlich relevanten Beeinflussung auszugehen ist (siehe diesbezüglich Tabelle 4-2, in der die Werte der Zytokinausschüttung von IL-10, TNF und IL-12 im Mittelwert dargestellt sind). Dabei ist eine geringe Streuung der Werte klar ersichtlich.

Ergebnisse

	Signifikanz (p)
IL-12	,000
TNFα	,012
IL-10	,000
MIP-1a	,086
MIP-1b	,062
MCP 1	,414
IFN γ	1,000
IL-1b	,406
IL-8	,133
IL-6	,201

Tabelle 4-1: Statistische Auswertung nach Kruskal-Wallis, Bestimmung der p-Werte (Signifikanz) in Bezug auf die unstimulierten Zellproben (Z), $p > 0,05$ Nullhypothese ist abzulehnen (statische Signifikanz nicht gegeben), **Fett** (IL-12, TNF α , IL-10) $p < 0,05$, siehe diesbezüglich nachfolgende Tabellenanordnung 4-2.

	N	Mittelwert	Standardabweichung		N	Mittelwert	Standardabweichung
IL12 (Z)	10	13,1500	,68516	TNF (Z)	10	5,1100	2,85675
IL12 (Z+BM)	2	12,5000	,00000	TNF (Z+BM)	2	3,3875	1,39654
IL12 (Z+IM3)	2	12,5000	,00000	TNF (Z+IM3)	2	2,4000	,00000
IL12 (Z+IM1)	2	12,5000	,00000	TNF (Z+IM1)	2	3,2112	1,14728
IL12 (Z+IM0,3)	2	12,5000	,00000	TNF (Z+IM0,3)	2	2,4138	,01945
IL12 (Z+BM+IM3)	2	12,5000	,00000	TNF (Z+BM+IM3)	2	2,4000	,00000
IL12 (Z+BM+IM1)	2	12,5000	,00000	TNF (Z+BM+IM1)	2	3,3875	1,39654
IL12 (Z+BM+IM0,3)	2	12,5000	,00000	TNF (Z+BM+IM0,3)	2	7,5738	7,31679

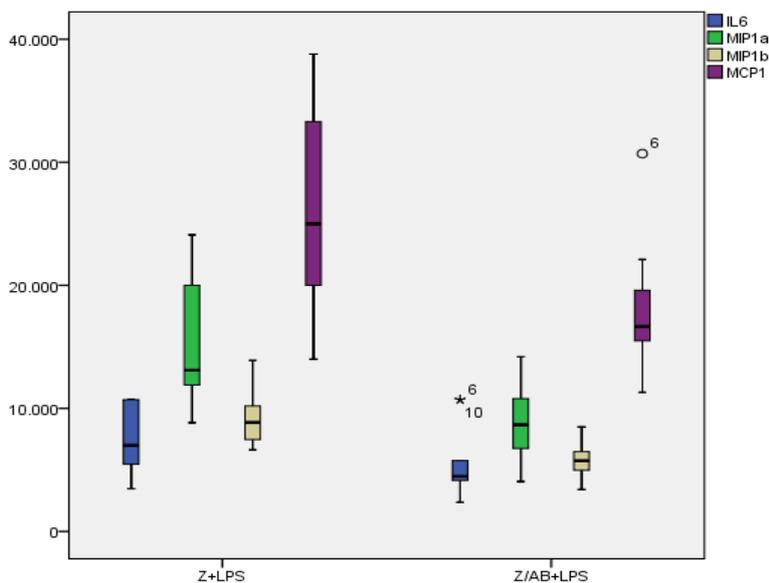
	N	Mittelwert	Standardabweichung
IL10 (Z)	10	16,5000	,52705
IL10 (Z+BM)	2	16,0000	,00000
IL10 (Z+IM3)	2	16,0000	,00000
IL10 (Z+IM1)	2	16,0000	,00000
IL10 (Z+IM0,3)	2	16,0000	,00000
IL10 (Z+BM+IM3)	2	16,0000	,00000
IL10 (Z+BM+IM1)	2	16,0000	,00000
IL10 (Z+BM+IM0,3)	2	16,0000	,00000

Tabelle 4-2: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung, N = Probenanzahl, Z = Zellen, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$, IM1 = Indometacin in der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ und IM0,3 = Indometacin in der Konzentration 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Alle Werte zeigen ein niedriges Freisetzungsniveau der Zytokine mit geringer Streuung. Vergleiche diesbezüglich auch Tabelle 4-4.

4.3 Der Einfluss von Antibiotika auf einen LPS-stimulierten Versuchsaufbau

Nach den Vorversuchen mit den Versuchskomponenten Betamethason und Indometacin erfolgten separate Vorversuche, um die Beeinflussung der antibiotischen Versuchskomponente näher zu beleuchten. Hierzu wurde die Antibiotikakombination Penicillin und Streptomycin bei dem in Kapitel 3 beschriebenen Versuchsaufbau in zwei mit LPS stimulierten Versuchsreihen eingesetzt und unter anderem die Zytokine IL-6, MiP-1 α , MCP-1, MiP-1 β gemessen. Wie in den Arbeiten von Brooks et al. und Van Velm et al. konnte in den Versuchsreihen besonders im Falle von MiP-1 α , MiP-1 β und MCP-1 eine signifikante Reduktion der Zytokinausschüttung beobachtet werden (59). Im Falle von IL-6 zeigte sich jedoch keine signifikante Hemmung der Konzentration. Diese Erkenntnis wurde in die spätere Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen.

	IL6	MIP1a	MIP1b	MCP1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,094	,008	,001	,019
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,105	,007	,001	,019



Ergebnisse

Tabelle 4-3: Zytokinfreisetzung von IL-6, MiP-1a, MiP-1b und MCP-1 von zwei Nabelschnurblutproben, Zytokinkonzentrationen in pg/ml, Z = Zellen, AB = Antibiotikum. Im Falle von MiP-1 α , MiP-1 β und MCP-1 zeigen Z/AB+LPS deutlich niedrigere Werte als Zellen stimuliert ohne AB. Im Falle von IL-6 ist dies außerhalb des Signifikanzniveaus.

4.4 Grampositive Bakterien und ihr Einfluss auf die Zytokinexpression von mononukleären Zellen

Stimuliert mit den Bakterienlysaten von *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis*, wurde die Freisetzung von IL-10, IL-6, TNF nach 24 Stunden, IL12 nach 24 Stunden und MiP-1 α signifikant gesteigert ($p = 0,005$). Die Expression von IL-8, IL-1 β , MCP-1, MiP-1 β und TNF nach vier Stunden war bei beiden Bakterienlysaten signifikant ($p = 0,043$). Die Ausschüttung von INF- γ und IL-12, gemessen nach vier Stunden, wurde dagegen durch die Bakterienlysate nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,5$). Siehe hierzu Tabelle 4-4, in der über die Mittelwertberechnungen die Ergebnisse ersichtlich sind.

Stimulation mit Enterokokken und Streptokokken

Zytokine	Z.MW	Z.Std	ZEK.MW	ZEK.Std	ZSK.MW	ZSK.Std
IL10	16.50	.50	75.70	32.40	88.90	47.80
IL12_24	13.20	.70	1167.70	383.40	1074.60	338.20
IL12_4	61.60	12.50	80.90	57.80	55.10	.00
IL6	6.30	3.70	2770.10	1729.10	3356.30	2201.40
IL8	338.40	363.10	85610.00	65262.40	800.40	75486.90
IL1b	4.80	.00	676.00	317.20	676.60	314.90
INF γ	2.40	.00	2.60	.40	2.40	.00
MCP1	8.30	.00	30427.00	28941.10	29343.50	30043.20
MIP1a	20.90	10.70	5168.60	1862.40	6341.30	2064.80
MIP1b	54.40	52.60	7356.50	2069.10	8071.50	2391.50
TNF_24	5.10	2.80	1051.60	460.20	814.30	251.00
TNF_4	33.70	28.30	207.50	116.10	290.40	184.90

Tabelle 4-4: Zytokinsekretion in pg/ml, reine Zellproben bzw. unter Lysat-Stimulation nach vier- bzw. 24-stündiger Inkubation. Darstellung als Mittelwerte. Z = Zellen, EK = Enterokokken, SK = Streptokokken, MW = Mittelwert, Std = Standardabweichung. Fünf bzw. zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. Qualitative Darstellung vergleiche Kapitel 4.5.

4.5 Indometacin und Betamethason und deren Einfluss auf lysat-stimulierte mononukleäre Zellen

Ziel der Versuche war es, die Wirkung von Indometacin und Betamethason auf die Zytokin-freisetzung von fetalen mononukleären Zellen nach Stimulation mit grampositiven Erregern zu untersuchen. Die Analyse dieser Versuche wird im Folgenden nach Zytokin- und Erregergruppe dargestellt.

4.5.1 Veränderung der proinflammatorischen Zytokine

4.5.1.1 IL-8

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Stimuliert mit *Enterococcus faecalis* wurde die IL-8 Freisetzung signifikant durch Indometacin (1 µg/ml) und Betamethason in Kombination mit Indometacin(1 µg/ml und 0,3 µg/ml) gehemmt. Allgemein konnten stimuliert hohe Mengen an IL-8 gemessen werden. Eine Nabelschnurprobe fiel dabei durch sehr hohe Werte auf, zeigte aber auf diesem hohen Niveau ähnliche Veränderungen auf die Medikamente wie die anderen Nabelschnurblutproben.

IL-8		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,225
	Z+EK+IM3	,080
	Z+EK+IM1	,043
	Z+EK+IM0,3	,225
	Z+EK+BM+IM3	,080
	Z+EK+BM+IM1	,043
	Z+EK+BM+IM0,3	,043

Tabelle 4-5: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+EK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

Ergebnisse

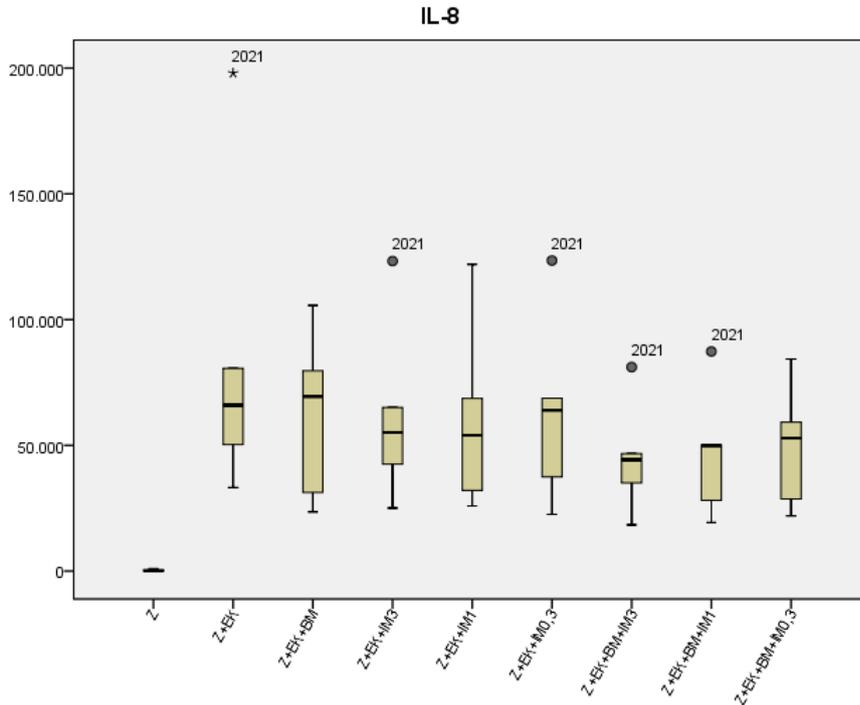


Tabelle 4-6: Veränderung der IL8-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2021 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

Stimulation mit *Streptococcus agalactiae*

Ein anderes Bild zeigt sich innerhalb der Stimulationsversuche mit *Streptococcus agalactiae*. Hier hemmte die Inkubation mit Betamethason und Indometacin (3 µg/ml) und die Kombination von Betamethason und Indometacin in allen Konzentrationen signifikant die IL-8 Produktionen. Eine Nabelschnurprobe reagierte auch hier mit sehr viel höheren IL-8 Konzentrationen als die anderen Zellproben. Inkubiert mit den Medikamenten wurde aber auch in dieser Zellprobe die Ausschüttung an IL-8 signifikant gehemmt.

Ergebnisse

IL8

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,043
	Z+SK+IM3	,043
	Z+SK+IM1	,080
	Z+SK+IM0,3	,138
	Z+SK+BM+IM3	,043
	Z+SK+BM+IM1	,043
	Z+SK+BM+IM0,3	,043

Tabelle 4-7: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

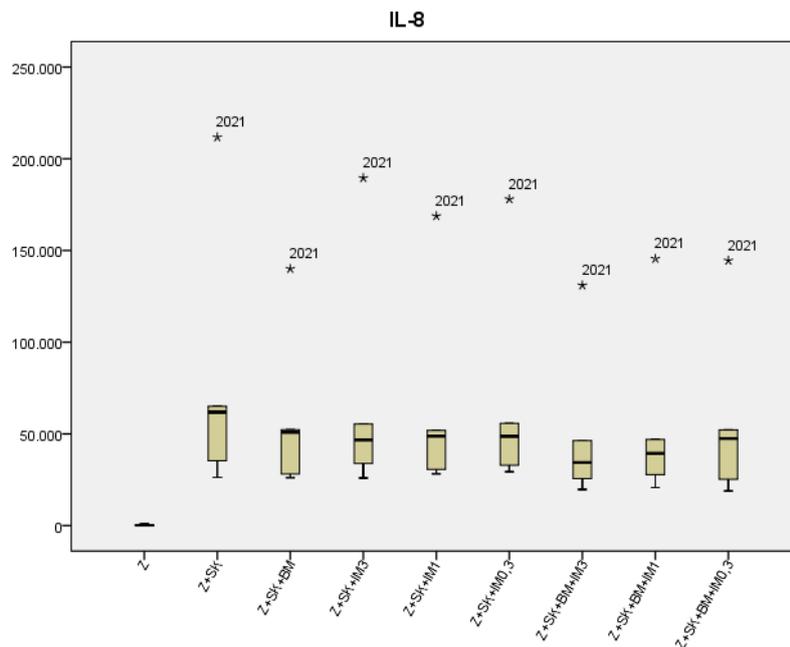


Tabelle 4-8: Veränderung der IL-8-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2021 = Probennummern Nabelschnurblutproben.

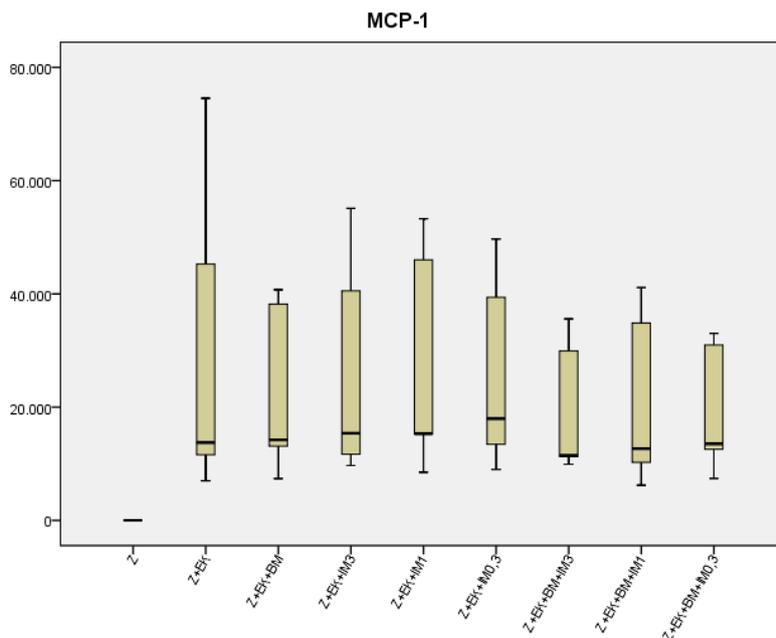
4.5.1.2 MCP-1

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Messungen der MCP-1-Konzentrationen, inkubiert mit den Medikamenten, zeigten (Anzahl der Nabelschnurproben n = 5) keine signifikante Veränderung zu den stimulierten Zellproben ohne Medikamentenzugabe. Die Werte aller Proben befanden sich innerhalb der normalen Standardabweichung, zeigten jedoch eine große Varianz in der Messung.

MCP-1		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,345
	Z+EK+IM3	,500
	Z+EK+IM1	,500
	Z+EK+IM0,3	,686
	Z+EK+BM+IM3	,225
	Z+EK+BM+IM1	,138
	Z+EK+BM+IM0,3	,500

Tabelle 4-9: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf Nabelschurproben, je vier Stimulationsansätze.



Ergebnisse

Tabelle 4-10: Veränderung der MCP-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

Stimulation durch *Streptococcus agalactiae*

Angeregt mit den Streptokokkenenerregern hemmt die kombinierte Gabe von Betamethason und Indometacin in allen Konzentrationen die Zytokinausschüttung signifikant. Auch hier zeigte eine Nabelschnurprobe höhere Werte als die anderen Nabelschnurproben. Eine Minderung der MCP-1 Konzentration zeigte sich jedoch auch in dieser fetalen mononukleären Zellprobe.

MCP-1		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,225
	Z+SK+IM3	,686
	Z+SK+IM1	,500
	Z+SK+IM0,3	,893
	Z+SK+BM+IM3	,043
	Z+SK+BM+IM1	,043
	Z+SK+BM+IM0,3	,043

Tabelle 4-11: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf Nabelschurproben, je vier Stimulationsansätze.

Ergebnisse

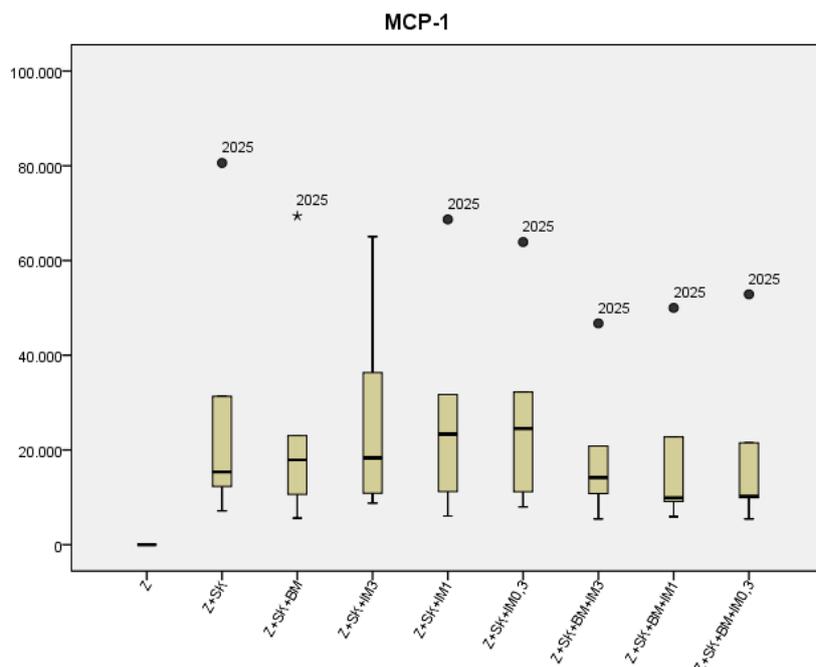


Tabelle 4-12: Veränderung der MCP-1-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2025 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

4.5.1.3 IFN- γ

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Wie bereits beschrieben, konnte die Konzentration von IFN- γ durch die Enterokokkenerreger nicht signifikant stimuliert werden. Diese Tatsache zeigte sich auch in den Versuchsanordnungen mit den Medikamenten. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Konzentrationen gemessen werden.

Ergebnisse

IFNγ		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,317
	Z+EK+IM3	,317
	Z+EK+IM1	,180
	Z+EK+IM0,3	1,000
	Z+EK+BM+IM3	,317
	Z+EK+BM+IM1	,317
	Z+EK+BM+IM0,3	,317

Tabelle 4-13: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 $\mu\text{g/ml}$), IM1 = Indometacin (1 $\mu\text{g/ml}$), IM0,3 = Indometacin (0,3 $\mu\text{g/ml}$). Fünf Nabelschurproben, je vier Stimulationsansätze.

Stimulation durch *Streptococcus agalactiae*

Auch durch die Stimulation der Streptokokkenerreger konnte die IFN- γ -Konzentration nicht gesteigert werden. In den Versuchsproben mit Indometacin in der höchsten Konzentration konnte eine Signifikanz festgestellt werden. Jedoch basiert diese Signifikanz darauf, dass jeweils in jeder der fünf vermessenen Nabelschnurproben in zwei Probenwiederholungen ein Wert oberhalb des Grenzwertes von 2,4 pg/ml gemessen wurde. Diese Werte überstiegen jedoch eine Konzentration von 10 pg/ml nicht. Dies ist eine sehr geringe Zytokinfreisetzung, welche eine signifikante Veränderung in Frage stellt.

IFNγ		
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Z+SK+BM	,157
	Z+SK+IM3	,043
	Z+SK+IM1	,144
	Z+SK+IM0,3	,078
	Z+SK+BM+IM3	1,000
	Z+SK+BM+IM1	,223
	Z+SK+BM+IM0,3	1,000

Tabelle 4-14: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 $\mu\text{g/ml}$), IM1 = Indometacin (1 $\mu\text{g/ml}$), IM0,3 = Indometacin (0,3 $\mu\text{g/ml}$). Fünf Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

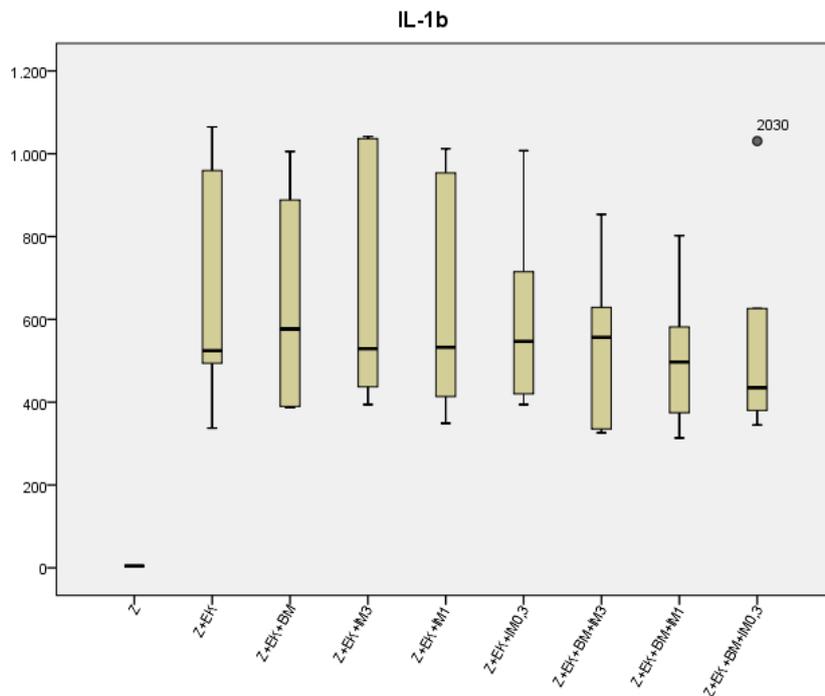
4.5.1.4 IL-1 β

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Die Zytokinfreisetzung von IL-1 β wurde durch die Zugabe der beiden Medikamente nicht signifikant beeinflusst. Sowohl Betamethason als auch Indometacin hemmten die Zytokinfreisetzung nicht.

IL1b		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,686
	Z+EK+IM3	,686
	Z+EK+IM1	,686
	Z+EK+IM0,3	,686
	Z+EK+BM+IM3	,138
	Z+EK+BM+IM1	,225
	Z+EK+BM+IM0,3	,345

Tabelle 4-15: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 μ g/ml), IM1 = Indometacin (1 μ g/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 μ g/ml). Fünf Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.



Ergebnisse

Tabelle 4-16: Veränderung der IL-1 β -Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 μ g/ml), IM1 = Indometacin (1 μ g/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 μ g/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2030 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

Stimulation durch *Streptococcus agalactiae*

Die Kombination von Betamethason und Indometacin 1 μ g/ml hemmte die Zytokinfreisetzung von IL-1 β signifikant. Alle anderen Versuchsanordnungen wiesen keine markanten Unterschiede in der Konzentration auf. In einer Nabelschnurprobe wurden erheblich höhere Konzentrationen an IL-1 β gemessen. Diese Probe zeigte sich aber im Verlauf zu den anderen Proben ähnlich reaktiv und zeigte geringere Werte in den Versuchsanordnungen mit den Medikamenten.

IL1b		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,345
	Z+SK+IM3	,500
	Z+SK+IM1	,686
	Z+SK+IM0,3	,686
	Z+SK+BM+IM3	,138
	Z+SK+BM+IM1	,043
	Z+SK+BM+IM0,3	,138

Tabelle 4-17: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 μ g/ml), IM1 = Indometacin (1 μ g/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 μ g/ml). Fünf Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

Ergebnisse

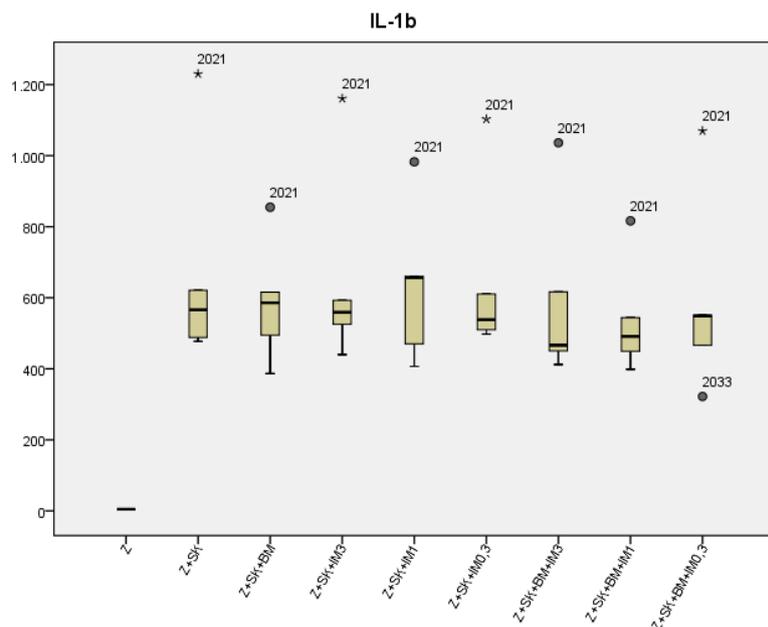


Tabelle 4-18: Veränderung der IL-1 β -Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 μ g/ml), IM1 = Indometacin (1 μ g/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 μ g/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2021 und 2033 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

4.5.1.5 MiP-1 β

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Auch die Zytokinfreisetzung von MiP-1 β wurde durch die beiden Medikamente nicht signifikant beeinflusst, weder durch Betamethason noch durch Indometacin.

MiP1b		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,686
	Z+EK+IM3	,225
	Z+EK+IM1	,893
	Z+EK+IM0,3	,893
	Z+EK+BM+IM3	,345
	Z+EK+BM+IM1	,500
	Z+EK+BM+IM0,3	,893

Ergebnisse

Tabelle 4-19: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+EK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

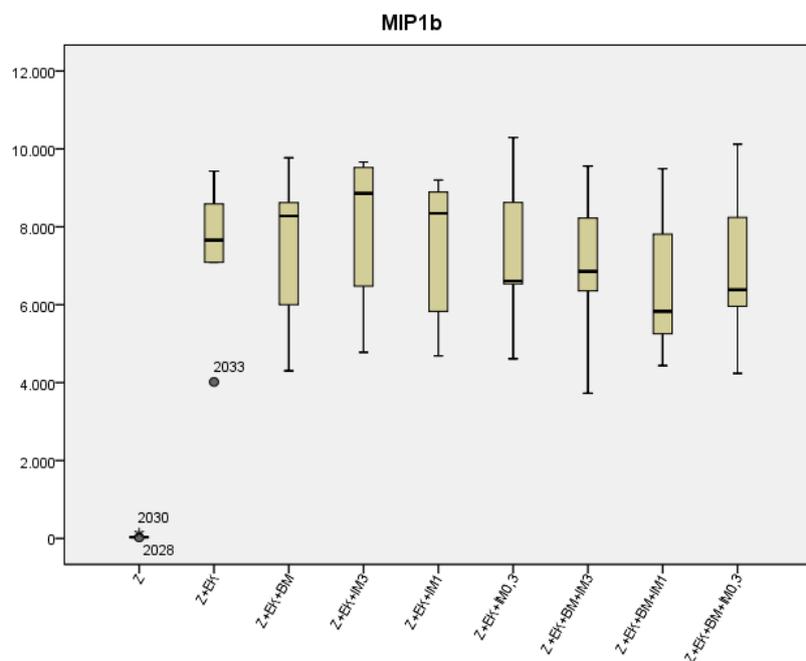


Tabelle 4-20: Veränderung der MiP-1β-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2030, 2028 und 2033 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

Stimulation mit *Streptococcus agalactiae*

Wie im Falle von IL-1β hemmte die Kombination von Betamethason und Indometacin 1 µg/ml die Zytokinfreisetzung von MiP-1β signifikant. Alle anderen Versuchsproben wiesen keine statistisch relevanten Unterschiede in der Konzentration auf.

Ergebnisse

MiP1b

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,500
	Z+SK+IM3	,345
	Z+SK+IM1	,893
	Z+SK+IM0,3	,500
	Z+SK+BM+IM3	,893
	Z+SK+BM+IM1	,043
	Z+SK+BM+IM0,3	,225

Tabelle 4-21: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

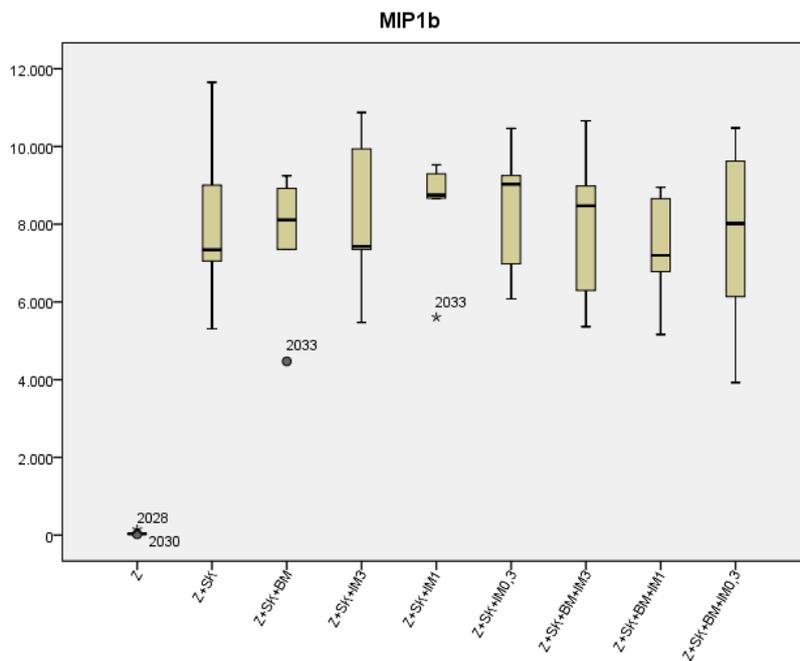


Tabelle 4-22: Boxplot und Säulendiagrammdarstellung der Veränderung der MiP-1β-Freisetzung nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. **Säulendiagramm:** Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung. Jeweils fünf Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2030, 2028 und 2033 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

4.5.1.6 MiP-1 α

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Bei den Proben der Enterokokkenversuchsreihe senkte die Applikation von Betamethason und die Kombination von Betamethason und Indometacin in der höchsten Dosierung (3 $\mu\text{g/ml}$) die Ausschüttung von MiP-1 α signifikant ($p = 0,028$). Sowohl Indometacin als auch die Kombination von Betamethason und Indometacin in niedrigeren Konzentrationen hatten keinen deutlichen Einfluss auf die MiP-1 α Ausschüttung. Acht Nabelschnurblutproben lagen innerhalb der normalen Streuung. Zwei Proben reagierten überschüssig auf das Bakterienlysat. Diese verhielten sich auch im weiteren Versuchsverlauf sehr unterschiedlich. Während eine Nabelschnurblutprobe eine markante Beeinflussung durch die Gabe der Medikamente zeigte, verblieb die andere Probe unverändert auf hohem Stimulationsniveau.

MiP1a		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,028
	Z+EK+IM3	,575
	Z+EK+IM1	,799
	Z+EK+IM0,3	,959
	Z+EK+BM+IM3	,037
	Z+EK+BM+IM1	,093
	Z+EK+BM+IM0,3	,093

Tabelle 4-23: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Testung nach Wilcoxon für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+EK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 $\mu\text{g/ml}$), IM1 = Indometacin (1 $\mu\text{g/ml}$), IM0,3 = Indometacin (0,3 $\mu\text{g/ml}$). Zehn Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

Ergebnisse

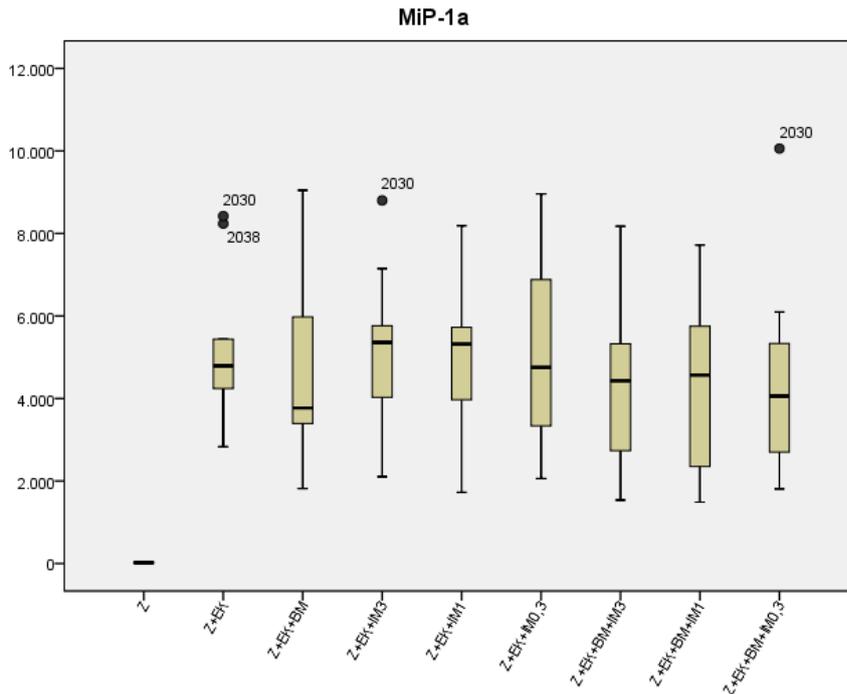


Tabelle 4-24: Veränderung der MiP-1 α -Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 μ g/ml), IM1 = Indometacin (1 μ g/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 μ g/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2030 und 2038 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

Stimulation durch *Streptococcus agalactiae*

Ähnliche Ergebnisse zeigte die *Streptococcus agalactiae*-stimulierte Zellpopulation (SASZP). Indometacin allein hemmte die Zytokinausschüttung nicht. Betamethason und die Kombination von Betamethason und Indometacin (3 μ g/ml) senkten die Ausschüttung von MiP-1 α signifikant. Bei der Stimulation mit den Streptokokken zeigte sich jedoch für die Medikamentenkombinationen von Betamethason und Indometacin (1 μ g/ml und 0,3 μ g/ml) eine andere Wirkung. In der SASZP hemmte diese Kombination die Zytokinfreisetzung signifikant.

Ergebnisse

MiP1a

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,005
	Z+SK+IM3	,959
	Z+SK+IM1	,878
	Z+SK+IM0,3	,799
	Z+SK+BM+IM3	,005
	Z+SK+BM+IM1	,005
	Z+SK+BM+IM0,3	,007

Tabelle 4-25: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Zehn Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

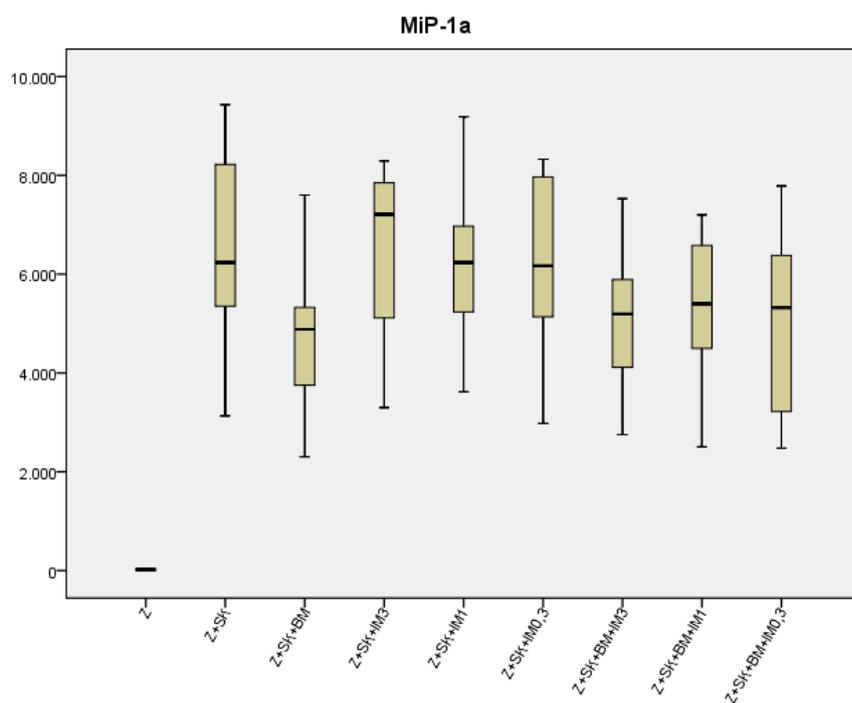


Tabelle 4-26: Veränderung der MiP-1 α -Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

4.5.1.7 TNF

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Das Zytokin TNF wurde nach der Stimulation früh exprimiert. Messungen von Proben nach vierstündiger Stimulation zeigten einen signifikanten Anstieg des Immunmodulators. Ein Einfluss von Betamethason oder Indometacin konnte zu diesem Zeitpunkt nicht erfasst werden. Nach 24-stündiger Inkubation zeichnete sich jedoch ein signifikanter Effekt ab. Die Gabe von Betamethason und die Gabe der Kombination von Betamethason und Indometacin in der höchsten Dosis (3 µg/ml) wirkten dabei in der *Enterococcus faecalis*-stimulierten Zellpopulation (EFSZP) signifikant supprimierend. Die meisten Proben zeigten einen gleichförmigen Anstieg der Zytokinfreisetzung. In den Proben der vierstündigen Inkubation waren die Messungen des Zytokins einer Nabelschnurblutprobe übermäßig. Nach 24 Stunden verblieb diese Probe innerhalb der normalen Streuung, wies aber weiterhin eine hohe Zytokinfreisetzung auf. Eine weitere Nabelschnurblutprobe, die allgemein auch mit einer hohen Zytokinfreisetzung reagierte, war nach 24-stündiger Inkubation in der Probenkombination Betamethason mit Indometacin in der niedrigsten Dosierung außerhalb der normalen Streuung.

TNF_4h

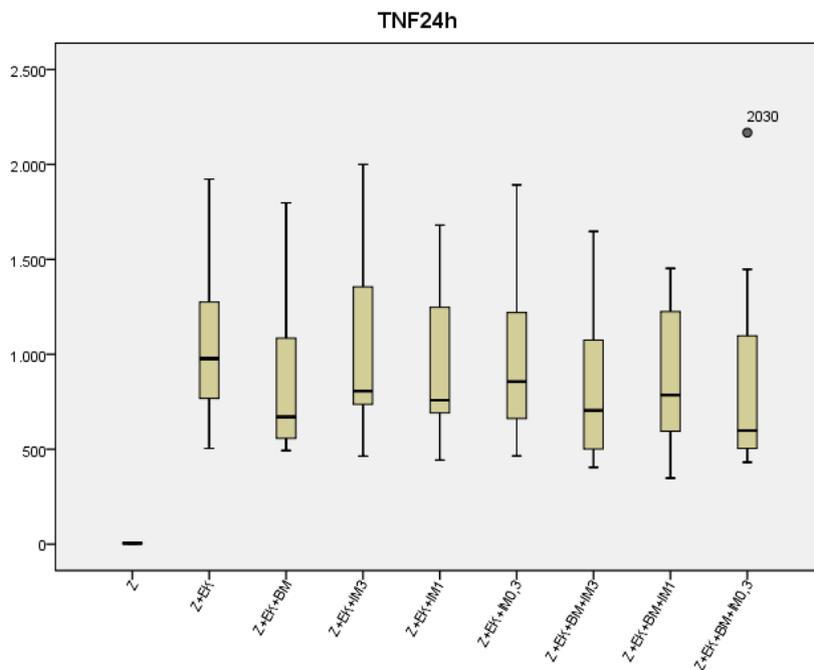
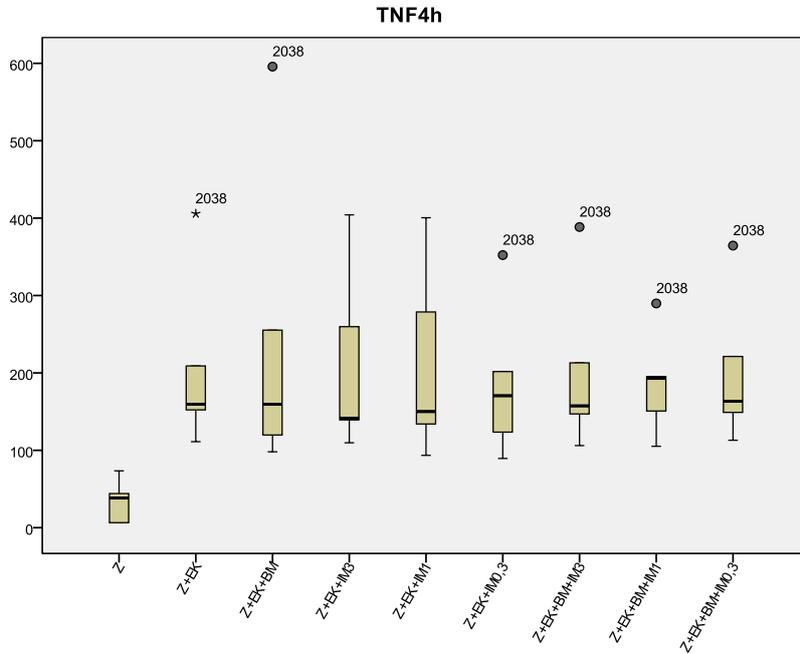
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,500
	Z+EK+IM3	,500
	Z+EK+IM1	,500
	Z+EK+IM0,3	,138
	Z+EK+BM+IM3	,138
	Z+EK+BM+IM1	,345
	Z+EK+IM0,3	,893

TNF_24h

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,047
	Z+EK+IM3	,959
	Z+EK+IM1	,285
	Z+EK+IM0,3	,241
	Z+EK+BM+IM3	,047
	Z+EK+IM1	,203
	Z+EK+IM0,3	,241

Ergebnisse

Tabelle 4-27: Darstellung der einzelnen Signifikanzen nach vier und 24 Stunden, Testung nach Wilcoxon für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+EK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf bzw. zehn Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.



Ergebnisse

Tabelle 4-28: Veränderung der TNF-Konzentration nach vier- und 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf bzw. zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2030 und 2038 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

Stimulation durch *Streptococcus agalactiae*

In den Vermessungen der Proben nach vierstündiger Inkubationszeit hemmte der Cyclooxygenase-Hemmer Indometacin die Expression signifikant in allen Konzentrationen. Für die Medikamentenkombination aus Betamethason und Indometacin (0,3 µg/ml) konnte ebenfalls ein hemmender Effekt festgestellt werden. Betamethason und die Kombination mit Indometacin (3 µg/ml und 1 µg/ml) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinfreisetzung. Nach 24-stündiger Inkubation wurde in der Probengruppe Betamethason kombiniert mit Indometacin (1 µg/ml) eine signifikante niedrigere Konzentration an TNF gemessen. Auch die Hemmung der TNF-Expression durch Betamethason war signifikant. Die Senkung der Zytokinfreisetzung durch die alleinige Gabe von Indometacin in verschiedenen Konzentrationen konnte nach 24 Stunden nicht mehr erfasst werden. Eine Nabelschnurblutprobe zeigte nach 24-stündiger Inkubationszeit eine sehr hohe TNF-Freisetzung. Dieses hohe Niveau blieb im Verlauf der Versuchsreihen unverändert. In den Proben mit der alleinigen Gabe von Indometacin (0,3 µg/ml) und den Proben mit Betamethason und Indometacin (3 µg/ml) zeigte sie sich weit oberhalb der Standardabweichung.

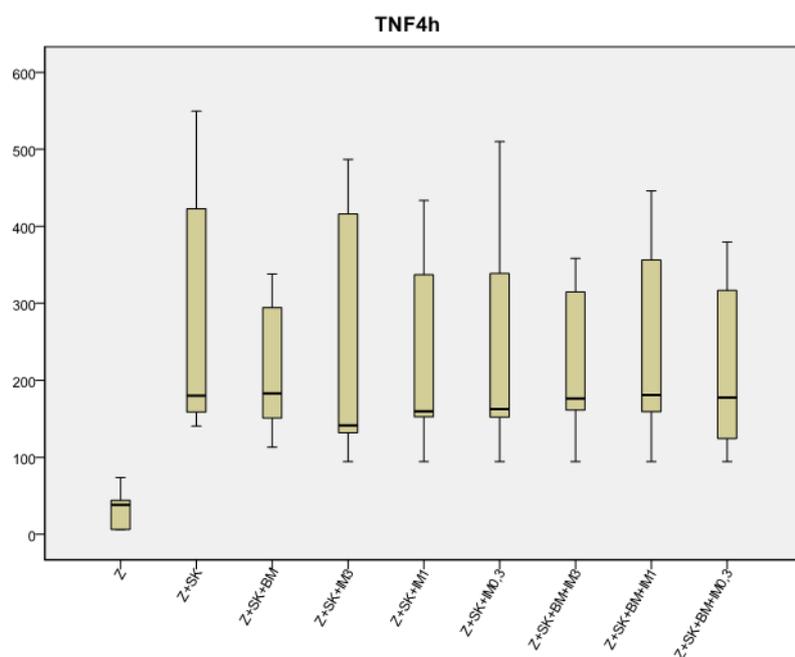
TNF_4h		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,080
	Z+SK+IM3	,043
	Z+SK+IM1	,043
	Z+SK+IM0,3	,043
	Z+SK+BM+IM3	,080
	Z+SK+BM+IM1	,225
	Z+SK+BM+IM0,3	,043

Ergebnisse

TNF_{24h}

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,005
	Z+SK+IM3	,059
	Z+SK+IM1	,093
	Z+SK+IM0,3	,139
	Z+SK+BM+IM3	,169
	Z+SK+BM+IM1	,022
	Z+SK+BM+IM0,3	,093

Tabelle 4-29: Darstellung der einzelnen Signifikanzen nach vier und 24 Stunden, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Beta-methason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf bzw zehn Nabelschnurblutproben, je vier Ansätze.



Ergebnisse

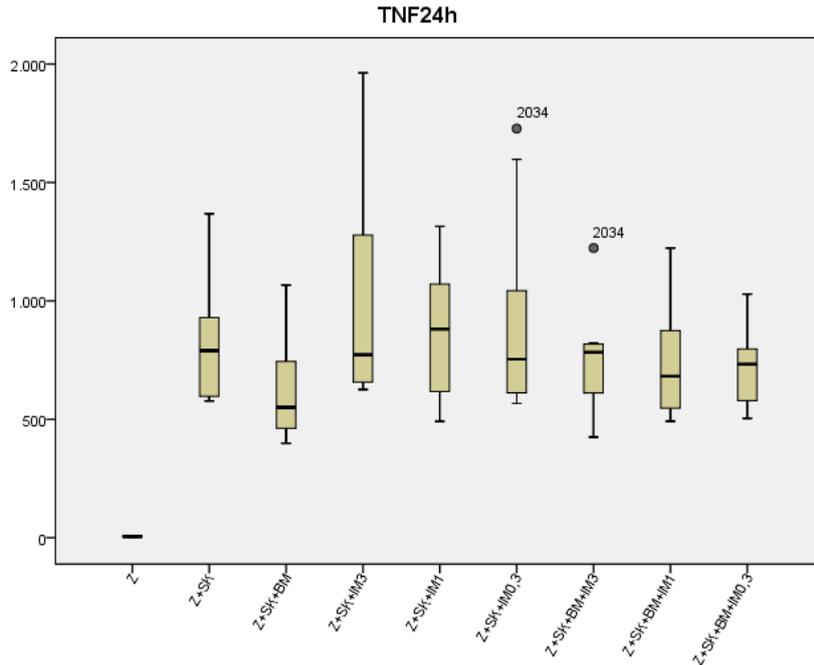


Tabelle 4-30: Veränderung der TNF-Konzentration nach vier- und 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Jeweils fünf bzw. zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze. 2034 = Probennummer Nabelschnurblutproben.

4.5.1.8 IL-12

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Im Gegensatz zu TNF führte die vierstündige Stimulation mit dem Enterokokkenlysate zu keiner markanten IL-12-Ausschüttung. Die Zytokinausschüttung wies erst nach einer 24-stündigen Inkubationszeit der Proben markante Werte auf. Die Kombinationsanordnungen von Betamethason und Indometacin hemmten die Freisetzung von IL-12, während die Gabe der Medikamente einzeln keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Zytokins hatte. Eine einzige wies nach vier-stündiger Inkubation eine gewisse Zytokinfreisetzung auf niedrigem Niveau auf. Da die anderen Proben jedoch kaum eine Zytokinkonzentration aufzeigten, lag diese Probe außerhalb der normalen Streuung.

Ergebnisse

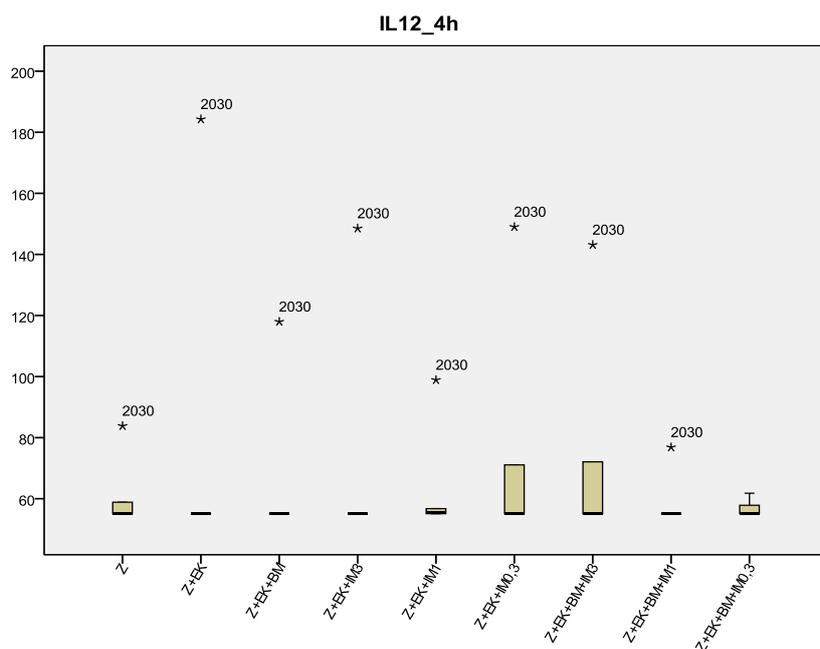
IL12_4h

Asymptotische Signifikanz p(2-seitig)	Z+EK+BM	,317
	Z+EK+IM3	,317
	Z+EK+IM1	1,000
	Z+EK+IM0,3	,655
	Z+EK+BM+IM3	,655
	Z+EK+BM+IM1	,317
	Z+EK+BM+IM0,3	,655

IL12_24h

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,139
	Z+EK+IM3	,203
	Z+EK+IM1	,333
	Z+EK+IM0,3	,169
	Z+EK+BM+IM3	,007
	Z+EK+BM+IM1	,022
	Z+EK+BM+IM0,3	,009

Tabelle 4-31: Darstellung der einzelnen Signifikanzen nach vier und 24 Stunden, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen Z+EK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Beta-methason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf bzw. zehn Nabelschnurblutproben, je vier Ansätze.



Ergebnisse

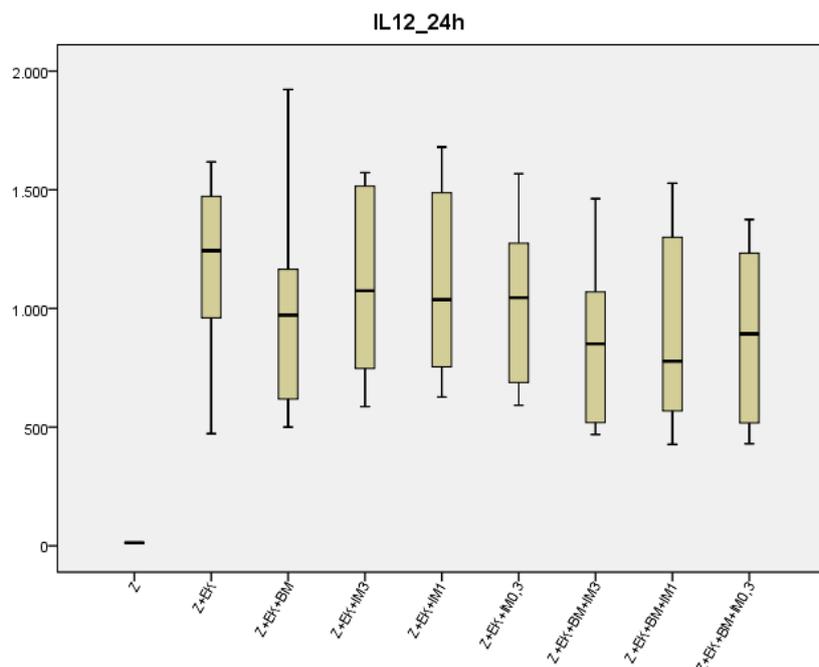


Tabelle 4-32: Veränderung der IL-12-Freisetzung nach vier- und 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1= Indometacin (1µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Fünf bzw. zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

Stimulation durch *Streptococcus agalactiae*

Proben, die mit den Streptokokkenbakterien inkubiert wurden, reagierten nach vierstündiger Inkubationszeit markanter als die Proben, die mit den Enterokokken inkubiert wurden. Hier war nach vier Stunden eine stimulatorische Tendenz zu erkennen. Aber auch hier waren deutliche Unterschiede erst nach 24-stündiger Inkubationszeit detektierbar. Sowohl die getrennte Versetzung der Proben mit Betamethason und Indometacin (0,3 µg/ml) als auch deren kombinierte Gabe führten zu einer signifikanten Hemmung der Expression. Wie schon in der EFSZP, konnte zu Beginn auch hier in einer Nabelschnurblutprobe eine erhöhte Konzentration an IL-12 gemessen werden.

Ergebnisse

IL12_4h

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,109
	Z+SK+IM3	,317
	Z+SK+IM1	,180
	Z+SK+IM0,3	,109
	Z+SK+BM+IM3	,109
	Z+SK+BM+IM1	,317
	Z+SK+BM+IM0,3	,109

IL12_24h

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,009
	Z+SK+IM3	,241
	Z+SK+IM1	,241
	Z+SK+IM0,3	,017
	Z+SK+BM+IM3	,005
	Z+SK+BM+IM1	,005
	Z+SK+BM+IM0,3	,005

Tabelle 4-33: Darstellung der einzelnen Signifikanzen nach vier und 24 Stunden, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Beta-methason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Fünf bzw. zehn Nabelschnurblutproben, je vier Ansätze.

Ergebnisse

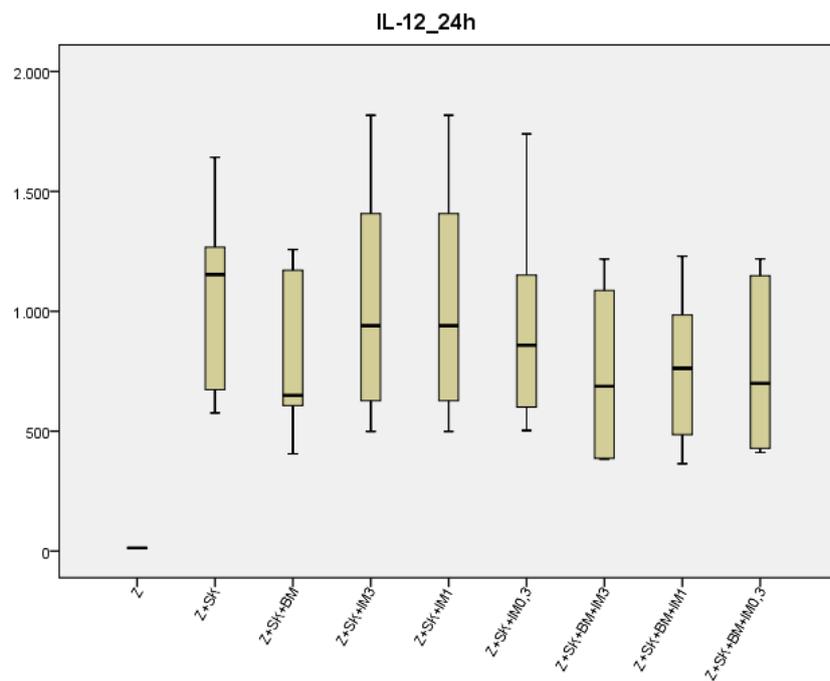
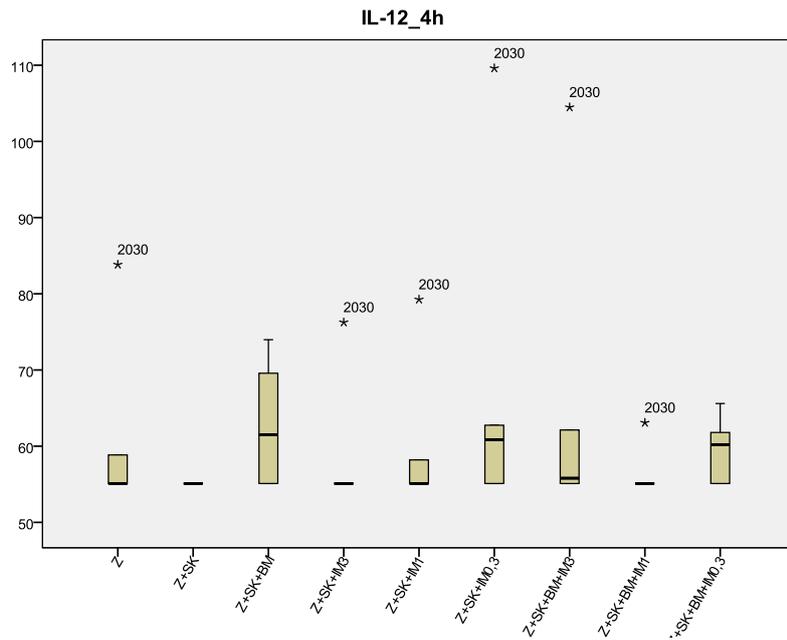


Tabelle 4-34: Boxplot und Säulendiagrammdarstellung der Veränderung der IL-12-Freisetzung nach vier- und 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Fünf bzw. zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze

4.5.1.9 Interleukine 6

Stimulation durch *Enterococcus faecalis*

Die Gabe von Betamethason und die Kombination von Betamethason mit Indometacin in allen Konzentrationen hemmten die Ausschüttung von IL-6 signifikant. Die Proben mit alleiniger Gabe von Indometacin zeigten keine signifikante Veränderung den stimulierten Zellproben ohne Medikamentengabe. Eine Nabelschnurblutprobe zeigte sich in der IL-6 Freisetzung sehr sensitiv. Sowohl in den reinen Stimulationproben als auch in den mit den Medikamenten inkubierten Proben waren die Zytokinkonzentrationen erhöht und teilweise außerhalb der zu erwartenden Streuung.

IL6		
Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,047
	Z+EK+IM3	,386
	Z+EK+IM1	,285
	Z+EK+IM0,3	,333
	Z+EK+BM+IM3	,007
	Z+EK+BM+IM1	,022
	Z+EK+BM+IM0,3	,011

Tabelle 4-35: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+EK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Zehn Nabelschurproben, je vier Stimulationsansätze.

Ergebnisse

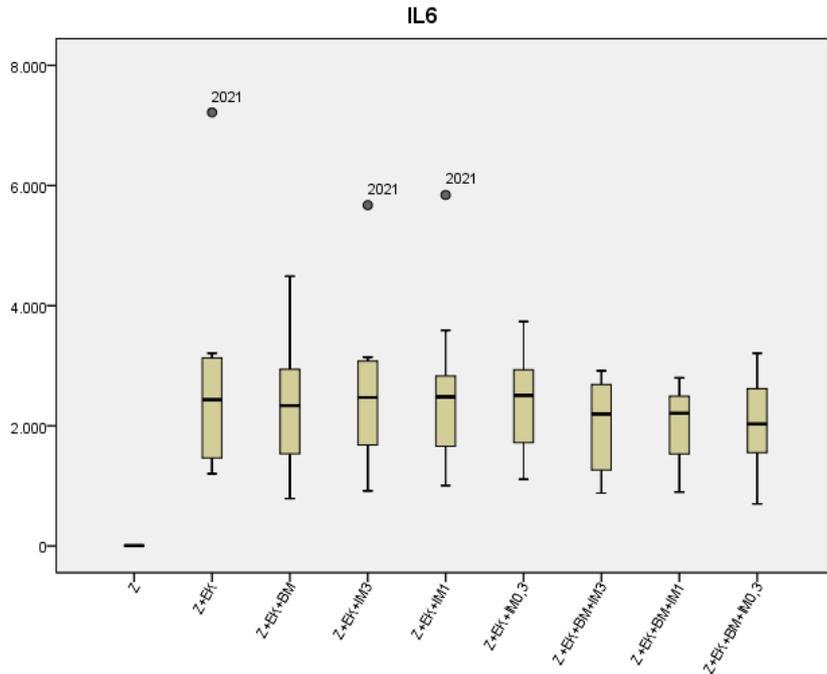


Tabelle 4-36: Veränderung der IL-6-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

Stimulation durch *Streptococcus agalactiae*

Wie in der EFSZP, hemmten Betamethason alleine und die Kombination von Betamethason und Indometacin die Freisetzung von IL-6. Die alleinige Gabe von Indometacin hatte keinen Einfluss auf die Expression des Zytokins. Die gleiche Nabelschnurblutprobe, die sich gegenüber den Enterokokken in der Zytokinfreisetzung von IL-6 sensitiv zeigte, reagierte in den IL-6 Ausschüttungen der Streptokokken-inkubierten Proben ähnlich. In dieser Probe konnten größtenteils sehr viel höhere Werte an IL-6 gemessen werden als in den anderen Proben.

Ergebnisse

IL6

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,013
	Z+SK+IM3	,646
	Z+SK+IM1	,333
	Z+SK+IM0,3	,126
	Z+SK+BM+IM3	,005
	Z+SK+BM+IM1	,005
	Z+SK+BM+IM0,3	,009

Tabelle 4-37: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

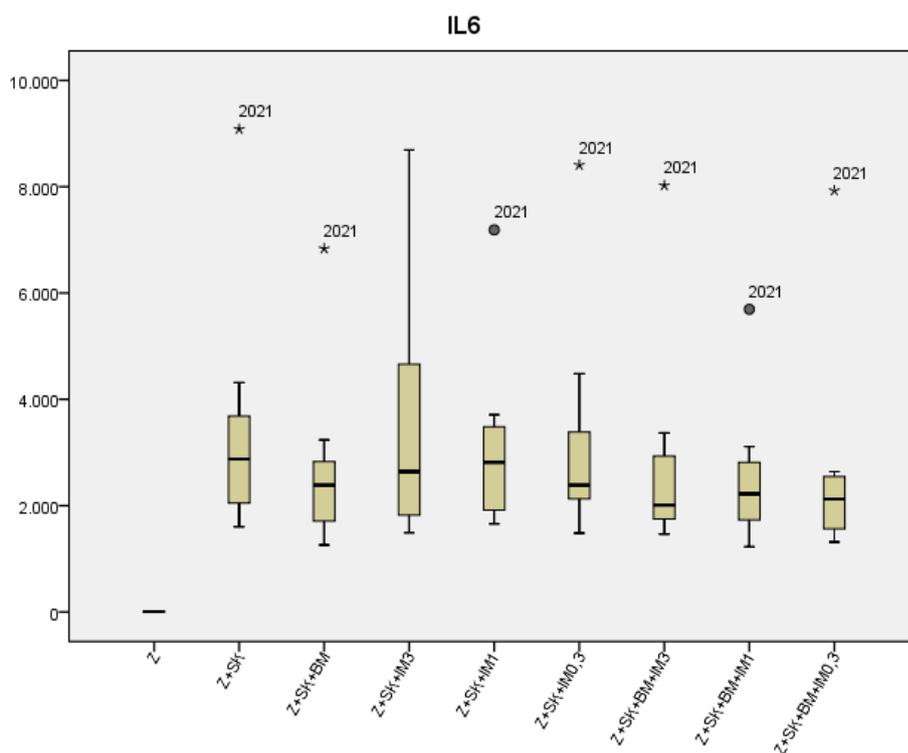


Tabelle 4-38: Boxplot- und Säulendiagrammdarstellung der Veränderung der IL-6-Freisetzung nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. **Säulendiagramm:** Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung. Zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

4.5.2 Veränderung des antiinflammatorischen Zytokins

4.5.2.1 IL-10

Stimulation mit *Enterococcus faecalis*

Die selektive Gabe von Betamethason und Indometacin in den höchsten Konzentrationen (3 µg/ml und 1 µg/ml) steigerten die IL-10 Ausschüttungen signifikant. Auch die Kombination von Betamethason und Indometacin in der höchsten Konzentration hatte einen fördernden Effekt auf die IL-10 Produktionen der fetalen mononukleären Zellen. Dabei reagierten die einzelnen Nabelschnurblutproben unterschiedlich. Während eine Nabelschnurblutprobe auf die Stimulation mit einer allgemein sehr hohen Zytokinfreisetzung reagierte und dessen Konzentrationen in den Ansätzen inkubiert mit Betamethason und Indometacin (3 µg/ml) außerhalb der normalen Streuung lagen, waren die IL-10 Freisetzungen einer anderen Nabelschnurblutprobe im Gegensatz dazu auf einem sehr niedrigen Niveau, und lagen teilweise auch hier außerhalb der Streuung der anderen Proben.

IL10

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+EK+BM	,028
	Z+EK+IM3	,013
	Z+EK+IM1	,013
	Z+EK+IM0,3	,074
	Z+EK+BM+IM3	,047
	Z+EK+BM+IM1	,074
	Z+EK+BM+IM03	,059

Tabelle 4-39: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+EK. Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Zehn Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

Ergebnisse

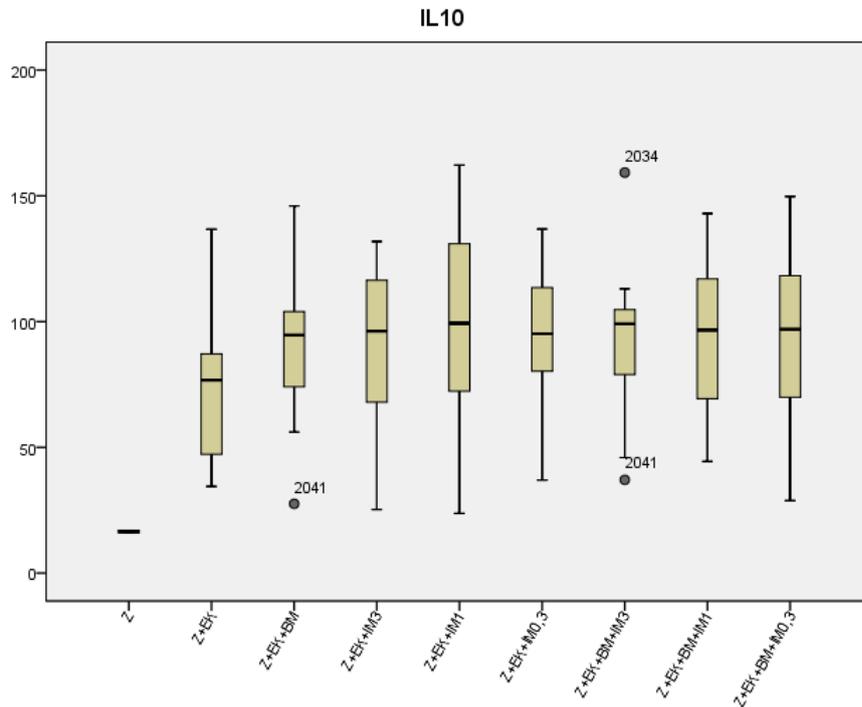


Tabelle 4-40: Veränderung der IL-10-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, EK = Enterokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

Stimulation mit *Streptococcus agalactiae*

Anders als bei den Enterokokken schien nur Indometacin in der höchsten Dosierung einen Einfluss auf die IL-10 Zytokinfreisetzung zu haben. Indometacin in der höchsten Dosierung (3 µg/ml) steigerte signifikant die IL-10 Ausschüttungen der Versuchsreihe. Eine Nabelschnurblutprobe wies höhere Zytokinkonzentrationen auf als die anderen Proben. Inkubiert mit den Medikamenten lagen ihre Werte teilweise außerhalb der normalen Streuung.

Ergebnisse

IL10

Asymptotische Signifikanz p (2-seitig)	Z+SK+BM	,678
	Z+SK+IM3	,022
	Z+SK+IM1	,114
	Z+SK+IM0,3	,169
	Z+SK+BM+IM3	,074
	Z+SK+BM+IM1	,139
	Z+SK+BM+IM0,3	,721

Tabelle 4-41: Darstellung der einzelnen Signifikanzen, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben gegen die stimulierten mononukleären Zellen = Z+SK. Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). Zehn Nabelschnurproben, je vier Stimulationsansätze.

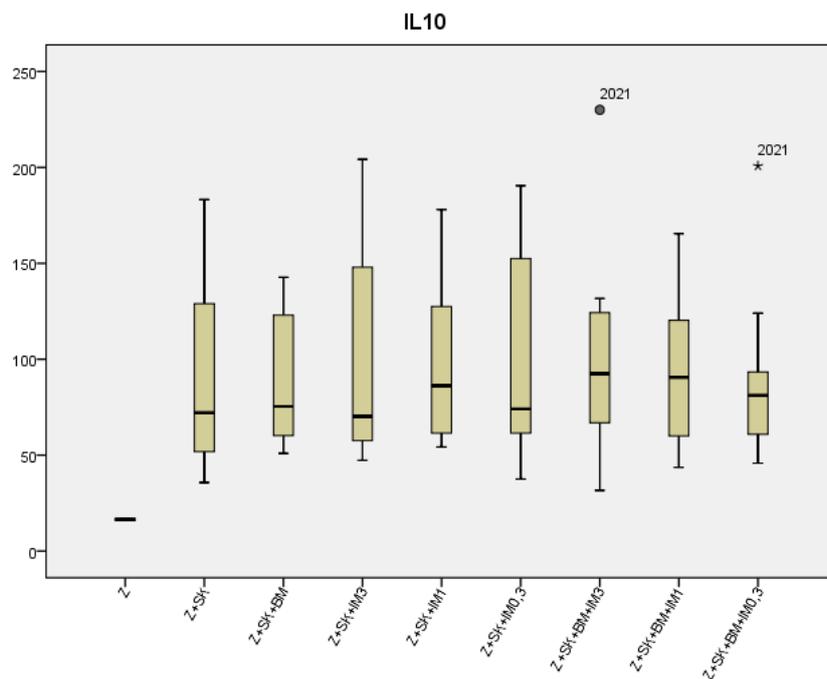


Tabelle 4-42: Veränderung der IL-10-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Betamethason und Indometacin, Angaben in pg/ml, Z = Zellen, SK = Streptokokken, BM = Betamethason, IM3 = Indometacin (3 µg/ml), IM1 = Indometacin (1 µg/ml), IM0,3 = Indometacin (0,3 µg/ml). **Boxplot:** Darstellung des Medians, unteres und oberes Quartil, Whiskers und Ausreißer. Zehn Nabelschnurblutproben, je vier Stimulationsansätze.

5. Diskussion

Zytokine sind Schlüsselemente des menschlichen Immunsystems. Sie aktivieren die menschliche Immunantwort, regulieren sie, rufen Immunzellen an ihren Wirkungsort und induzieren deren Differenzierung (60). Die löslichen Proteinmediatoren werden ab dem zweiten Trimenon von fetalen Zellen freigesetzt (28). Die Effektivität der Zytokinexpression von fetalen mononukleären Zellen wird jedoch bis zum heutigen Tag diskutiert. Während einige Studien postulieren, dass fetale Immunzellen nur zu geringen Zytokinfreisetzungen fähig sind, berichten andere Untersuchungen von hohen fetalen proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen als Antwort auf bakterielle Stimuli (61). In der Interpretation dieses Widerspruchs kommen Chirico et al. 2005 und Witkin et al. 2010 zu dem Schluss, dass im Zusammenschau aller Daten fetale mononukleäre Zellen erniedrigte proinflammatorische Zytokinkonzentrationen, besonders der TH-1 Zytokinkonzentrationen -IL-2, TNF und INF- γ , aufweisen. Je nach Erreger und entsprechender Stimulation seien die Zellen jedoch zu kompetenten Immunantworten fähig und könnten sehr hohe Konzentrationen an IL-6, IL-10 und IL-23 exprimieren (62, 63). Diese Erwägungen werden auch von Kunzmann et al. geteilt, die zusätzlich als weiteres Erklärungsmodell die Hypothese der fetalen „Immunparalyse“ unterstützen. Laut der Studie von Wolf et al. aus 2012 geht diese Hypothese davon aus, dass durch den intrauterinen Erstkontakt mit Keimen der Fet zum physiologischen Selbsterhalt im mütterlichen System die MHC-II-Antigene-Präsentationen von Immunzellen supprimiert und erhöhte Konzentrationen an immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF- β (Transforming Growth Faktor-beta) ausschüttet. Dies bedeutet im Verlauf niedrigere Zytokinproduktionen der fetalen Immunzellen und könnte die niedrigen Zytokinkonzentrationen erklären (63-65). In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass in PCR-Analysen der Amnionflüssigkeit von gesunden Schwangeren 71 % der untersuchten Patientinnen intrauterin einen Keimbefall aufwiesen (66, 67).

In der vorliegenden Studie konnten wir feststellen, dass in unseren Nabelschnurblutproben die Expression aller Zytokine - außer die von INF- γ durch die Stimuli *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis*, signifikant induziert wurde ($p \leq 0,05$). Die Zytokine IL-8 und MCP-1 wiesen dabei besonders hohe Werte auf. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Tatad et al. und Berner et al., welche auch signifikant höhere Werte der pro- und

antiinflammatorischen Zytokine von fetalen Immunzellen nach Inkubation mit grampositiven Keimen dokumentieren konnten (61, 68).

5.1 Der immunmodulatorische Effekt von Indometacin und Betamethason auf die Zytokinfreisetzung von fetalen mononukleären Zellen

Der Fokus der Studie galt unter Simulation eines grampositiven Infektionsgeschehens der Erfassung des immunmodulatorischen Effekts von Indometacin und Betamethason auf die Zytokinfreisetzung von fetalen mononukleären Zellen. Vergleichbare Untersuchungen finden sich in der Literatur nur im gramnegativen Keimpektrum, durchgeführt meist mit LPS-stimulierten mononukleären Zellen. Die hier diskutierten Untersuchungen erfolgten erstmalig unter der Stimulation von grampositiven Bakterien.

Überraschend war für uns, dass verglichen mit unserer Arbeit zum immunmodulatorischen Effekt von Indometacin und Betamethason im gramnegativen Keimbereich die Zytokinmodulationen der beiden Medikamente sich unter einem grampositiven Infektionsgeschehen teilweise stark unterschieden und Indometacin und Betamethason einen größeren hemmenden Effekt auf die proinflammatorische Komponente zeigten (9). Generell wirkten in der vorliegenden Studie Betamethason und Indometacin auf das proinflammatorische Zytokinspektrum inhibierend und auf das antiinflammatorische Zytokin IL-10 fördernd, wobei einige Zytokine wie IL-1 β oder INF- γ gar nicht oder kaum beeinflusst wurden und TNF im Gegensatz zu unserer vorausgehenden LPS-Studie in der Freisetzung sowohl von Indometacin als auch Betamethason gehemmt werden konnte.

Im Folgenden werden noch einmal alle gemessenen Zytokine näher betrachtet, um ihr Freisetzungsverhalten einzuordnen.

INF- γ

INF- γ konnte weder von *Streptococcus agalactiae* noch von *Enterococcus faecalis* stimuliert werden. Um zu erklären, warum die Expressierung von INF- γ erst gar nicht durch die beiden Keime induziert werden konnte, ist der Blick auf den Produktionsort und die Wirkungsweise des Zytokins sinnvoll. INF- γ wird von Immunzellen vornehmlich in einem viralen Infektionsgeschehen ausgeschüttet. Auch die Synthese dieses Zytokins gilt durch die hauptverantwortli-

chen fetalen CD-Zellen allgemein als erniedrigt (69). Chipeta et al. berichten von einem phänotypischen Unterschied zwischen fetalen und adulten CD45⁺ Zellen. CD45RA⁺, die im Feten vorherrschend sind, werden erst in der späteren Entwicklung mit CD45RO⁺ Zellen ersetzt, welche in Erwachsenen vor allem INF- γ sezernieren. Fetale CD45RA⁺ sezernieren nur insuffizient INF- γ (70). Dies bestätigte sich in unserer Studie letztendlich in der Inkubation mit den Medikamenten, in der die INF- γ Konzentrationen kaum über ihren Basalwert erhöht wurden.

IL-1 β

Die Freisetzung von IL-1 β konnte hingegen durch die grampositiven Erreger induziert werden. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β ist neben TNF ein Hauptmediator des neonatalen Schockgeschehens und hat synergistisch proinflammatorische Eigenschaften zu TNF (28, 32, 60). Für dieses Zytokin konnten wir jedoch keine Veränderung der stimulierten hohen Konzentration durch die alleinige Gabe von Indometacin – weder in der *Enterococcus faecalis*-stimulierten Zellpopulation (EFSZP) noch in der *Streptococcus agalactiae*-stimulierten Zellpopulation (SASZP) – feststellen. Auch die alleinige Gabe von Betamethason zeigte keine Wirkung. Einzig die Kombination von Betamethason und Indometacin in der mittleren Dosierung konnte eine signifikante Hemmung der IL-1 β Konzentration in der SASZP ($p \leq 0,05$) induzieren. In der Literatur untersuchten Sirota et al. und Kunkel et al. separat die IL-1 β Freisetzung von LPS-stimulierten mononukleären Zellen nach Indometacingabe (71, 72). Beide Forschungsgruppen kamen dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen: Analog zu unseren Studienergebnissen konnten Sirota et al. keine Beeinflussung der stimulierten IL-1 β -Konzentrationen durch die alleinige Gabe von Indometacin erfassen. Kunkel et al. berichten dagegen von dosis-abhängigen Steigerungen der IL-1 β Konzentration durch den Cyclooxygenasehemmer Indometacin. Allerdings benutzten Kunkel et al. in ihrer Studie peritoneale Makrophagen von Mäusen, statt fetale mononukleäre Zellen, was eine Übertragung der Ergebnisse schwierig gestaltet. Betamethason in alleiniger Gabe induzierte keine signifikante Hemmung. In gramnegativen Stimulationsversuchen stellten Yoo et al. und Bessler et al. eine signifikante Hemmung der IL-1 β Konzentrationen durch das Glukokortikoid fest. Yoo et al. untersuchten dabei die Zellen aus dem Lungengewebe von Neugeborenen, während Bessler et al. mononukleäre Zellen von Neugeborenen verwendeten (73, 74). Die Hemmung der IL-1 β Konzentrationen lässt sich durch die Hemmung des NK- κ b Induktionsweges, der auch positiv

rückkoppelnd auf IL-1 β Konzentrationen wirkt, gut erklären. *In vitro* benötigte in unseren Versuchen Betamethason jedoch für eine signifikante Unterdrückung der IL-1 β -Freisetzung den Zusatz von Indometacin.

MiP-1 β

Derselbe immunmodulatorische Effekt von Indometacin und Betamethason zeigte sich auch für das Chemokin MiP-1 β . Dieses Zytokin wirkt sowohl chemotaktisch als auch T-zellproliferierend (29). Wie IL-1 β wurde MiP-1 β durch die Medikamente größtenteils nicht beeinflusst, außer durch die kombinierte Gabe von Betamethason und Indometacin in der mittleren Dosierung in der SASZP. Die inhibierende Wirkung von Betamethason auf die MiP-1 β Konzentration konnte *in vitro* auch in unseren LPS-Studien beobachtet werden. Janabi et al. berichten jedoch in der - nach unserer Recherche einzigen - Studie zu Stimulationsversuchen mit MiP-1 β von einem stimulatorischen Effekt von Indometacin. Die Forschungsgruppe arbeitete allerdings mit stimulierten Astrozyten und Mikrogliazellen, welche andere Zelltypen darstellen als mononukleäre Zellen (75).

IL-8

IL-8 ist ein pro-inflammatorisches Chemokin, bekannt auch unter dem Namen CXCL8, welches vor allem neutrophile Granulozyten an ihren Wirkungsort ruft. Es gilt auch beim Neugeborenen als ein wichtiger Unterhalter von entzündlichen Prozessen (60). Janabi et al. sowie unsere Stimulationsversuche mit LPS konnten keinen Einfluss von Betamethason auf die IL-8-Freisetzung feststellen (9, 75). In unseren Versuchen im grampositiven Keimspektrum jedoch wurden die IL-8 Konzentrationen sowohl durch Betamethason als auch durch Indometacin beeinflusst. Die von *Enterococcus faecalis* stimulierten Zellen schienen dabei eher durch Indometacin in der IL-8 Freisetzung gehemmt zu werden, während die von *Streptococcus agalactiae* stimulierten Zellen gleichermaßen von Betamethason und Indometacin inhibiert wurden. Der Einfluss von Betamethason auf die IL-8 Freisetzung von LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten wurde bereits 2002 von Irakam et al. beschrieben (76). Wie oben bereits erörtert, ist der Vergleich zu der Studie von Janabi et al. nur eingeschränkt möglich (75).

MCP-1

Erstmalig stellen wir hier den immunmodulatorischen Effekt von Indometacin und Betamethason auf das Chemokin MCP-1 vor. Das Chemokin ist besonders an der chronischen Unterhaltung von entzündlichen Prozessen beteiligt und wird von allen mononukleären Zellen ausgeschüttet (29). Wie in der Studie von Moller et al. stieg in unseren Versuchen die Freisetzung von MCP-1 unter grampositiver Stimulation steil an (77). Lediglich die SASZP wurde durch die kombinierte Gabe von Betamethason und Indometacin in allen Dosierungen in ihrer MCP-1 Freisetzung beeinflusst und obstruiert, was bei EFSZP nicht der Fall war. Bezüglich des zytokinmodulatorischen Effekts von Betamethason und Indometacin auf die MCP-1-Freisetzung ist die wissenschaftliche Datenlage dünn. Über die Hemmung der MCP-1 Induktion veröffentlichten nur Hew et al. im Jahr 2006 eine Studie. Sie untersuchten LPS-induzierte Immunzellen von Erwachsenen und konnten für MCP-1 eine immunsupprimierende Wirkung des Glukokortikoids Dexamethason feststellen (78).

MiP-1 α

Im Gegensatz zu MiP-1 β zeigte sich, dass die MiP-1 α -Freisetzung sehr viel sensibler auf Indometacin und Betamethason reagierte, obwohl MiP-1 α zu der gleichen CC (Chemokine)-Family wie MiP-1 β gehört (79). Sowohl in den Zellpopulationen, die durch *Enterococcus faecalis*, als auch in den Zellpopulationen, welche mit *Streptococcus agalactiae* stimuliert wurden, zeigte sich bei diesem Zytokin besonders die immunsuppressive Wirkung von Betamethason. Auch hier waren die SASZP stärker durch die Medikamente beeinflusst als die EFSZP. Während Indometacin eine additive Hemmung in der EFSZP nur in seiner höchsten Dosierung zeigte, wurde die SASZP durch alle Kombinationen von Betamethason und Indometacin beeinflusst. Die starke inhibierende Wirkung von Betamethason auf die Zytinausschüttung von MiP-1 α wurde auch von Irakam et al. wahrgenommen (76).

IL-12

IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das besonders an der intrazellulären Abwehr von bakteriellen Keimen und an der Differenzierung von dendritischen Zellen und TH-1 Zellen beteiligt ist. Der medikamentöse Effekt auf die Konzentration diese Zytokins war in unserer Studie überraschend. Nach vier Stunden wurden die IL-12 Produktionen zwar nicht signifi-

kant gesteigert. Nach 24-stündiger Inkubation senkte aber die Kombination von Betamethason und Indometacin die Ausschüttung signifikant. Dabei zeigten sich die SASZPs sensibler. Betamethason und Indometacin in der niedrigsten Dosierung wirkten sich hier hemmend auf die Zytokinausschüttung aus. Der immunsupprimierende Effekt von Betamethason auf die IL-12-Konzentration wird im Rahmen der allgemeinen suppressiven Wirkung von Kortikosteroiden beschrieben (80). Überraschend war jedoch die Hemmung von Indometacin in der niedrigsten Dosierung in den SASZPs, da im wissenschaftlichen Kontext im gramnegativen Keimspektrum bislang eher von einem stimulatorischen Effekt von Indometacin auf die IL-12 Freisetzung berichtet wurde. Diese konnte in der vorliegenden Studie in keiner der Proben verifiziert werden und war auch in unseren Stimulationversuchen mit LPS nicht feststellbar (81-83). Es liegen zwei Studien vor, von Par et al., die maternale Lymphozyten untersuchten sowie Feitoza et al., welche die renale parenchymale Zytokinreaktion nach einem renalen Trauma und Zugabe von Indometacin analysierten und ebenfalls von einem hemmenden Effekt von Indometacin im gramnegativen Keimspektrum berichteten (84, 85). Der Vollständigkeit halber muss aber auch hier erwähnt werden, dass sich eine Übertragung, wie bei Janabi et al., aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen schwierig gestaltet (75).

TNF

Ein weiteres interessantes Ergebnis war der Einfluss der Medikamente auf die TNF-Freisetzung der stimulierten mononukleären Zellen. Das Zytokin ist von zentraler Bedeutung, da es als ein Mediator, der sowohl parakrin als auch endokrin wirkt, essentiell an den inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. Als schnell induzierbares Zytokin konnten wir schon vier Stunden nach Stimulation mit den Erregern eine signifikante Zytokinfreisetzung von TNF feststellen. In diesen Proben konnten wir einen hemmenden Einfluss von Indometacin in den SASZPs dokumentieren.

Betamethason hemmte im Rahmen seiner immunsuppressiven Wirkung nach 24-stündiger Inkubation die TNF-Produktion unabhängig vom Erregertypus. Jedoch war keine Hemmung durch Indometacin in den Proben mit 24-stündiger Inkubationszeit nachweisbar und kehrte sich, im Gegenteil, in eine stimulierende Tendenz der TNF-Freisetzung in den SASZPs um, die jedoch statistisch nicht signifikant war. In den Kombinationsversuchen der Medikamente unterdrückte Betamethason jeglichen stimulatorischen Effekt. In den EFSZPs hemmten Betamethason und Indometacin in der höchsten Dosierung, in den SASZPs hemmten Betame-

thason und Indometacin in der mittleren Dosierung die TNF-Ausschüttungen signifikant. Während die immunsupprimierende Wirkung von Betamethason von mehreren Studien belegt ist, wird Indometacin in der Literatur ein eher stimulatorischer Effekt unter LPS nachgesagt, welcher sich auch in unseren Stimulationsversuchen mit LPS zeigte. In der Studie von Sirota et al. wird jedoch auch diskutiert, dass dieser stimulatorische Effekt von Indometacin auf die TNF-Freisetzung nicht generell für fetale mononukleäre Immunzellen zu gelten scheint. In ihrer Untersuchung reagierten die Zellen, die spontan mit einer Induktion ihrer TNF-Produktion auf Indometacin reagiert hatten, nicht mehr, wenn sie zuerst mit LPS stimuliert wurden (71).

IL-6

Das letzte untersuchte proinflammatorische Zytokin, welches jedoch auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweist, war IL-6. Als wichtigster diagnostischer Marker im neonatalen Sepsisgeschehen reguliert das Zytokin unter anderem die menschliche Körpertemperatur sowie den Blutdruck mit und induziert die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen aus Hepatozyten. Es wird von allen fetalen mononukleären Zellen ausgeschüttet (29, 60). Für dieses zentral wirkende Zytokin konnten wir feststellen, dass Betamethason sowie die Kombination von Betamethason und Indometacin in allen Dosierungen einen signifikanten beziehungsweise hoch signifikanten Effekt in beiden Stimulationsversuchsreihen hatte. Dabei ist der supprimierende Effekt von Betamethason klar im Vordergrund zu sehen, während Indometacin ein additiv inhibierender Effekt zukommt. Die hemmende Wirkung von Betamethason auf die Freisetzung von IL-6 ist in mehreren Studien beschrieben (73, 74, 86). Als signifikant ist ebenso ein supprimierender Effekt von Indometacin in fetalen mononukleären Zellen durch Studien von Tsuboi et al. und Komatsu et al. belegt (81, 87). Die unserer Studie ähnlichste Untersuchung von Sirota et al. konnte keine Beeinflussung der Zytokinexpression durch Indometacin nachweisen. Dies konnten wir auch in unseren Untersuchungen mit der alleinigen Gabe von Indometacin beobachten, bei der der Effekt des Medikaments nicht signifikant war (71).

IL-10

Das bedeutendste Ergebnis wurde für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 nachgewiesen, das eines der wichtigsten immunsupprimierenden und damit regulatorischen Zytokine im Körper darstellt. IL-10 wurde in unseren Studien durch Betamethason, jedoch noch klarer

durch Indometacin in der höchsten und mittleren Dosierung stimuliert ($p = 0,013$). Dabei zeigte sich eine vermehrte Induktion, je höher die Dosierung an Indometacin war. Auch hier trat ein Unterschied zwischen den verschiedenen Erregerversuchsgruppen auf: Während in den SASZPs Indometacin in der höchsten Dosierung die Produktion an IL-10 stimulierte, zeigten sich die EFSZPs hier zum ersten Mal sensibler. Betamethason sowie Indometacin förderten in diesem Fall ausgeprägt die Zytokinproduktion von IL-10. In den Untersuchungen von Bessler et al. konnte bei dem Glukokortikoid Dexamethason kein Einfluss auf die IL-10-Ausschüttung von fetalen mononukleären Zellen beobachtet werden (80). Jedoch berichten Hew et al. von dosisabhängigen Stimulationen ihrer untersuchten adulten B-Zellpopulation (78). Dandona et al. beschreiben eine Steigerung des plasmatischen Interleukin-10s nach Gabe von Hydrocortison, welches Betamethason in seiner Wirkung ähnelt (88). Dass IL-10 durch Indometacin in seiner Freisetzung stimuliert wurde, konnten wir in der Mehrheit der Nabelschnurblutproben bereits in unseren Versuchen mit LPS-stimulierten mononukleären Zellen belegen (9). Dies scheint zunächst überraschend, da mehrere Studien eine Induktion der IL-10 Produktion durch Prostaglandin, besonders Prostaglandin E_2 , postulieren und Indometacin eigentlich einen Prostaglandininhibitor darstellt (9, 81, 82, 89, 90). Dieses lässt sich aber eventuell dadurch erklären, dass es Anzeichen dafür gibt, dass Indometacin neben der Hemmung der Cyclooxygenase auch andere Enzyme wie die NADPH-Oxidase und die Phospholipase C hemmt und die gesamte Wirkungsweise des Medikaments noch nicht ausreichend erforscht wurde (81). Beispielsweise berichten auch Feitoza et al. von einer anregenden Wirkung von Indometacin auf die IL-10 Freisetzung von renalen parenchymalen Zellen (84).

In der Gesamtsicht aller Ergebnisse präsentierte sich unter einem grampositiven Infektionsgeschehen besonders die antiinflammatorische Wirkung von Indometacin und Betamethason. Interessant war, dass obwohl beide Erreger dem grampositiven Keimspektrum zu zuordnen sind, die Lysate von *Streptococcus agalactiae* und *Enterococcus faecalis* die Wirkweise der Medikamente unterschiedlich beeinflussten. Unter dem Einfluss von *Streptococcus agalactiae* hatten Betamethason und Indometacin einen größeren Einfluss auf die Produktion verschiedener Zytokine mit größeren inhibierenden bzw. stimulierenden Effekten. Diese variable Zytokinausschüttung, welche stark vom Erregertypus abhing, konnte auch von Tatad et al. in ihren Versuchen beobachtet werden (68). Obwohl Streptokokken und Enterokokken sehr ähnliche Virulenzfaktoren aufweisen, besitzen sie dennoch unterschiedliche Pathogenfaktoren, die dann wiederum individuell im Infektionsgeschehen und Entzündungsprozess, aber auch in

der Interaktion mit Medikamenten wirken. Auch die spontane Zytokinausschüttung sowie das Reaktionsvermögen der einzelnen Nabelschnurproben waren sehr individuell und schwankten über eine große Bandbreite. Unter dieser Tatsache litten bis dato alle Stimulationsversuche und werden im wissenschaftlichen Diskurs unter anderem genetischen Polymorphismen zugeschrieben (91). Die zum Teil diskrepanten wissenschaftlichen Ergebnisse sind unter Beachtung dieses Sachverhalts verständlicher und verdeutlichen die Dringlichkeit von weiteren, größeren Untersuchungen in diesem Themenbereich.

5.2 Einordnung des Antibiotikazusatzes

Für die gesamte Studie ist es wichtig anzumerken, dass in dieser Arbeit in allen Proben eine Antibiotikazugabe erfolgte. Wie bereits im Kapitel 4.3 untersucht und beschrieben wurde, berichten auch Morikawa et al., dass Antibiotika selbst Veränderung der Zytokinfreisetzung induzieren können. In ihrer Studie mit Fosfomycin und Clarithromycin kam es zu Supprimierung der TNF und IL-1 β Konzentration aber auch zur Stimulierung von IL-6 und IL-10 (92). Brooks et al. konnten in ihren Stimulationsversuchen besonders die Inhibierung durch das Antibiotikum Benzylpenicillin, aber auch durch das in unseren Versuchen benutzte Ampicillin von INF- γ nachweisen. Dabei konnten sie feststellen, dass sich das Benzylpenicillin an INF- γ bindet und es deshalb in seiner Aktivität inhibiert wird (59, 93). In unserer Studie könnte dies ein weiterer Grund dafür gewesen sein, dass wir keine relevanten Konzentrationen an INF- γ messen konnten. In unseren Vorversuchen konnten wir letztendlich feststellen, dass das Antibiotikum Ampicillin hemmend auf die von uns gemessenen Zytokine wirkt. Da aber allen Zellproben, auch den rein stimulierten Zellproben, Ampicillin hinzugefügt wurden, wirkt sich dies unseres Erachtens nicht auf die Aussagen über den immunmodulatorischen Effekt von Indometacin und Betamethason aus.

5.3 Klinische Bedeutung von perinatal applizierten Indometacin und Betamethason

Der gegenwärtige Forschungsstand geht davon aus, dass immunmodulatorische Einflüsse zentral am neonatalen und maternalen Outcome in der Schwangerschaft beteiligt sind und die Wirkung von Zytokinen eine bedeutende Rolle in der Schwangerschaft, Frühgeburtlichkeit und in den Auswirkungen der Spätfolgen für Mutter und Kind einnimmt (94). Dabei stehen

vor allem die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF und IL-6, sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 im Fokus der Aufmerksamkeit. Bereits 1993 etablierte Leviton die Verbindung zwischen TNF, Frühgeburtlichkeit und dem Risiko desaströser fetaler Spätfolgen für Frühchen. Yoon et al konnten in ihren Studien 1997 feststellen, dass intrauterine Infektion und die erhöhte Konzentration an TNF, IL-6 und IL-1 β signifikant das Risiko einer Zerebralparese erhöhten (95, 96). Damman und Leviton postulierten schon früh, dass intrauterine Infektionen eine FIRS verursachen können, was wiederum das Risiko für neonatale Folgeschädigungen, wie die Schädigung der weißen Hirnsubstanz, Zerebralparesen, intraventrikulären Blutungen, visuelle Einschränkungen und Bronchodysplasien erhöht. Diese Annahme wird auch durch mehrere Studien gestützt, die eine Assoziation zwischen einer Funisitis und dem erhöhten Risiko von neurologischen und bronchialen Schäden belegen (96-98).

Eine erhöhte Expression von IL-10 hingegen wird mit einem positiven Effekt auf das Neugeborene in Verbindung gebracht. Sadowsky et al. konnten in Tierversuchen mit Rhesus-Affen zeigen, dass mit Hilfe von exogen zugeführtem IL-10 über die Hemmung von IL-1 β Uteruskontraktionen beherrscht und Geburten bei Affen verhindert werden können. Eine jüngst veröffentlichte Studie von Kasat et al. berichtet, dass die exogene Zugabe von IL-10 im Vergleich zu anderen antiinflammatorischen Arzneimitteln wie Dexamethason und Betamethason die Ausschüttung an proinflammatorischen Zytokinen von LPS-stimulierten Makrophagen aus dem Lungenparenchym am effektivsten inhibieren konnte und sich dies protektiv auf das entzündete Lungenparenchym auswirkte. Knoblauch et al., Frøen et al., aber auch Lygn et al. sowie Molina-Holdago et al. stellen eine Assoziation zwischen IL-10 und der Neuroprotektion des menschlichen Gehirns her. Dabei scheint die Inhibierung von TNF und IL-6 und anderen proinflammatorischen Zytokinen genauso relevant zu sein wie die Hemmung der oxidativen apoptotischen Zellprozesse der Oligodendrozyten und Mikrogliazellen sowie die Regulierung der zerebralen Hämodynamik über die Inhibierung von TNF und IL-6 (38, 99-103). Cusumano et al. belegen ebenso einen Benefit der Gabe von IL-10 bei neugeborenen Mäusen (104). In unserer Studie hemmten Indometacin und Betamethason vermehrt die proinflammatorischen Zytokine und förderten das antiinflammatorische Zytokin IL-10, was sich im Falle von Betamethason über die Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ b und aktiviertem Protein-1, im Falle von Indometacin über die Hemmung der Cyclooxygenase und anderen Enzymen wie Phospholipase A2 erklären lässt (49, 81). Im Zusammenhang mit der beschriebenen neonatalen Wirkung von Zytokinen ist diese Tatsache von großer Bedeutung.

Diskussion

Die Ergebnisse weisen aufgrund der antiinflammatorischen Wirkung auf einen günstigen immunmodulatorischen Effekt der Medikamente bei einem grampositiven Infektionsgeschehen hin. Dies ist besonders bedeutsam, da dem fetalen Infektionssyndrom besonders im Falle einer GBS-Infektion eine eskalierende Immunantwort zu Grunde liegt und sich genau hier die Medikamente positiv auswirken könnten.

Betamethason ist heute ein in der Perinatalmedizin regulär eingesetztes Medikament zur vorzeitigen Induktion der Lungenreifung des Feten. Zentral liegt bei dessen Einsatz der Fokus auf der Verhinderung eines RDS des Neugeborenen, was zu langfristigen Lungenparenchymschäden führen kann und eine je nach Schwere neonatal lebensgefährdende Situation darstellt. Zunehmend berichten Studien und Übersichtsarbeiten jedoch auch von mittelfristig positiven Wirkungen von Kortikosteroiden auf das fetale Gehirn (105, 106). Kortikosteroide scheinen sich dabei über die Verbesserung der respiratorischen Lage und folglich der Hämodynamik positiv auf die zerebrale Entwicklung auszuwirken (105). Unsere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Ursachen nicht nur in den somatisch-regulatorischen Prozessen zu finden sind, sondern auch ein direkter immunologischer Effekt der Kortikosteroiden dazu beitragen könnte.

Indometacin wird in seinem Benefit und seinen Nebenwirkungsprofil noch immer heftig erörtert. Haas et al. bekräftigten 2012 in einem Cochrane Review, dass Indometacin in der gesamten Übersicht der Datenlage als das Tokolytikum der ersten Wahl anzusehen sei und als Einziges nachweislich Wehen länger als 48 Stunden zu hemmen vermag (47). Nachdem Studien über ein erhöhtes Risiko von nekrotisierender Enterokolitis, intraventrikulären Blutungen und vorzeitigem Verschluss des Ductus Botalli nach Indometacingabe berichtet hatten (107-109), zeigten sich einige Experten über das mögliche Nebenwirkungsprofil des Medikaments besorgt. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Studien unter sehr kleinen Fallzahlen litten und es sich bei den betroffenen Kindern um frühe Frühgeborene handelte. Ferner wurden die Untersuchungen noch vor dem Einsatz der routinemäßigen Betamethasongabe zur Lungenreifung durchgeführt (110). Abbasi et al., die daraufhin eine retrospektive Kohortenstudie unter Ausschluss dieser Faktoren durchführten, konnten keinen Zusammenhang mehr zwischen Indometacin und den vermeintlichen Nebenwirkungen feststellen. Ihre Studie weist kein höheres Risiko für neonatale Folgeschäden nach (110). Auch Suarez et al. fanden in einer anderen retrospektiven Studie keinen Zusammenhang zwischen Indometacin

cin und dem Risiko einer intraventrikulären Blutung (51). Im Gegenteil: Studien von Miller et al. und Ment et al. weisen auf scheinbar neuroprotektive Eigenschaften von Indometacin hin (111, 112). Wie Miller et al. abschließend andeuten, könnte die antiinflammatorische Wirkung von Indometacin dafür als Grund gelten (111). Denn auch in unseren Studien bestätigte sich, dass Indometacin die proinflammatorischen Zytokine vermehrt hemmte und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 um bis zu 33 % in seiner Freisetzung steigern konnte.

Um die genauen Wirkungen von Betamethason sowie von Indometacin verstehen zu lernen und einen individuellen Benefit der Medikamente zum Wohle von Mutter und Kind besser abschätzen zu können, sind weitere Forschungen in diesem Bereich unabdingbar. Diese Studie war die erste Arbeit, welche die Medikamente unter Stimulation eines grampositiven Infektionsgeschehens untersuchte. GBS, aber auch die Besiedlungen mit Enterokokken sind perinatal zunehmend zu verzeichnen und können fatale neonatale Schäden zur Folge haben. Dagegen bieten beide Medikamente therapeutische Ansatzpunkte.

5.4 Limitationen der Studie

Abschließend soll auf die verschiedenen Limitationen dieser Studie hingewiesen werden. Das Studienprotokoll basierte auf unserer vorangehenden Arbeit mit LPS-stimulierten Zellen (9). Bereits in dieser Arbeit wurde zum einen das Problem der meist bakteriell kontaminierten Blutproben von Frühgeborenen festgestellt und zum anderen die Problematik der geringen abnehmbaren Blutprobenmenge von Frühgeborenen erkannt. Aus diesem Grund entschloss man sich zur Verwendung von Nabelschnurblut von gesunden, reifgeborenen Kindern. Tatad et al. beschreiben unterschiedliche Zytokinauswirkungen von Frühgeborenen und Reifgeborenen, die darauf hinweisen, dass die Ergebnisse nicht vollständig auf Frühgeborene übertragbar sind (68). Neue Studien mit humanisierten Mausmodellen befinden sich aktuell in unserer Forschungsgruppe in Arbeit, unter anderem mit dem Ziel, das Ausmaß der Übertragbarkeit zu untersuchen (113).

Des Weiteren war die Fallzahl mit bis zu zehn getesteten Nabelschnurblutproben in vierfacher Wiederholung niedrig und die einzelnen Proben wiesen sehr individuelle Zytokinfreisetzungen auf. Allgemeingültige Aussagen sind deshalb sehr schwer zu treffen. Dies ist die erste stimulatorische Untersuchung im grampositiven Keimspektrum mit den Erregern *Streptococ-*

cus agalactiae und *Enterococcus faecalis*. Weiterhin ist die Studie eine *in vitro* Untersuchung, die wie jedes *in vitro*-Modell, *in vivo*-Modellen in ihrer Aussagekraft unterlegen ist. Dennoch liefert sie erste wichtige Hinweise auf die immunmodulatorischen Prozesse und ist im Rahmen der Grundlagenforschung in diesem Themenbereich wichtig.

6. Zusammenfassung

Intrauterine Infektionen mit grampositiven Erregern stehen im Fokus der Perinatalmedizin. Seit Anfang der neunziger Jahre wird *Streptococcus agalactiae*, neben *Escherichia coli*, als einer der ursächlichen Keime bei schwerwiegenden Erkrankungen des Feten und Neugeborenen - von FIRS bis hin zur neonatalen Sepsis und Meningitis - beobachtet. Ebenso wird das grampositive Bakterium *Enterococcus faecalis* immer häufiger in vaginalen Abstrichen von Schwangeren isoliert. Auch dieser Keim wird mittlerweile vermehrt bei neonataler Sepsis, besonders unter Frühgeborenen gefunden. Die Frühgeburtlichkeit stellt enorme Anforderungen an neonatale Intensivstationen weltweit. Zur Verhinderung der Frühgeburt und Reduktion von Folgeschäden der Kinder werden aktuell Tokolytika und Kortikosteroide eingesetzt. Während Steroide, wie Betamethason eine vorzeitige Lungenreifeung induzieren, ist Indometacin das einzige Tokolytikum, das nachweislich Wehen über 48 Stunden adäquat zu hemmen vermag. Befürchtungen bezüglich erhöhter fetaler Komplikationsraten durch Indometacin aus früheren Studien bestätigten sich in neueren Studien nicht. In diesem Zusammenhang führten wir immunologische Stimulationsuntersuchungen von fetalen mononukleären Zellen unter grampositiver Induktion durch, um erstmalig den immunmodulatorischen Effekt von Indometacin und Betamethason unter Simulation eines grampositiven Infektionsgeschehens auf die fetale Zytokinfreisetzung untersuchen zu können. Dazu wurde von zehn reifgeborenen Kindern Nabelschnurblut entnommen, aufgearbeitet und mit den Versuchskomponenten *in vitro* behandelt. Anschließend wurden die Zytokinfreisetzungen von IL-1 β , INF- γ , MiP-1 β , IL-8, MCP-1, MiP-1 α , TNF, IL-12, IL-6 und IL-10 vermessen. Es zeigte sich insbesondere, dass vor allem die kombinierte Gabe von Betamethason und Indometacin hemmend auf die proinflammatorische Zytokinfreisetzung wirkten, während das antiinflammatorische Zytokin IL-10 von Indometacin um bis zu 33 % in seiner Expression angeregt werden konnte. Angesichts der eskalierenden Zytokinausschüttung im fetalen septischen Geschehen unter grampositiver Infektion, ist dies eine Wirkung, die bei antepartaler Gabe von Betamethason und Indometacin

Zusammenfassung

cin an die werdende Mutter das neonatale Outcome auch im Hinblick auf somatische und neurologische Folgeschäden positiv beeinflussen könnte.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
BM	Betamethason
BMJ	British Medical Journal
bzw.	beziehungsweise
CBMC	Cord Blood Mononuclear Cells
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRP	C-reaktives Protein
CspA	Kälteschockprotein A
CXCL8	Interleukin 8
EFSZP	<i>Enterococcus faecalis</i> -stimulierten Zellpopulation
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOI	Early Onset Infection
EOS	Early Onset Sepsis
FIRS	fetales Infektionssyndrom
GBS	Streptokokken der Gruppe B
i.m.	intramuskulär
IGFBP-1	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor und Bindungsprotein-1
IL	Interleukin
IM	Indometacin
INF	Interferon
LOI	Late Onset Infection
LOS	Late Onset Sepsis
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MIAC	Mikrobielle Infektion der Amnionhöhle
NaCL-Lösung	Natriumchlorid-Lösung
NADPH-Oxidase	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat Oxidase
NEC	nekrotisierender Enterokolitis
Nf- κ b	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO-Donoren	Stickstoffmonoxid-Donoren
PAMG-1	Plazenta-Alpha-Mikroglobulin-1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptoren
RDS	Respiratorisches Distress-Syndrom
RPE	Fluorchrom-R-Phycoerytin
Rpm	Rounds per Minute
SASZP	<i>Streptococcus agalactiae</i> -stimulierten Zellpopulation
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF- β	Transforming Growth Faktor-beta
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
USA	United States of America
v. a.	vor allem
Z	Zellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

1. Salinger E, Schreiber M: Allgemeines zu Fehl- und Frühgeburten. Erich Saling-Institut für Perinatale Medizin e.V.; 2003 [updated 26.03.2013; cited 2013 30.04.2014]. Available from: <http://www.saling-institut.de/german/04infoph/01allg.html>.
2. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R: Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84. Epub 2008/01/08. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60074-4. PubMed PMID: 18177778.
3. Schleußner E: The prevention, diagnosis and treatment of premature labor. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(13):227–36. doi: 10.3238/arztebl.2013.0227.
4. Garnier Y: Problemfeld Frühgeburtlichkeit und Inflammation- Besteht eine genetische Determinierung. *Geburtsh Frauenheilk*. 2006(66):939-46.
5. Seelbach-Goebel B: Antibiotic Therapy for Premature Rupture of Membranes and Preterm Labor and Effect on Fetal Outcome. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2013;73(12):1218-27. Epub 2014/04/29. doi: 10.1055/s-0033-1360195. PubMed PMID: 24771902.
6. Garnier Y: Antenatale Infektionen und periventrikuläre Leukomalazie. *Frauenarzt*. 2005(46):1-4.
7. WHO: Preterm Birth: WHO; 2013 [cited 2014 30.04.2014]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>.
8. Aqua: Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2011- Geburtshilfe 2011 [updated 31.05.2012; cited 2014 30.04.2014]. Available from: http://www.sqg.de/downloads/Bundesauswertungen/2011/bu_Gesamt_16N1-GEBH_2011.pdf.
9. Doblinger A: Immunmodulatorischer Effekt von Betamethason und Indometacin auf die Zytokinproduktion fetaler mononukleärer Zellen nach Stimulation mit LPS. Regensburg: Universität Regensburg; 2013.
10. Monset-Couchard M, de Bethmann O, Kastler B: Mid- and long-term outcome of 89 premature infants weighing less than 1,000 g at birth, all appropriate for gestational age. *Biology of the neonate*. 1996;70(6):328-38. Epub 1996/01/01. PubMed PMID: 9001694.
11. Hack M, Taylor HG, Klein N, Eiben R, Schatschneider C, Mercuri-Minich N: School-age outcomes in children with birth weights under 750 g. *The New England journal of medicine*. 1994;331(12):753-9. Epub 1994/09/22. doi: 10.1056/NEJM199409223311201. PubMed PMID: 7520533.
12. Stjernqvist K, Svenningsen NW: Extremely low-birth-weight infants less than 901 g: development and behaviour after 4 years of life. *Acta Paediatr*. 1995;84(5):500-6. Epub 1995/05/01. PubMed PMID: 7633143.

13. Bartels D, Gerber A: Gesundheitsökonomie und Pädiatrie: mit 50 Tabellen. Stuttgart: Schattauer; 2006. 248 p. p.
14. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW: Intrauterine infection and preterm delivery. *The New England journal of medicine*. 2000;342(20):1500-7. Epub 2000/05/18. doi: 10.1056/NEJM200005183422007. PubMed PMID: 10816189.
15. Agrawal V, Hirsch E: Intrauterine infection and preterm labor. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2012;17(1):12-9. Epub 2011/09/29. doi: 10.1016/j.siny.2011.09.001. PubMed PMID: 21944863; PubMed Central PMCID: PMC3242863.
16. Friese K, Plath C, Briese V: Frühgeburt und Frühgeborenes: eine interdisziplinäre Aufgabe. Heidelberg: Springer Verlag; 2000.
17. Holst D, Garnier Y: Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2008;141(1):3-9. Epub 2008/09/12. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.07.020. PubMed PMID: 18783866.
18. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, 3rd, Petraglia F: Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*. 2009;16(2):206-15. Epub 2009/02/12. doi: 10.1177/1933719108329095. PubMed PMID: 19208789.
19. Plano LR: The changing spectrum of neonatal infectious disease. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2010;30 Suppl:S16-20. Epub 2010/10/12. doi: 10.1038/jp.2010.92. PubMed PMID: 20877402.
20. Buchberger A: Infektionen an der Vulva, Vagina und Zervix. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2009.
21. Fisher K, Phillips C: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009;155(Pt 6):1749-57. Epub 2009/04/23. doi: 10.1099/mic.0.026385-0. PubMed PMID: 19383684.
22. Edwards MS, Nizet V: Group B Streptococcal Infections. 2010. In: *Infectious Diseases of Fetus and Newborn* [Internet]. Elsevier. 6rd ed.; [417-55].
23. Hof H, Dörries R: *Medizinische Mikrobiologie*. 3., komplett überarb. und erw. Aufl. ed. Stuttgart: George Thieme Verlag; 2004. 718 S. p.
24. Agatharied M: Prophylaxe der Neugeborenssepsis - frühe Form - durch Streptokokken der Gruppe B Nr. 024/020. AWMF online 2008.
25. Dobson SR, Baker CJ: Enterococcal sepsis in neonates: features by age at onset and occurrence of focal infection. *Pediatrics*. 1990;85(2):165-71. Epub 1990/02/01. PubMed PMID: 2104974.
26. Löscher C: Neonatale Enterokokken – Besiedelung in Abhängigkeit von perinatalen Risikofaktoren [Ph D]. Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau 2007.

27. Ardissonne AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al: Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PloS one*. 2014;9(3):e90784. Epub 2014/03/13. doi: 10.1371/journal.pone.0090784. PubMed PMID: 24614698; PubMed Central PMCID: PMC3948723.
28. 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(12 Pt 2):S194-202. Epub 2008/02/05. PubMed PMID: 18240548.
29. Fitzgerald K, O'Neill L, Gearing A, Callard R: *The Cytokine Factsbook*. 2. ed. ed. San Diego: Acad. Press; 2001. 515 p. p.
30. Thomson A: *The Cytokine Handbook*. 3. ed. ed. San Diego: Acad. Press; 1998. 1017 p. p.
31. Hagberg H, Mallard C, Jacobsson B: Role of cytokines in preterm labour and brain injury. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2005;112 Suppl 1:16-8. Epub 2005/02/18. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00578.x. PubMed PMID: 15715588.
32. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O, et al: The fetal inflammatory response syndrome. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2007;50(3):652-83. Epub 2007/09/01. doi: 10.1097/GRF.0b013e31811ebef6. PubMed PMID: 17762416.
33. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM: The fetal inflammatory response syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(1):194-202. Epub 1998/08/15. PubMed PMID: 9704787.
34. Kacerovsky M, Cobo T, Andrys C, Musilova I, Drahosova M, Hornychova H, et al: The fetal inflammatory response in subgroups of women with preterm prelabor rupture of the membranes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2013;26(8):795-801. Epub 2013/01/15. doi: 10.3109/14767058.2013.765404. PubMed PMID: 23311694.
35. Lee SE, Romero R, Jung H, Park CW, Park JS, Yoon BH: The intensity of the fetal inflammatory response in intraamniotic inflammation with and without microbial invasion of the amniotic cavity. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007;197(3):294 e1-6. Epub 2007/09/11. doi: 10.1016/j.ajog.2007.07.006. PubMed PMID: 17826426.
36. Cuenca AG, Wynn JL, Moldawer LL, Levy O. Role of innate immunity in neonatal infection: *American journal of perinatology*. 2013;30(2):105-12. Epub 2013/01/09. doi: 10.1055/s-0032-1333412. PubMed PMID: 23297181; PubMed Central PMCID: PMC3959733.
37. Dammann O, Leviton A: Inflammation, brain damage and visual dysfunction in preterm infants. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2006;11(5):363-8. Epub 2006/04/04. doi: 10.1016/j.siny.2006.02.003. PubMed PMID: 16581321.

38. Viscardi RM, Muhumuza CK, Rodriguez A, Fairchild KD, Sun CC, Gross GW, et al: Inflammatory markers in intrauterine and fetal blood and cerebrospinal fluid compartments are associated with adverse pulmonary and neurologic outcomes in preterm infants. *Pediatric research*. 2004;55(6):1009-17. Epub 2004/05/25. doi: 10.1203/01.pdr.0000127015.60185.8a. PubMed PMID: 15155869.
39. Elovitz MA, Mrinalini C, Sammel MD: Elucidating the early signal transduction pathways leading to fetal brain injury in preterm birth. *Pediatric research*. 2006;59(1):50-5. Epub 2005/12/06. doi: 10.1203/01.pdr.0000191141.21932.b6. PubMed PMID: 16327009.
40. Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W: Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet*. 2001;357(9261):989-94. Epub 2001/04/11. PubMed PMID: 11293641.
41. Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W: Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet*. 2001;357(9261):979-88. Epub 2001/04/11. PubMed PMID: 11293640.
42. Kenyon S, Pike K, Jones DR, Brocklehurst P, Marlow N, Salt A, et al: Childhood outcomes after prescription of antibiotics to pregnant women with spontaneous preterm labour: 7-year follow-up of the ORACLE II trial. *Lancet*. 2008;372(9646):1319-27. Epub 2008/09/23. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61203-9. PubMed PMID: 18804276.
43. Kenyon S, Pike K, Jones DR, Brocklehurst P, Marlow N, Salt A, et al: Childhood outcomes after prescription of antibiotics to pregnant women with preterm rupture of the membranes: 7-year follow-up of the ORACLE I trial. *Lancet*. 2008;372(9646):1310-8. Epub 2008/09/23. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61202-7. PubMed PMID: 18804274.
44. Ragosch V, Dudenhausen W, Grauel L, Schneider K, Vetter K, Weitzel H: Empfehlungen zum Vorgehen beim vorzeitigen Blasensprung. AWMF online: Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), 2006.
45. Yudin M, Van Schalkwyk J, Van Eyk N: Antibiotic therapy in preterm premature rupture of the membranes. National Guideline Clearinghouse: 2009
46. S C: Premature Prelabour Rupture of Membrans. RCOG 2010.
47. Haas DM, Caldwell DM, Kirkpatrick P, McIntosh JJ, Welton NJ: Tocolytic therapy for preterm delivery: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2012;345:e6226. Epub 2012/10/11. doi: 10.1136/bmj.e6226. PubMed PMID: 23048010.
48. Rath W: Tokolyse: Offene Fragen - ungelöste Probleme - Zukunftsperspektiven *Geburtsh Frauenheilk*. 2009(69):677-81. doi: 10.1055/s-0029-1185939.

49. Gravett MG, Adams KM, Sadowsky DW, Grosvenor AR, Witkin SS, Axthelm MK, et al: Immunomodulators plus antibiotics delay preterm delivery after experimental intraamniotic infection in a nonhuman primate model. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007;197(5):518 e1-8. Epub 2007/11/06. doi: 10.1016/j.ajog.2007.03.064. PubMed PMID: 17980193; PubMed Central PMCID: PMC2128777.
50. Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391(6662):82-6. Epub 1998/01/09. doi: 10.1038/34184. PubMed PMID: 9422509.
51. Suarez RD, Grobman WA, Parilla BV: Indomethacin tocolysis and intraventricular hemorrhage. *Obstetrics and gynecology*. 2001;97(6):921-5. Epub 2001/06/01. PubMed PMID: 11384697.
52. Klauser CK, Briery CM, Martin RW, Langston L, Magann EF, Morrison JC: A comparison of three tocolytics for preterm labor: a randomized clinical trial. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2014;27(8):801-6. Epub 2013/10/05. doi: 10.3109/14767058.2013.847416. PubMed PMID: 24090282.
53. Braun J: Einfluss des Tragzeitalters bzw. der Schwangerschaftsprolongation sowie schwangerschaftsspezifischer Parameter auf das fetal outcome bei Frühgeburtsbestrebungen unter 28 SSW unter besonderer Berücksichtigung einer Tokolyse mit Indomethacin. Regensburg: Universität Regensburg; 2011.
54. Brownfoot FC, Crowther CA, Middleton P: Different corticosteroids and regimens for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2008(4):CD006764. Epub 2008/10/10. doi: 10.1002/14651858.CD006764.pub2. PubMed PMID: 18843729.
55. Dudenhausen W, Berger R, Gortner L, Hackelöer B, Schneider K, Vetter K: Antenatale Kortikosteroide zur Lungenreifung- ACS. AWMF online: 2009.
56. Crowther CA, McKinlay CJ, Middleton P, Harding JE: Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for improving neonatal health outcomes. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(6):CD003935. Epub 2011/06/17. doi: 10.1002/14651858.CD003935.pub3. PubMed PMID: 21678343.
57. Asztalos EV, Murphy KE, Willan AR, Matthews SG, Ohlsson A, Saigal S, et al: Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth study: outcomes in children at 5 years of age (MACS-5). *JAMA pediatrics*. 2013;167(12):1102-10. Epub 2013/10/16. doi: 10.1001/jamapediatrics.2013.2764. PubMed PMID: 24126948.
58. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG: Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;188(1):252-63. Epub 2003/01/28. PubMed PMID: 12548226.

59. Brooks BM, Hart CA, Coleman JW. Differential effects of beta-lactams on human IFN-gamma activity: The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2005;56(6):1122-5. Epub 2005/10/22. doi: 10.1093/jac/dki373. PubMed PMID: 16239287.
60. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A: Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. Clin Sci (Lond). 2014;126(9):593-612. Epub 2014/01/24. doi: 10.1042/CS20130497. PubMed PMID: 24450743.
61. Berner R, Welter P, Brandis M: Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to Streptococcus agalactiae. Pediatric research. 2002;51(3):304-9. Epub 2002/02/28. doi: 10.1203/00006450-200203000-00007. PubMed PMID: 11861934.
62. Chirico G: Development of the Immune System in Neonates. J Arab Neonatal Forum. 2005;2:5-11.
63. Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D: Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology. 2011;118(2):145-53. Epub 2010/11/09. doi: 10.1111/j.1471-0528.2010.02773.x. PubMed PMID: 21054766.
64. Wolfs TG, Jellema RK, Turrisi G, Becucci E, Buonocore G, Kramer BW: Inflammation-induced immune suppression of the fetus: a potential link between chorioamnionitis and postnatal early onset sepsis. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet. 2012;25 Suppl 1:8-11. Epub 2012/02/22. doi: 10.3109/14767058.2012.664447. PubMed PMID: 22348330.
65. Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, Kramer BW: Thrown off balance: the effect of antenatal inflammation on the developing lung and immune system. American journal of obstetrics and gynecology. 2013;208(6):429-37. Epub 2013/01/15. doi: 10.1016/j.ajog.2013.01.008. PubMed PMID: 23313727.
66. Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al: Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. Current microbiology. 2005;51(4):270-4. Epub 2005/09/28. doi: 10.1007/s00284-005-0020-3. PubMed PMID: 16187156.
67. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP: Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology. 2002;109(5):527-33. Epub 2002/06/18. PubMed PMID: 12066942.
68. Tatad AM, Nesin M, Peoples J, Cheung S, Lin H, Sison C, et al: Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes. Neonatology. 2008;94(1):8-15. Epub 2007/12/22. doi: 10.1159/000112541. PubMed PMID: 18097152.

69. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, et al: Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biology of the neonate*. 2003;84(4):297-303. Epub 2003/11/01. doi: 73638. PubMed PMID: 14593240.
70. Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, et al: CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age. *Cellular immunology*. 1998;183(2):149-56. Epub 1998/06/02. doi: 10.1006/cimm.1998.1244. PubMed PMID: 9606999.
71. Sirota L, Punskey I, Bessler H: Effect of indomethacin on IL-1beta, IL-6 and TNFalpha production by mononuclear cells of preterm newborns and adults. *Acta Paediatr*. 2000;89(3):331-5. Epub 2000/04/20. PubMed PMID: 10772282.
72. Kunkel SL, Chensue SW, Phan SH: Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J Immunol*. 1986;136(1):186-92. Epub 1986/01/01. PubMed PMID: 3079606.
73. Bessler H, Mendel C, Straussberg R, Gurary N, Aloni D, Sirota L: Effects of dexamethasone on IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha production by mononuclear cells of newborns and adults. *Biology of the neonate*. 1999;75(4):225-33. Epub 1999/02/23. doi: 14099. PubMed PMID: 10026370.
74. Yoo HS, Chang YS, Kim JK, Ahn SY, Kim ES, Sung DK, et al: Antenatal betamethasone attenuates intrauterine infection-aggravated hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Pediatric research*. 2013;73(6):726-33. Epub 2013/03/16. doi: 10.1038/pr.2013.51. PubMed PMID: 23493167.
75. Janabi N, Hau I, Tardieu M: Negative feedback between prostaglandin and alpha- and beta-chemokine synthesis in human microglial cells and astrocytes. *J Immunol*. 1999;162(3):1701-6. Epub 1999/02/11. PubMed PMID: 9973432.
76. Irakam A, Miskolci V, Vancurova I, Davidson D: Dose-related inhibition of proinflammatory cytokine release from neutrophils of the newborn by dexamethasone, betamethasone, and hydrocortisone. *Biology of the neonate*. 2002;82(2):89-95. Epub 2002/08/10. doi: 63094. PubMed PMID: 12169830.
77. Moller AS, Ovstebo R, Westvik AB, Joo GB, Haug KB, Kierulf P: Effects of bacterial cell wall components (PAMPs) on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and the chemokine receptor CCR2 by purified human blood monocytes. *Journal of endotoxin research*. 2003;9(6):349-60. Epub 2004/01/22. doi: 10.1179/096805103225002791. PubMed PMID: 14733721.

78. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, et al: Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(2):134-41. Epub 2006/04/15. doi: 10.1164/rccm.200512-1930OC. PubMed PMID: 16614347; PubMed Central PMCID: PMC2662905.
79. Cook DN: The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology*. 1996;59(1):61-6. Epub 1996/01/01. PubMed PMID: 8558069.
80. 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(4):262-6. Epub 2001/10/20. doi: 47154. PubMed PMID: 11641548.
81. 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(4):372-9. Epub 1995/05/01. doi: 10.1006/cyto.1995.0047. PubMed PMID: 8589268.
82. Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N: Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cellular immunology*. 2001;209(1):19-28. Epub 2001/06/21. doi: 10.1006/cimm.2001.1785. PubMed PMID: 11414733.
83. 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(3):150-5. Epub 2003/05/20. PubMed PMID: 12753465.
84. Feitoza CQ, Semedo P, Goncalves GM, Cenedeze MA, Pinheiro HS, Dos Santos OF, et al: Modulation of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2010;59(3):167-75. Epub 2009/08/28. doi: 10.1007/s00011-009-0083-x. PubMed PMID: 19711010.
85. Par G, Bartok B, Szekeres-Bartho J. Cyclooxygenase is involved in the effects of progesterone-induced blocking factor on the production of interleukin 12. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2000;183(1):126-30. Epub 2000/08/02. doi: 10.1067/mob.2000.105742. PubMed PMID: 10920319.
86. Kramer BW, Ikegami M, Moss TJ, Nitsos I, Newnham JP, Jobe AH: Antenatal betamethasone changes cord blood monocyte responses to endotoxin in preterm lambs. *Pediatric research*. 2004;55(5):764-8. Epub 2004/02/20. doi: 10.1203/01.PDR.0000120678.72485.19. PubMed PMID: 14973182.
87. 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(8):1137-46. Epub 1991/01/01. PubMed PMID: 1814850.

88. Dandona P, Aljada A, Garg R, Mohanty P: Increase in plasma interleukin-10 following hydrocortisone injection. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(3):1141-4. Epub 1999/03/20. doi: 10.1210/jcem.84.3.5656. PubMed PMID: 10084608.
89. Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD: Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *International immunology*. 1995;7(4):517-23. Epub 1995/04/01. PubMed PMID: 7547677.
90. Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N: Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol*. 2002;168(5):2255-63. Epub 2002/02/23. PubMed PMID: 11859113.
91. Henneke P, Berner R: SIRS and group-B streptococcal sepsis in newborns: pathogenesis and perspectives in adjunctive therapy. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2006;11(5):333-42. Epub 2006/05/13. doi: 10.1016/j.siny.2006.03.003. PubMed PMID: 16690364.
92. Morikawa K, Watabe H, Araake M, Morikawa S: Modulatory effect of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(6):1366-70. Epub 1996/06/01. PubMed PMID: 8726002; PubMed Central PMCID: PMC163332.
93. Brooks BM, Thomas AL, Coleman JW: Benzylpenicillin differentially conjugates to IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta, IL-4 and IL-13 but selectively reduces IFN-gamma activity. *Clinical and experimental immunology*. 2003;131(2):268-74. Epub 2003/02/04. PubMed PMID: 12562387; PubMed Central PMCID: PMC1808618.
94. Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994;171(6):1660-7. Epub 1994/12/01. PubMed PMID: 7802084.
95. Yoon BH, Park CW, Chaiworapongsa T: Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2003;110 Suppl 20:124-7. Epub 2003/05/24. PubMed PMID: 12763129.
96. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, et al: Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1997;177(1):19-26. Epub 1997/07/01. PubMed PMID: 9240577.
97. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al: Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1997;177(4):825-30. Epub 1997/11/25. PubMed PMID: 9369827.

98. Selmaj KW, Raine CS: Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Annals of neurology*. 1988;23(4):339-46. Epub 1988/04/01. doi: 10.1002/ana.410230405. PubMed PMID: 3132891.
99. Froen 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(1-2):87-94. Epub 2002/05/29. PubMed PMID: 12031856.
100. Saliba E, Henrot A: Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biology of the neonate*. 2001;79(3-4):224-7. Epub 2001/03/29. doi: 47096. PubMed PMID: 11275656.
101. Knoblach SM, Faden AI: Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Experimental neurology*. 1998;153(1):143-51. Epub 1998/09/23. doi: 10.1006/exnr.1998.6877. PubMed PMID: 9743576.
102. Lyng K, Munkeby BH, Saugstad OD, Stray-Pedersen B, Froen JF: Effect of interleukin-10 on newborn piglet brain following hypoxia-ischemia and endotoxin-induced inflammation. *Biology of the neonate*. 2005;87(3):207-16. Epub 2005/01/08. doi: 10.1159/000083131. PubMed PMID: 15637455.
103. 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. *The European journal of neuroscience*. 2001;13(3):493-502. Epub 2001/02/13. PubMed PMID: 11168556.
104. Cusumano V, Genovese F, Mancuso G, Carbone M, Fera MT, Teti G: Interleukin-10 protects neonatal mice from lethal group B streptococcal infection. *Infection and immunity*. 1996;64(7):2850-2. Epub 1996/07/01. PubMed PMID: 8698523; PubMed Central PMCID: PMC174154.
105. Reimer T, Ulfig N, Friese K Immunmodulation am unreifen fetalen Gehirn. *Der Gynäkologe* 2001;Volume 34(Issue 6):pp. 531-8. doi: 10.1007/s001290050749.
106. Foix-L'Helias L, Marret S, Ancel PY, Marchand L, Arnaud C, Fresson J, et al: 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(2):275-82. Epub 2007/12/18. doi: 10.1111/j.1471-0528.2007.01566.x. PubMed PMID: 18081606.
107. Major CA, Lewis DF, Harding JA, Porto MA, Garite TJ: Tocolysis with indomethacin increases the incidence of necrotizing enterocolitis in the low-birth-weight neonate. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994;170(1 Pt 1):102-6. Epub 1994/01/01. PubMed PMID: 8296809.
108. Norton ME, Merrill J, Cooper BA, Kuller JA, Clyman RI: Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor. *The New England journal of medicine*. 1993;329(22):1602-7. Epub 1993/11/25. doi: 10.1056/NEJM199311253292202. PubMed PMID: 8232428.

Literaturverzeichnis

109. Hammerman C, Glaser J, Kaplan M, Schimmel MS, Ferber B, Eidelman AI: Indomethacin tocolysis increases postnatal patent ductus arteriosus severity. *Pediatrics*. 1998;102(5):E56. Epub 1998/10/31. PubMed PMID: 9794986.
110. 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(3):782-5. Epub 2003/10/04. PubMed PMID: 14526313.
111. Miller SP, Mayer EE, Clyman RI, Glidden DV, Hamrick SE, 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 at birth. *Pediatrics*. 2006;117(5):1626-31. Epub 2006/05/03. doi: 10.1542/peds.2005-1767. PubMed PMID: 16651316.
112. Ment LR, Oh W, Ehrenkranz RA, Philip AG, Vohr B, Allan W, et al: Low-dose indomethacin and prevention of intraventricular hemorrhage: a multicenter randomized trial. *Pediatrics*. 1994;93(4):543-50. Epub 1994/04/01. PubMed PMID: 8134206.
113. Ernst W, Zimara N, Hanses F, Mannel DN, Seelbach-Gobel B, Wege AK: Humanized mice, a new model to study the influence of drug treatment on neonatal sepsis. *Infection and immunity*. 2013;81(5):1520-31. Epub 2013/02/27. doi: 10.1128/IAI.01235-12. PubMed PMID: 23439310; PubMed Central PMCID: PMC3647987.

Danksagung

Danksagung

“Im Grunde sind es immer die Verbindungen mit Menschen, die dem Leben seinen Wert geben”

– Wilhelm von Humboldt

Mein tiefer Dank gilt den Menschen, die zum Wert und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Doktormutter Fr. Prof. Seelbach-Göbel für die Vergabe meines Themas, die stetige Unterstützung und Geduld bedanken.

Bei Fr. Dr. Reuschel, meiner Doktorarbeitsbetreuerin, bedanke ich mich für den fortwährenden Beistand und der helfenden Hand in der Not. Sie standen stets hinter mir, das werde ich Ihnen nie vergessen.

Ich möchte mich bei Herr PD Dr. Ludwig Deml für die Bereitstellung von labortechnischen Räumen und Geräten und die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Außerdem möchte ich Wolf Lesener, Wolfgang Koessler, und Andju Sara Labuhn meinen Dank für die statistische Beratung ausdrücken.

Bei Maren und Martina bedanke ich mich für die Durchführung der Zytokinbestimmung mittels der Luminex®-Technologie und ihre besondere Anteilnahme.

Auch Fr. Ellen Wiesler, ihrer steten Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit gilt mein Dank.

Zu guter Letzt, doch stets in meinem Herzen, bedanke ich mich bei meiner Mutter, meinem Vater, meinen Geschwistern und meiner gesamten Herzfamilie. Ohne eure Liebe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.
